



T.C.
VAN YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



**BAZI LİKEN SEKONDER METABOLİTLERİNİN
LİPOPOLİSAKKARİT İLE İNDÜKLENMİŞ RAW264.7
MAKROFAJ HÜCRELERİNDEKİ ANTİENFLAMATUVAR
ETKİNLİKLERİNİN İNCELENMESİ**

Mesud KAPLAN
TEMEL ECZACILIK BİLİMLERİ ANABİLİM DALI
(ECZACILIK PROGRAMI)
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Dr. Öğr. Üyesi Mehmet BERKÖZ

VAN-2022

T.C.
VAN YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**BAZI LİKEN SEKONDER METABOLİTLERİNİN
LİPOPOLİSAKKARİT İLE İNDÜKLENMİŞ RAW264.7
MAKROFAJ HÜCRELERİNDEKİ ANTİENFLAMATUVAR
ETKİNLİKLERİNİN İNCELENMESİ**

Mesud KAPLAN
TEMEL ECZACILIK BİLİMLERİ ANABİLİM DALI
(ECZACILIK PROGRAMI)
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Dr. Öğr. Üyesi Mehmet BERKÖZ

VAN-2022

Bu araştırma Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından TYL-2022-9835 numaralı proje olarak desteklenmiştir.

ETİK BEYAN

T.C.
VAN YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE

Yüksek Lisans tezi olarak hazırlayıp sunduğum “*Bazı Liken Sekonder Metabolitlerinin Lipopolisakkarit ile İndüklenmiş RAW264.7 Makrofaj Hücrelerindeki Antiinflamatuvar Etkinliklerinin İncelenmesi*” başlıklı tezim; bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin fikir/hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan deneysel çalışma/araştırma tarafımdan yapılmış olup, tüm cümleler, yorumlar bana aittir. Bu tezdeki bütün bilgiler akademik kurallara ve etik ilkelere uygun olarak hazırlanıp, bu kural ve ilkeler gereği, çalışmada bana ait olmayan tüm veri, düşünce ve sonuçlara atıf yapılmış ve kaynak gösterilmiştir.

Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı: Mesud KAPLAN

Tarih: 20/05/2022

İmza:

TEŞEKKÜR

Tez çalışmamın planlanması ve yürütülmesi süresince yardımlarını esirgemeyen tez danışmanım Sayın Dr. Öğr. Üyesi Mehmet BERKÖZ'e teşekkür ederim. Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dekanı Sayın Prof. Dr. Yavuz YARDIM'a, Eczacılık Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı Sayın Doç. Dr. Abdulahad DOĞAN'a, Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi Tıp Fakültesi öğretim üyesi Sayın Dr. Öğr. Üyesi Oruç YUNUSOĞLU'na, Mersin Üniversitesi Eczacılık Fakültesi öğretim üyesi Sayın Prof. Dr. Serap YALIN'a, Mersin Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi öğretim üyeleri Sayın Prof. Dr. Ferbal Özkan-YILMAZ'a ve Sayın Prof. Dr. Arzu Özlüer HUNT'a, tez çalışmamın proje olarak desteklenmesini sağlayan Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne, yüksek lisans tez çalışmam süresince yardımlarını ve desteklerini esirgemeyen yüksek lisans arkadaşlarım Seda ÜNAL'a, Oğuzhan ÇİFTÇİ'ye, Hava GEZİCİ'ye, Zeynep DİNLER TARTIK'a, Davut VOLKAN'a ve Ayhan YİĞİT'e teşekkürü bir borç bilirim.

Son olarak bugünlere gelmemde emeklerini asla ödeyemeyeceğim, bana her zaman güvenen ve destekleyen, en zor zamanlarımda dualarıyla ve varlıklarıyla yaşamımı kolaylaştıran başta babam Feyzullah KAPLAN ve annem Emine KAPLAN olmak üzere abilerim Mücahid KAPLAN'a ve Dr. Bilal KAPLAN'a, kardeşim Dr. Mehmet Emin KAPLAN'a ve ailemin diğer tüm fertlerine teşekkürlerimi sunarım.

Mesud KAPLAN

ÖZET

KAPLAN M, Bazı Liken Sekonder Metabolitlerinin Lipopolisakkarit ile İndüklenmiş RAW264.7 Makrofaj Hücrelerindeki Antienflamatuvar Etkinliklerinin İncelenmesi, Temel Eczacılık Anabilim Dalı, Biyokimya Bilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, Van, 2022. Enflamasyon, romatoid artrit, kronik enflamatuvar bağırsak hastalıkları, nörodejeneratif bozukluklar, septik şok sendromu, kalp krizleri, Alzheimer hastalığı ve kanser gibi birçok hastalığın etiolojisinde yer almaktadır. Enflamasyona bağlı olarak gelişen hastalıkların tedavisi için yeni ilaçların keşfine yönelik çalışmalar, antienflamatuvar potansiyele sahip etkin maddelerin tespiti üzerine yoğunlaşmıştır. Oluşabilecek yan etkinin de en aza indirgenmesini sağlamak adına, bu çalışmalarda yoğun olarak doğal kaynaklı etkin maddeler ele alınmaktadır. Likenler, mikobiyont fungal ortak ile fotobiyont bir ya da daha fazla sayıda alg ya da siyanobakterinin simbiyotik ortaklığı ile oluşan organizmalar olarak tanımlanmaktadır. Liken kaynaklı sekonder metabolitlerin antibakteriyel, antifungal, antioksidan, antiviral, antiinflamatuvar ve antikanser gibi biyolojik etkinliklerini ortaya çıkarmakta ve bu konuyla ilgilenen araştırmacıların dikkatini çekmektedir. Yaptığımız çalışmada, ülkemizde yaygın olarak bulunan liken türlerindeki bazı sekonder metabolitlerin (atranorin, diffraktaik asit, evernik asit ve vulpinik asit), lipopolisakkarit ile indüklenen makrofaj hücrelerindeki antienflamatuvar aktivitesini araştırdık. Yaptığımız çalışmada lipopolisakkarit (LPS) (1 µg/mL) indüksiyonu ile RAW264.7 makrofaj hücrelerinde enflamasyon modeli oluşturulmuş ve farklı konsantrasyonlardaki (200 µM, 100 µM, 50 µM, 25 µM ve 12,5 µM) çeşitli liken sekonder metabolitlerinin (atranorin, diffraktaik asit, evernik asit ve vulpinik asit) antienflamatuvar etkinliği araştırılmıştır. Bu amaçla madde uygulanan ve uygulanmayan hücrelerdeki nitrik oksit, prostaglandin E₂ (PGE₂), tümör nekroz faktör-alfa (TNF-α), interlökin-1 beta (IL-1β), IL-6 ve IL-10 düzeyleri ELISA kit kullanılarak ölçüldü. Yapılan çalışma beş tekrar olarak dizayn edilmiştir. Analizler SPSS for Windows v16.0 paket programında yapılmıştır. Tüm parametreler için gruplar arasındaki istatistiksel farklılıkların test edilmesinde ANOVA ve alt grup karşılaştırmalarında Tukey çoklu karşılaştırma testleri kullanılmıştır. Tanıtıcı istatistik olarak ortalama±standart sapma değerleri verilmiştir. Elde edilecek sonuçlarda $p < 0,05$ ise fark veya ilişki istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir. Elde ettiğimiz bulgular, atranorin, diffraktaik asit, evernik asit ve vulpinik asit sub-toksik konsantrasyonlarda bile LPS indüksiyonuyla aktive edilen makrofaj hücrelerdeki enflamatuvar yanıtı baskılayabildiğini ve antienflamatuvar etkinlik gösterebileceğini işaret etmektedir. Bu sonuçlar doğrultusunda liken sekonder metabolitlerinin LPS kaynaklı enflamatuvar hastalıkların tedavisinde önemli bir değere sahip olabileceğini söylemek mümkün olabilmektedir. Bu nedenle, zengin bir liken florasına sahip olan ülkemizde liken sekonder metabolitlerinin LPS'nin neden olduğu enflamasyon hastalıklarının tedavilerine yönelik yeni ilaçların geliştirilmesinde daha ileri çalışmalara yön vereceğini ve özellikle antienflamasyon etkisi yüksek olan türlerin biyolojik kökenli ilaç hammaddesi olarak endüstriyel üretimlerinin gerçekleştirilmesi halinde ülke ekonomisine katkı sağlayabileceğini söylemek mümkündür.

Anahtar Kelimeler: Liken, Sekonder metabolit, Lipopolisakkarit, RAW264.7 hücre hattı, Makrofaj, Enflamasyon

ABSTRACT

KAPLAN M, Investigation of Anti-Inflammatory Activities of Some Lichen Secondary Metabolites in Lipopolysaccharide-induced RAW264.7 Macrophage Cells, Van Y.Y.U. Institute of Health Sciences, Department of Basic Pharmaceutical Sciences, Biochemistry Science, Master Thesis, Van, 2022. Inflammation is involved in the etiology of many diseases such as rheumatoid arthritis, chronic inflammatory bowel diseases, neurodegenerative disorders, septic shock syndrome, heart attacks, Alzheimer's disease and cancer. Studies for the discovery of new drugs for the treatment of diseases caused by inflammation have focused on the detection of active substances with anti-inflammatory potential. In order to minimize the possible side effects, these studies focus heavily on active substances of natural origin. Lichens are defined as organisms formed by the symbiotic partnership of mycobiont fungal partner and photobiont one or more algae or cyanobacteria. It reveals the biological activities of lichen-derived secondary metabolites such as antibacterial, antifungal, antioxidant, antiviral, anti-inflammatory and anticancer, and attracts the attention of researchers who will be interested in this subject. In our study, we investigated the anti-inflammatory activity of some secondary metabolites (atranorine, diffractaic acid, evernic acid and vulpinic acid) in lipopolysaccharide-induced macrophage cells in lichen species common in our country. In our study, an inflammation model was created in RAW264.7 macrophage cells with the induction of lipopolysaccharide (LPS) (1 $\mu\text{g/mL}$), and various lichen secondary metabolites (atranorine, diffractaic acid, evernic acid and vulpinic acid) anti-inflammatory activity was investigated. For this purpose, nitric oxide, prostaglandin E_2 (PGE_2), tumor necrosis factor-alpha ($\text{TNF-}\alpha$), interleukin-1 beta ($\text{IL-1}\beta$), IL-6 and IL-10 levels were measured using ELISA kit in the cells treated and untreated. The study was designed as five repetitions. Analyzes were made in SPSS for Windows v16.0 package program. ANOVA was used to test for statistical differences between groups for all parameters, and Tukey's multiple comparison tests were used for subgroup comparisons. Mean $\pm$ standard deviation values are given as descriptive statistics. If $p<0.05$ in the results to be obtained, the difference or relationship was considered statistically significant. Our findings indicate that even at sub-toxic concentrations of atranorine, diffractaic acid, evernic acid and vulpinic acid, it can suppress the inflammatory response in macrophage cells activated by LPS induction and show anti-inflammatory activity. In line with these results, it is possible to say that lichen secondary metabolites may have an important value in the treatment of LPS-induced inflammatory diseases. For this reason, we believe that in our country, which has a rich lichen flora, lichen secondary metabolites will guide further studies in the development of new drugs for the treatment of inflammatory diseases caused by LPS, and it is possible to say that especially species with high anti-inflammatory effects can contribute to the country's economy if industrial production is carried out as a biological drug raw material.

Key Words: Lichen, Secondary metabolite, Lipopolysaccharide, RAW264.7 cell line, Macrophage, Inflammation

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY	ii
ETİK BEYAN	iii
TEŞEKKÜR	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR	x
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	xii
TABLolar LİSTESİ	xiv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Makrofajlar	4
2.1.1. Makrofaj polarizasyonu	6
2.2. Enflamasyon ve Makrofajların Rolü	10
2.2.1. Enflamasyon	10
2.2.2. Enflamasyona makrofajların yanıtı	11
2.2.3. Enflamasyon Biyobelirteçleri	12
2.3. Likenler	17
2.3.1. Likenler tarafından üretilen metabolitler	19
2.3.2. Liken sekonder metabolitlerinin genel etkileri	20
2.3.3. Çalışmamızda kullanılan liken sekonder metabolitleri	24
2.4. Çalışmanın Amacı	26
3. GEREÇ VE YÖNTEM	28
3.1. Gereç	28
3.1.1. Hücre hattı	28
3.1.2. Analizlerde kullanılan kimyasallar	28
3.1.3. Kullanılan cihazlar	29
3.2. Yöntem	29
3.2.1. Hücre kültürü ortamı	29
3.2.2. Dondurulmuş hücrelerin çözündürülmesi	30

3.2.3. Hücrelerin ekilmesi	30
3.2.4. Alt kültürleme (Pasajlama)	31
3.2.5. RAW264.7 makrofaj hücrelerinin sayılması ve canlılık testi	32
3.2.6. RAW264.7 makrofaj hücrelerinin dondurulması ve saklanması	33
3.2.7. Stok ve çalışma çözeltilerinin hazırlanması	34
3.2.8. Liken sekonder metabolitlerinin hücre canlılığı üzerine etkileri	35
3.2.9. Enzim bağlı immünosorbent analizi (ELISA) çalışmaları	36
3.3. İstatistik Analiz	37
4. BULGULAR	38
4.1. Atranorin Uygulamasının Hücre Canlılığına Etkisi	38
4.2. Diffraktaik Asit Uygulamasının Hücre Canlılığına Etkisi	39
4.3. Evernik Asit Uygulamasının Hücre Canlılığına Etkisi	40
4.4. Vulpinik Asit Uygulamasının Hücre Canlılığına Etkisi	41
4.5. Atranorin Uygulamasının Nitrik Oksit Düzeyine Etkisi	42
4.6. Diffraktaik Asit Uygulamasının Nitrik Oksit Düzeyine Etkisi	43
4.7. Evernik Asit Uygulamasının Nitrik Oksit Düzeyine Etkisi	44
4.8. Vulpinik Asit Uygulamasının Nitrik Oksit Düzeyine Etkisi	45
4.9. Atranorin Uygulamasının PGE ₂ Düzeyine Etkisi	46
4.10. Diffraktaik Asit Uygulamasının PGE ₂ Düzeyine Etkisi	47
4.11. Evernik Asit Uygulamasının PGE ₂ Düzeyine Etkisi	48
4.12. Vulpinik Asit Uygulamasının PGE ₂ Düzeyine Etkisi	49
4.13. Atranorin Uygulamasının TNF- α Düzeyine Etkisi	50
4.14. Diffraktaik Asit Uygulamasının TNF- α Düzeyine Etkisi	51
4.15. Evernik Asit Uygulamasının TNF- α Düzeyine Etkisi	52
4.16. Vulpinik Asit Uygulamasının TNF- α Düzeyine Etkisi	53
4.17. Atranorin Uygulamasının IL-1 β Düzeyine Etkisi	54
4.18. Diffraktaik Asit Uygulamasının IL-1 β Düzeyine Etkisi	55
4.19. Evernik Asit Uygulamasının IL-1 β Düzeyine Etkisi	56
4.20. Vulpinik Asit Uygulamasının IL-1 β Düzeyine Etkisi	57
4.21. Atranorin Uygulamasının IL-6 Düzeyine Etkisi	58
4.22. Diffraktaik Asit Uygulamasının IL-6 Düzeyine Etkisi	59
4.23. Evernik Asit Uygulamasının IL-6 Düzeyine Etkisi	60

4.24. Vulpinik Asit Uygulamasının IL-6 Düzeyine Etkisi	61
4.25. Atranorin Uygulamasının IL-10 Düzeyine Etkisi	62
4.26. Diffraktaik Asit Uygulamasının IL-10 Düzeyine Etkisi	63
4.27. Evernik Asit Uygulamasının IL-10 Düzeyine Etkisi	64
4.28. Vulpinik Asit Uygulamasının IL-10 Düzeyine Etkisi	65
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	66
KAYNAKLAR	75
ÖZGEÇMİŞ	86
EKLER	87
EK 1. Çalışma Onay Belgesi	87
EK 2. Tez Orijinallik Raporu	88

SİMGELER VE KISALTMALAR

ANOVA	: Tekrarlanan ölçümlü varyans analizi
ATR	: Atranorin
C/EBP	: CCAAT/enhancer bağlayan protein
C/EBP	: CCAAT/enhancer bağlayan protein
COX-1	: Siklooksijenaz-1
COX-2	: Siklooksijenaz-2
CREB	: cAMP yanıt elementi bağlayan protein
CREB	: cAMP yanıt elementi bağlayan protein
DA	: Diffraktaik asit
DMSO	: Dimetil sülfoksit
EA	: Evernik asit
EDTA	: Etilendiamin tetraasetik asit
ELISA	: Enzim bağlı immünosorbent analizi
eNOS	: Endotelyal NOS
FBS	: Fetal Bovine Serum
GM-CSF	: Granülosit makrofaj koloni uyarıcı faktör
IFN-γ	: İnterferon-gama
IgE	: İmmünoglobulin E
IL-1	: İnterlökin-1
IL-1Ra	: IL-1 reseptör antagonisti
iNOS	: İndüklenebilen NOS
LPS	: Lipopolisakkarit
M1	: Klasik olarak aktive edilmiş makrofaj
M2	: Alternatif olarak aktive edilmiş makrofaj
MAP kinaz	: Mitojen tarafından aktive edilen kinaz
MCP-1	: Monosit kemotaktik proteini-1
MHC	: Büyük doku uygunluk kompleksi
mtNOS	: Mitokondriyal nitrik oksit sentaz
MTT	: 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide

NADPH	: Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat hidrojen
NF-κB	: Nükleer faktör kappa beta
nNOS	: Nöronal NOS
NOS	: Nitrik oksit sentaz
NOx	: Nitrik oksit
NSAIDs	: Non-steroidal antienflamatuvar ilaçlar
PBS	: Phosphate Buffered Saline
PGE₂	: Prostaglandin E2
PGES	: Prostaglandin E sentetaz
PGs	: Prostaglandinler
ROS	: Reaktif oksijen türleri
TGF-β	: Transforme edici büyüme faktör-beta
Th2	: Tip 2 yardımcı T lenfosit
TLR	: Toll-benzeri reseptör
TNF-α	: Tümör nekroz faktörü-alfa
UV	: Ultraviyole
VA	: Vulpinik asit
VEGF	: Vasküler endotelial büyüme faktörü

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1. Makrofajların mikroskopik görüntüsü	4
Şekil 2. Atranorinin moleküler yapısı	25
Şekil 3. Evernik asitin moleküler yapısı	25
Şekil 4. Vulpinik asitin moleküler yapısı	26
Şekil 5. Diffraktaik asitin moleküler yapısı.....	26
Şekil 6. Neubauer laminın sayım alanı.....	32
Şekil 7. RAW264.7 makrofaj hücrelerinin tripan mavisi ile boyaması	33
Şekil 8. Atranorin uygulamasının hücre canlılık oranlarına etkileri	38
Şekil 9. Diffraktaik asit uygulamasının hücre canlılık oranlarına etkileri	39
Şekil 10. Evernik asit uygulamasının hücre canlılık oranlarına etkileri	40
Şekil 11. Vulpinik asit uygulamasının hücre canlılık oranlarına etkileri	41
Şekil 12. Atranorin uygulamasının nitrik oksit düzeylerine etkisi	42
Şekil 13. Atranorin uygulamasının nitrik oksit düzeylerine etkisi	43
Şekil 14. Evernik asit uygulamasının nitrik oksit düzeylerine etkisi	44
Şekil 15. Vulpinik asit uygulamasının nitrik oksit düzeylerine etkisi	45
Şekil 16. Atranorin uygulamasının PGE ₂ düzeylerine etkisi	46
Şekil 17. Diffraktaik asit uygulamasının PGE ₂ düzeylerine etkisi	47
Şekil 18. Evernik asit uygulamasının PGE ₂ düzeylerine etkisi	48
Şekil 19. Vulpinik asit uygulamasının PGE ₂ düzeylerine etkisi	49
Şekil 20. Atranorin uygulamasının TNF- α düzeylerine etkisi	50
Şekil 21. Diffraktaik asit uygulamasının TNF- α düzeylerine etkisi	51
Şekil 22. Evernik asit uygulamasının TNF- α düzeylerine etkisi	52
Şekil 23. Vulpinik asit uygulamasının TNF- α düzeylerine etkisi	53
Şekil 24. Atranorin uygulamasının IL-1 β düzeylerine etkisi	54
Şekil 25. Diffraktaik asit uygulamasının IL-1 β düzeylerine etkisi	55
Şekil 26. Evernik asit uygulamasının IL-1 β düzeylerine etkisi	56

Şekil 27. Vulpinik asit uygulamasının IL-1 β düzeylerine etkisi	57
Şekil 28. Atranorin uygulamasının IL-6 düzeylerine etkisi	58
Şekil 29. Diffraktaik asit uygulamasının IL-6 düzeylerine etkisi.....	59
Şekil 30. Evernik asit uygulamasının IL-6 düzeylerine etkisi	60
Şekil 31. Vulpinik asit uygulamasının IL-6 düzeylerine etkisi	61
Şekil 32. Atranorin uygulamasının IL-10 düzeylerine etkisi	62
Şekil 33. Diffraktaik asit uygulamasının IL-10 düzeylerine etkisi	63
Şekil 34. Evernik asit uygulamasının IL-10 düzeylerine etkisi	64
Şekil 35. Vulpinik asit uygulamasının IL-10 düzeylerine etkisi	65



TABLÖLAR LİSTESİ



1. GİRİŞ

Enflamasyon, çeşitli zararlı etkenler nedeniyle gelişen doku irritasyonuna karşı, dokunun yeniden yapılanmasını ve iyileşmesini sağlayan vasküler, humoral ve hücrel reaksiyonları içeren koruyucu yanıttır. Enflamasyonun genetik mekanizması olmasına rağmen zararlı yönleri bulunmaktadır. Enflamatuvar yanıt çeşitli hastalıklarda farklılık göstermesine rağmen, büyüme faktörleri, prostaglandinler, kemokinler, matriks metaloproteazları gibi endojen mediatörlerin, interlökin-1 (IL-1), IL-6, IL-8 gibi interlökinler, tümör nekroz faktörü (TNF) gibi enflamatuvar sitokinler, nitrik oksit gibi toksik moleküller ve serbest radikallerin yaygın spekturumu ile karakterizedir. Kısacası enflamatuvar yanıtın, enflamasyonu tetikleyen etkene bağımlı olarak, farklı fizyolojik amacı ve patolojik sonucu olabilir (Goverman, 2009).

Enflamatuvar uyarıcıya yanıt olarak makrofajlar, dendritik hücreleri ve mast hücreleri gibi immün hücreler aktifleşir. Bunu takiben hücrelerde enflamatuvar mediyatörler salınır. Bu mediyatörler kızarıklık, vücut ısısının artışı, şişlik, ağrı ve fonksiyon kaybı gibi klinik belirtilerin ortaya çıkmasına neden olur. Enflamasyon süresince vazodilatasyon meydana gelir ve enflamasyon alanına bağışıklık hücrelerinin yüksek miktarda taşınmasıyla kan akışı artar. Bazı mediatörler ağrıya duyarlılığı artırırken, bazı mediatörler ise damarlara lökosit göçünü sağlamak için kan damarlarının geçirgenliğini arttırabilir (Harvey ve Champe, 1998). Başlangıçta akut enflamasyon nötrofilik infiltrasyon ile karakterizedir. 24 ve 48 saat sonra ise ortamda monositik hücreler hâkimdir. Buna karşılık kronik enflamasyon makrofajlar ve lenfositler gibi tek çekirdekli hücrelerin varlığı ile karakterizedir. Akut enflamasyona eikozanoidler ve vazoaktif aminler aracılık eder. Bu mediyatörler, enflamasyon bölgesinde plazma ve lökositlerin hareketini artırarak enflamatuvar uyararlara karşı bağışıklık sisteminde erken yanıtı başlatır. Çeşitli sitokinler ve büyüme faktörleri kronik enflamasyonda lökosit, lenfosit ve fibroblastlar gibi immün hücreleri tarafından salınır (Medzhitov, 2008).

Akut enflamasyon, çeşitli enflamatuvar uyaranlara karşı yararlı konak yanıt olmasına rağmen kronik enflamasyon sürekli ve doku hasarına neden olabilir. Kronik enflamasyon romatoid artrit, kronik enflamatuvar bağırsak hastalıkları, nörodejeneratif bozukluklar, septik şok sendromu, kalp krizleri, Alzheimer hastalığı ve kanser gibi

birçok hastalığın etiyolojisinde yer almaktadır (Nardin ve Abastado, 2008; Gabay, 2006). Kronik enflamasyona bağlı olarak gelişen hastalıkların tedavisi için yeni ilaçların keşfine yönelik çalışmalar, antienflamatuvar potansiyele sahip etkin maddelerin tespiti üzerine yoğunlaşmıştır. Oluşabilecek yan etkinin de en aza indirgenmesini sağlamak adına, bu çalışmalarda yoğun olarak doğal kaynaklı etkin maddeler ele alınmaktadır (de Haas ve ark., 2008; Paloneva ve ark., 2002).

Likenler, bir mikobiyont ile bir veya daha fazla ekolojik olarak zorunlu biyotrof olarak fotosentez yapan tek hücreli veya filamentöz yapılar arasındaki simbiyotik ilişki ile oluşan kararlı, mutualist yaşam sergileyen ve biyolojik olarak aktif birçok düşük moleküler ağırlıklı sekonder metabolit kaynağı oluşturan mikroorganizmaların kompleks topluluklarıdır (Calcott ve ark., 2018; Molnár ve Farkas, 2010).

Likenler tarafından üretilen metabolitler, primer ve sekonder metabolit olmak üzere ikiye ayrılır. Protein, amino asit, poliol, karotenoid, polisakkarit ve vitamin yapısında olan primer metabolitler, doğrudan hayati fonksiyonlarla ilgili ürünlerdir. Poliketid, polifenol, kinon, terpenoid, ksanton, dibenzofuran, depsid, depsidon, depson, terpenoid vb. yapısında olan sekonder metabolitler ise temel hayati fonksiyonlarla doğrudan ilgili olmayan ancak likenlere birçok avantaj sağlayan ürünlerdir (Fernández-Moriano ve ark., 2016). Çeşitli liken türlerinden ve bunların kültürlü simbiyontlarından tanımlanan 1000'den fazla sekonder metabolit likenlerin çevre koşullarına uyum sağlamasında, onları korumada, hayatta kalmasına ve büyümesine destek olmada ve ekosistemle ilişkileri düzenlemesinde çeşitli görevleri üstlenmektedir (Calcott ve ark., 2018).

Deneyssel yöntemlerle liken sekonder metabolitleri hakkında birçok bilgi edinilmesine rağmen simbiyotik yaşamdaki işlevleri hakkında hala net bilgiler elde edilememiştir. Yapısal olarak birbirlerine çok benzer olan metabolitler arasında bile çok farklı biyolojik etkilerin olduğu gözlemlenmiştir. Birçoğunun da çoklu biyolojik aktivite sergilediği bilinen bu metabolitlerin liken talluslarını zararlı otlara, patojenlere, rakiplerine ve yüksek ultraviyole (UV) ışıması gibi dış faktörlere karşı koruduğu düşünülmüştür. Araştırmalar sonucunda ise genel fonksiyonlarının antioksidan aktivite, simbiyoz gelişimi, metal homeostazisi ve kirlilik toleransı, fotokoruma, allelopati, antimikrobiyal, antiviral ve antifungal aktivite, antiherbivor ve böcek öldürücü

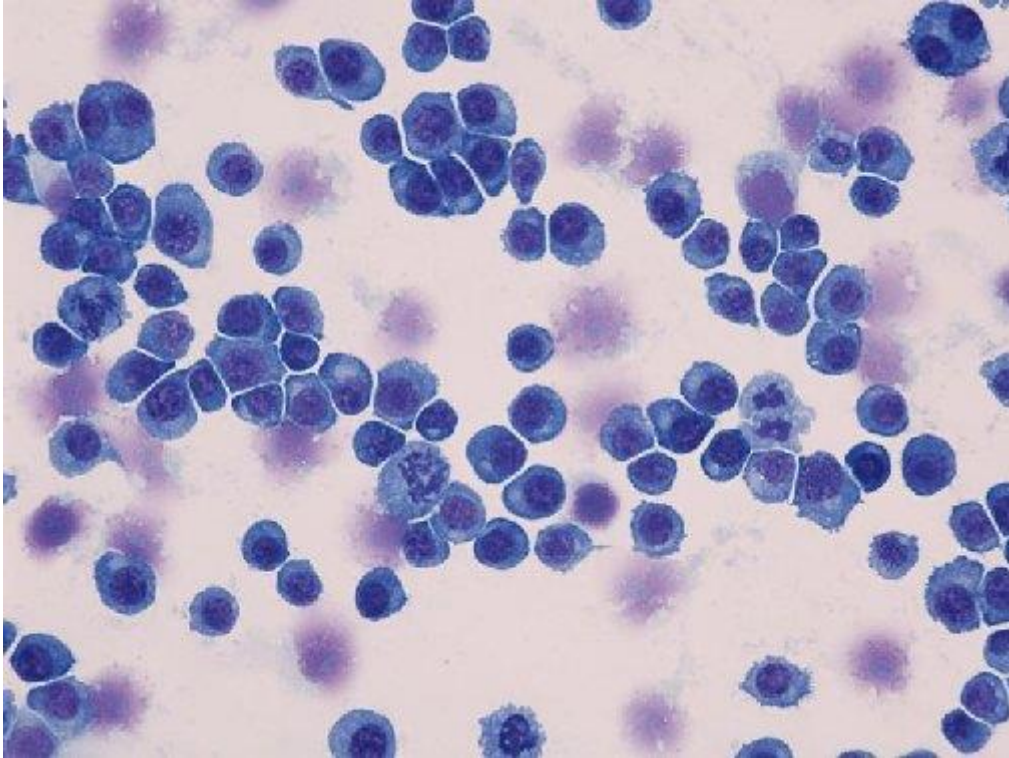
aktivitesi, antikanser aktivitesi, antipiretik ve analjezik etki olduğu belirlenmiştir (Molnár ve Farkas, 2010). Yaptığımız çalışmada liken sekonder metabolitlerinden atranorin, diffraktaik asit, evernik asit ve vulpinik asitin lipopolisakkarit ile indüklenen makrofaj hücrelerindeki antienflamatuvar aktiviteleri araştırılmıştır.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Makrofajlar

Makrofajlar, fagositozu tanımlaması nedeniyle 1905'te Nobel ödülü kazanan Elie Metchnikoff tarafından tanımlanmıştır (Nathan, 2008). İlk olarak fagositoz teorisini tanımlamasıyla başlanılan çalışmalar günümüze kadar devam etmektedir. Makrofajların patojenlere karşı primer yanıtta önemli rolleri olan doğuştan gelen immün hücreleri olduğu, enfeksiyon veya yaralanmadan sonra antijenlerin ortaya çıkarılmasında, yara iyileşmesinde ve enflamasyonun düzenlenmesinde önemli görevleri olduğu bilinmektedir (Şekil 1) (Gouinaud ve Leclerc, 2013; Hao ve ark., 2012).



Şekil 1. Makrofajların mikroskopik görüntüsü (Gouinaud ve Leclerc, 2013)

Kan monositleri, kemik iliğinde, aynı zamanda nötrofillere yol açan ortak bir miyeloid progenitöründen kaynaklanır (Strauss-Ayali ve ark., 2007). Makrofajlar, vücudun tüm dokularında bulunan mononükleer fagositlerdir (Desalegn ve Pabst, 2019). Fizyolojik ve patolojik durumlarda çeşitli görevlerde yer alan hemetopoetik kök hücrelerden köken alan doğal bağışıklık sisteminin miyeloid hücrelerinin heterojen bir

popülasyonunu oluşturur (Genin ve ark., 2015). Makrofajlar, kemik iliğinden olgunlaşmamış monositler olarak üretilir ve kan dolaşımından sonra, karaciğerdeki kupffer hücreleri, akciğerdeki alveolar makrofajlar ve kemikteki osteoklastlar dahil olmak üzere yerleşik makrofajlara farklılaşmak için dokulara göç ederler (Bingle ve ark., 2002). Özellikle enflamasyon ve enfeksiyonda aktif olmalarının yanı sıra yara iyileşmesinde de görev almaktadırlar. Bu koşullar altında, kan monositleri, makrofajlara farklılaştıkları dokularda toplanmaktadır (Gordon, 2007). Dokuda yerleşik makrofajlar, yetişkin memelilerin hemen hemen tüm organlarında bulunan ve hem doku homeostazının gelişmesine hem de enflamasyonun giderilmesine önemli ölçüde katkıda bulunan çok yönlü hücrelerdir. Kökenlerine göre, dokuda yerleşik makrofajlar kan monositinden türetilmiş makrofajlar ve yerel olarak kendi kendine yenilenen yerleşik makrofajlar olarak sınıflandırılabilir (Funes ve ark., 2018).

Makrofajlar, fagositoz, sitotoksikite ve çok çeşitli sitokin dizisinin salgılanması, büyüme faktörleri, lizozimler, proteazlar, kompleman bileşenleri, pıhtılaşma faktörleri ve prostaglandinler dahil olmak üzere doku yeniden şekillenmesi, enflamasyon ve bağışıklık için gerekli çok sayıda işlevi yerine getirir (Bingle ve ark., 2002). Makrofajlar, hem pro-enflamatuvar hemde anti-enflamatuvar etki göstermektedir. Makrofajların doku mikroçevrelerindeki değişikliklere işlevsel olarak adapte olma kabiliyetlerinden dolayı aşırı fonksiyonel ve fenotipik heterojenliği oluşturmaktadır. Bu işlevsel plastisiteyi doku hasarına ve/veya enfeksiyonuna cevap verme, hasar görmüş doku ve istilacı mikroorganizmaların temizlenmesine katkıda bulunma, adaptif bağışıklık sisteminin uyarılmasına katkıda bulunma ve yaranın iyileşmesine katkıda bulunma yeteneklerinde kritik bir rol oynamaktadır (Quero ve ark., 2017).

Klasik akut enflamatuvar yanıtta, kan monositleri, nötrofillerden kısa bir süre sonra hasarlı dokuya girer. Bakteriler, ürünleri ile karşılaşılacak hasarlı bir doku, tümör nekroz faktör-alfa (TNF- α), IL-1 ve IL-6 üretimi ve metaloproteinazların salgılanması gibi pro-enflamatuvar aktivitelerin aktivasyonu ile sonuçlanır. Doku içindeki bakterilerin temizlenmesi ilerledikçe, temizlenmiş doku bölgelerindeki enflamatuvar ve efektör aktiviteler için uyarıcı azalır. Akut faz proteinleri, glukokortikoidler, transforme edici büyüme faktör-beta (TGF- β), IL-10 ve apoptotik nötrofillerin fagositozu gibi birçok faktörün mevcudiyeti ile birlikte enflamatuvar aktivite için uyarandaki bu azalma,

makrofaj enflamatuvar/sitotoksik aktivitelerin aşağı regülasyonuna katkıda bulunmaktadır. Anti-enflamatuvar ve doku yenileyici aktivitelerin gelişmiş olmaktadır (Diegelmann ve Evans, 2004; Cvetanovic ve Ucker, 2004; Lucas ve ark., 2003). Bu nedenle, dinamik bir enflamatuvar yanıt sırasında, makrofaj popülasyonu, doku mikroçerçesinde mevcut olan makrofaj modüle edici ligandların dengesine bağlı olarak, çeşitli fonksiyonel modeller gösterecektir (Stout ve Suttles, 2005).

Makrofajlar tarafından oluşturulan enflamatuvar çevre miyeloid dendritik hücrelerin olgunlaşmasını önemli ölçüde etkileyebilir ve böylece ortaya çıkacak adaptif immün yanıtın doğasını etkileyebilir (Gratchev ve ark., 2000).

2.1.1. Makrofaj polarizasyonu

Makrofajlar hemen hemen tüm dokularda bulunur ve doku homeostazının korunmasında önemli roller oynar (Hao ve ark., 2012). Doku makrofajları, yaşlanmış hücrelerin temizlenmesi ve enflamasyon sonrası dokuların yeniden yapılandırılması ve onarımı yoluyla doku homeostazının korunmasında geniş bir role sahiptir (Gordon ve Taylor, 2005).

Heterojenite, farklı anatomik bölgelerdeki makrofajların fonksiyonun farklı uzmanlaşmasını yansıtmaktadır. Osteoklastların kemiği yeniden şekillendirmesi yeteneği (Quinn ve Gillespie, 2005), akciğerlerdeki mikroorganizmaların, virüslerin ve çevresel partiküllerin temizlenmesinde rol oynayan alveoler makrofajlar (Palecanda et.al., 1999), bağırsaktaki makrofaj yüksek fagositik ve bakterisidal aktiviteye sahip, ancak pro-enflamatuvar sitokinlerin zayıf üretimi ile karakterize edilen bir makrofaj fenotipini vurgulanmıştır (Smythies ve ark., 2005). Bu fenotip, intestinal stromal hücreli ürünler tarafından periferik kandan türetilmiş makrofajlarda indüklenebilir, bu da doku mikroçerçesindeki komponentler dokuda yerleşik makrofajların fenotipini belirgin şekilde etkileyebileceğini göstermektedir. Farklı organlardaki makrofaj heterojenliğine ek olarak, tek bir organda makrofaj heterojenliği gözlenebilir ve makrofaj alt küme heterojenliğine yansımaktadır (Rubio ve ark., 2019).

Fenotipik değişikliklerin, polarize sitokinlere maruz kaldıktan sonra kromatin modifikasyonları ile büyük ölçüde sabitlenebileceği lenfositlerin aksine; makrofajlar,

başka uyarıcılar tarafından yoğun şekilde değerlendirildiği gibi, uyarıcı maddelere maruz kalmanın tipine, konsantrasyonuna ve uzunluğuna bağlı olarak değişen plastisite gen ekspresyon fenotipine sahiptir (Murray ve Wynn 2011). Diğer immün efektör hücreler gibi makrofajlar, çoklu alt tiplere sahiptir ve mikroçevreye bağlı olarak çeşitli fenotipleri alabilmektedir. Th1/Th2 sınıflandırmasına benzer şekilde, makrofajlar için iki farklı polarize olmak üzere klasik olarak aktive edilmiş makrofaj (M1) ve alternatif olarak aktive edilmiş makrofaj (M2) olarak sınıflandırılmıştır. Polarize makrofajlar sitokin ve kemokin üretimi, reseptör ifadesi, efektör fonksiyonu ve aktivitesi açısından farklılık göstermektedir (Hao ve ark., 2012).

Makrofaj aktivasyon fenotipleri, interferon-gama (IFN- γ) ve toll benzeri reseptör (TLR) ligandları gibi mikrobiyal ürünler ile indüklenen klasik aktivasyon (M1) ve T yardımcı (Th) tarafından üretilen sitokinler IL-4 ve IL-13 ile indüklenen alternatif aktivasyon (M2) makrofajları olarak bilinmektedir. M1 makrofajları konak savunmasında ve patojenleri temizlemede etkilidir ve M2 makrofajlar, iltihaplanma ve doku onarımı için önemlidir (Ivashkiv, 2013).

Makrofaj plastisitesi, dış koşullara bağlı olarak hücrenin fenotipik ve fonksiyonel kapasitelerini kolayca değiştirme kapasitesi olarak tanımlanır. Bu nedenle, yüzey reseptörlerinin repertuarı, reaktif oksijen türleri üretme kabiliyeti ve spesifik kemoatraktanlarla doğru göç etme potansiyeli, dış koşullara bağlı olarak büyük ölçüde değişebilir. Buna karşılık, makrofaj polarizasyonu terimi, spesifik şartlar tarafından indüklenebilen ve spesifik yüzey belirteçlerinin veya fonksiyonel kapasitelerin varlığı ile tanımlanmış olan, makrofaj plastikliği durumları için kullanılır (Biswas ve ark., 2008). Th1 tipi tepkiler hücre-içi bağışıklık ve hücre içi patojenlerle başa çıkmak için önemli sitotoksik cevabı indüklemektedir. Bununla birlikte, yüksek Th1 yanıtı otoimmüniteye neden olmaktadır. Öte yandan, Th2 tipi yanıt, hücre dışı patojenlerin yanı sıra mukozal immünite ile başa çıkmak için önemli humoral bağışıklığı arttırmaktadır. Artan Th2 yanıtları astım ve alerji gibi kronik enflamatuvar hastalık durumlarına neden olabilmektedir. Monositler bir Th1 bağışıklık ortamında M1 polarize makrofaja, Th2 bağışıklık ortamında elde edilen M2 polarize makrofaja farklılaşmaktadır (Van Ginderachter, 2006). M1 ve M2 polarize fenotipleri, çoklu faktörler tarafından indüklenen ve özel fonksiyonlar altında yatan transkripsiyonel modüllerin ekspresyonu

ile karakterize edilen, makrofaj polarizasyon durumlarının fonksiyonel bir spektrumunun iki ucunu temsil eder (Sica ve Mantovani, 2012).

Klasik Olarak Aktive Edilmiş Makrofajlar (M1)

Hücre aracılı immün yanıtlar sırasında üretilen efektör makrofajlarını belirtmek için klasik olarak aktive edilen makrofajlar (M1) terimi kullanılmıştır. Klasik olarak aktive edilmiş makrofajların orijinal karakterizasyonunda, Th1 sitokinlerinden IFN- γ ve TNF- α kombinasyonu, mikrobisidal veya tümörisidal kapasiteyi arttırmış ve yüksek seviyede pro-enflamatuvar sitokin salgılayan bir makrofaj popülasyonu ile sonuçlanmıştır (Mosser ve Edwards, 2008). Makrofajlar mikro çevrelerini sürekli algılamaktadır. Buna göre, polarize durumlarını kontrol etmek için düzenleyici epigenetik programlar geliştirmektedirler. Histon yeniden yapılanmasında (metilasyon, asetilasyon, fosforilasyon ve ubikikasyon yoluyla) değişikliklerin lipopolisakkarit (LPS), IL-4 ve IFN- γ ile makrofajların polarizasyonu sırasında ortaya çıktığı bildirilmiştir. Bu histon modifikasyonları, hayatta kalma, farklılaşma ve aktivasyon dahil olmak üzere çeşitli makrofaj biyolojik özellikleri ile ilişkili olduğu düşünülmektedir (Rubio ve ark., 2019).

M1 polarize makrofajlar IFN- γ , granülosit makrofaj koloni stimüle edici faktör (GM-CSF), LPS ve diğer mikrobiyal ürünler tarafından indüklenmektedir. Mikropları öldürmede ve enflamatuvar sitokinleri üretmede etkilidir, ancak mikrop öldürücü toksisitesi kollateral doku hasarına yol açabilmektedir. M1 benzeri fenotip grubunun temel özellikleri, salgıladıkları sitokinler TNF- α , IL-1 ve IL-12, antimikrobiyal moleküller, reaktif oksijen ve reaktif azot ara maddeleri ve Th1 alıcı kemokinler CXCL9 ve CXCL10 gibi IFN'ların neden olduğu genler tarafından sentezlenir (Ivashkiv, 2013).

M1 polarizasyonu ile ilişkili belirteçler ve salgılanan moleküller, STAT1, STAT3, IRF4, NF κ B, CIITA, CD80, CD86, ana histo-uyumluluk kompleksi sınıf II reseptörü (MHC-II), kemokinler reseptörleri (CXC'ler), kemokin ligandları (CXCL'ler ve CCL'ler), CCL2 (MCP1), COX-2, TNF- α , IFN- γ , nitrik oksit (NOx), indüklenbilir nitrik oksit sentaz (iNOS), reaktif oksijen türleri (ROS), ve IL-12 β bulunmaktadır (de Groot ve Pienta, 2018). M1 polarize makrofajlar tarafından üretilen pro-enflamatuvar sitokinler, konakçı savunmasının önemli bir bileşenidir, ancak konakçıya büyük hasar verebilir. Örneğin, IL-1, IL-6 ve IL-23, klasik olarak aktive edilmiş makrofajlar tarafından üretilir

(Mosser ve Edwards, 2008). Makrofaj polarizasyonunu ve plastisitesini yönlendiren mekanizmalar çeşitlidir ve sinyalleşme, epigenetik ve transkripsiyon sonrası değişiklikler seviyesinde hareket eder (Lawrence ve Natoli, 2011). Her polarize makrofaj popülasyonundaki gen transkripsiyonu, farklı transkripsiyon faktörlerinin koordineli etkisinin bir sonucudur. DNA veya sargısız nükleozomların diferansiyel kompresyonunun şematik olarak epigenetik değişiklikleri temsil ettiği gösterilmiştir (Biswas ve ark., 2012). Kanserojenezin erken safhasında, M1 makrofajlarında nükleer faktör kappa-beta (NF- κ B) aktivasyonu, kansere bağlı enflamasyon için gereklidir. Enflamatuvar araçların kronik salınımı yoluyla bu makrofajlar doku hasarı, neoplastik dönüşüm ve neoplastik hücrelerin büyümesini başlatır (Biswas ve ark., 2008).

Alternatif Olarak Aktive Edilmiş Makrofaj (M2)

Makrofajların alternatif aktivasyonu, özellikle parazitik ve seçilmiş patojen enfeksiyonlarına alerjik, hücresel ve humoral cevaplar sırasında, Th-2 tipi bir cevapta üretilen sitokinler IL-4 ve IL-13 tarafından indüklenmektedir (Varin ve Gordon, 2009). Anjiyogenezden, dokunun yeniden yapılanmasından sorumludur ve tümörün ilerlemesini kolaylaştırabilmektedir (Sica ve ark., 2008). Sitokin uyarılarına göre ve üretilen transkripsiyonel değişiklikler ile M2 polarize makrofajları M2a'dan M2d'ye kadar farklı alt gruplara ayrılmıştır (Rubio ve ark., 2019).

M2 polarize makrofajları, IL-4 gibi Th2 sitokinleri tarafından indüklenebilmektedir. IL-10 gibi Th2 sitokinlerini eksprese edebilirler ve spesifik olarak CD163, CD206 (mannoz reseptörü) veya temizleyici reseptör-A ve CD36 gibi yüzey reseptörlerinin ekspresyonu ile karakterize edilmektedir (Gleissner ve Erbel, 2012). M2 polarize makrofajlar M2a (IL-4 veya IL-13 tarafından indüklenen), M2b (immün kompleksleri ve TLR ligandları tarafından indüklenen), M2c (IL-10 tarafından indüklenen) ve M2d (IL-6 adenosinler tarafından indüklenen) olmak üzere 4 farklı alt gruplara ayrılmaktadır (Rubio ve ark., 2019). Genel olarak, M2 makrofajlar Th2 yanıtını yansıtır ve oldukça anti-enflamatuvar olarak kabul edilebilir (Gleissner ve Erbel, 2012).

M2 makrofajları tümörün başlatılması ve ilerlemesi ile korele olmuş, ayrıca enflamasyonun inhibitörleri olarak tanımlanmaktadır (Ohri ve ark., 2009). M2 polarize makrofajları, IL-10 gibi anti-enflamatuvar sitokinler üretmekte ve iNOS ekspresyonunu

azaltmakta, antijen sunumunu ve T hücresi çoğalmasını inhibe etmektedir (Redente ve ark., 2010). M2 polarize makrofajlarının, çeşitli tümör hücrelerinin in vitro büyümesini teşvik ettiği ve tümör hücresi sağkalımını arttırdığı bulunmaktadır. (Biswas ve ark., 2008). Anjiyogenezin önde gelen bir aracısı olan vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF) ile anjiyogenezin desteklenmesinde hayati bir rol oynamaktadır (Almatroodi ve ark., 2016). Alternatif olarak aktive edilmiş makrofajlar, Th2 tepkilerini indükler ve genellikle IL-4, IL-13, IL-10 ve glukokortikoidler tarafından polarize edilmektedirler. M2 polarize makrofajlarla ilişkili markerler ve salgılanan moleküller arasında SOCS1, PPAR γ , STAT6, GATA3, c-MYC, HIF-1 α , LXR, CD206 (MRC1), CD163, CD36, ARG1, IL-10, TGF- γ , vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF), FIZZ1 ve YM1 (Chi313) bulunmaktadır (de Groot ve Pienta, 2018).

2.2. Enflamasyon ve Makrofajların Rolü

2.2.1. Enflamasyon

Enflamasyon, çeşitli zararlı etkenler nedeniyle gelişen doku irritasyonu veya enfeksiyonuna karşı, dokunun yeniden yapılanmasını ve iyileşmesini sağlayan vasküler, humoral ve hücrel reaksiyonları içeren koruyucu yanıttır. Enflamasyon genetik faktörler ve çoklu fizyolojik yanıtların birikmiş sonucudur. Enflamasyon bir savunma mekanizması olmasına rağmen zararlı yönleri bulunmaktadır (Goverman, 2009). Enflamatuvar yanıt çeşitli hastalıklarda farklılık göstermesine rağmen, büyüme faktörleri, prostaglandinler, kemokinler, matriks metaloproteazları gibi endojen mediatörlerin, IL-1, IL-6, IL-8 interlokinler, TNF- α gibi enflamatuvar sitokinler, nitrik oksit gibi toksik moleküller ve serbest radikallerin yaygın spektrumunu ile karakterizedir. Kısacası enflamatuvar yanıtın, enflamasyonu tetikleyen etkene bağımlı olarak, farklı fizyolojik amacı ve patolojik sonucu olabilir (Medzhitov, 2008).

Enflamatuvar uyarıcıya yanıt olarak makrofajlar, dendritik hücreleri ve mast hücreleri gibi immün hücreleri aktifleşir. Bunu takiben hücrelerde enflamatuvar mediyatörler salınır. Bu mediyatörler kızarıklık, vücut ısısının artışı, şişlik, ağrı ve fonksiyon kaybı gibi klinik belirtilerin ortaya çıkmasına neden olur. Enflamasyon süresince vazodilatasyon meydana gelir ve enflamasyon alanına bağışıklık hücrelerinin yüksek miktarda taşınmasıyla kan akışı artar. Bazı mediatörlerin ağrıya

duyarlılığı artırırken, bazı mediatörler kan damarlarından damarlara lökosit göçüne sağlamak için kan damarlarını değiştirir (Harvey ve Champe, 1998). Başlangıçta akut enflamasyon nötrofilik lökosit infiltrasyonu ile karakterizedir. 24 ve 48 saat sonra monositik hücreler hâkimdir. Buna karşılık kronik enflamasyon makrofajlar ve lenfositler gibi tek çekirdekli hücrelerin varlığı ile karakterizedir. Akut enflamasyona eikozanoidler ve vazoaktif aminler aracılık eder. Bu mediyatörler, enflamasyon bölgesinde plazma ve lökositlerin hareketini artırarak enflamatuvar uyararlara karşı bağışıklık sisteminde erken yanıtı başlatır. Çeşitli sitokinler ve büyüme faktörleri kronik enflamasyonda lökosit, lenfosit ve fibroblastlar gibi immün hücreleri tarafından salınır (Gabay, 2006).

Akut enflamasyon çeşitli enflamatuvar uyararlara karşı yararlı konak yanıt olmasına rağmen kronik enflamasyon sürekli ve doku hasarına neden olabilir. Kronik enflamasyon romatoid artrit, kronik enflamatuvar bağırsak hastalıkları, nörodejeneratif bozukluklar, septik şok sendromu, kalp krizleri, Alzheimer hastalığı ve kanser gibi birçok hastalığın etiyolojisinde yer almaktadır (Coussens ve Werb, 2002).

2.2.2. Enflamasyona makrofajların yanıtı

Enfeksiyona karşı ilk savunma hattı doku makrofajlarıdır. Enflamasyon başladıktan sonra, dakikalar içinde dokuda var olan makrofajlar deri altı dokulardaki histiyositler, akciğerdeki alveoler makrofajlar, beyindeki mikroglialar ve diğerleri, hemen fagositik etkinliklerine başlarlar. Enflamasyon veya bu hücrelerin hızla genişlemeleridir. Sonra, daha önce sabit olan makrofajların çoğu bağlarından ayrılarak hareketli hale gelirler ve ilk birkaç saat içinde enfeksiyona karşı ilk savunma hattını oluştururlar. Bu erken mobilize olan makrofajların sayıları genellikle çok fazla değildir ancak yaşam kurtarıcıdır.

Nötrofillerin yayılımı ile birlikte monositler de kanda enflamasyonlu dokuya göç eder ve genişleyerek makrofaj haline gelirler. Ancak, dolaşan kandaki monosit sayısı düşüktür, ayrıca kemik iliğindeki monositlerin depo havuzu, nötrofillerden daha azdır. Bu yüzden enflamasyonlu doku bölgesinde makrofajların yerleşmesi yavaş olup etkin olmaları için günler gerekir. Bu arada kemik, iliğinde monosit üretimi çok artacağı için,

ancak günler, haftalar sonra, sonuçta makrofajlar enflamasyonlu doku bölgesinde en baskın fagositik hücre haline gelirler. Makrofajlar nötrofillere oranla daha fazla bakteriyi (yaklaşık beş katı) ve daha büyük partikülleri, hatta nötrofillerin kendilerini bile ve büyük miktarda ölü dokuyu fagosit edebilirler. Ayrıca makrofajlar antikorların gelişiminin başlamasında önemli rol oynarlar (Nardin ve Abastado, 2008).

2.2.3. Enflamasyon Biyobelirteçleri

Nitrik Oksit

Nitrik oksit (NO_x) hücre içi ve hücreler arası sinyalizasyonda önemli bir moleküldür. Birçok organın fizyolojik ve patolojik fonksiyonuna katkıda bulunan pek çok hücre tipi tarafından üretilir. Nöronal sistemde nörotransmitterler gibi biyolojik mediyatör olarak görev yapar. Vasküler sistemde ise kan damar tonunu düzenler ve bağışıklık hücreleri için önemli bir savunma molekülüdür.

NO_x, nitrik oksit sentaz (NOS) tarafından sentezlenir. Böylece nöronal NOS (nNOS ya da NOSI), indüklenebilen NOS (iNOS ya da NOSII) ve endotelial NOS (eNOS ya da NOSIII) meydana gelir. Ayrıca farklı NOS enzimi olan mitokondriyal NOS (mtNOS)'ın bazı kalıntıları vardır. Bu enzim ailesi, L-arjinin nikotinamid adenin dinükleotid fosfat hidrojen (NADPH) bağımlı oksidasyonunu, NO_x ve L-sitrulin üretimini katalizlerler. nNOS ve eNOS yapısal olarak nöronal ve endotelial hücrelerinde ifade edilir. iNOS ise yapısal olarak bulunmaz, hızlı bir şekilde enflamatuvar uyarılar, bakteriyel lipopolisakkarit ve sitokinler tarafından indüklenebilir (Aktan, 2004).

Biyolojik sıvılarda NO_x'in yarı ömrü çok kısadır ve hızla nitrit ve nitrat oksitlenir. NO_x üretimi, NO_x'in son ürünleri ile ölçülebilir. Bağışıklık sistemi aktive edildiğinde, monositler, makrofajlar ve nötrofiller nitrik oksit üretirler (Sun ve ark., 2003). NO_x çiftleri süperoksit O₂⁻ ile birleşerek peroksinitriti (ONOO⁻) oluştururlar. NO_x ve O₂⁻ ile karşılaştırıldığında peroksinitrit (ONOO⁻) oldukça reaktiftir. Ayrıca NO_x nitrasyon ve oksidasyonu DNA hasarına neden olan kimyasal olarak potansiyel bir molekül olarak bilinir (Szabo ve Ohshima, 1997).

iNOS geninin transkripsiyonu, uyarana ya da hücre tipine bağlı olarak protein

kinaz C, tirozin kinaz, janus kinaz, raf-1 protein kinaz, mitojen tarafından aktive edilen kinazlar (MAP kinaz) gibi farklı sinyal yolları tarafından uyarılır (Lahti ve ark., 2002). Faredeki *i*NOS geninin promotör bölgesi NF-kB gibi transkripsiyon faktörlerinin yanı sıra Jun/Fos heterodimer, bazı CCAAT/enhancer bağlayan protein (C/EBP), cAMP yanıt elementi bağlayan protein (CREB) ve transkripsiyon faktörlerinin sinyal ileticisi ve transkripsiyon aktivatör (STAT) ailesi için çeşitli bağlayıcı bölgeleri içerir (Kleinert ve ark., 1998). NF-kB ve AP-1 gibi transkripsiyon faktörleri *i*NOS ekspresyonuna da aracılık eder (Xia ve ark., 2001). LPS, sitokinler, IFN- γ , TNF- α gibi uyarıcılar sitozolden çekirdeğe NF-kB'nın translokasyonunu ve *i*NOS gen ifadesinin indüksiyonunu kolaylaştırırlar. TNF- α , IL-1 α ve IL-1 β sitokinleri *i*NOS'ın endojen uyarıcılarıdır (Huang ve ark., 1998).

*i*NOS tarafından üretilen NOx, makrofajların antimikrobiyal aktivitesine katkıda bulunur. Bununla birlikte NOx ve onun peroksinitrit ve azot dioksit gibi reaktif türlerinin yüksek konsantrasyonları karsinogenezis ve enflamasyonda önemli rol oynadığı bilinmektedir (Tsai ve ark., 1999). Ayrıca NOx enflamasyon ve sepsis de önemli bir molekül olarak tanımlanmıştır. *i*NOS ile indüklenen NOx üretiminin inhibisyonu enflamasyona karşı ilaçların etkinliğini değerlendirmek için bir ölçüm sağlayabilir (Chen ve ark., 2001).

Prostaglandin

Prostaglandinler (PGs), araşidonik asitin prostanoid yağ asitleri türevleridir. Hücre zarında bulunan fosfolipidlerden, fosfolipaz enzimi ile arşidonik asitler oluşur. Araşidonik asit, PGG₂ ve PGH₂ oluşturmak için siklooksijenaz-1 (COX-1) veya COX-2 tarafından metabolize edilir. Ardından, prostaglandin E sentetaz (PGES) tarafından PGE₂ dönüştürülür (Kudo ve Murakami, 2005).

COX-1 enzimi her hücrede yapısal olarak bulunan ve hemostatik fonksiyonlar, mide hücre koruyucu ve hemostaz dâhil olmak üzere gerekli olan PG'leri sağlar. COX-2 enzimi ise enflamasyon sırasında hücrelerde indüklenir ve enflamasyon boyunca PG'nin oluşumunda rol oynar. Seçici COX-2 inhibisyonu, klasik non-steroid antienflamatuvar ilaçların gastrointestinal yan etkiler olmaksızın antienflamatuvar aktivitesi için önemlidir (Rouzer ve Marnett, 2009).

COX-1 kaynaklı PGE₂, mide mukozasının korunmasında rol oynar. Böbrekte PGE₂ üretimi, normal böbrek fonksiyonu için tuz ve su dengesi ve renin salınımının uyarılmasında önemlidir. PGE₂, ya düz kas gevşemesini ya da dokuya bağlı kasılmayı uyarır. Ayrıca kan basıncının sürekliliğinde rol oynadığı gösterilmiştir (Hata ve Breyer, 2004). PGE₂ damar düz kas hücrelerinin gevşemesini sağlar, kan akışı artırır böylece ödemi artırır.

PGE₂ aferent sinir sonlarında, bradikin ve histaminin etkisiyle ağrıya hassasiyeti artırır (Giuliano ve Warner, 2002). COX-2, bakteriyel lipopokisakkarit dâhil olmak üzere pro-enflamatuvar uyarıcılar tarafından indüklenir ve enflamasyon yerinde pro-enflamatuvar prostaglandileri üretir (Akira ve Takeda, 2004). COX-2'nin enflamasyondaki rolü dışında, aynı zamanda kolon kanseri, Alzheimer hastalığı, kalp yetmezliği ve hipertansiyon gibi hastalıkların patojenezinde önemli rol oynar (Chen ve ark., 2001).

Sitokinler

Sitokinler, aktive olan hücreler tarafından sentezlenen, enflamasyon, travma, immun cevap ve enfeksiyon gibi önemli biyolojik olaylarda rol oynayan glikoprotein yapısındaki sinyal polipeptidlerdir (Zhang ve An, 2009). Esas olarak makrofaj ve lenfositler tarafından üretilen sitokinler her çeşit hücre tarafından salgılanmaktadır (Stout ve Suttles, 1997). Sentezlenmeleri ve hedef hücreleri etkilemeleri için çoğunlukla bir uyarı gerektirir. Sentezlenen sitokinler hemen salgılanır, hücre içinde biriktirilmez. Genel olarak sentezleri gen transkripsiyonu ile başlatıldığından salınımları geçici olup, hücre membranındaki sitokin reseptörleri aracılığıyla görevlerini yaparlar. Sitokinler enflamasyon reaksiyonlarındaki rollerine göre pro-enflamatuvar sitokinler ve antienflamatuvar sitokinler olarak sınıflandırılmaktadır (Zhang ve An, 2009).

Pro-enflamatuvar Sitokinler

Genellikle makrofaj ve fibroblastlardan meydana gelen pro-enflamatuvar sitokinler, enflamatuvar cevabın şiddetini, yapısını, süresini düzenlemede aracılık yapan ve immun sistemini aktive eden mediyatörlerdir. Enflamatuvar değişikliklerin meydana

gelmesinde, patojenin eliminasyonunu sağlayan hızlı bağışıklık yanıtın ortaya çıkmasında rol oynar. Pro-enflamatuvar sitokin reaksiyonu, ilk olarak IL-1 ve TNF- α salınımı ile başlamaktadır. Bunlar ateş, enflamasyon, doku yıkımında üretilir. Bazı durumlara şok ve ölümün yanı sıra pro-enflamatuvar genler ve endotel adezyon moleküllerin transkripsiyonu uyarır (Van Herreweghe ve ark., 2010).

TNF- α , enflamasyon, bağışıklık sisteminin geliştirilme ve apoptozda yer alır (Salek-Ardakani ve Croft, 2010). TNF- α , astım, Crohn hastalığı, romatizmal artrit, nöropatik ağrı, otoimmünite ve kanserler de dâhil olmak üzere birçok patolojik koşulları kapsar (Hehlhans ve Pfeffer, 2005). TNF'ye karşı monoklonal antikorların, Chron hastalığına karşı klinik açıdan aktif olduğu gösterilmiştir. TNF- α , enflamasyon bölgesine nötrofil ve monositlerin çekilmesinde önemli rol oynar ve diğer hücrelerden özellikle IL-1 ve IL-6 salgılanmasına neden olur. Düşük yoğunluklarda lökositler ve endotel hücreleri için akut enflamasyonu indükler. Normal dozlarda enflamasyonun sistemik etkilerini düzenler. Yüksek dozlarda septik şokun patolojik anormalliklerine neden olur (Van Deventer, 2000).

IL-1 α ve IL-1 β immün yanıtın düzenlenmesine, enflamatuvar reaksiyonlara ve hematopoeze katılan sitokinlerdir. IL-1 α ve IL-1 β , fibroblastlar ve kondrositlerden oluşan akut faz proteinleri; prostaglandin ve kolajenaz sentezini artırır. COX-2 transkripsiyonunu indüklerken, COX-1 üretiminin artmasında çok az etkiye sahiptir. Tip II fosfolipaz A2'nin gen ifadesini indükler bu durumda pirojeniteyi artırır (Dinarello, 2000).

IL-6 akut faz yanıtına aracılık eder ama pro-enflamatuvar sitokinlerin aktivitesi devam ettiği zaman akut enflamasyon bağışıklık yanıtları içeren kronik enflamasyona dönüşür. Kronik enflamasyonda IL-6, yaralanma bölgesinde mononükleer hücrelerin toplanmasını sağlar, bu durumu monosit kemotaktik proteini-1 (MCP-1) sekresyonu ve T- hücrelerinin anti-apoptotik ve anjiyoproliferasyon etkileri takip eder. Nötrofillerden makrofajlara sinyalizasyonun değişikliği akut enflamasyondan kronik enflamasyona geçişte önemli bir belirteçdir. Makrofajlar pro-enflamatuvar sitokinlerin ana kaynağıdır. Sistemik juvenil idiyopatik artrit, sistemik deri veremi eritematozus, ankilozan spondilit, sedef ve Crohn hastalığı, romatizmal artrit de dâhil olmak üzere bazı enflamasyon hastalıklarında dolaşımdaki IL-6 seviyeleri yüksektir (Gabay, 2006).

Antienflamatuvar Sitokinler

Antienflamatuvar sitokinler monositik büyük doku uygunluk kompleksi (MHC) sınıf 2 ekspresyonunu, antijen sunma aktivitelerini ve hücrelerin pro-enflamatuvar sitokin salınımlarını azaltma da görev alırlar (Bone ve ark., 1997). Sitokin üretimini azaltıcı faktör olarak da adlandırılmış olan IL-10, yardımcı T lenfositler, B lenfositler, mast hücreleri, eozinofiller, monositler, makrofajlar ve keratinositler tarafından salgılanırlar (Lalani ve ark., 1997). IL-10'un iki önemli etkisi vardır. Bunlardan birincisi makrofajlar tarafından sitokinlerin (örn: TNF- α , IL-1, IL-12, kemokin) üretimini engellemek, ikincisi ise makrofajların T hücresi aktivasyonundaki işlevleri engellemektir. Bu etkilerin sonucunda T hücresi aracılığı ile gelişen bağışıklık yanıtı inhibe edilir (Moore ve ark., 1993). T hücrelerinin proliferasyonunu ve sitokin salgılamasını baskılar. Pro-enflamatuvar sitokinlerin salgılanmasını engeller. Ayrıca IL-15, IL-6, IL-12 ve TNF- α 'yı baskılar. Nitrik oksit ve prostaglandin sentezinin baskılar, IFN- γ üretiminin baskılar, B hücrelerinin farklılaşması ve proliferasyonunu artırır, makrofajlarca IL-1 reseptör salgılanmasını artırarak enflamasyonu engelleyebilir (Mosser DM ve Zhang, 2008).

T hücresi kaynaklı, B hücresi büyüme faktörü olarak tanımlanan IL-4 antienflamatuvar bir sitokindir (Dinarello, 2000). Temel olarak tip 2 yardımcı T lenfosit (Th2) hücrelerinden salınmakla birlikte, makrofajlar, monositler, mast hücreleri, bazofiller, fibroblast ve endotel hücrelerinden de salınımları yapılmaktadır (Momose ve ark., 2000). IL-4, TNF- α ve IL-6 gibi enflamatuvar sitokinlerin ve monositler tarafından salgılanan (monokin) parçalayıcı enzimlerin üretimini azaltır. IL-1 β sentezini azaltabilir ve bu sentezi doğal olarak durduran IL-1 reseptör antagonistini (IL-1Ra) uyarır (De Vries, 1998).

IL-13, hücresel kaynağı Th2 hücreleri olup, birçok özellikleri IL-4 ile ortaktır. İmmünoglobulin E (IgE) sentezi yönünden B hücrelerine yardımcı olur, monosit adezyonuna katkısı vardır (Moore ve ark., 2004). IL-4'ün aksine IL-13, yardımcı T2 lenfositlerin farklılaşmasına neden olmaz. IL-13, özellikle IL-4 üretiminin az veya hiç olmadığı durumlarda IgE'nin uygun bir şekilde üretilmesi için gereklidir (De Vries, 1998). IL-13'ün in vitro olarak pro-enflamatuvar sitokin (IL-1 ve TNF) ve kemotaktik sitokinlerin üretimini inhibe ettiği ve in vivo olarak güçlü antienflamatuvar etkilere

sahip olduğu bilinmektedir. IL-13 ve IL-4; IL-1 α ve IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α , IL-10 gibi sitokinler ile nitrik oksit üretimini inhibe ederler (Moore ve ark., 1993).

2.3. Likenler

Likenler, bir mikobiyont (mantar partneri) ile bir veya daha fazla ekolojik olarak zorunlu (obligat) biyotrof olarak fotosentez yapan tek hücreli veya filamentöz yapılı fotobiyont (fotoototrofik partnerleri: alg veya siyanobakteri) arasındaki simbiyotik ilişki ile oluşan kararlı, mutualist yaşam sergileyen ve biyolojik olarak aktif birçok düşük moleküler ağırlıklı sekonder metabolit kaynağı oluşturan mikroorganizmaların kompleks topluluklarıdır (Calcott ve ark., 2018; Molnár ve Farkas, 2010).

Likenler, kutup bölgelerinden tropik bölgelere, ovalardan en yüksek dağlara kadar çok çeşitli habitatlarda ortaya çıkar. Örneğin kayaların içinde veya yüzeyinde, toprakta, ağaç gövdelerinde ve çalılıklarda, canlı yaprakların yüzeyinde ve ahşap, deri, cam, metal, beton gibi insan yapımı ürünlerin yüzeylerinde bulunabilirler. Çoğu liken karasal ortamlarda bulunurken bazı liken türleri tatlı su akıntılarında ve deniz intertidal bölgelerinde bulunur. Ayrıca likenler aşırı sıcaklıklara, kuraklığa, su baskınlığına, tuzluluk oranına, yüksek hava kirletici konsantrasyonlarına ve besin açısından fakir, yüksek oranda nitrit bulunan ortamlara uyum sağlayarak ekstrem çevresel koşullarda da yaşayabilirler (Molnár ve Farkas, 2010).

Liken birlikteliklerinde mikobiyont gibi davranan mantar partnerleri, tüm mantarların yaklaşık % 21'lik kısmını kapsamaktadır. Tanımlanan bu dominant mikobiyontların % 98'inden fazlası Ascomycetes şubesine aittir ve tüm Ascomycetes'lerin yaklaşık % 50'si mutualist olan bu liken hayatını benimsemişlerdir. Bu mikobiyontların geriye kalan yaklaşık % 0,3'lük kısmı ise Basidiomycetes şubesine aittir ve kalanların çoğu anamorfik mantarlardır yani eşeysel üreme evresi olmayan çeşitli mantarlardır (Calcott ve ark., 2018; Huneck ve ark., 1999).

Mikobiyontlar, likenlerde fotobiyontlar için uygun bir ortam sağlama; fotosentez, hidrasyon ve gaz değişimi gibi olaylar için geniş bir yüzey alanı oluşturma; aşırı sıcaklıklar ve zararlı ultraviyole radyasyon gibi olumsuz çevresel koşullarına karşı fotobiyontu koruma ve fotobiyontun optimum ışığa maruz kalmasını sağlama; mantar

hipleri sayesinde koruyucu bir tabaka oluşturarak savunma; dış ortamdan konsantre ettiği fosfor, demir, çinko ve magnezyum gibi temel iz mineralleri ile simbiyozla besin maddesi olarak katkıda bulunma; fotobiyontlar ve liken tallusları için su ve CO₂ sağlamak gibi birçok görevi üstlenmektedir (Lo ve ark., 2019; Sigurbjörnsdóttir ve ark., 2016; Nguyen ve ark., 2013).

Likenlerin yaklaşık % 95'i iki kısımlı olup mikobiyontun fotosentetik partneri klorobiyont (yeşil algal form, kloromorf) (likenin yaklaşık % 85'i) veya siyanobiyonttan (siyanobakteriyel form, siyanomorf) (likenin yaklaşık % 10'u) sadece biri olur (Osyczka ve ark., 2021). Geriye kalan yaklaşık % 5'lik kısım ise üç kısımlıdır yani mikobiyontun fotosentetik partneri olarak klorobiyont ve siyanobiyont birlikte bulunur ve bu likenler fotosimbiyotem olarak isimlendirilirler (Simon ve ark., 2018). Fotobiyont liken oluşumuna katıldıktan sonra genellikle tek hücreli hale gelmeye teşvik edilmektedir ve eşeyli üremeleri baskılanmaktadır. Ayrıca liken oluşumu esnasında mikobiyontun hücre duvarları, fotosentezle üretilen ve bir kısmı dağılan karbonhidratların mikobiyont tarafından kullanılabilmesi için daha geçirgen hale gelir ve böylece fotobiyontlar sayesinde mikobiyontlar enerji kaynağı edinmiş olur (Kosecka ve ark., 2021).

Likenlerin yaklaşık % 98'inin fotobiyontları tür düzeyinde bilinmemekle beraber fotosentetik partner olarak 40 cins tanımlanmıştır ve bunların 25 tanesi alg (klorobiyont), 15 tanesi de siyanobakteridir (siyanobiyont). Fotobiyontlar arasında algler baskın olmasına rağmen likenlerde sadece birkaç farklı alg sınıfı tanımlanmıştır. Yeşil alg fotobiyontlarının en büyük grubunu Trebouxiophyceae oluşturmaktadır. Bir sonraki en yaygın klorobiyont ise Trentepohlia cinsinin türlerine aittir ve serbest yaşayan filamentli yeşil alglerden, türetilen ve klorofili maskeleyen turuncu bir karotenoid ile ayırt edilirler. Diğer küçük alg sınıfları ise yaygın olarak suda yaşayan likenlerde göze çarpıp bunların arasında altın alg Heterococcus ve kahverengi alg *Pteroderma maculiforme* yer almaktadır. Doygun haldeyken fotosentez yapabilen ve bunun sonucu olarak düşük ışıklı, nemli, besin açısından fakir habitatlara özellikle iyi adapte olabilen siyanobiyontlar arasında en yaygın olan fotobiyontlar ise Nostoc, Scytonema ve Rhizonema cinsine ait türlerdir. Siyanobakteriler dışında en baskın olan bakteri sınıfı Alphaproteobacteria olmasına rağmen, özellikle Burkholderiales ve Actinomycetales gibi sekonder metabolit

üretimini zengin bir şekilde gerçekleştiren bakteriler de likenlerdeki bakteri popülasyonlarına katılmaktadır (Calcott ve ark., 2018). Klorobiyontlar ve siyanobiyontlar ürettikleri birincil metabolitleri açısından birbirinden ayrılırlar. Yeşil algal fotobiyontlar birincil metabolit olarak ribitol, eritritol ve sorbitol gibi şeker alkolleri üretirken siyanobakteriyel fotobiyontlar (siyanobiyotlar) glukoz üretir. Sonuç olarak üretilmiş olan bu karbonhidratlar mantarlara aktarılır ve mantarlar tarafından başka bir şeker alkolü olan mannitola dönüştürülerek depolanır. Ayrıca siyanobiyontlar, klorobiyontların aksine, atmosferden azot fikse etme yeteneğine sahiptir ve böylece simbiyoz ek bir besin katkısı sağlarlar (Kosecka ve ark., 2021).

2.3.1. Likenler tarafından üretilen metabolitler

Likenler tarafından üretilen metabolitler, primer ve sekonder metabolit olmak üzere ikiye ayrılır. Protein, amino asit, poliol, karotenoid, polisakkarit ve vitamin yapısında olan primer metabolitler, doğrudan hayati fonksiyonlarla ilgili ürünlerdir. Poliketid, polifenol, kinon, terpenoid, ksanton, dibenzofuran, depsid, depsidon, depson, terpenoid vb. yapısında olan sekonder metabolitler ise temel hayati fonksiyonlarla doğrudan ilgili olmayan ancak likenlere birçok avantaj sağlayan ürünlerdir (Fernández-Moriano ve ark., 2016). Çeşitli liken türlerinden ve bunların kültürlü simbiyontlarından tanımlanan 1000'den fazla sekonder metabolit likenlerin çevre koşullarına uyum sağlamasında, onları korumada, hayatta kalmasına ve büyümesine destek olmada ve ekosistemle ilişkileri düzenlemesinde çeşitli görevleri üstlenmektedir (Calcott ve ark., 2018).

Nispeten düşük moleküler ağırlığa sahip olan sekonder metabolitlerin likenlerde oluşturdıkları kimyasal profil, mikobiyont ile fotobiyont arasındaki iletişimden, kültür temelli çalışmalarda karbon kaynağından, UV-radyasyonu gibi çevresel etkenlerden ve mevsim, iklim, bulunduğu bölge gibi coğrafi durumlardan etkilenmektedir (Gauslaa ve ark., 2013). Ayrıca fotobiyont, mikobiyontun sekonder metabolizması üzerinde de bir etkiye sahiptir. Bazı çalışmalarda aksenik mikobiyont kültürleri veya mikobiyont ve fotobiyont içeren ko-kültürleriyle kıyaslandığında, liken oluşumuna katılan mikobiyontların daha farklı metabolit serisi ürettiği gösterilmiştir (Wrede ve ark., 2014). Başka bir çalışmada da fotobiyontları olmadan yetiştirilen mikobiyontların, belirli koşullar altında spesifik olarak sentezledikleri sekonder liken bileşiklerinden farklı,

simbiyozda bulunmayan maddeler de sentezlediği belirtilmiştir. Ayrıca simbiyotik bakteriler tarafından üretilen sekonder metabolitlerin, simbiyotik olmayan bakterilerde nadir görüldüğü saptanmıştır (Brunauer ve ark., 2007).

Üretilmiş olan bu metabolitlerin % 15,5'inin mantar ve % 17,6'sının bakteri orjinli olduğu, % 7,6'sının mantar ve bakteri bileşiklerine benzer olduğu ve %59,3'ünün ise kültürlenebilir bakteri ve mantarların ürettiği bileşiklerle alakasız olduğu belirlenmiştir. Bakteri orjinli bileşiklerden sadece % 12'si tatlı su siyanobakteri örnekleri tarafından üretilen bileşiklere benzemektedir. Siyanobiyontlar 1.100'den fazla eşsiz sekonder metabolit üretmektedir ve genomları sıklıkla yüksek sayıda biyosentetik küme içerir. Sekonder metabolit üretimine ayrıca büyük katkı sağlayan bakteri popülasyonları Burkholderiales ve Actinomycetales cinsleridir. Ancak izole edilebilen liken sekonder metabolitlerinin büyük çoğunluğu mantar orjinlidir (Calcott ve ark., 2018).

Liken metabolitleri poliketit yolu (asetil – polimalonil yolu), mevalonik asit yolu ve şikimik asit yolu olmak üzere üç farklı biyosentez yolundan biri tarafından üretilmektedir. Sekonder metabolitlerin çoğu ise poliketit yolağından, geri kalan kısımlar ise mevalonik asit ve şikimik asit yollarından üretilmektedir (Stocker-Wörgötter, 2008).

Likenlerde alt ve üst korteks, alg tabakası ve medüller olarak adlandırılan kısımlar göze çarpmaktadır. Mikobiyontlar tarafından üretilen metabolitler kortekste veya medüller katman içerisinde birikirler. Ayrıca çeşitli sekonder metabolitler, mantar hiflerinin dış yüzeylerinde hücre dışı minik kristaller oluşturacak şekilde bulunurlar. Bu konumlandırılma durumları da simbiyotik hayata katkıda bulunmaktadır. Örneğin korteks tabakasında bulunan kortikal liken bileşikleri, alg tabakası için bir çeşit ışık filtresi olarak kabul edilmektedir (Molnár ve Farkas, 2010).

2.3.2. Liken sekonder metabolitlerinin genel etkileri

Deneyssel yöntemlerle liken sekonder metabolitleri hakkında birçok bilgi edinilmesine rağmen simbiyotik yaşamdaki işlevleri hakkında hala net bilgiler elde edilememiştir. Yapısal olarak birbirlerine çok benzer olan metabolitler arasında bile çok farklı biyolojik etkilerin olduğu gözlemlenmiştir. Birçoğunun da çoklu biyolojik aktivite

sergilediği bilinen bu metabolitlerin liken talluslarını zararlı otlara, patojenlere, rakiplerine ve yüksek UV ışınması gibi dış faktörlere karşı koruduğu düşünülmüştür. Araştırmalar sonucunda ise genel fonksiyonlarının antioksidan aktivite, simbiyoz gelişimi, metal homeostazisi ve kirlilik toleransı, fotokoruma, allelopati, antimikrobiyal, antiviral ve antifungal aktivite, antiherbivor ve böcek öldürücü aktivitesi, antikanser aktivitesi, antipiretik ve analjezik etki olduğu belirlenmiştir (Molnár ve Farkas, 2010).

Antioksidan aktivite

Hidroksil radikali, süperoksit anyonu ve hidrojen peroksit gibi reaktif oksijen türleri ve nitrik oksit gibi reaktif azot türleri hücrelerde kimyasal süreçlerde önemli rol oynamasına rağmen bu serbest radikaller hücrelerde proteinlere, nükleik asitlere ve hücre zarındaki doymamış yağ asitlerine saldırarak hasara neden olmaktadır. Bu serbest radikallerin zarar verici etkileri ise çeşitli antioksidan savunma sistemleri tarafından giderilmeye çalışılmaktadır. Bu radikaller ve antioksidan savunma sistemleri arasında denge kurulamadığı takdirde hücrelerde oksidatif stres durumu meydana gelmektedir. Likenlerde ise bu oksidatif stres durumu liken talluslarında meydana gelir ve sekonder metabolitler, UV ışığı tarafından üretilen serbest radikallere karşı koruma sağlar (Toledo Marante ve ark., 2003). Bu yüzden oksidatif stres durumuna karşı likenler bunu elemine etmek için sekonder metabolit üretimine yönelirler. Örneğin Antarktika'daki düşük sıcaklık, kuraklık, kış karanlığı, yüksek UV-B ve güneş ışını gibi ekstrem koşullar oksidatif stresin artmasına neden olur. Bunun sonucu olarak da Antarktika likenlerinin daha fazla miktarda antioksidan madde içerdiği ve bu madde içeriğinin tropik ve ılıman likenlerinkinden daha yüksek antioksidan aktiviteye sahip olduğu gösterilmiştir (Harrisson ve ark., 1989). Bu maddeler fenolik grup içerdiklerinden dolayı zararlı olan bu serbest radikalleri yok edebilme yeteneğine sahiptirler. Dolayısı ile liken ve liken metabolitlerinin doğal antioksidanlar için yeni kaynak oluşturabileceği düşünülmektedir (Molnár ve Farkas, 2010).

Metal homeostazı ve kirlilik toleransına etkisi

Metal homeostazında ve kirlilik toleransında genel bir rol oynayan liken sekonder metabolitleri ağır metal birikimine karşı hassas olup bu hassasiyetleri türe özgüdür (Molnár ve Farkas, 2010). Ağır metallere maruz kalan likenlerde bazı sekonder

metabolitlerinin miktarının azaldığı bazılarının ise ağır metallerin zararlı etkilerini ortadan kaldırmak için metabolit miktarlarının arttığı çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir (Hauck, 2008; Hauck ve Huneck, 2007). Bu çalışmalar doğrultusunda bu liken metabolitlerinin belirli metal katyonlarının alımını teşvik ederek likenlerde metal homeostazisini kontrol ettiği, diğerlerinin adsorpsiyonunu azalttığı ve böylece likenlerin kirli alanlarda ağır metallerle karşı toleransının arttığı belirlenmiştir (Molnár ve Farkas, 2010).

Fotokoruma

Likenler, yüksek ışık seviyelerine ve UV ışınlarının zararlı etkilerine karşı klorobiyontlarını korumak için alg tilakoid membranlarındaki ksantafil döngüsü ve liken metabolitlerinin ışık taraması ve UV-B koruması gibi stratejiler kullanmaktadır. Örneğin ışık tarama stratejisinde kortikal kısımda biriken liken bileşikleri sayesinde üst korteksin opaklığı artmakta ve bunun sonucunda alg katmanına ulaşan yüksek olay ışması azaltılmaktadır. Burada görev alan ışık tarama pigmentleri (parietin, usnik asit, vulpinik asit gibi), gelen ışığı emerek fotobiyontu yoğun radyasyondan korumaktadır ve alg katmanına ulaşan güneş ışınlarını düzenlemektedir (Solhaug ve Gauslaa, 1996). Ayrıca fotosentezi inhibe eden ve DNA'ya zarar veren UV-B ışınları, birkaç liken sekonder metabolitleri (atranorin, kalisin, pinastrik asit, pulvinik asit, rizokarpik asit, usnik asit, vulpinik asit gibi) tarafından güçlü bir şekilde emilerek bu ışınlarla karşı liken bileşikleri filtre görevini üstlenmektedir. Bu metabolitlerin sentezini ise UV-B ışınları tetiklemektedir (Carter ve ark., 2007). Ayrıca UV-B ışınlarına karşı fotokoruma sağlayan bazı liken sekonder metabolitlerinin (atranorin) floresans karaktere sahip olmalarından dolayı bu bileşiklerden yayılan ışıklar algler tarafından fotosentezde kullanılarak fotobiyont için fayda sağlamaktadır (Thune ve Solberg, 1980).

Allelopati

Liken sekonder metabolitleri; ışık, substrat, besin ve su için rekabet eden komşu likenlerin, yosunların ve vasküler bitkilerin yanı sıra mikroorganizmaların gelişimini ve büyümesini etkileyerek allelopatik ajan (allelkimyasallar olarak adlandırılır) olarak işlev göstermektedir. Bu allelopatik ajanlar ortama salınarak diğer organizmaların fotosentez, solunum, terleme, protein ve nükleik asit sentezi, iyonların zardan taşınımı ve iyon zarı

geçirgenliği gibi temel hücresel fonksiyonları etkileyebilmektedir. Örneğin liken birlikteliğine katılmayan diğer mantarların istilasına karşı vulpinik asit ve evernik asit, saldıran mantarlarda aksospor germinasyonunu engelleyerek etki göstermektedir. Liken metabolitleri, bitkiler üzerindeki allelopati özelliğini bitkilerin büyümesini inhibe ederek veya büyük ölçüde geciktirerek göstermektedir (Macias ve ark., 2007).

Antimikrobiyal aktivite

Likenler doğadaki patojenlerin çoğuna karşı antimikrobiyal, antiviral ve antifungal olacak şekilde savunma sağlayan sekonder metabolitler sentezlemektedir. Bunlara örnek olarak fisodik asit, atranorin, lekanorik asit, usnik asit, evernik asit ve vulpinik asit verilebilir. Bu sonuçlara göre liken sekonder metabolitleri, antibiyotiklere direnç gösteren mikroorganizmalara karşı antimikrobiyal ajan olarak yeni kaynak oluşturma potansiyeline sahiptir (Schmeda-Hirschmann ve ark., 2008).

Antiherbivor ve böcek öldürücü aktivitesi

Likenler böcekler, akarlar, salyangozlar, sümüklü böcekler, lepidopteran larvaları, karibu ve ren geyiği gibi herbivorlar tarafından besin olarak tüketilmektedir. Ancak bu duruma likenlerin bitki örtüsü, muhtemelen düşük beslenme kalitesi, kendilerine özgü yapısal özellikleri ve savunma bileşikleri sentezlemesi nedeniyle nadir olarak rastlanmaktadır. Ayrıca herbivorların gıda olarak likenleri tercih etmelerinde de liken sekonder metabolitleri önemli bir rol oynamaktadır. Bu yüzden zararlı sentetik kimyasalların pestisit olarak kullanımı yerine doğal ve çevreye daha az zararlı etkisi olduğu bilinen bu liken sekonder metabolitlerinin iyi birer pestisit olabileceği düşünülmüştür (Asplund ve Gauslaa, 2008).

Antikanser etkisi

DNA'ya zarar vermeden ve hastanın ilerleyen yaşamında ikincil malignitelerin gelişimine neden olmayan yan etkilerin az olduğu kanser tedavilerinin araştırılması büyük ilgi odağı haline gelmiştir. Bu nedenle doğal ortamlarda bulunan daha az yan etkisi olabilecek yeni antikanser ilaçları araştırılmaya başlanmıştır. Birçok liken sekonder metabolitinin de antikanser etkisinin varlığı incelenmiş ve saptanmıştır. Bunlara örnek olarak, usnik asit, atranorin, parietin, salazinik asit, evernik asit, vulpinik asit, difraktaik

asit, lekanorik asit, lobarik asit gibi birçok sekonder metabolit verilebilir. Bu liken sekonder metabolitlerinin ise çeşitli antikanser mekanizmalarını kullanarak bu etkiyi sağladığı gösterilmiştir (Kumar ve ark., 2014; White ve ark., 2014).

Antipiretik ve analjezik etki

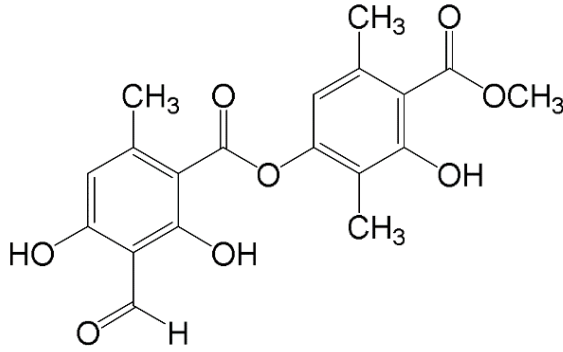
Bazı liken sekonder metabolitlerinin ağrıyı etkili bir şekilde hafiflettiği ve bazı memelilerde ateş ve enflamasyonu azalttığı gösterilmiştir. Örneğin usnik asit, sıçanlarda pençe ödemi azalttığı ve önemli derecede doza bağlı olarak antienflamatuvar etki gösterdiği belirlenmiştir (Vijayakumar ve ark., 2000). Bir başka çalışmada ise difraktaik ve usnik asitlerinin farelerde analjezik etkiye, usnik asidin ise lipopolisakkaritlerin tetiklediği ateşe karşı antipiretik etkiye sahip olduğu gösterilmiştir. Bu yüzden liken sekonder metabolitlerinin insanlar üzerinde de etkili olabileceği düşünülmektedir (Okuyama ve ark., 1995).

Birçok yararlı biyolojik aktiviteye sahip olan bu liken sekonder metabolitlerinin kullanımını kısıtlayan birçok durum söz konusudur. Likenlerden elde edilecek olan bileşiklerin aydınlatılması ve çalışmalarda kullanılabilmesi için gereken yeterli miktarlarda bileşiklerin, oldukça yavaş büyüyen ve kompleks yapıya sahip olan likenlerden saflaştırılmasının zor ve zahmetli olmasından dolayı çalışmaların yürütülmesi oldukça zorlaşmaktadır. Ayrıca liken ve liken bileşiklerinin (atranorin, difraktaik asit, evernik asit, lobarik asit vb.) hassas kişilerde alerjik reaksiyonlara (alerjik dermatit, fotokontakt dermatit, eritem, kaşıntı, ölçeklenme, rinit ve astım vb.) neden olması da likenlerin kullanımını kısıtlamaktadır (Calcott ve ark., 2018; Molnár ve Farkas, 2010).

2.3.3. Çalışmamızda kullanılan liken sekonder metabolitleri

Atranorin

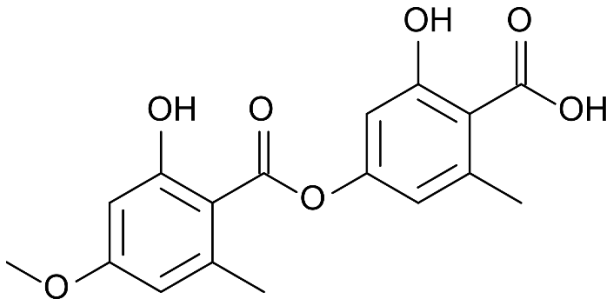
$C_{19}H_{18}O_8$ kapalı formülüne sahip atranorin, depsidler grubunun önemli bir üyesi olup, çeşitli liken türlerinde bulunmaktadır (Şekil 2) (Studzinska-Sroka ve ark., 2017). Genellikle, *Stereocaulon cacspitorim*, *Everniastrum vexans* ve *Parmatrema* türleri gibi çeşitli likenlerde rapor edilen bir liken sekonder metabolitidir. Atranorinin biyolojik özellikleri arasında antimikrobiyal ajanlar, antinosiseptif, antienflamatuvar, antioksidan, antikanser ve fotokoruyucu kapasite bulunmaktadır (Studzinska-Sroka ve ark., 2017).



Şekil 2. Atranorinin moleküler yapısı (Studzinska-Sroka ve ark., 2017)

Evernik Asit

$C_{17}H_{16}O_7$ kapalı formülüne sahip olan depsid yapısındaki evernik asit, *Evernia prunastri* ve *Pseudoevernia furfuraceae* gibi likenlerde bulunan bir sekonder metabolittir (Şekil 3) (Wang ve ark., 2018; Fernández-Moriano ve ark., 2017). Bu bileşiğin antioksidan, antimikrobiyal ve antikarsinogenik etkiler gösterdiği belirtilmiştir (Ristic ve ark., 2016). Ayrıca evernik asidin likenlerin yakın çevrelerinde yaşayan yosunların büyümesini ve spor üretimini inhibe ederek alleopatik etki gösterdiği saptanmıştır (Calcott ve ark., 2018).

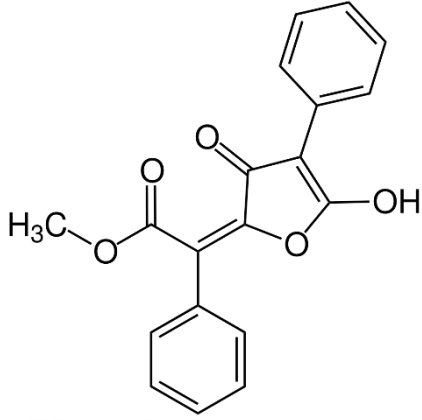


Şekil 3. Evernik asitin moleküler yapısı (Wang ve ark., 2018)

Vulpinik Asit

Vulpinik asit ($C_{19}H_{14}O_5$), ilk olarak *Letharia vulpina*'dan izole edilen furan yapısındaki bir lakton olup kimyasal yapısı ilk olarak 1881'de formüle edilmiştir (Şekil 4) (Kılıç ve ark., 2018; Koparal ve ark., 2015). Şikimik asit yolağı üzerinden sentezlenen

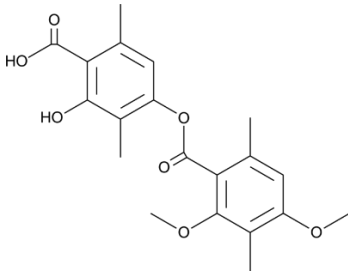
sarı renkli bu bileşik ilk olarak 1925 yılında Mazza tarafından izole edilmiştir (Kılıç ve ark., 2018).



Şekil 4. Vulpinik asitin moleküler yapısı (Kılıç ve ark., 2018)

Diffraktaik Asit

Başta *Usnea* cinsine ait liken türleri olmak üzere *Usnea diffracta*, *Protousnea magellanica*, *Usnea subcavata*, *Usnea longissima* türlerinden izole edilen difraktaik asit ($C_{20}H_{22}O_7$) depsid grubuna ait bir sekonder metabolit olup antioksidan ve mide koruyucu, bağışıklık uyarıcı, antikanserojenik, analjezik ve antipiretik etkiler gösterdiği kanıtlanmıştır (Şekil 5) (Wang ve ark., 2018; Okuyama ve ark., 1995).



Şekil 5. Diffraktaik asitin moleküler yapısı (Wang ve ark., 2018)

2.4. Çalışmanın Amacı

Son zamanlarda enflamasyon sonucu oluşan organ hasarını asgari düzeye indirecek fitokimyasallar ile ilgili çalışmaların sayısı giderek artmaktadır. Bu amaçla kullanılan maddelerin birçoğu sahip oldukları antioksidan ve antienflamatuvar aktivitelerden dolayı bu etkiyi göstermektedir. Enflamasyon sonucu oluşan doku ve

organ hasarını önlemede çeşitli fitokimyasalların koruyucu rolü araştırılmıştır. Liken kaynaklı ikincil metabolitlerin antibakteriyel, antifungal, antioksidan, antiviral, antienflamatuvar ve antikanser gibi biyolojik etkinliklerini ortaya çıkarmakta ve bu konuyla ilgilenecek araştırmacıların dikkatini çekmektedir. Yaptığımız çalışmada, liken sekonder metabolitlerinden atranorin, difraktaik asit, evernik asit ve vulpinik asitin lipopolisakkarit ile indüklenen makrofaj hücrelerindeki antienflamatuvar aktivitesini araştırdık.



3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereç

3.1.1. Hücre hattı

Çalışmamızda kullanılan RAW264.7 fare makrofaj hücre hattı Sayın Prof. Dr. Ahmet CUMAOĞLU'nun (Erciyes Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı) hücre kültürü koleksiyonundan temin edildi.

3.1.2. Analizlerde kullanılan kimyasallar

[3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)]-2,5-difeniltetrazolyum bromür	Sigma
Atranorin	Carbosynth
Bidistile su	Sigma
Diffraktaik Asit	Carbosynth
Disodyum hidrojen fosfat heptahidrat	Merck
DMSO	Merck
EDTA	Merck
Evernik Asit	Carbosynth
Fetal Bovine Serum (FBS)	Sigma
Hidroklorik asit	Merck
L-Glutamin	Sigma
Mouse IL-10 ELISA kiti	Elabscience
Mouse IL-1 β ELISA kiti	Elabscience
Mouse IL-6 ELISA kiti	Elabscience
Mouse Nitrik Oksit ELISA kiti	Elabscience
Mouse Prostaglandin E ₂ ELISA kiti	Elabscience
Mouse TNF- α ELISA kiti	Elabscience
Penisilin	Sigma
Potasyum dihidrojen fosfat	Merck
Potasyum klorür	Merck
RPMI 1640 medium	Sigma
Sodyum hidroksit	Merck
Sodyum klorür	Merck
Streptomisin	Sigma
Tripan Blue	Sigma
Trypsin-EDTA çözeltisi	Sigma

Tris-HCl
Vulpinik Asit

Nzytech
Carbosynth

3.1.3. Kullanılan cihazlar

Buzdolabı	Vestel
Çeker Ocak	Biolab
Derin Dondurucu (-20 °C)	Vestel
Derin dondurucu (-80 °C)	Elcold
Distile Su Cihazı	Millipore
ELISA mikropate okuyucu	VersaMax
Etüv	Nüve
Hassas Terazı	Mettler Toledo
İnverted mikroskop	Euromex
Işık mikroskobu	Olympus
Isıtıcılı Manyetik Karıştırıcı	Wisd
Karbondiyoksit tüpü	Tüpaş
Karbondiyoksitli inkübatör	Biolab
Laminar Akım Kabini (Class II)	Nüve
Mikropipet Seti	Brand
Mini santrifüj	Nüve
Otoklav	Nüve
Otomatik Pipetör	Isolab
pH Metre	Mettler Toledo
Sıvı Azot Stok Tankı	Thermo
Soğutmalı Santrifüj	Nüve
Su Banyosu	Wisd
Ultrasonik Su Banyosu	Wisd
UV Lambası	Philips
Vorteks	Wisd

3.2. Yöntem

3.2.1. Hücre kültürü ortamı

Hücre kültürü çalışmaları steril laminar akım kabiniinde (Class II) gerçekleştirildi. Hücre kültürü çalışmalarına başlamadan önce kabin % 70'lik etil alkol ile silindi. UV

ışıkta etkilenmeyen ve kabin içerisinde kullanılacak olan malzemeler kabin içerisine bırakılarak 15 dakika UV ışığına maruz bırakıldı. Çalışma sonunda kabin % 70'lik etil alkol ile tekrar silindi ve kabinin kapağı kapatıldı. Kabin ve hücre kültürü odası 1 saat UV ışığa maruz bırakıldı.

3.2.2. Dondurulmuş hücrelerin çözündürülmesi

Çalışmamızda kullanılan RAW264.7 makrofaj hücre hattı, çalışma yapılana kadar sıvı azot içerisinde (-196°C) saklandı. Çalışmaya başlamadan önce dondurulmuş hücreler 37°C sıcaklığındaki su banyosunda 1-2 dakika (yaklaşık 90 saniye) içerisinde çözüldü.

3.2.3. Hücrelerin ekilmesi

Hücre Besiyeri Ortamı (Komplete Medyum): Hücre kültüründe kullanılan hücre besiyeri ortamı şu şekilde hazırlandı;

RPMI 1640 besiyeri ortamı	100 mL
Fetal sığır serumu	% 10
L-Glutamin	2 mM
Penisilin	100 U/mL
Streptomisin	100 µg/mL

Tüm bu bileşenler otoklavlanmış kapaklı rekatif şişelerinin içerisinde hazırlanarak iyice karıştırıldı ve çalışma gününe kadar +4 °C'de saklandı. Çalışmamızda kullanılan RAW264.7 makrofaj hücre hattında kriyoprotektif ajan olarak % 10'luk dimetil sülfoksit (DMSO) bulunmaktaydı. Bu DMSO'yu ortamdan uzaklaştırmak için çözöürölen hücreler 15 mL'lik falkon tüplere konuldu ve üzerine 9 mL komplete medyum eklenerek 1000 rpm'de 3 dk santrifüj edildi. Süpernatant vakum ile hassas bir şekilde uzaklaştırıldıktan sonra altta kalan pellet üzerine taze hazırlanmış komplete medyumdan 6 mL eklenerek hücrelerin iyice süspande olması sağlandı ve 25 cm²'lik flasklara ekim yapılarak % 5 CO₂ ve % 95 hava içeren 37°C'deki inkübatöre kaldırıldı (Agrawal ve ark., 2021).

3.2.4. Alt kültürleme (Pasajlama)

Pek çok hayvan hücre hattı plastik ya da cam yüzeye yapışarak, tek bir hücre tabakası oluşturacak şekilde büyümektedir. Yüzey hücrelerle tam olarak kaplandığında (konflüe kültür) büyüme önce yavaşlar, sonra durur. Hücrelerin büyümeye devam etmesi için düzenli aralıklarla alt kültürleme (pasajlama) yapılması gerekmektedir. Alt kültürleme, hücre-hücre ve hücre-substrat arasındaki bağların tripsin, dispaz ya da kollajenaz gibi proteolitik enzimlerle kırılmasını gerektirir. Birbirlerinden ve tutundukları yüzeyden ayrılmış hücreler sayılır, istenilen dilüsyon yapılarak taze besiyeri içeren yeni kültür ortamına (flask, petri kabı vs.) alınır. Yeni kültür kabında hücreler önce yüzeye tutunur, daha sonra büyümeye ve bölünmeye başlar. Başlangıçta eklenen hücre sayısına, kültür koşullarına ve hücre hattına bağlı olarak inkübasyon zamanının sonunda kültür, yeniden konflüe hale gelir ve alt pasajlama tekrarlanır. Çalışmamızda kullandığımız RAW264.7 makrofaj hücreleri % 80-90 konflüe hale geldiğinde yapıldı. Pasajlamada kullanılan çözeltiler ve hazırlanışları aşağıda belirtildi;

Stok Phosphate Buffered Saline (PBS) Tamponu (10X): 80 g NaCl, 2 g KCl, 11,5 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 2 g KH_2PO_4 son hacim 1 L olacak şekilde distile su içerisinde çözüldükten sonra, pH değeri 7,5'e ayarlandı, 121°C'de 20 dakika otoklavlanarak steril edildi ve çalışma gününe kadar oda sıcaklığında saklandı.

PBS Çalışma Tamponu (1X): Hücre kültürü çalışmasından önce 10X stok PBS tamponu 1:10 oranında steril distile su ile seyreltilerek hazırlandı ve aynı gün içerisinde kullanıldı.

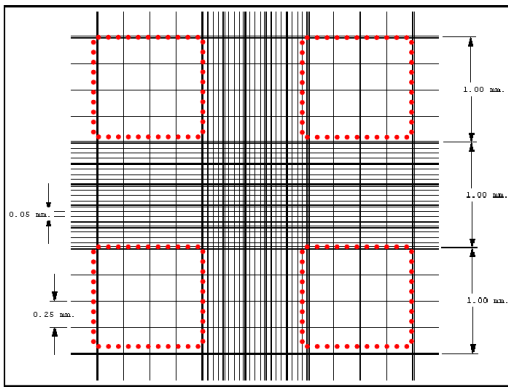
1X Trypsin-EDTA Çözeltisi: Ticari olarak elde edilen Trypsin-EDTA, steril 1X PBS ile 1:10 oranında seyreltilerek hücre pasajlamasında kullanıldı.

Çalışmada RAW264.7 makrofaj hücreleri % 80-90 konflüe hale geldiklerinde 25 cm^2 'lik flasklardaki kültür besiyeri uzaklaştırıldı, hücreler 5 mL 1X PBS tamponu ile yıkandı ve 1 mL 1X tripsin-EDTA çözeltisi eklenerek 1 dakika boyunca hücrelerin üzerinde bekletildi. Daha sonra flasklar CO_2 'li inkübatörde hücreler yüzeyden ayrılana kadar (yaklaşık 2 dakika) bekletildi. Hücrelerin PBS tamponu ile yıkanmasının sebebi, kültür ortamından tripsinin inhibitörü olan fetal sığır serumunu ortamdaki

uzaklaştırmaktır. İnkübasyon sonrası 5'er mL komplete medyum ile hücreler falkon tüp içerisinde toplandı. Tripsinin etkisinin ortadan kaldırılması için tripsinizasyon işleminden sonra hücrelere eklenen medyumun içeriğinde mutlaka % 10'luk fetal sığır serumu bulunmalıdır. Komplete medyum eklenen hücre süspansiyonu 1000 rpm'de 3 dakika santrifüj edilerek hücreler çöktürüldü. Süpernatant vakum ile hassas bir şekilde uzaklaştırıldıktan sonra altta kalan pellet üzerine komplete medyumdan 1 mL eklenerek hücrelerin iyice süspanse olması sağlandı. Hücre süspansiyonundan bir miktar örnek alınarak hücre sayımı yapılır. Hücre sayımı yapıldıktan sonra 25 cm²'lik flasklara uygun sayıda (yaklaşık 2×10^5) hücre aktarıldı ve toplam besiyeri hacmi 5 mL'ye tamamlandı. Yaptığımız çalışmada hücre sayımı ile yapılan alt kültürlemede pasajlama oranı genelde 1:3 olarak bulunmuştur (Agrawal ve ark., 2021).

3.2.5. RAW264.7 makrofaj hücrelerinin sayılması ve canlılık testi

Hücre kültürü testlerinde her kuyucukta eşit sayıda hücre olmalıdır. Çalışma öncesinde mL'deki canlı hücre sayısının hesaplanarak belirlenen sayıda hücrenin kuyucuklara alınması gerekmektedir. Bu amaçla hücreler tripan mavisi ile boyanarak canlı-ölü hücre sayımı yapılmaktadır. Hücrelerin sayımı için neubauer lamı kullanıldı. Neubauer lamı kalın, düz, sayım odacıklıdır. Neubauer lamı üzerinde 16'şar kareden oluşan, hacmi 0,1 µL olan toplam dört alan bulunmaktadır. Şekil 6'da neubauer lamının sayım alanları şematize edilmiştir.



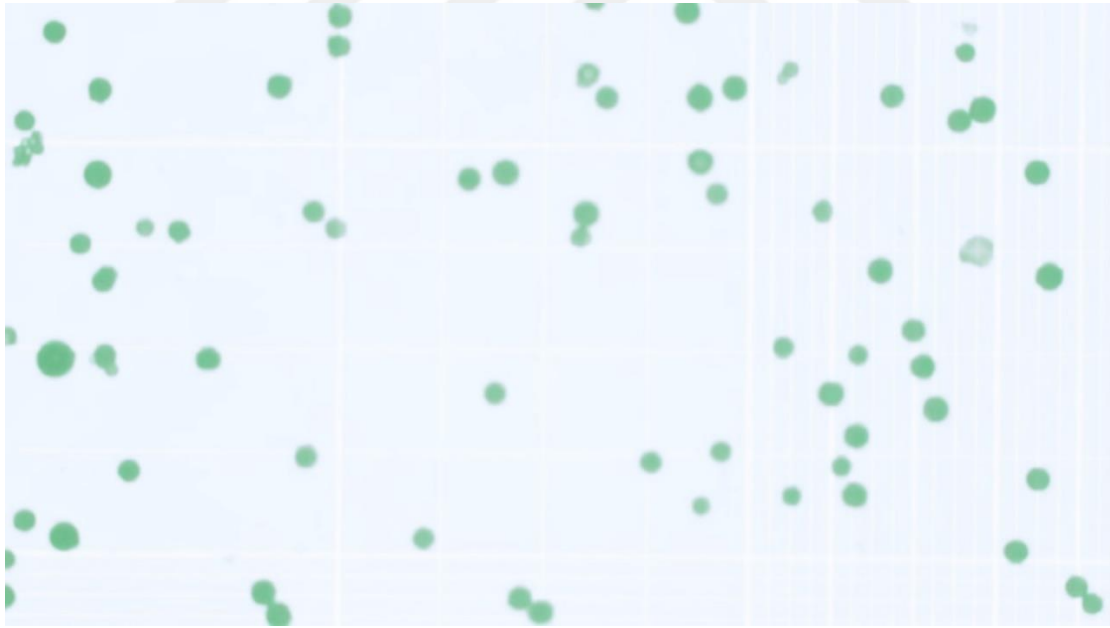
Şekil 6. Neubauer lamının sayım alanı

Tripsinizasyon sonrası falkon tüplere toplanan hücrelerin 10 µL' si 10 µL tripan blue ile karıştırılarak karışım 5 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Karışım, pipet ile tekrar karıştırılarak 10 µL'si alındı ve neubauer lamına aktarıldı. Toplam dört alandaki

seçili kare çizgisi içindeki hücreler ışık mikroskobu altında 10x objektif kullanılarak sayıldı. Sayılan alanlardaki toplam hücre sayısı dörde bölünerek alan başına düşen ortalama hücre sayısı bulundu. Hücreler çok yoğun halde ise süspende hücreler seyreltilerek bunun sonucunda dilüsyon katsayısı ile çarpıldı. Neubauer lamında dört büyük karedeki hücreler sayılıp ortalaması alındıktan sonra mililitredeki hücre sayısı aşağıdaki formüle göre hesaplandı (Tanaka ve ark., 1998);

$$1 \text{ mL'deki hücre sayısı (hücre/mL)} = \text{Ortalama canlı hücre sayısı} \times \text{Dilüsyon Faktörü} \times 10^4$$

Tripan mavisi boyama yöntemi ile canlı-ölü hücrelerin sayısı ve canlı-ölü hücrelerin yüzdesi belirlenebilmektedir. Ölü hücrelerde meydana gelen membran hasarı sonucunda işlev görmeyen $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPaz}$ pompası nedeniyle boya membran tarafından absorblanmakta ve dışarı atılamamakta, dolayısıyla hücreler mavi renkte görülmektedir. Tripan blue ile boyanan hücrelerden canlı olanların membranları intakt durumda olduğundan küçük, yuvarlak ve refraktil yapıda olup sarı-yeşil renkte, ölü olanlar ise büyük ve şiş yapıda olup mavi renkte görülürler (Şekil 7) (Tanaka ve ark., 1998).



Şekil 7. RAW264.7 makrofaj hücrelerinin tripan mavisi ile boyanması (100x büyütme)

3.2.6. RAW264.7 makrofaj hücrelerinin dondurulması ve saklanması

Pasajlanan hücrelerin bir kısmı daha sonra çalışılmak üzere dondurularak saklandı. Hücreleri dondurmak için öncelikle hücrelerin üzerindeki besiyeri

uzaklaştırıldı. 5 mL PBS ile hücreler yıkandıktan sonra flasklara, 1 mL tripsin-EDTA çözeltisi eklendi. Eklenen tripsin 1 dakika boyunca hücreler üzerinde gezdirildi ve flasklar inkübatörde 2 dakika bekletildi. İnkübasyon sonrası 5'er mL % 10 FBS içeren RPMI 1640 ile hücreler falkon tüp içerisinde toplandı ve hücre süspansiyonu 400 g' de 5 dakika santrifüjlendi. Santrifüj sonunda süpernatant kısmı 1 mL kalacak şekilde uzaklaştırıldı. Hücreler 1 mL besiyeri içinde sulandırılarak sayıldı. Hücre sayısı mililitrede 2×10^5 olacak şekilde %20 FBS içeren RPMI 1640 ile seyreltildi ve kriyoviallere 900 μ L bölüştürüldü. Buz üzerine alındı ve son hacminin %10'u olacak şekilde DMSO damla damla eklendi. DMSO eklenirken parmak ucuyla kriyovialler karıştırıldı. Kriyoviallerin kapakları kapatıldıktan sonra +4°C'de 1 saat, -20°C'de 1 saat ve daha sonra -80 °C'de 1 gece bekletildi. Kısa süre içinde kullanılacak hücreler -80°C de saklanmaya devam edildi. Uzun süre kullanılmayacak hücreler azot tankının buharında saklandı (Agrawal ve ark., 2021).

3.2.7. Stok ve çalışma çözeltilerinin hazırlanması

Öncelikle her dört madde (atranorin, diffraktaik asit, evernik asit ve vulpinik asit) için 1'er mM konsantrasyonunda stok çözeltiler ve bu stok çözeltilerden hareketle farklı konsantrasyonlarda günlük çalışma çözeltileri hazırlandı (Cardile ve ark., 2017).

Atranorin stok çözeltisi (1mM) (MW: 374.34 gr/mol): Bir miktar RPMI 1640 steril falkon tüpüne alındı, üzerine 3,743 mg atranorin eklendi, toplam hacim 10 mL olacak şekilde RPMI 1640 eklendi ve vortekslendi.

Farklı konsantrasyonlardaki atranorin çözeltilerinin hazırlanışı: 1 mM'lık stok çözeltiyle seri dilüsyon yöntemi kullanılarak 12,5, 25, 50, 100 ve 200 μ M'lık atranorin çözeltileri RPMI 1640 ile seyreltilerek hazırlandı.

Diffraktaik asit stok çözeltisi (1mM) (MW: 374.384 gr/mol): Bir miktar RPMI 1640 steril falkon tüpüne alındı, üzerine 3,744 mg diffraktaik asit eklendi, toplam hacim 10 mL olacak şekilde RPMI 1640 eklendi ve vortekslendi.

Farklı konsantrasyonlardaki diffraktaik asit çözeltilerinin hazırlanışı: 1 mM'lık stok çözeltiyle seri dilüsyon yöntemi kullanılarak 12,5, 25, 50, 100 ve 200 μ M'lık diffraktaik asit çözeltileri RPMI 1640 ile seyreltilerek hazırlandı.

Evernik asit stok çözeltisi (1mM) (MW: 332.308 gr/mol): Bir miktar RPMI 1640 steril falkon tüpüne alındı, üzerine 3,323 mg evernik asit eklendi, toplam hacim 10 mL olacak şekilde RPMI 1640 eklendi ve vortekslendi.

Farklı konsantrasyonlardaki evernik asit çözeltilerinin hazırlanışı: 1 mM'lık stok çözeltiyle seri dilüsyon yöntemi kullanılarak 12,5, 25, 50, 100 ve 200 µM'lık evernik asit çözeltileri RPMI 1640 ile seyreltilerek hazırlandı.

Vulpinik asit stok çözeltisi (1mM) (MW: 322.31 gr/mol): Bir miktar RPMI 1640 steril falkon tüpüne alındı, üzerine 3,223 mg vulpinik asit eklendi, toplam hacim 10 mL olacak şekilde RPMI 1640 eklendi ve vortekslendi.

Farklı konsantrasyonlardaki vulpinik asit çözeltilerinin hazırlanışı: 1 mM'lık stok çözeltiyle seri dilüsyon yöntemi kullanılarak 12,5, 25, 50, 100 ve 200 µM'lık vulpinik asit çözeltileri RPMI 1640 ile seyreltilerek hazırlandı.

3.2.8. Liken sekonder metabolitlerinin hücre canlılığı üzerine etkileri

Liken sekonder metabolitlerinin RAW264.7 makrofaj hücrelerinin canlılığı üzerine etkisi 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) testi ile değerlendirilmiştir. Bu yöntemde canlı hücreler tarafından tetrazolyum tuzu olan MTT boyasının indirgenmesi özelliğinden yararlanılmaktadır. Canlı hücreler, mitokondriyal enzimleriyle MTT boyasının tetrazolyum halkasını parçalayarak sarı renkli MTT boyasını mor renkli formazan ürününe dönüştürebilmektedir. Hücre içerisinde tutulan formazan kristalleri DMSO ile çözündürüldüğünde oluşan renk yoğunluğu 570 nm'de spektrofotometrik olarak ölçülür. Renk yoğunluğu ortamdaki canlı hücre sayısı ile orantılıdır. MTT testi için aşağıdaki işlemler uygulanmıştır.

Hücre sayımı yapıldıktan sonra 96 kuyucuklu hücre kültür pleytinin her kuyucuğuna 200 µL besiyeri içinde 1×10^4 hücre ekildi. 24 saat sonra pleyt inkübatörden alındı, içeriği uzaklaştırıldı. Farklı konsantrasyondaki atranorin, diffraktaik asit, evernik asit ve vulpinik asit çözeltilerinden (12,5, 25, 50, 100 ve 200 µM) her bir maddenin farklı konsantrasyonları için ayrılan beş kuyucuğa 200 µL eklenerek 37 °C'de 48 saat inkübe edildi. Kontrol grubuna sadece 200 µL RPMI 1640 eklendi. İnkübasyondan sonra pleyt içeriği hızlıca ortamdan uzaklaştırıldı ve kağıt peçete üzerine ters çevrilerek kalan

besiyerinin uzaklaştırılması sağlandı. Her kuyucuğa 200 µL RPMI 1640 eklendi ve üzerine son konsantrasyonu 0,25 mg/mL olacak şekilde 10 µL MTT boyası eklendi ve 2 saat 37 °C’de inkübe edildi. Pleyt içeriği uzaklaştırılarak tüm kuyucuklara 200 µL DMSO eklendi ve pleyt 20 dakika mikropleyt okuyucusunun çalkalayıcısında bekletildi. İnvert mikroskop altında kristallerin tamamen çözünüp çözünmediği kontrol edildi. Oluşan mor renkli bileşiğin absorbansı mikropleyt okuyucusunda 570 nm dalga boyunda, 620 nm referans dalga boyuna karşı okundu. Atranorin, difraktaik asit, evernik asit ve vulpinik asitin her bir konsantrasyonu için elde edilen absorbans değerinin referans absorbans değerine oranı 100 ile çarpılarak % hücre canlılığı hesaplandı (Li ve ark., 2012).

$$\% \text{ Hücre Canlılığı} = \frac{A_{570} \times 100}{A_{620}}$$

3.2.9. Enzim bağlı immünosorbent analizi (ELISA) çalışmaları

İnvert mikroskopta kontrol edilen RAW264.7 makrofaj hücreleri pasajlama için yeterli yoğunluğa ulaştığında, Tripsin/Etilendiamin tetraasetik asit (EDTA) uygulaması ile flasktan kaldırıldı. Daha sonra kaldırılan hücreler Neubauer lamında sayıldıktan sonra, modelimizin koşullarına göre 96 kuyucuklu plaklara, her kuyucuğa 5×10^4 hücre son hacim 200 µl olacak şekilde her koşul için 5 kuyucuğa ekim yapıldı. Ekimi yapılan 96 kuyucuklu plaklar inkübatöre kaldırıldı. İkinci gün kullanılacak olan deney ortamı hazırlandı. FBS içermeyen ve L-Glutamin, Penisilin ve Streptomisin içeren renksiz RPMI 1640 ortam hazırlandıktan sonra su banyosunda ısıtılarak deney için uygun hale getirildi. Daha sonra 96 kuyucuklu plak inkübatörden alınarak deneye başlandı.

Öncelikle kontrol, LPS ve LPS ve farklı konsantrasyonlardaki liken sekonder metabolitleri uygulanan gruplarındaki ortamlar vakum aracılığıyla çekildi. Daha sonra kontrol ve LPS gruplarına FBS içermeyen renksiz deney ortamı konuldu. LPS ve farklı konsantrasyonlardaki liken sekonder metabolitleri uygulanan gruplara ise kuyucuk başına 100 µl hacminde 12,5, 25, 50, 100 ve 200 µM konsantrasyonlarındaki atranorin, difraktaik asit, evernik asit ve vulpinik asit çözeltileri eklendi ve 1 saat boyunca bu grup inkübe edildi. Her bir sekonder metabolit için ayrı ayrı kontrol ve LPS grupları kullanıldı. 1 saatlik inkübasyon sonrasında, LPS grubundaki ortam çekilerek, kuyucuk başına 150

μl hacminde 1 $\mu\text{g/ml}$ LPS içeren deney ortamı eklendi. Yine LPS ve farklı konsantrasyonlardaki liken sekonder metabolitleri uygulanan gruplara da kuyucuk başına 50 μl hacminde 3 $\mu\text{g/ml}$ LPS (son konsantrasyon 1 $\mu\text{g/mL}$ olacak şekilde) ve 12,5, 25, 50, 100 ve 200 μM konsantrasyonlarındaki atranorin, diffraktaik asit, evernik asit ve vulpinik asit çözeltileri içeren deney ortamı eklendi ve hücreler 4 saat boyunca inkübe edildi. 4 saatlik inkübasyon sonrasında, LPS grubuna kuyucuk başına 1 $\mu\text{g/ml}$ LPS içeren deney ortamı eklendi. LPS ve farklı konsantrasyonlardaki liken sekonder metabolitleri uygulanan gruplara da 1 $\mu\text{g/ml}$ LPS ve 12,5, 25, 50, 100 ve 200 μM konsantrasyonlarındaki atranorin, diffraktaik asit, evernik asit ve vulpinik asit çözeltilerini içeren deney ortamı eklendi ve bu basamakta tüm koşullardaki kuyucukların son hacimleri 200 μL 'ye eşitlenmiş oldu. Tüm hücreler 1 saatlik inkübe edildi. Toplam 7 saatlik süreç sonrasında kuyucuklarda ki son hacimleri 200 μl olan plak inkübatörden alındı (González-Guerrero ve ark., 2013). Sonrasında hücrelerden salınan NO_x , PGE_2 , $\text{TNF-}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$, IL-6 ve IL-10 düzeyleri ELISA kit kullanılarak ve üretici firmanın çalışma protokolüne uygun olarak ölçüldü.

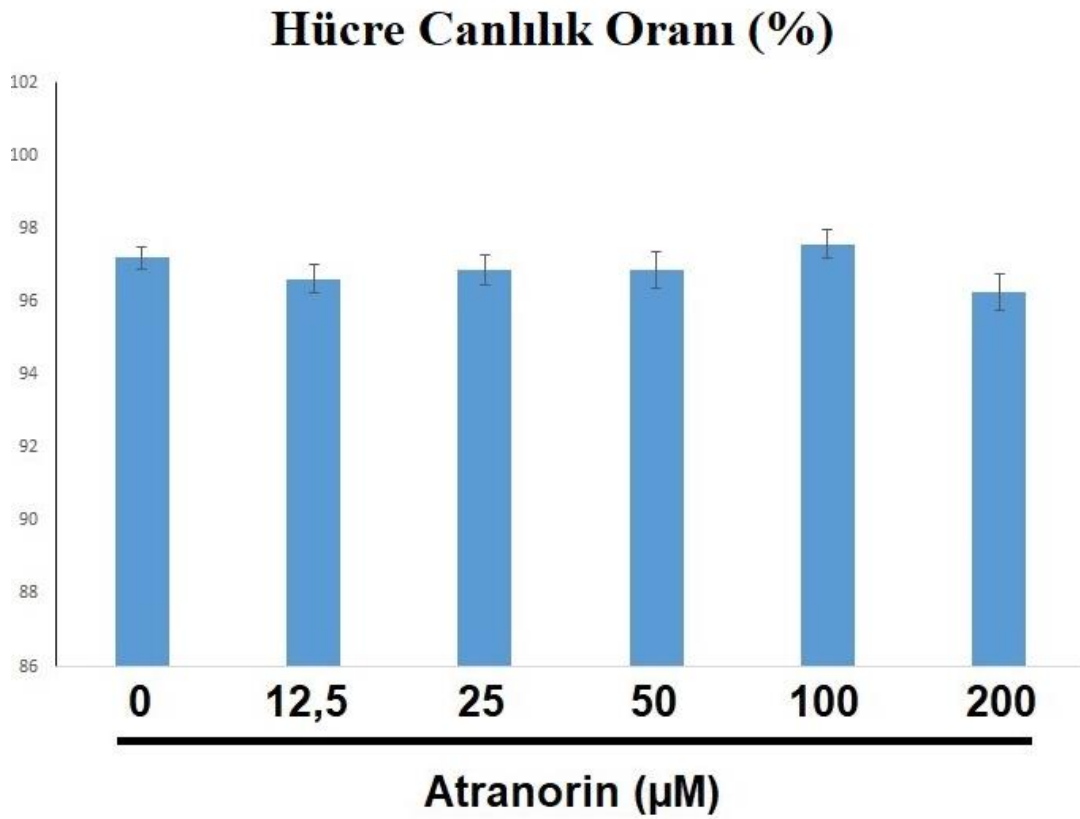
3.3. İstatistik Analiz

Çalışma sonunda elde edilen gruplara ait tüm veriler SPSS (versiyon 16.0) istatistik paket programı kullanılarak yapıldı. Gruplar arası karşılaştırmalar tekrarlanan ölçümlü varyans analizi (ANOVA) kullanılarak gerçekleştirildi. Varyans analizini takiben farklı grupları belirlemede Tukey çoklu karşılaştırma testi kullanıldı. Tüm analizlerden elde edilen ham değerler, grupların ortalaması $\pm$ standart hata şeklinde sunuldu. Hesaplamalarda istatistik anlamlılık düzeyi $p<0,05$ olarak alındı.

4. BULGULAR

4.1. Atranorin Uygulamasının Hücre Canlılığına Etkisi

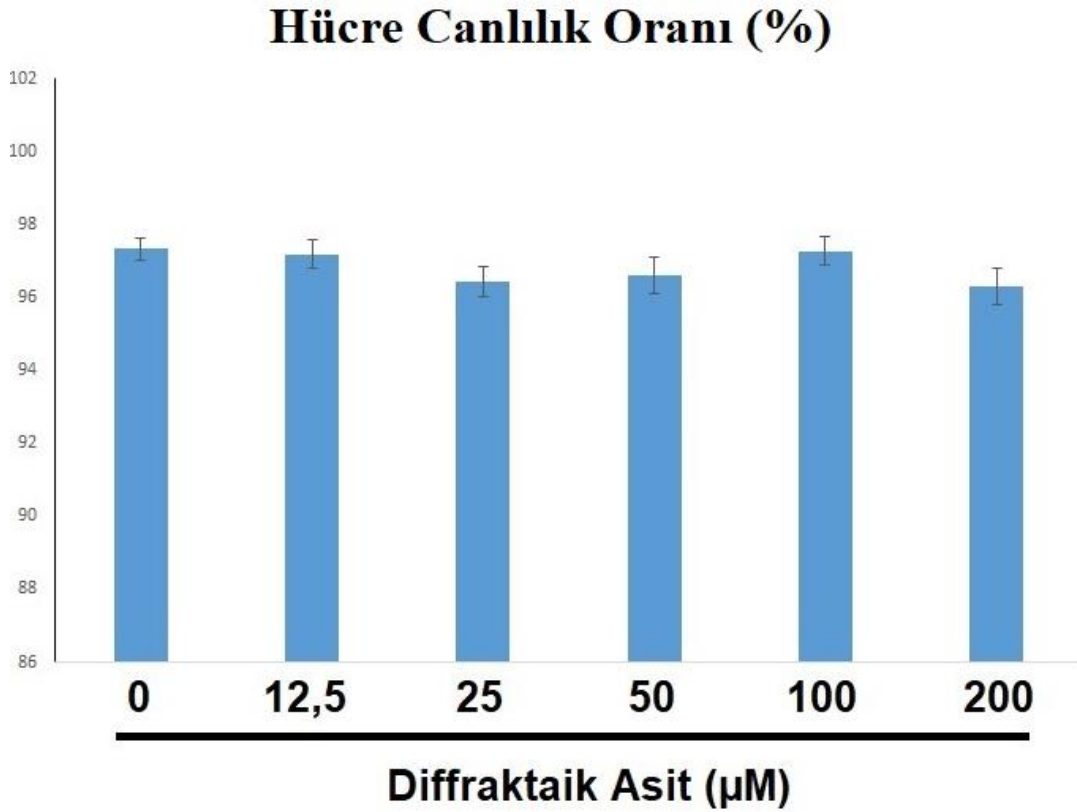
Tüm grupların hücre canlılık oranları Şekil 8’de gösterilmiştir. 0-200 μM konsantrasyonlarındaki atranorin uygulamaları hücre canlılığında önemli bir düşüşe yol açmamış olup uygulanan tüm atranorin konsantrasyonlarının RAW264.7 makrofaj hücreleri üzerindeki sitotoksisiteleri % 10’un altında bulunmuştur.



Şekil 8. Atranorin uygulamasının hücre canlılık oranlarına etkileri (%) ($n=5$).

4.2. Diffraktaik Asit Uygulamasının Hücre Canlılığına Etkisi

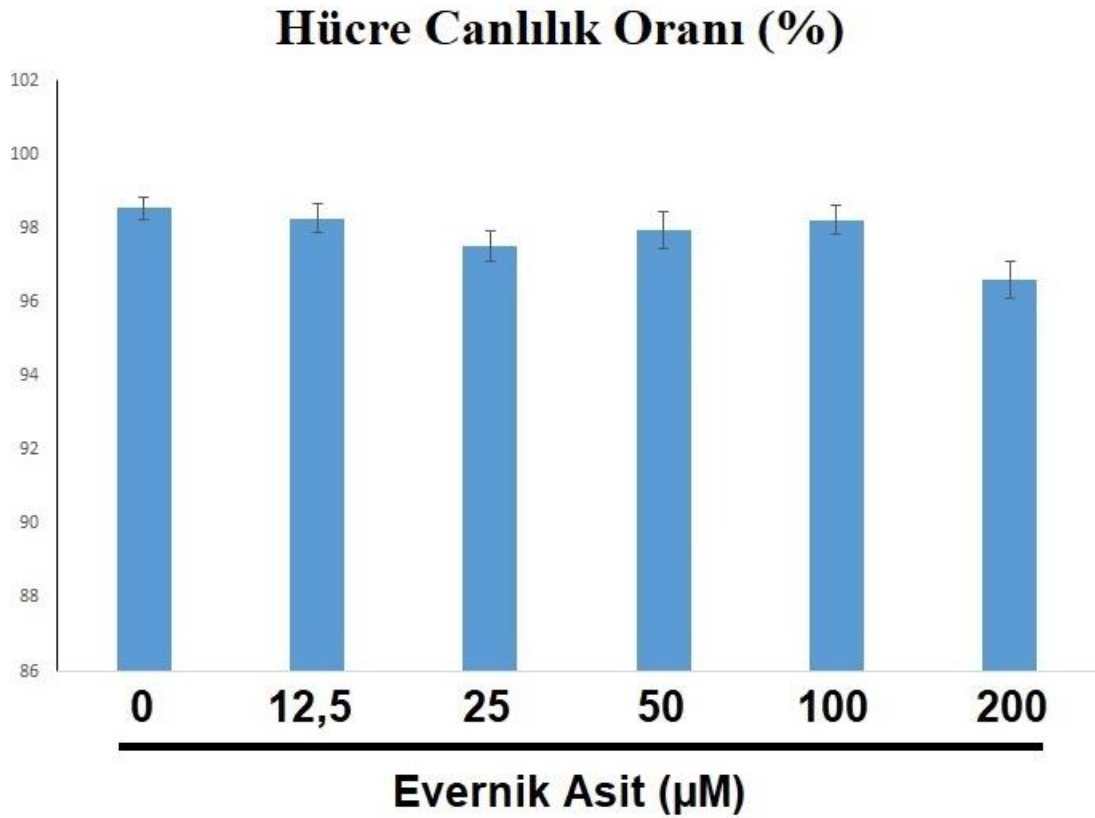
Tüm grupların hücre canlılık oranları Şekil 9’da gösterilmiştir. 0-200 μM konsantrasyonlarındaki diffraktaik asit uygulamaları hücre canlılığında önemli bir düşüşe yol açmamış olup uygulanan tüm diffraktaik asit konsantrasyonlarının RAW264.7 makrofaj hücreleri üzerindeki sitotoksisiteleri % 10’un altında bulunmuştur.



Şekil 9. Diffraktaik asit uygulamasının hücre canlılık oranlarına etkileri (%) ($n=5$).

4.3. Evernik Asit Uygulamasının Hücre Canlılığına Etkisi

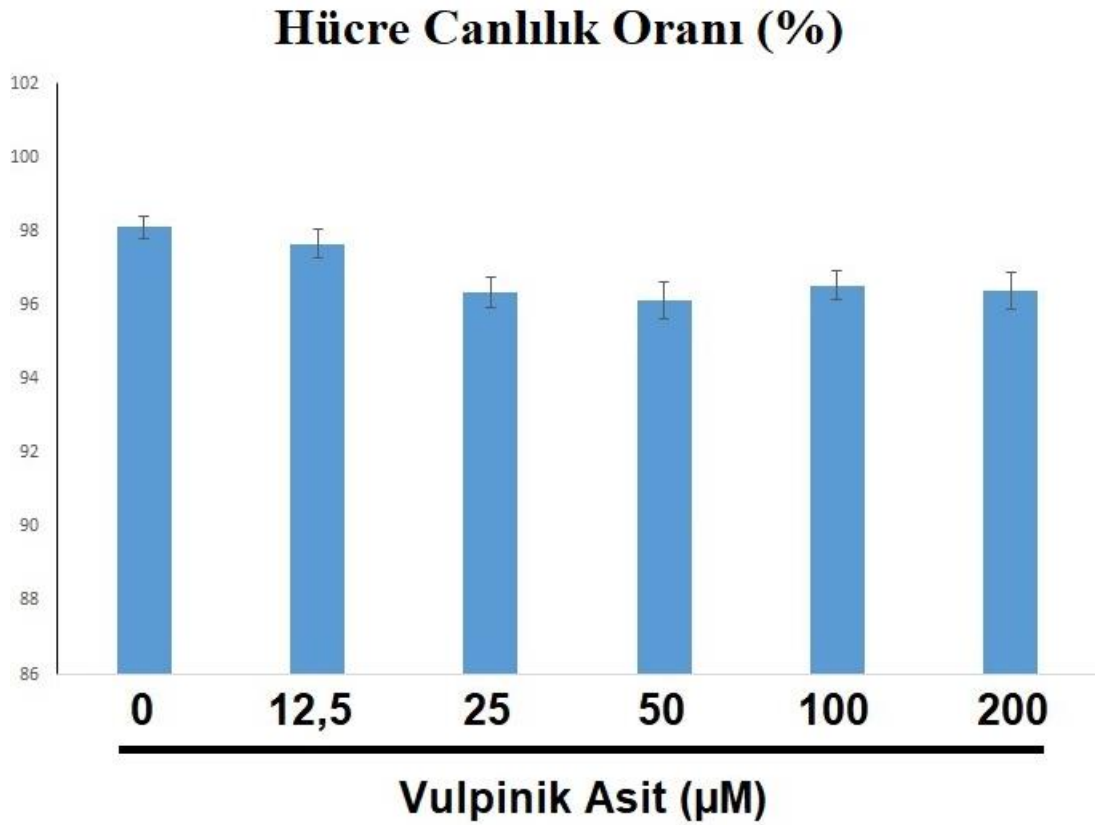
Tüm grupların hücre canlılık oranları Şekil 10'da gösterilmiştir. 0-200 μM konsantrasyonlarındaki evernik asit uygulamaları hücre canlılığında önemli bir düşüşe yol açmamış olup uygulanan tüm evernik asit konsantrasyonlarının RAW264.7 makrofaj hücreleri üzerindeki sitotoksiteleri % 10'un altında bulunmuştur.



Şekil 10. Evernik asit uygulamasının hücre canlılık oranlarına etkileri (%) ($n=5$).

4.4. Vulpinik Asit Uygulamasının Hücre Canlılığına Etkisi

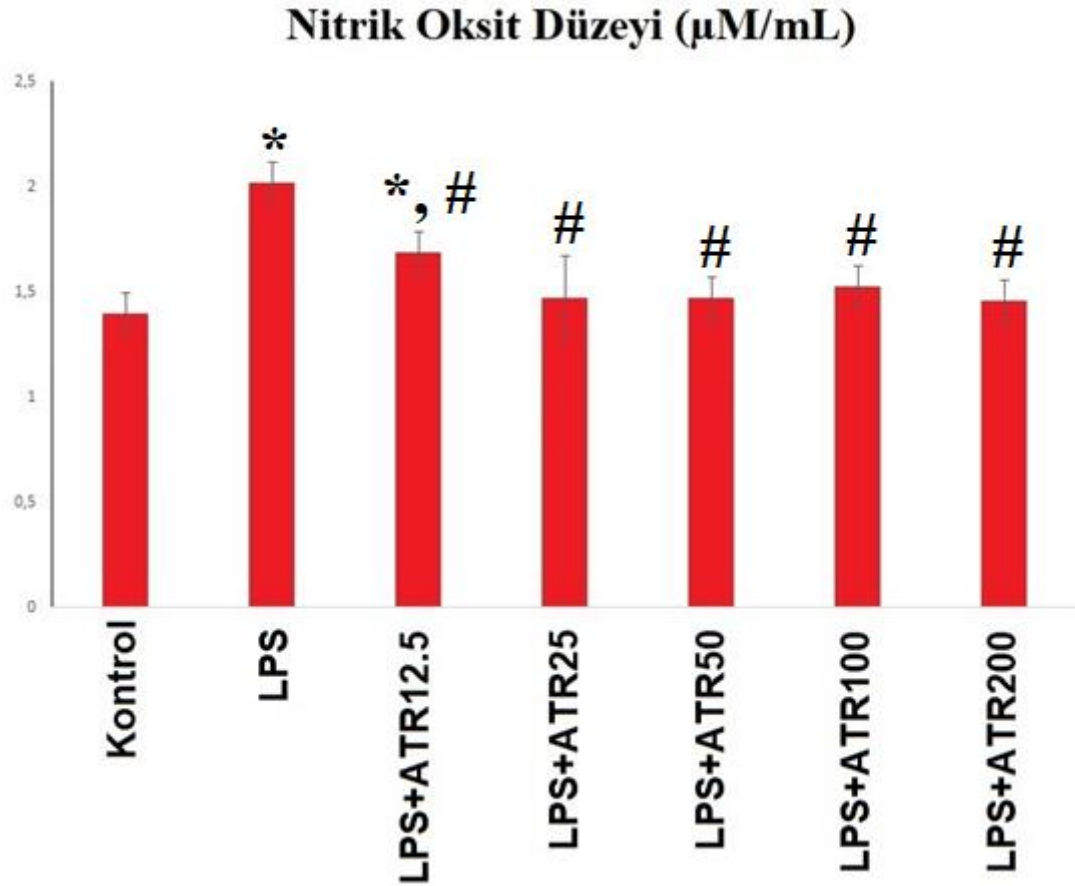
Tüm grupların hücre canlılık oranları Şekil 11’de gösterilmiştir. 0-200 μM konsantrasyonlarındaki vulpinik asit uygulamaları hücre canlılığında önemli bir düşüşe yol açmamış olup uygulanan tüm vulpinik asit konsantrasyonlarının RAW264.7 makrofaj hücreleri üzerindeki sitotoksiteleri % 10’un altında bulunmuştur.



Şekil 11. Vulpinik asit uygulamasının hücre canlılık oranlarına etkileri (%) ($n=5$).

4.5. Atranorin Uygulamasının Nitrik Oksit Düzeyine Etkisi

Tüm grupların nitrik oksit düzeyleri Şekil 12’de gösterilmiştir. LPS grubunun nitrik oksit düzeyi, kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ($p<0,05$). Atranorin uygulanan tüm grupların nitrik oksit düzeyleri LPS grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük bulunmuştur ($p<0,05$).



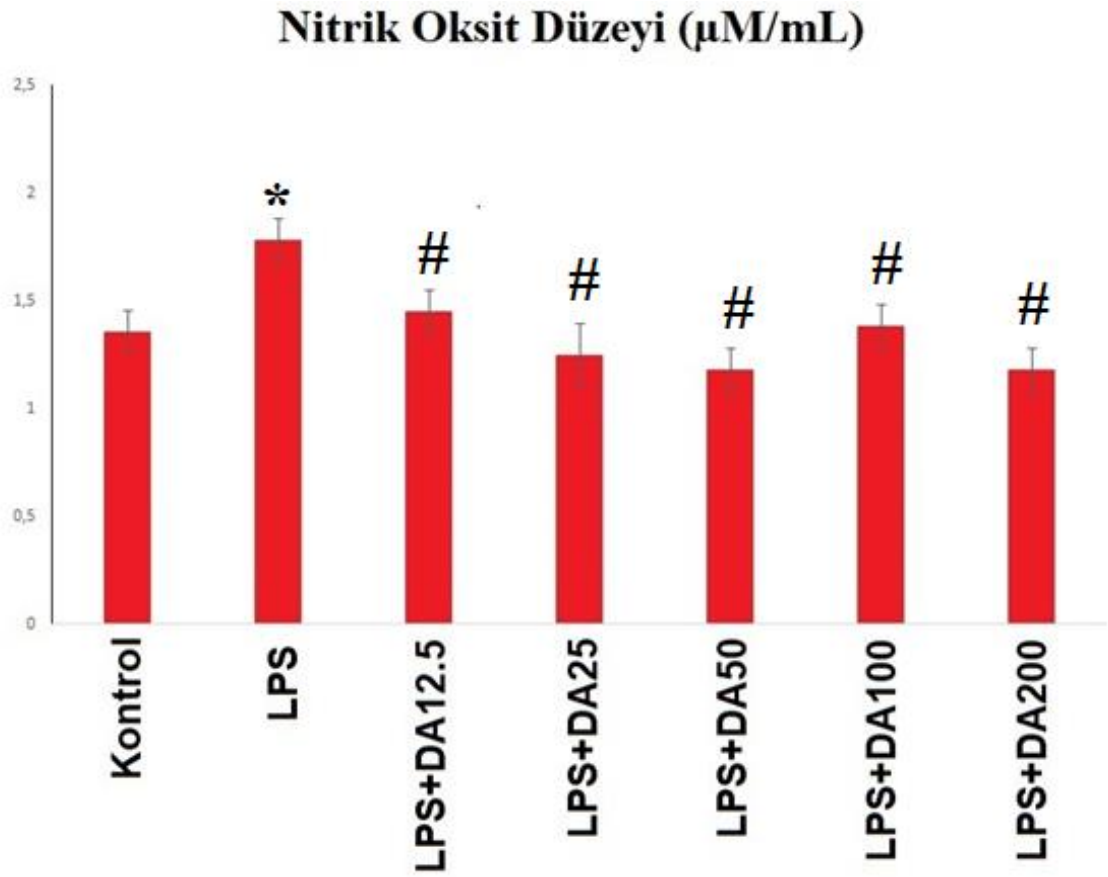
Şekil 12. Atranorin uygulamasının nitrik oksit düzeylerine etkisi ($\mu\text{M/mL}$) ($n=5$). (**LPS:** Lipopolisakkarit; **ATR:** Atranorin)

*Kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı ölçüde yüksek bulunmuştur ($p<0,05$)

#LPS grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı ölçüde düşük bulunmuştur ($p<0,05$)

4.6. Diffraktaik Asit Uygulamasının Nitrik Oksit Düzeyine Etkisi

Tüm grupların nitrik oksit düzeyleri Şekil 13’de gösterilmiştir. LPS grubunun nitrik oksit düzeyi, kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ($p<0,05$). Diffraktaik asit uygulanan tüm grupların nitrik oksit düzeyleri LPS grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük bulunmuştur ($p<0,05$).



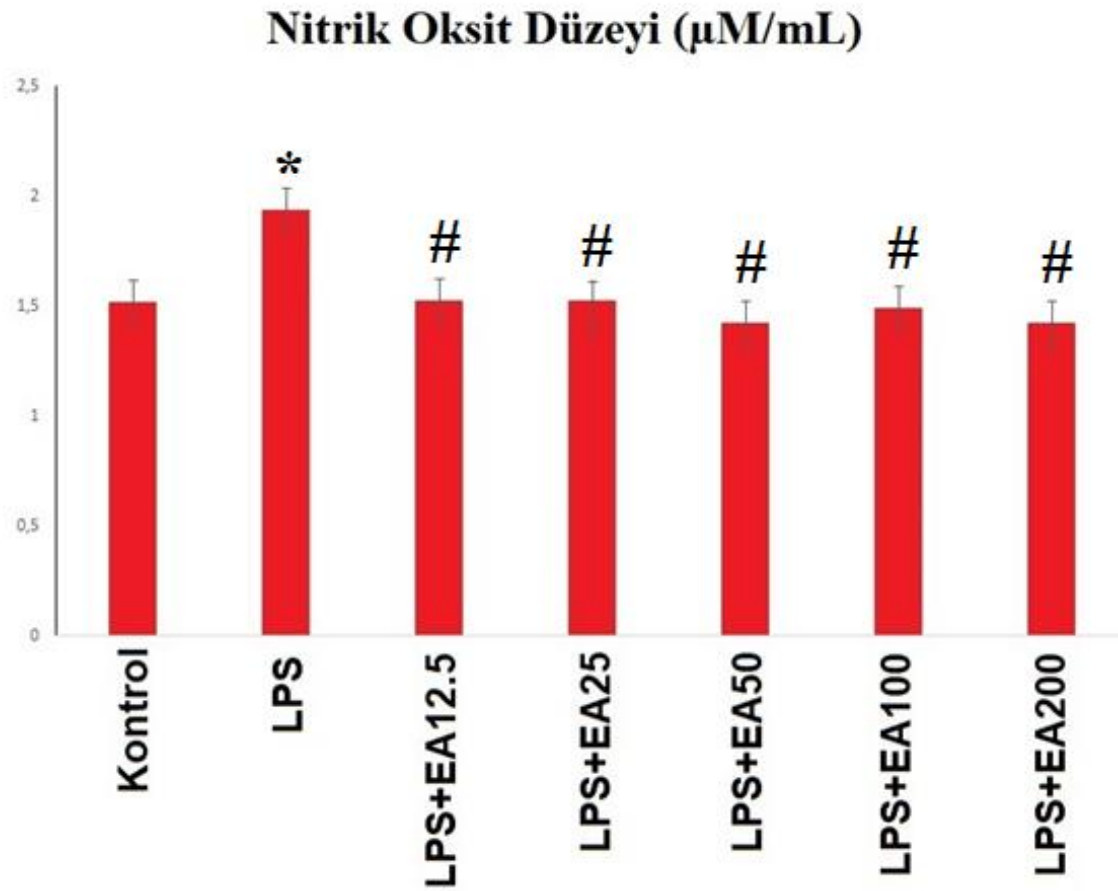
Şekil 13. Atranorin uygulamasının nitrik oksit düzeylerine etkisi ($\mu\text{M/mL}$) ($n=5$). (LPS: Lipopolisakkarit; ATR: Atranorin)

*Kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı ölçüde yüksek bulunmuştur ($p<0,05$)

#LPS grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı ölçüde düşük bulunmuştur ($p<0,05$)

4.7. Evernik Asit Uygulamasının Nitrik Oksit Düzeyine Etkisi

Tüm grupların nitrik oksit düzeyleri Şekil 14’te gösterilmiştir. LPS grubunun nitrik oksit düzeyi, kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ($p<0,05$). Evernik asit uygulanan tüm grupların nitrik oksit düzeyleri LPS grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük bulunmuştur ($p<0,05$).



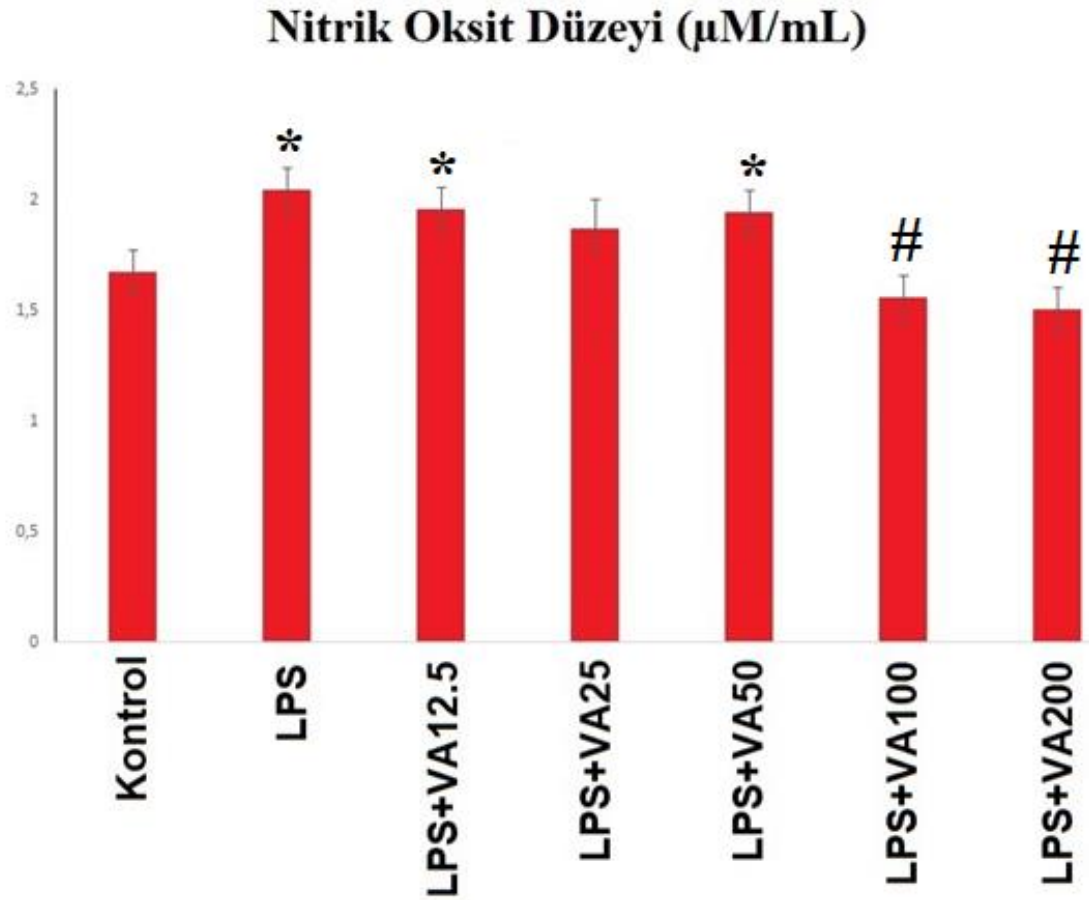
Şekil 14. Evernik asit uygulamasının nitrik oksit düzeylerine etkisi ($\mu\text{M/mL}$) ($n=5$). (LPS: Lipopolisakkarit; EA: Evernik asit)

* Kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı ölçüde yüksek bulunmuştur ($p<0,05$)

LPS grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı ölçüde düşük bulunmuştur ($p<0,05$)

4.8. Vulpinik Asit Uygulamasının Nitrik Oksit Düzeyine Etkisi

Tüm grupların nitrik oksit düzeyleri Şekil 15’de gösterilmiştir. LPS grubunun nitrik oksit düzeyi, kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ($p<0,05$). LPS+VA100 ve LPS+VA200 gruplarının nitrik oksit düzeyleri ise LPS grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük bulunmuştur ($p<0,05$).



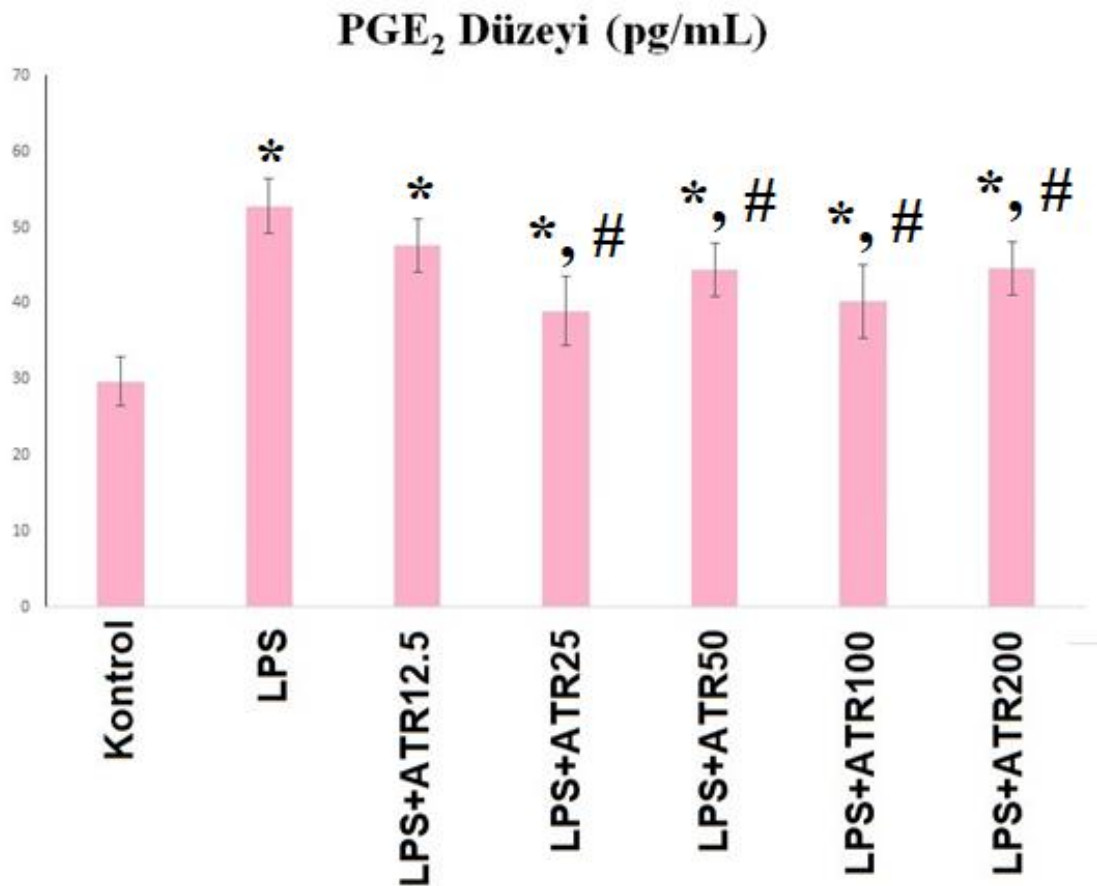
Şekil 15. Vulpinik asit uygulamasının nitrik oksit düzeylerine etkisi ($\mu\text{M/mL}$) ($n=5$). (LPS: Lipopolisakkarit; VA: Vulpinik asit)

*Kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı ölçüde yüksek bulunmuştur ($p<0,05$)

#LPS grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı ölçüde düşük bulunmuştur ($p<0,05$)

4.9. Atranorin Uygulamasının PGE₂ Düzeyine Etkisi

Tüm grupların PGE₂ düzeyleri Şekil 16'da gösterilmiştir. LPS grubunun PGE₂ düzeyi, kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ($p<0,05$). LPS+ATR25, LPS+ATR50, LPS+ATR100 ve LPS+ATR200 gruplarının PGE₂ düzeyleri ise LPS grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük bulunmuştur ($p<0,05$).



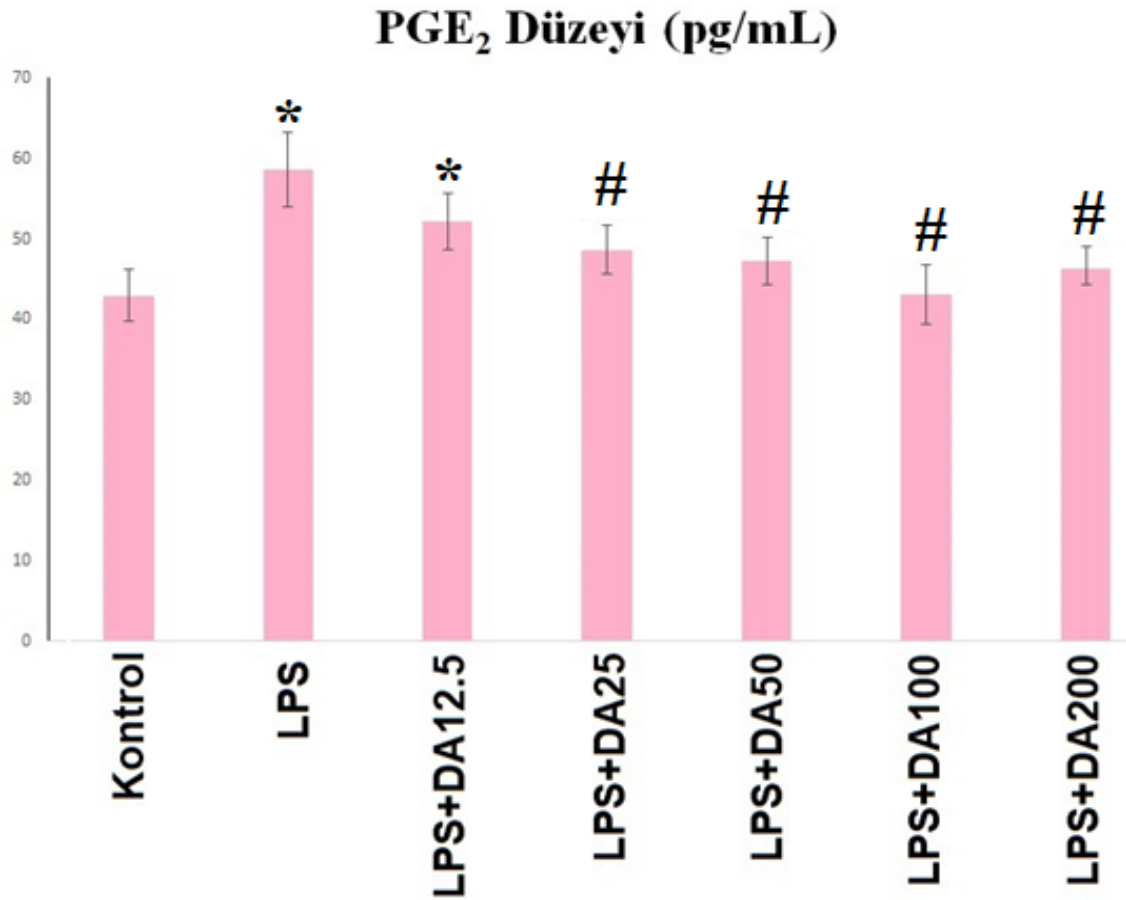
Şekil 16. Atranorin uygulamasının PGE₂ düzeylerine etkisi (pg/mL) ($n=5$). (PGE₂: Prostaglandin E₂; LPS: Lipopolisakkarit; ATR: Atranorin)

*Kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı ölçüde yüksek bulunmuştur ($p<0,05$)

#LPS grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı ölçüde düşük bulunmuştur ($p<0,05$)

4.10. Diffraktaik Asit Uygulamasının PGE₂ Düzeyine Etkisi

Tüm grupların PGE₂ düzeyleri Şekil 17’de gösterilmiştir. LPS grubunun PGE₂ düzeyi, kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ($p<0,05$). LPS+DA25, LPS+DA50, LPS+DA100 ve LPS+DA200 gruplarının PGE₂ düzeyleri ise LPS grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük bulunmuştur ($p<0,05$).



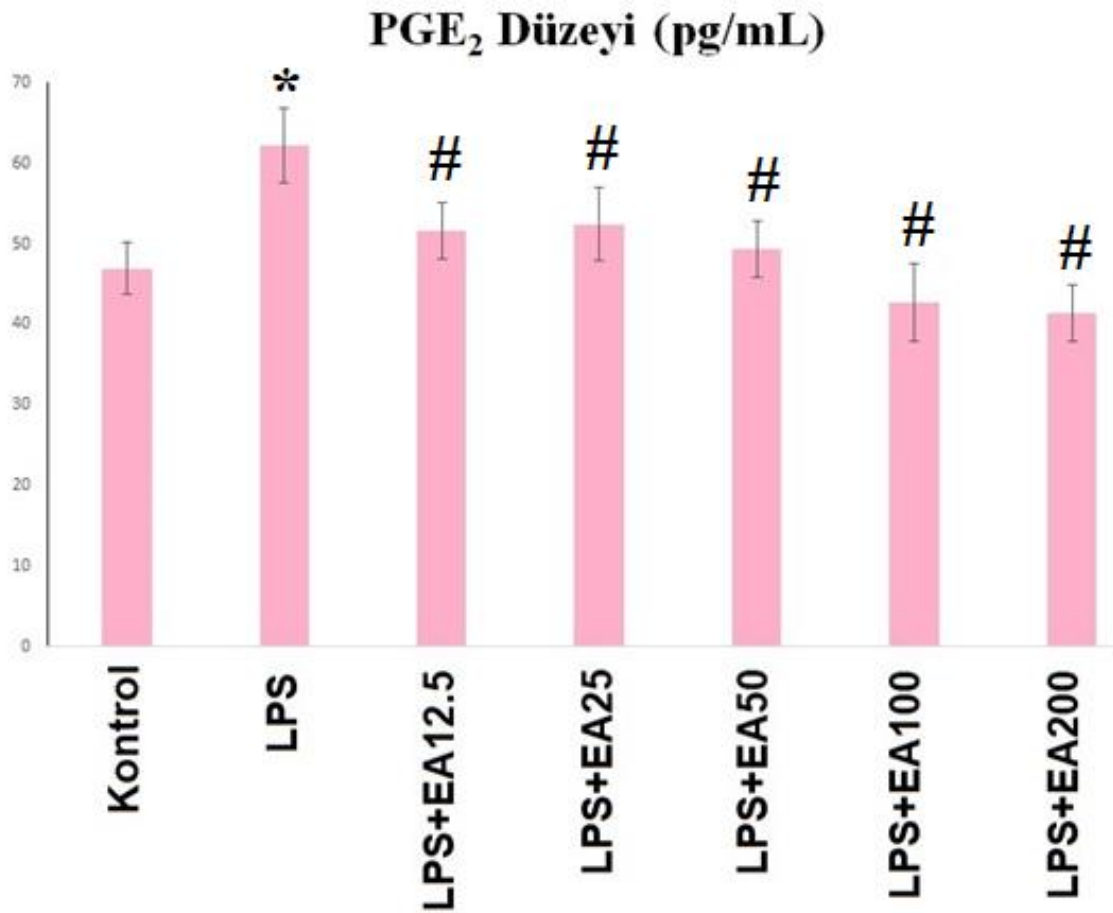
Şekil 17. Diffraktaik asit uygulamasının PGE₂ düzeylerine etkisi (pg/mL) ($n=5$). (PGE₂: Prostaglandin E₂; LPS: Lipopolisakkarit; DA: Diffraktaik asit)

*Kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı ölçüde yüksek bulunmuştur ($p<0,05$)

#LPS grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı ölçüde düşük bulunmuştur ($p<0,05$)

4.11. Evernik Asit Uygulamasının PGE₂ Düzeyine Etkisi

Tüm grupların PGE₂ düzeyleri Şekil 18’de gösterilmiştir. LPS grubunun PGE₂ düzeyi, kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ($p<0,05$). LPS+EA12.5, LPS+EA25, LPS+EA50, LPS+EA100 ve LPS+EA200 gruplarının PGE₂ düzeyleri ise LPS grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük bulunmuştur ($p<0,05$).



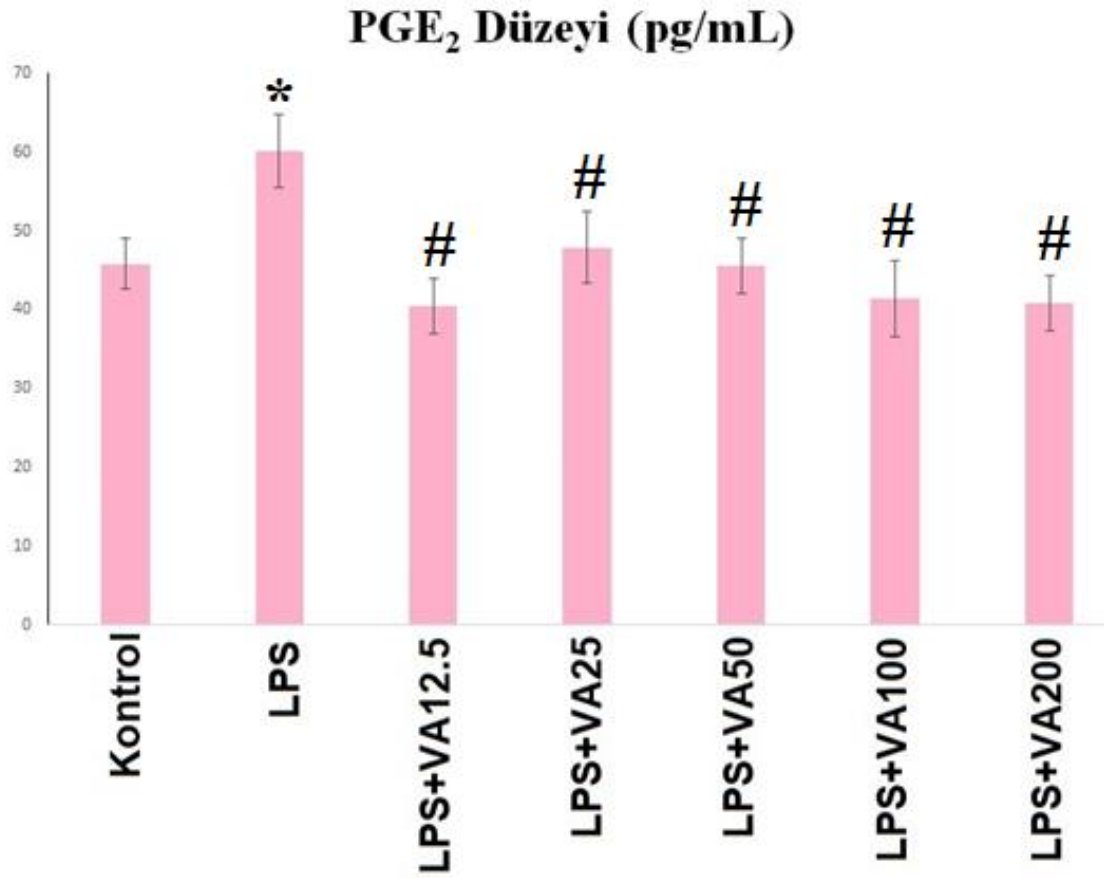
Şekil 18. Evernik asit uygulamasının PGE₂ düzeylerine etkisi (pg/mL) ($n=5$). (PGE₂: Prostaglandin E₂; LPS: Lipopolisakkarit; EA: Evernik asit)

*Kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı ölçüde yüksek bulunmuştur ($p<0,05$)

#LPS grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı ölçüde düşük bulunmuştur ($p<0,05$)

4.12. Vulpinik Asit Uygulamasının PGE₂ Düzeyine Etkisi

Tüm grupların PGE₂ düzeyleri Şekil 19’da gösterilmiştir. LPS grubunun PGE₂ düzeyi, kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ($p<0,05$). Vulpinik asit uygulanan tüm grupların PGE₂ düzeyleri ise LPS grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük bulunmuştur ($p<0,05$).



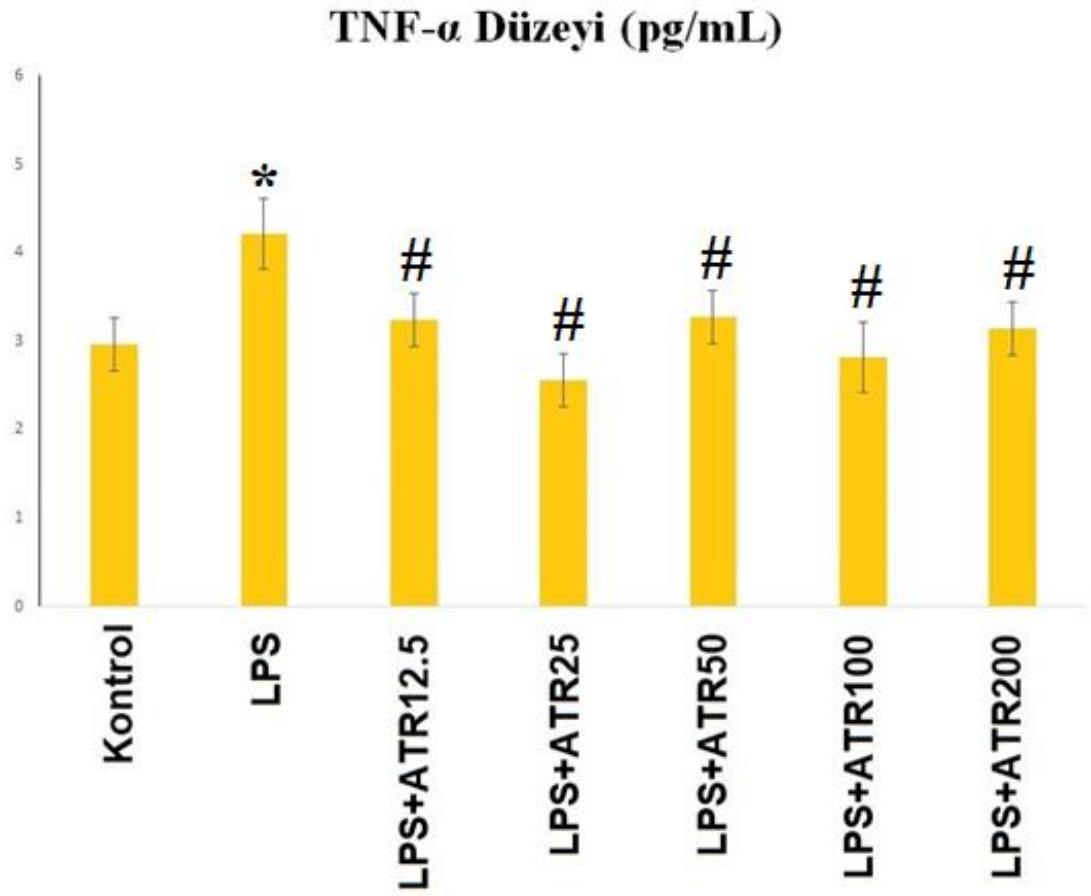
Şekil 19. Vulpinik asit uygulamasının PGE₂ düzeylerine etkisi (pg/mL) ($n=5$). (PGE₂: Prostaglandin E₂; LPS: Lipopolisakkarit; VA: Vulpinik asit)

*Kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı ölçüde yüksek bulunmuştur ($p<0,05$)

#LPS grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı ölçüde düşük bulunmuştur ($p<0,05$)

4.13. Atranorin Uygulamasının TNF- α Düzeyine Etkisi

Tüm grupların TNF- α düzeyleri Şekil 20’de gösterilmiştir. LPS grubunun TNF- α düzeyi, kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ($p<0,05$). Atranorin uygulanan grupların TNF- α düzeyleri ise LPS grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük bulunmuştur ($p<0,05$).



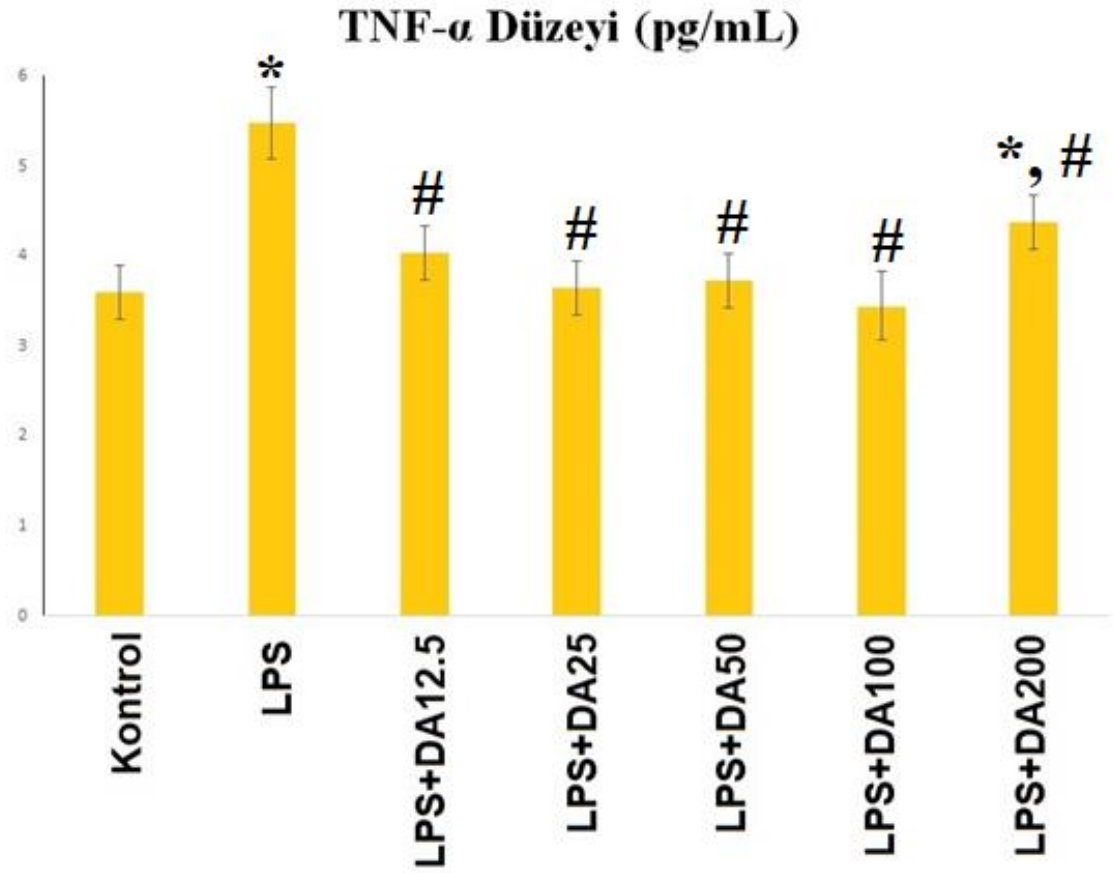
Şekil 20. Atranorin uygulamasının TNF- α düzeylerine etkisi (pg/mL) ($n=5$). (TNF- α : Tümör nekroz faktör alfa; **LPS**: Lipopolisakkarit; **ATR**: Atranorin)

*Kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı ölçüde yüksek bulunmuştur ($p<0,05$)

#LPS grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı ölçüde düşük bulunmuştur ($p<0,05$)

4.14. Diffraktaik Asit Uygulamasının TNF- α Düzeyine Etkisi

Tüm grupların TNF- α düzeyleri Şekil 21’de gösterilmiştir. LPS grubunun TNF- α düzeyi, kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ($p<0,05$). Diffraktaik asit uygulanan tüm grupların TNF- α düzeyleri ise LPS grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük bulunmuştur ($p<0,05$).



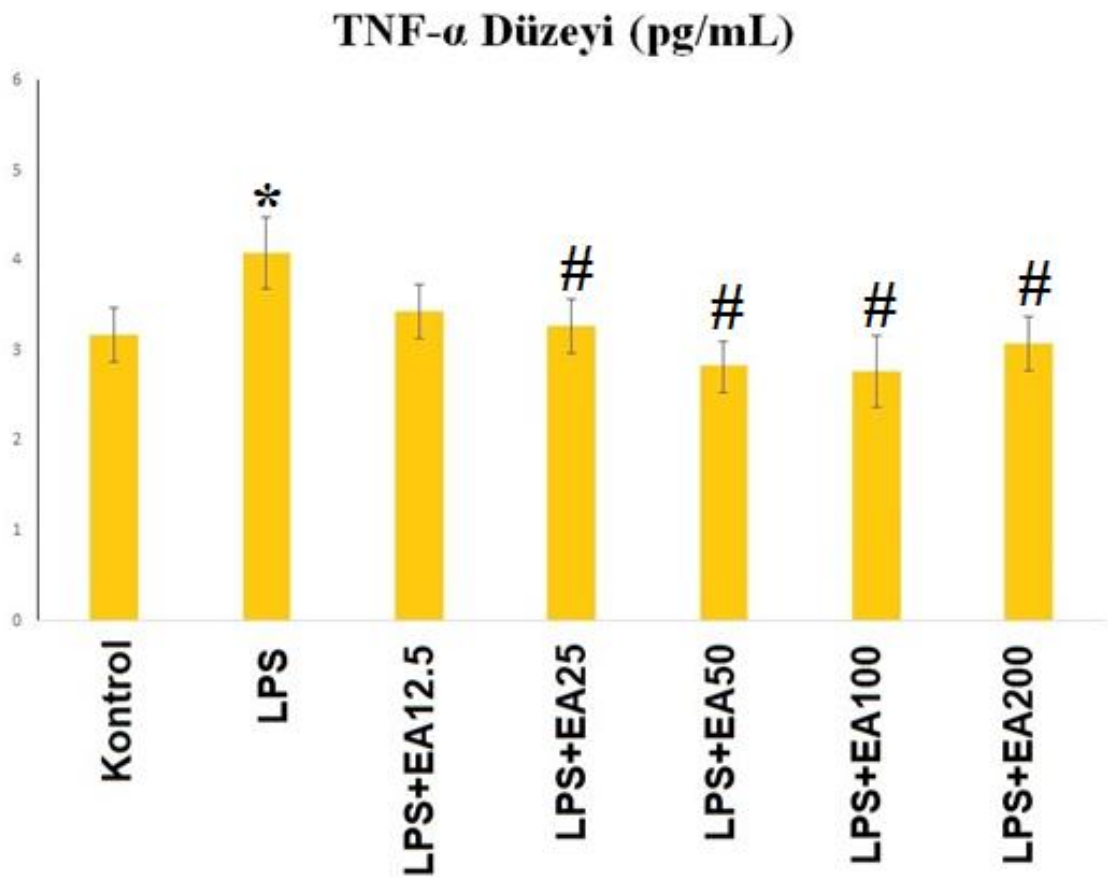
Şekil 21. Diffraktaik asit uygulamasının TNF- α düzeylerine etkisi (pg/mL) ($n=5$). (TNF- α : Tümör nekroz faktör alfa; LPS: Lipopolisakkarit; DA: Diffraktaik asit)

*Kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı ölçüde yüksek bulunmuştur ($p<0,05$)

#LPS grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı ölçüde düşük bulunmuştur ($p<0,05$)

4.15. Evernik Asit Uygulamasının TNF- α Düzeyine Etkisi

Tüm grupların TNF- α düzeyleri Şekil 22’de gösterilmiştir. LPS grubunun TNF- α düzeyi, kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ($p<0,05$). LPS+EA25, LPS+EA50, LPS+EA100 ve LPS+EA200 gruplarının TNF- α düzeyleri ise LPS grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük bulunmuştur ($p<0,05$).



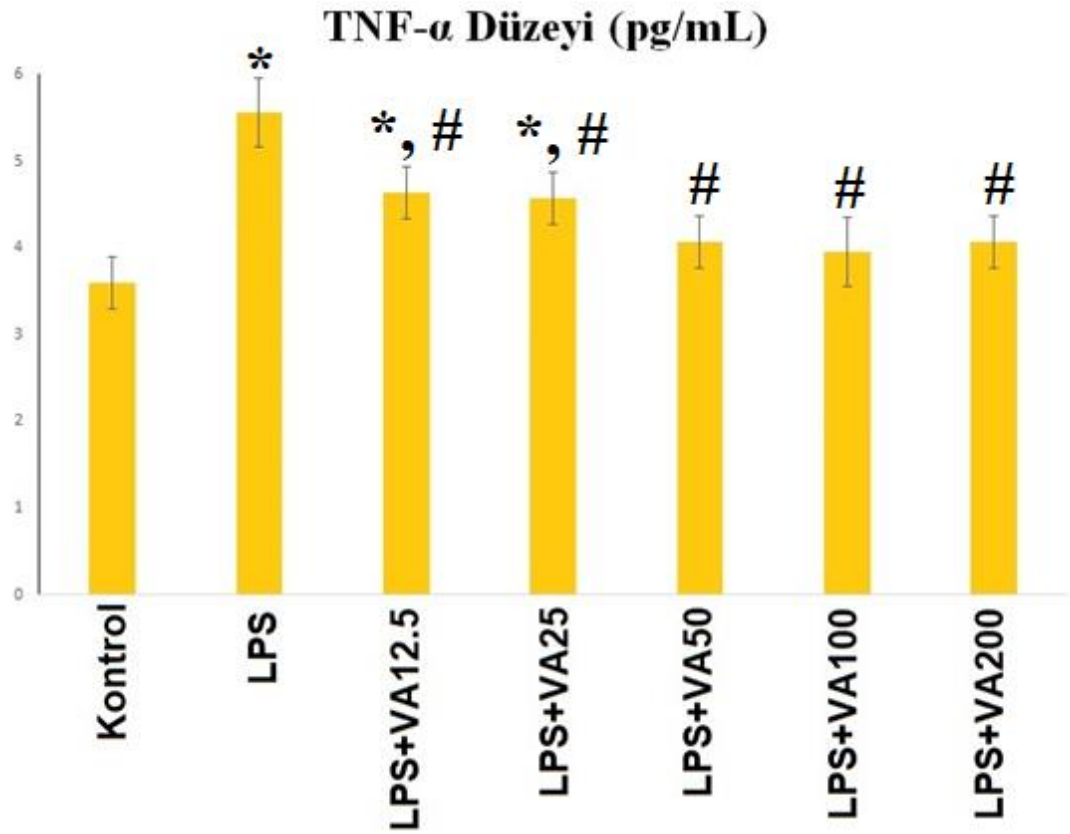
Şekil 22. Evernik asit uygulamasının TNF- α düzeylerine etkisi (pg/mL) ($n=5$). (TNF- α : Tümör nekroz faktör alfa; **LPS**: Lipopolisakkarit; **EA**: Evernik asit)

*Kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı ölçüde yüksek bulunmuştur ($p<0,05$)

#LPS grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı ölçüde düşük bulunmuştur ($p<0,05$)

4.16. Vulpinik Asit Uygulamasının TNF- α Düzeyine Etkisi

Tüm grupların TNF- α düzeyleri Şekil 23’de gösterilmiştir. LPS grubunun TNF- α düzeyi, kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ($p<0,05$). Vulpinik asit uygulanan tüm grupların TNF- α düzeyleri ise LPS grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük bulunmuştur ($p<0,05$).



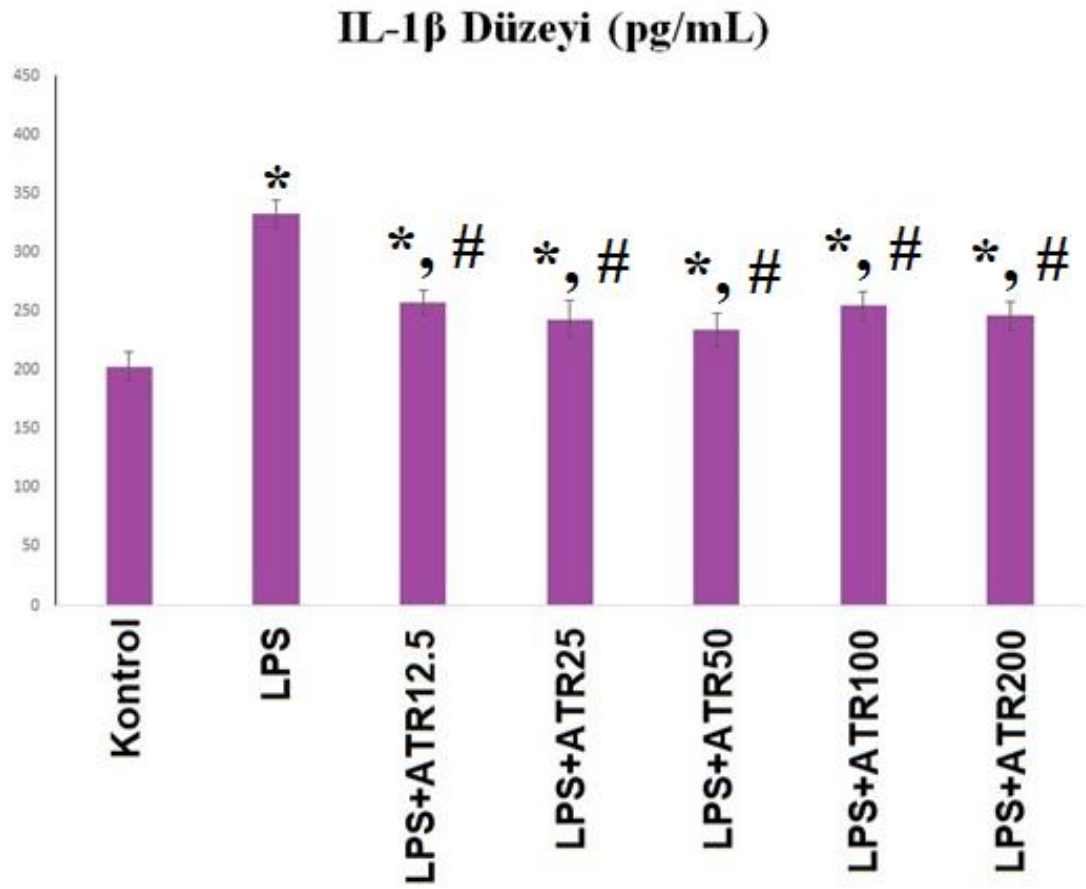
Şekil 23. Vulpinik asit uygulamasının TNF- α düzeylerine etkisi (pg/mL) ($n=5$). (TNF- α : Tümör nekroz faktör alfa; **LPS**: Lipopolisakkarit; **VA**: Vulpinik asit)

*Kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı ölçüde yüksek bulunmuştur ($p<0,05$)

#LPS grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı ölçüde düşük bulunmuştur ($p<0,05$)

4.17. Atranorin Uygulamasının IL-1 β Düzeyine Etkisi

Tüm grupların IL-1 β düzeyleri Şekil 24'te gösterilmiştir. LPS grubunun IL-1 β düzeyi, kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ($p<0,05$). Atranorin uygulanan tüm grupların IL-1 β düzeyleri ise LPS grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük bulunmuştur ($p<0,05$).



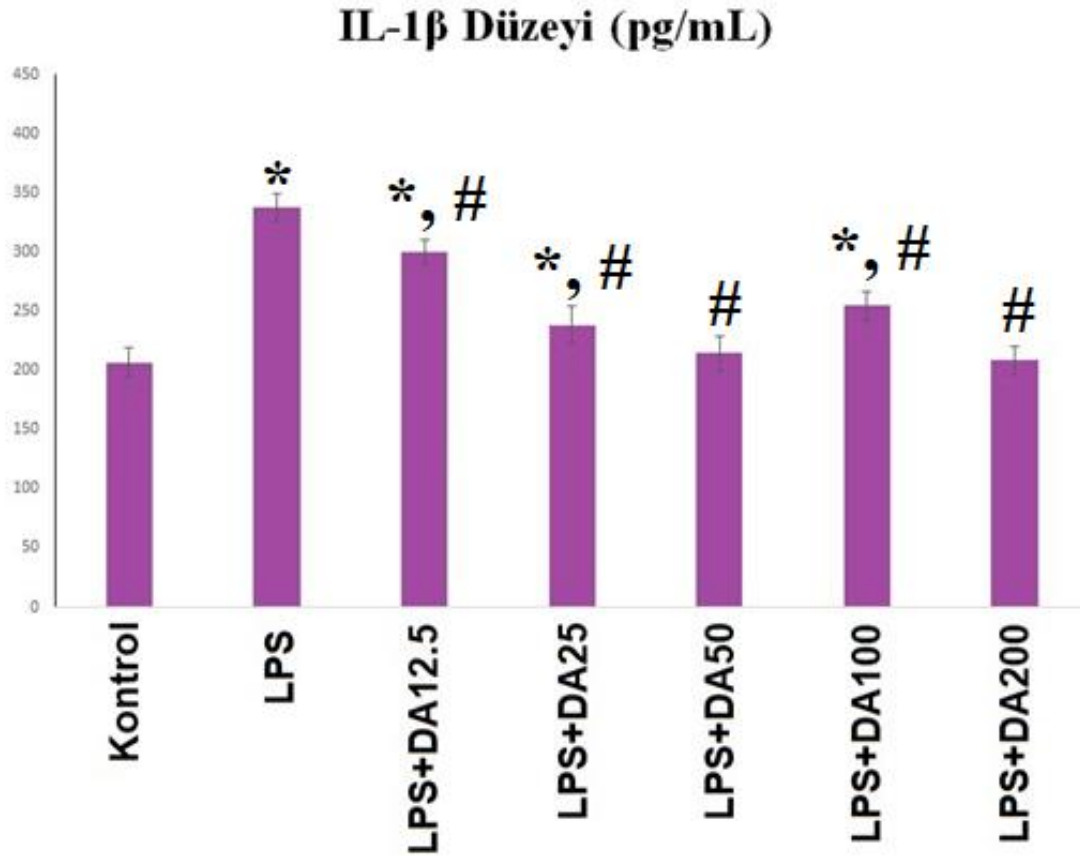
Şekil 24. Atranorin uygulamasının IL-1 β düzeylerine etkisi (pg/mL) ($n=5$). (IL-1 β : İnterlökin-1 beta; LPS: Lipopolisakkarit; ATR: Atranorin)

*Kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı ölçüde yüksek bulunmuştur ($p<0,05$)

#LPS grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı ölçüde düşük bulunmuştur ($p<0,05$)

4.18. Diffraktaik Asit Uygulamasının IL-1 β Düzeyine Etkisi

Tüm grupların IL-1 β düzeyleri Şekil 25’de gösterilmiştir. LPS grubunun IL-1 β düzeyi, kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ($p<0,05$). Diffraktaik asit uygulanan tüm grupların IL-1 β düzeyleri ise LPS grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük bulunmuştur ($p<0,05$).



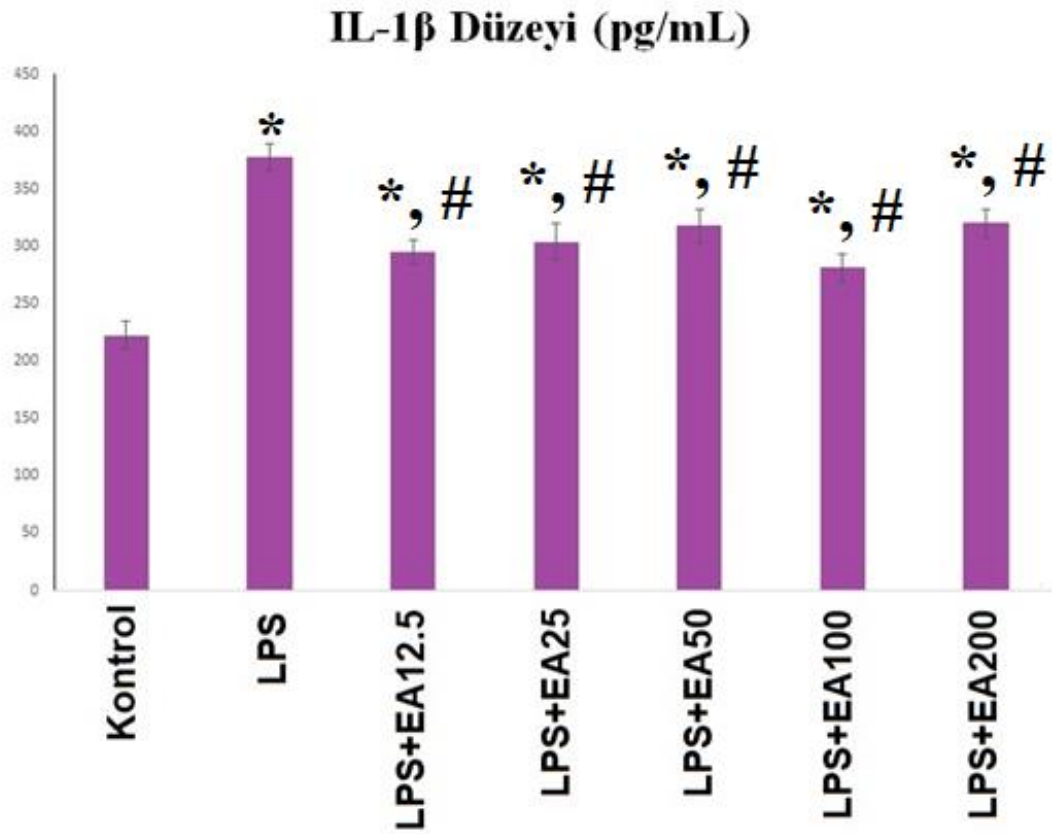
Şekil 25. Diffraktaik asit uygulamasının IL-1 β düzeylerine etkisi (pg/mL) ($n=5$). (**IL-1 β** : Interlökin-1 beta; **LPS**: Lipopolisakkarit; **DA**: Diffraktaik asit)

*Kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı ölçüde yüksek bulunmuştur ($p<0,05$)

#LPS grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı ölçüde düşük bulunmuştur ($p<0,05$)

4.19. Evernik Asit Uygulamasının IL-1 β Düzeyine Etkisi

Tüm grupların IL-1 β düzeyleri Şekil 26'da gösterilmiştir. LPS grubunun IL-1 β düzeyi, kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ($p<0,05$). Evernik asit uygulanan tüm grupların IL-1 β düzeyleri ise LPS grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük bulunmuştur ($p<0,05$).



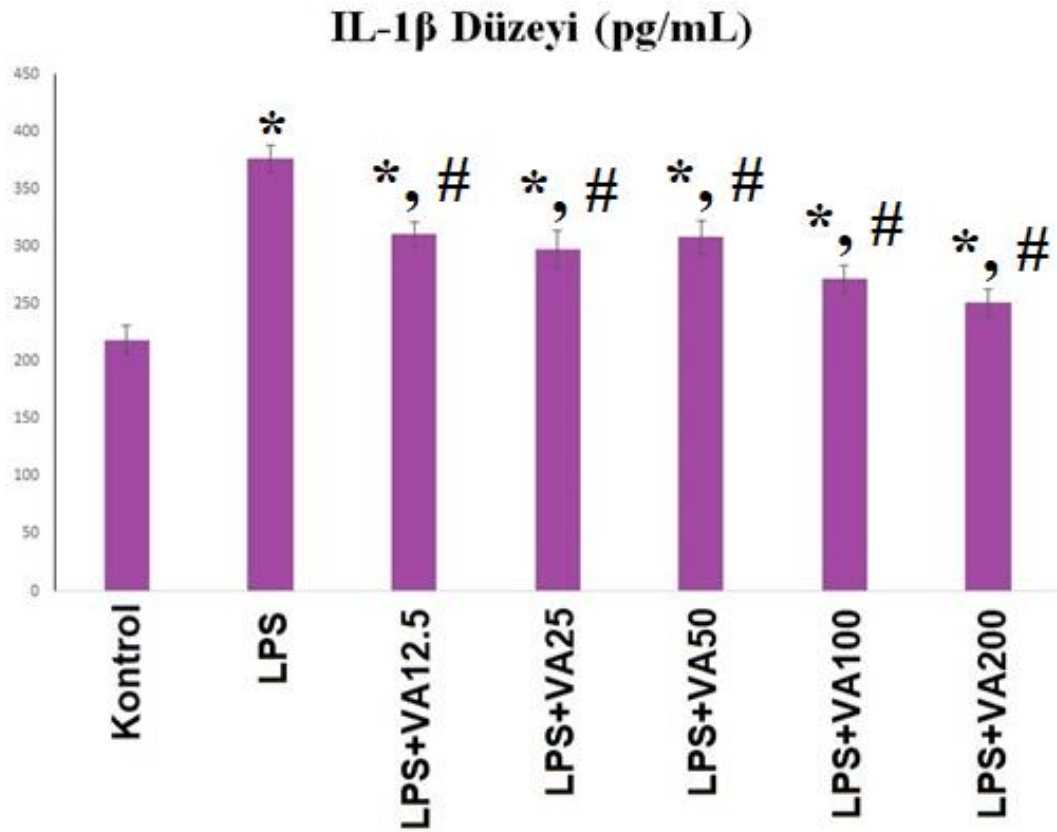
Şekil 26. Evernik asit uygulamasının IL-1 β düzeylerine etkisi (pg/mL) ($n=5$). (IL-1 β : Interlökin-1 beta; LPS: Lipopolisakkarit; EA: Evernik asit)

*Kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı ölçüde yüksek bulunmuştur ($p<0,05$)

#LPS grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı ölçüde düşük bulunmuştur ($p<0,05$)

4.20. Vulpinik Asit Uygulamasının IL-1 β Düzeyine Etkisi

Tüm grupların IL-1 β düzeyleri Şekil 27’de gösterilmiştir. LPS grubunun IL-1 β düzeyi, kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ($p<0,05$). Vulpinik asit uygulanan tüm grupların IL-1 β düzeyi ise LPS grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük bulunmuştur ($p<0,05$).



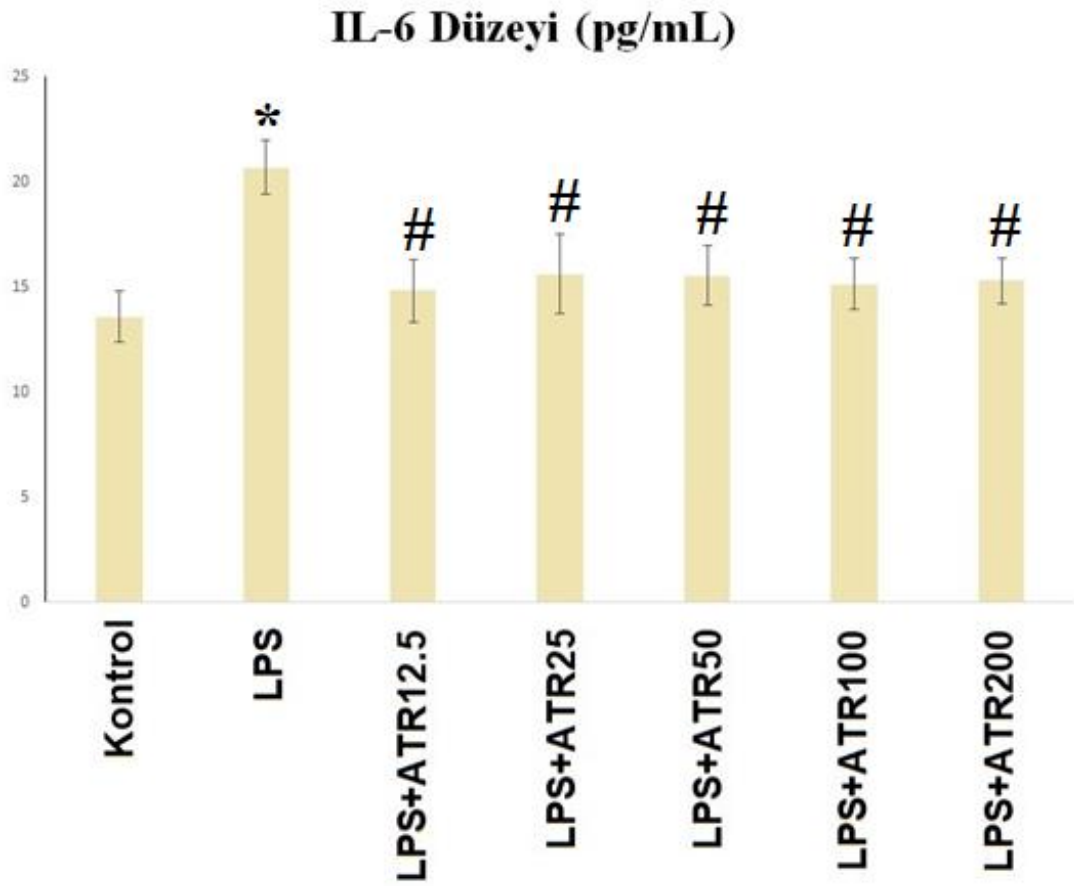
Şekil 27. Vulpinik asit uygulamasının IL-1 β düzeylerine etkisi (pg/mL) ($n=5$). (IL-1 β : Interlökin-1 beta; LPS: Lipopolisakkarit; VA: Vulpinik asit)

*Kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı ölçüde yüksek bulunmuştur ($p<0,05$)

#LPS grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı ölçüde düşük bulunmuştur ($p<0,05$)

4.21. Atranorin Uygulamasının IL-6 Düzeyine Etkisi

Tüm grupların IL-6 düzeyleri Şekil 28’de gösterilmiştir. LPS grubunun IL-6 düzeyi, kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ($p<0,05$). Atranorin uygulanan tüm grupların IL-6 düzeyleri ise LPS grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük bulunmuştur ($p<0,05$).



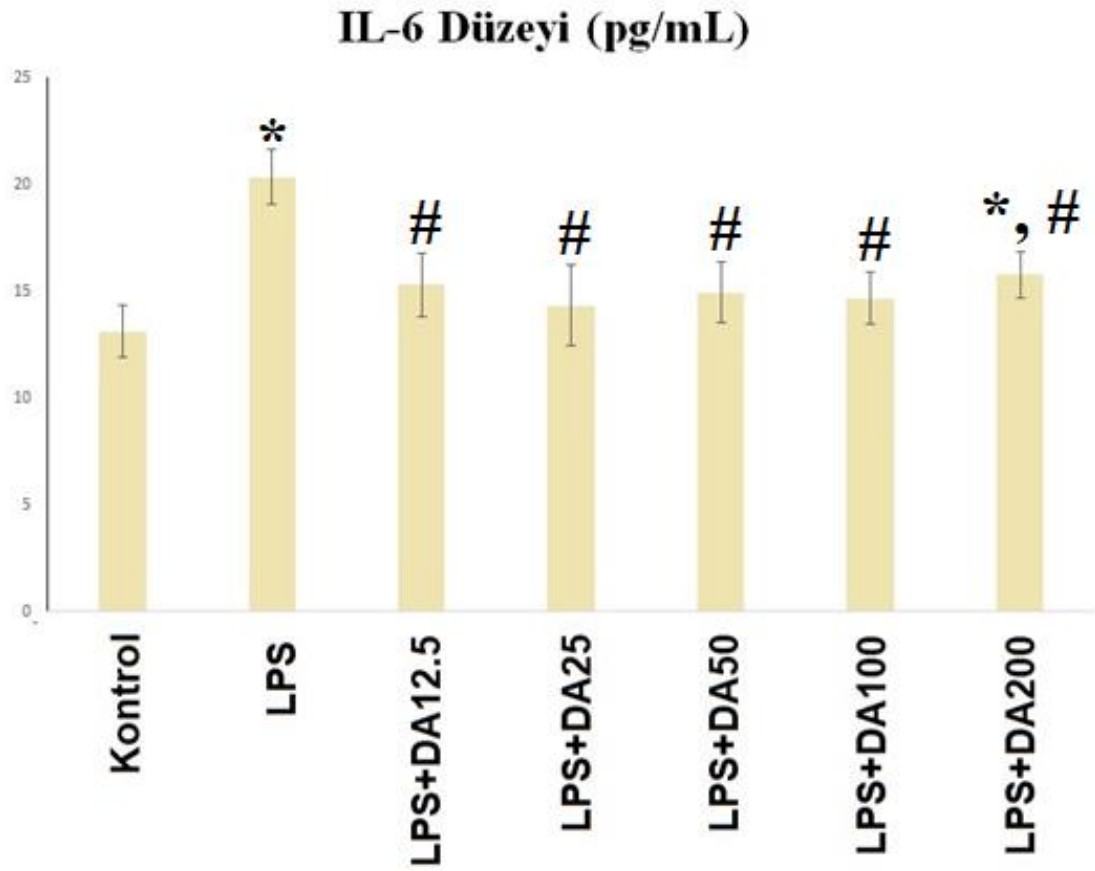
Şekil 28. Atranorin uygulamasının IL-6 düzeylerine etkisi (pg/mL) ($n=5$). (IL-6: Interlökin-6; LPS: Lipopolisakkarit; ATR: Atranorin)

*Kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı ölçüde yüksek bulunmuştur ($p<0,05$)

#LPS grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı ölçüde düşük bulunmuştur ($p<0,05$)

4.22. Diffraktaik Asit Uygulamasının IL-6 Düzeyine Etkisi

Tüm grupların IL-6 düzeyleri Şekil 29’da gösterilmiştir. LPS grubunun IL-6 düzeyi, kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ($p<0,05$). Diffraktaik asit uygulanan tüm grupların IL-6 düzeyleri LPS grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük bulunmuştur ($p<0,05$).



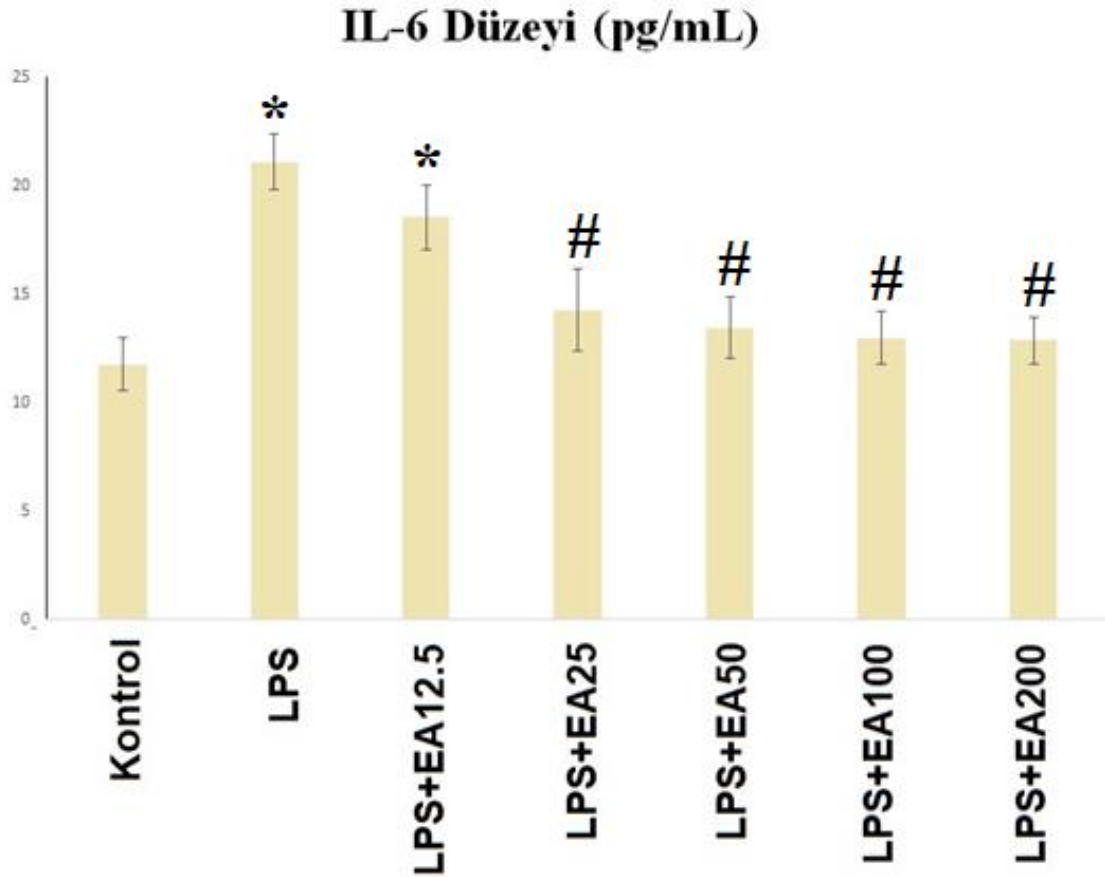
Şekil 29. Diffraktaik asit uygulamasının IL-6 düzeylerine etkisi (pg/mL) ($n=5$). (IL-6: Interlökin-6; LPS: Lipopolisakkarit; DA: Diffraktaik asit)

*Kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı ölçüde yüksek bulunmuştur ($p<0,05$)

#LPS grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı ölçüde düşük bulunmuştur ($p<0,05$)

4.23. Evernik Asit Uygulamasının IL-6 Düzeyine Etkisi

Tüm grupların IL-6 düzeyleri Şekil 30’da gösterilmiştir. LPS grubunun IL-6 düzeyi, kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ($p<0,05$). LPS+EA25, LPS+EA50, LPS+EA100 ve LPS+EA200 gruplarının IL-6 düzeyleri ise LPS grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük bulunmuştur ($p<0,05$).



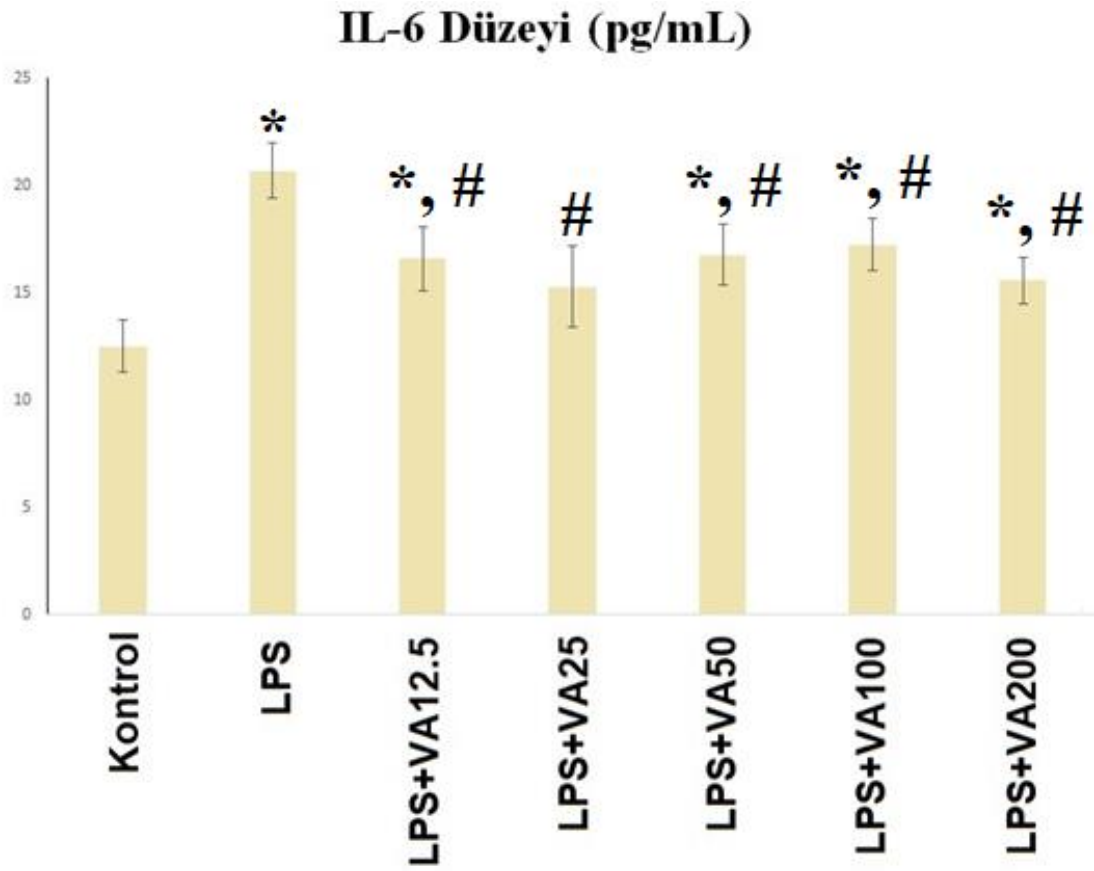
Şekil 30. Evernik asit uygulamasının IL-6 düzeylerine etkisi (pg/mL) ($n=5$). (IL-6: Interlökin-6; LPS: Lipopolisakkarit; EA: Evernik asit)

*Kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı ölçüde yüksek bulunmuştur ($p<0,05$)

#LPS grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı ölçüde düşük bulunmuştur ($p<0,05$)

4.24. Vulpinik Asit Uygulamasının IL-6 Düzeyine Etkisi

Tüm grupların IL-6 düzeyleri Şekil 31’de gösterilmiştir. LPS grubunun IL-6 düzeyi, kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ($p<0,05$). Vulpinik asit uygulanan tüm grupların IL-6 düzeyleri ise LPS grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük bulunmuştur ($p<0,05$).



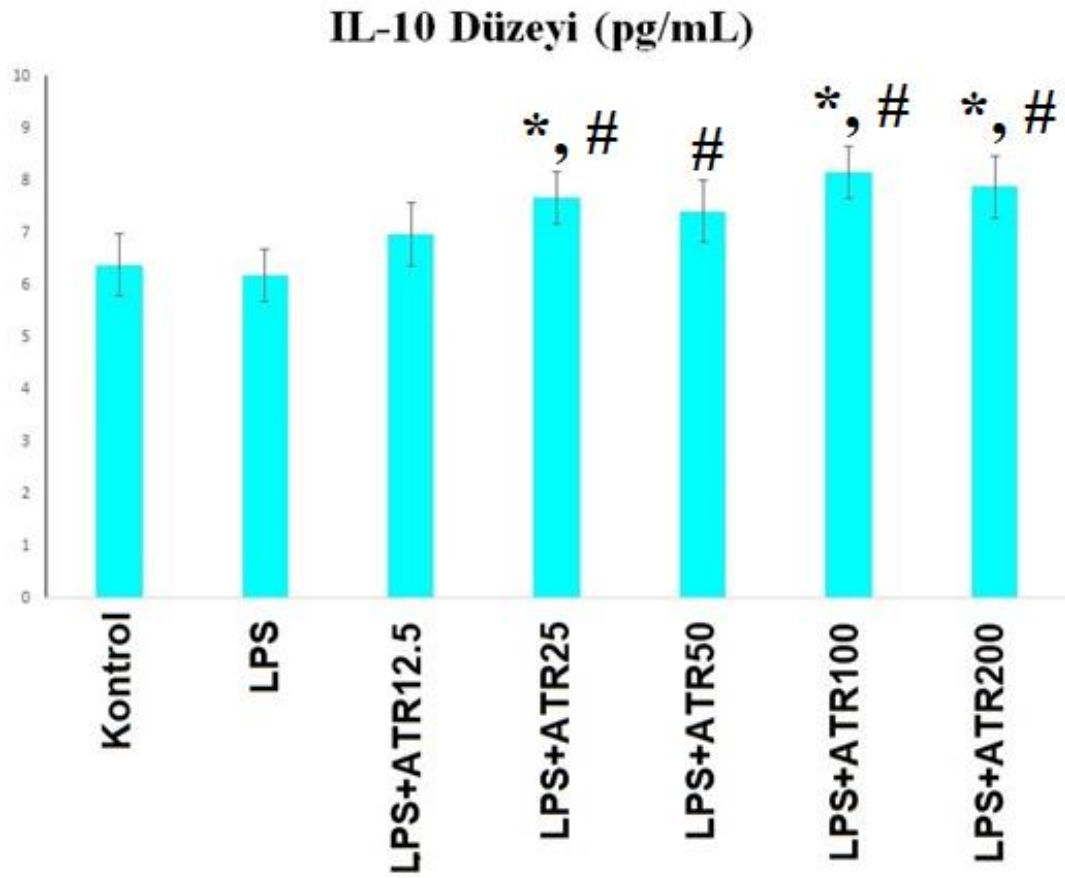
Şekil 31. Vulpinik asit uygulamasının IL-6 düzeylerine etkisi (pg/mL) ($n=5$). (IL-6: Interlökin-6; LPS: Lipopolisakkarit; VA: Vulpinik asit)

*Kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı ölçüde yüksek bulunmuştur ($p<0,05$)

#LPS grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı ölçüde düşük bulunmuştur ($p<0,05$)

4.25. Atranorin Uygulamasının IL-10 Düzeyine Etkisi

Tüm grupların IL-10 düzeyleri Şekil 32’de gösterilmiştir. LPS grubu ile kontrol grubunun IL-10 düzeyleri istatistiksel açıdan fark göstermemektedir ($p>0,05$). Öte yandan LPS+ATR25, LPS+ATR50, LPS+ATR100 ve LPS+ATR200 gruplarının IL-10 düzeyleri ise LPS grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ($p<0,05$).



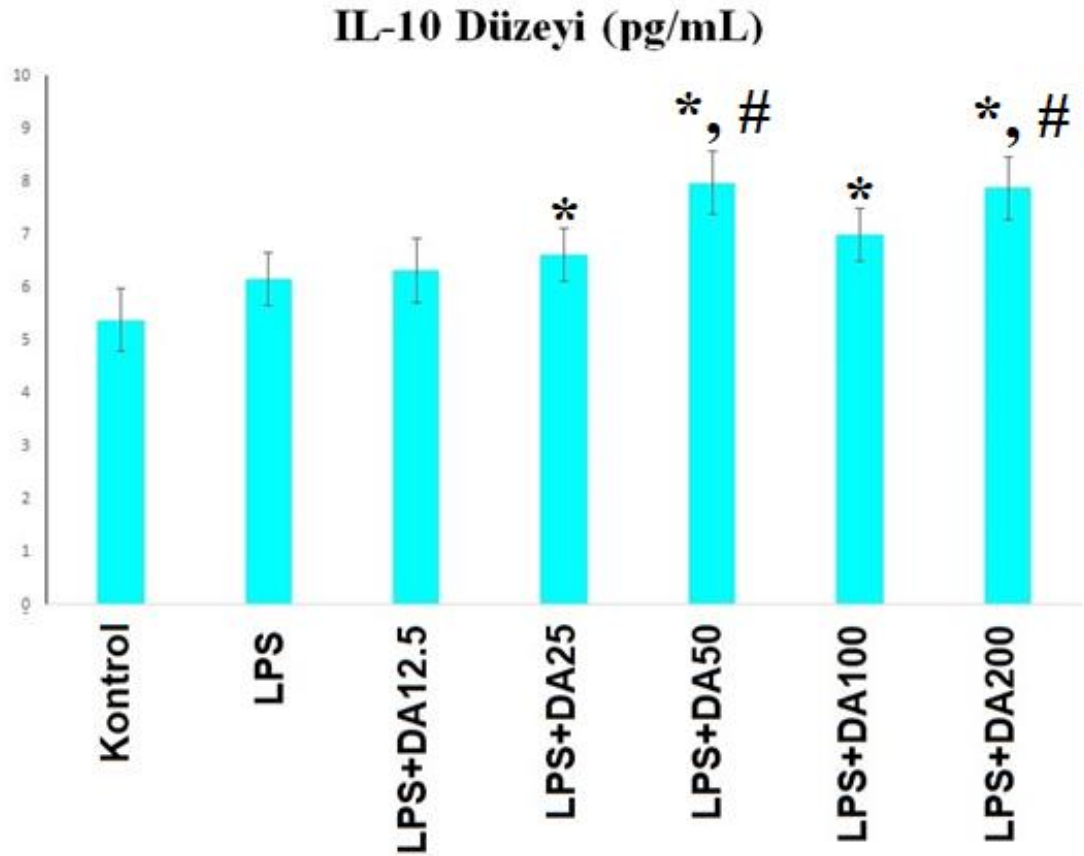
Şekil 32. Atranorin uygulamasının IL-10 düzeylerine etkisi (pg/mL) ($n=5$). (IL-10: Interlökin-10; LPS: Lipopolisakkarit; ATR: Atranorin)

*Kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı ölçüde yüksek bulunmuştur ($p<0,05$)

#LPS grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı ölçüde yüksek bulunmuştur ($p<0,05$)

4.26. Diffraktaik Asit Uygulamasının IL-10 Düzeyine Etkisi

Tüm grupların IL-10 düzeyleri Şekil 33’de gösterilmiştir. LPS grubu ile kontrol grubunun IL-10 düzeyleri istatistiksel açıdan fark göstermemektedir ($p>0,05$). Öte yandan LPS+DA50 ve LPS+DA200 gruplarının IL-10 düzeyleri ise LPS grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ($p<0,05$).



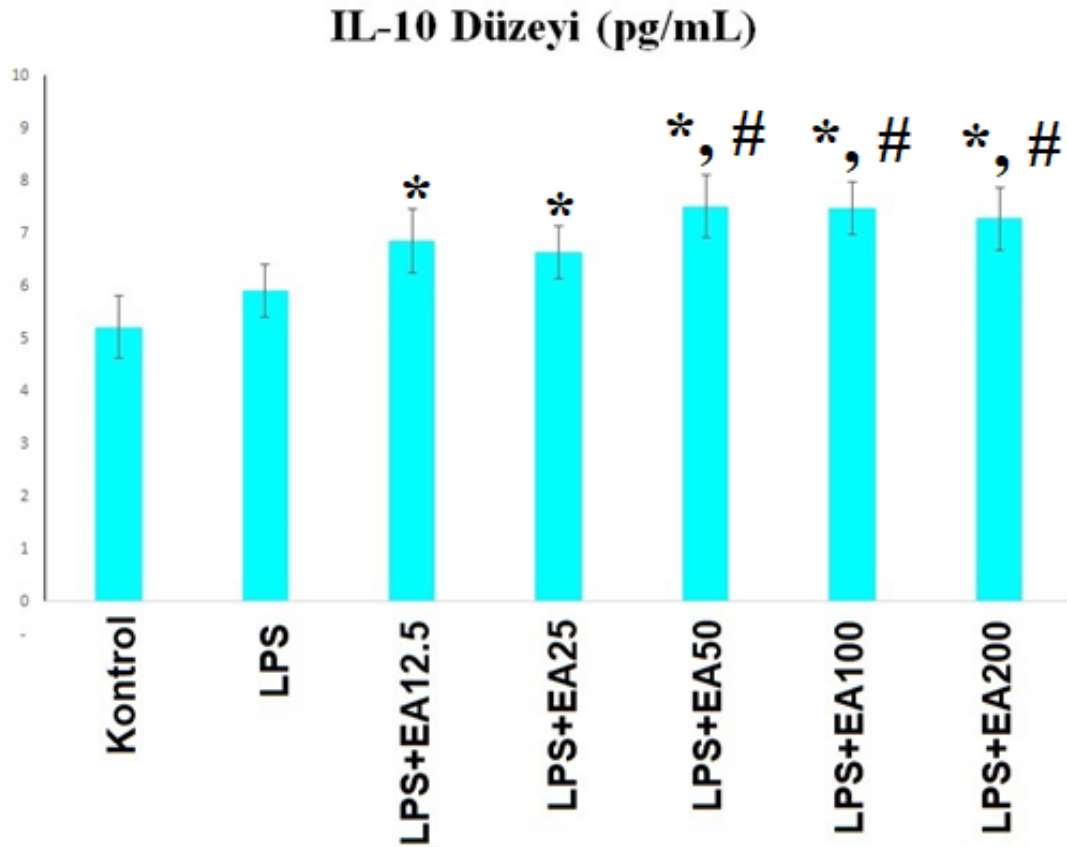
Şekil 33. Diffraktaik asit uygulamasının IL-10 düzeylerine etkisi (pg/mL) ($n=5$). (IL-10: Interlökin-10; LPS: Lipopolisakkarit; DA: Diffraktaik asit)

*Kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı ölçüde yüksek bulunmuştur ($p<0,05$)

#LPS grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı ölçüde yüksek bulunmuştur ($p<0,05$)

4.27. Evernik Asit Uygulamasının IL-10 Düzeyine Etkisi

Tüm grupların IL-10 düzeyleri Şekil 34'te gösterilmiştir. LPS grubu ile kontrol grubunun IL-10 düzeyleri istatistiksel açıdan fark göstermemektedir ($p>0,05$). Öte yandan LPS+EA50, LPS+EA100 ve LPS+EA200 gruplarının IL-10 düzeyleri ise LPS grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ($p<0,05$).



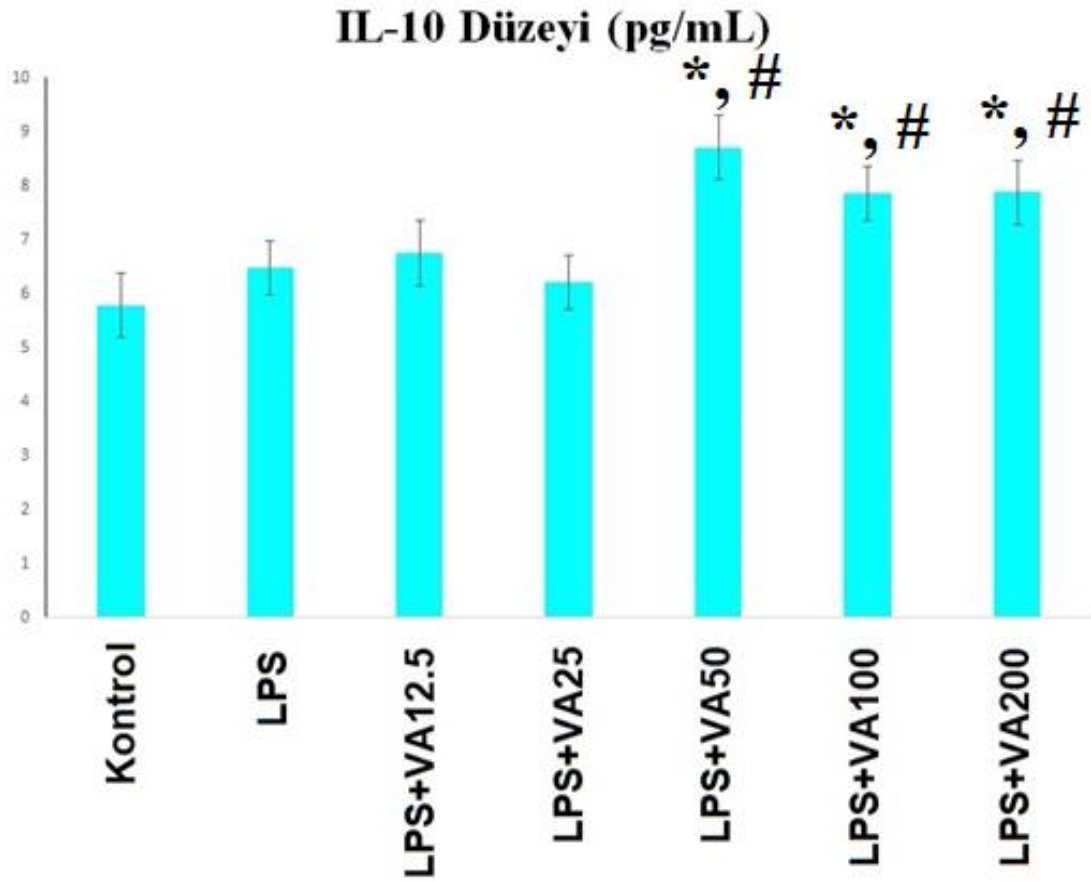
Şekil 34. Evernik asit uygulamasının IL-10 düzeylerine etkisi (pg/mL) ($n=5$). (IL-10: İnterlökin-10; LPS: Lipopolisakkarit; EA: Evernik asit)

*Kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı ölçüde yüksek bulunmuştur ($p<0,05$)

#LPS grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı ölçüde yüksek bulunmuştur ($p<0,05$)

4.28. Vulpinik Asit Uygulamasının IL-10 Düzeyine Etkisi

Tüm grupların IL-10 düzeyleri Şekil 35’de gösterilmiştir. LPS grubu ile kontrol grubunun IL-10 düzeyleri istatistiksel açıdan fark göstermemektedir ($p>0,05$). Öte yandan LPS+VA50, LPS+VA100 ve LPS+VA200 gruplarının IL-10 düzeyleri ise LPS grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ($p<0,05$).



Şekil 35. Vulpinik asit uygulamasının IL-10 düzeylerine etkisi (pg/mL) ($n=5$). (IL-10: Interlökin-10; LPS: Lipopolisakkarit; VA: Vulpinik asit)

*Kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı ölçüde yüksek bulunmuştur ($p<0,05$)

#LPS grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı ölçüde yüksek bulunmuştur ($p<0,05$)

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Makrofaj olarak adlandırılan ve fagositoz yapan hücreler, vücutta çeşitli dokulara dağılmış olarak bulunurlar (Varol ve ark., 2015). Makrofajlar doğal immunité, inflamasyon ve konakçı savunmasında çok önemli rollere sahip hücrelerdir. Bilindiği gibi aynı zamanda antijen sunma yetenekleri de olan makrofajlar doğal immün sistemin bir unsurudur fakat doğal ve edinsel immün sistemler arasında adeta bir köprü görevi yaparlar. Karaciğerin, yabancı antijenlere karşı immünolojik tolerans dâhil birçok fonksiyona sahip hayati bir organ olması nedeniyle, karaciğer hastalıkları ciddi oranda ölüme yol açabilen çok önemli sağlık sorunlarıdır. Karaciğer parankimal hepatositler ve parankimal olmayan hücrelerden oluşur; parankimal olmayan hücreler arasında endotel hücreleri, karaciğer makrofaj hücreleri olan Kupffer hücreleri, pit hücreleri, hepatik stellat hücreleri ve kolanjiyositler vardır (Ju ve Tacke, 2016; Bouwens, 1998). Bu hücrelerden karaciğer makrofajları homeostazisin sağlanmasında önemli roller üstlenmektedirler (Guan ve He, 2013). Son yıllarda, hepatogenezis sırasında iki türlü karaciğer makrofaj gelişimi bildirilmiştir. Prenatal dönemde karaciğer makrofajlarının büyük çoğunluğu vitellüs kesesinden köken alan CD68 pozitif makrofajlar olup, bu hücreler çok yüksek düzeyde fagositik aktiviteye sahiptir. Bu dönemde karaciğerde CD163 ve CD204 pozitif olan hücreler çok azdır. Doğumdan sonra ise CD68 pozitif makrofajlar derece derece azalırken CD163 pozitif Kupffer hücreleri artar. Karaciğer makrofajlarının gelişimindeki bu köken farklılıkları hepatik makrofajların farklı fonksiyonlara sahip olması nedeniyle önemlidir (Yamate ve ark., 2016).

Karaciğer makrofajları, hepatik mikroçevreden köken alan ve özellikleri mikroçevre koşullarından oldukça etkilenen, uyarılara kolaylıkla adapte olabilen, değişken hücrelerdir. Patolojik lezyonlarda ortaya çıkan makrofajlar, patolojinin aşamalarına veya dokulara bağlı olarak karmaşık durumlara sahip olabilirler. Klasik olarak aktive edilen M1 makrofajlar ve alternatif olarak aktive edilen M2 makrofajlar olarak ayrılan iki ayrı makrofaj polarizasyon fenotipi bulunmaktadır. Son yıllarda M1/M2 makrofaj polarizasyonu olarak adlandırılan bu yeni makrofaj polarizasyon konsepti önemli kabul edilmektedir. M1 makrofajlar; CD68 pozitif olup, esas olarak IFN- γ ile uyarılırlar ve yüksek oranda fagositoz yeteneği ve sitotoksisiteye sahiptirler. M2 tip

makrofajlar ise CD163 pozitif ve CD204 pozitif olup temel olarak IL-4 tarafından uyarılırlar ve onarıcı fibrozisde görev yaparlar (Yamate ve ark., 2016). Endotoksinler organizmada ateş, şok ve ölüm gibi ciddi durumlara neden olabilirler. Tehlikeli endotoksinlerden olan LPS'lerin ortadan kaldırılması karaciğerde esas olarak Kupffer hücreleri aracılığı ile olur (Hamano ve ark., 2002). TLR'lerin aktivasyonunun, proinflatuar aktivasyonu indükleyen M1 polarize makrofaj cevabını uyardıklarını bildirmiştir. Karaciğer makrofajları olan Kupffer hücreleri portal kandaki bağırsak kökenli bakteriyel LPS gibi çeşitli zararlı ajanlara cevap vermede önemli bir rol oynarlar. Gram negatif bakterilerin bir bileşeni olan LPS, konakçıdaki inflamatuvar yanıtta güçlü bir sitokin aracılığını indükleyen, güçlü bir endotoksindir. LPS, TNF- α ve IL-1 gibi proinflatuvar sitokinlerin salınması için TLR4 sinyal yoluyla Kupffer hücrelerini aktive eder. LPS, karaciğere nötrofillerin birikimine yol açar ve ardından inflamatuvar faktörlerin ekspresyonunu uyarak inflamasyonu başlatır. TLR4'ün uyarılmasının hücrel hiperaktivasyona ve nötrofillerin karaciğerin dar kılcal damarlarında birikmesine neden olduğuna inanılmaktadır (McDonald ve ark., 2013). LPS, makrofajları aktive edebilir özelliğinden dolayı enflamasyon modeli oluşturulması amacıyla sıklıkla kullanılmaktadır. LPS ile aktive edilen makrofaj hücreleri, sitokinler, kemokinler, prostaglandinler, koloni stimule edici faktörler, lizozimler, proteazlar, büyüme faktörleri, eikazonoidler ve nitrik oksit üreterek enflamatuvar cevapta merkezi rol oynarlar (Qi ve Shelhamer, 2005). Farmakoterapide özellikle non-steroidal antienflamatuvar ilaçlar (NSAIDs) COX-2'nin inhibisyonunda sıklıkla kullanılmaktadır. Ancak bu ilaçlar trombosit agregasyonunu engelleyecek prostanoidlerin sentezini engellemekte ve miyokart enfarktüsü ve gastrointestinal sistem patolojilerinin riskinde artışa neden olabilmektedir (Aalbers, 2012). Bu durum yan etkisi nispeten daha az olan doğal kaynaklı ilaçların keşfini gerektirmektedir. Yapılan çalışmalarda, doğal kaynaklı pek çok molekülün, çeşitli enflamatuvar sitokinlerin veya mediatörlerin seviyelerini düzenleyerek antienflamatuvar aktivite gösterdiği bildirilmiştir (Wu ve ark., 2011).

Likenler, bir mikobiyont ile bir veya daha fazla ekolojik olarak zorunlu biyotrof olarak fotosentez yapan tek hücreli veya filamentöz yapılu fotobiyont arasındaki simbiyotik ilişki ile oluşan kararlı, mutualist yaşam sergileyen ve biyolojik olarak aktif birçok düşük moleküler ağırlıklı sekonder metabolit kaynağı oluşturan mikroorganizmaların kompleks topluluklarıdır (Spribille ve ark., 2022). Liken sekonder

metabolitlerinin antioksidan, antibakteriyel, antifungal, antiviral, antiherbivor, fotoprotektif, antikanser, antipiretik ve analjezik aktiviteye sahip oldukları bildirilmiştir (Mohammadi ve ark., 2022). Ayrıca son yıllarda liken ekstraktlarının ve liken sekonder metabolitlerinin antienflamatuvar aktivitelerini araştıran çalışmalar gittikçe artmaktadır (Mun ve ark., 2020). Lobarik asit, stereocalpin A ve ramalinin, TNF- α ile uyarılan fare düz kas hücrelerinde antienflamatuvar aktivite gösterdiği bildirilmiştir (Kwon ve ark., 2016; Park ve ark., 2015; Byeon ve ark., 2012). Choi ve ark. (2009) *Ramalina terebrata* ekstresinin makrofajlarda nitrit/nitrat salınımını anlamlı derece azalttığını göstermişlerdir. Jin ve ark. (2008), usnik asidin fare makrofaj hücrelerinde LPS stimülasyonu ile artan TNF- α ve nitrik oksit düzeylerini anlamlı derecede azalttığını göstermişlerdir. Odabaşoğlu ve ark. (2006), sıçanlarda indometazin ile oluşturulan gastrik ülser modelinde usnik asidin iNOS aktivitesini azalttığını ortaya koymuştur. Engel ve ark. (2007), *Usnia barbata* özütünün insan keratinosit hücrelerinde UV-B ile oluşturulan enflamatuvar hasara karşı COX-2 ve PGE₂ üretimini anlamlı derecede azalttığını göstermişlerdir. Ancak literatürde liken sekonder metabolitleri olan atranorin, diffraktaik asit, evernik asit ve vulpinik asitin makrofaj hücreleri üzerindeki antienflamatuvar aktivitesini araştıran bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Bu bağlamda, biz de çalışmamızda bu sekonder metabolitlerin LPS ile uyarılan makrofaj hücrelerinde antienflamatuvar etkinlik gösterip göstermediklerini araştırdık.

Potansiyel terapötik/protektif ajanların yüksek derecede sitotoksik etkisinin olmaması istendiğinden dolayı, öncelikle çalışmamızda kullanacağımız liken sekonder metabolitlerinin makrofaj hücreleri üzerine sitotoksik etkisini test ettik. Çalışmamızda amaç LPS ile oluşturulacak enflamatuvar uyarıya karşı liken sekonder metabolitlerinin sitotoksik olmayan koruyucu olabilecek konsantrasyonlarını belirlemektir. Daha önceki çalışmalarda atranorin, diffraktaik asit, evernik asit ve vulpinik asitin çeşitli hücelere sitotoksik etkisinin olmadığını gösterir çalışmalar olsa da bu sekonder metabolitlerin makrofaj hücreleri üzerine sitotoksik etkisini araştıran bir çalışmaya literatürde rastlanılmamıştır. Yaptığımız çalışmada atranorin, diffraktaik asit, evernik asit ve vulpinik asitin 12,5-200 μ M konsantrasyonları denenmiş olup bu konsantrasyonlardaki sekonder metabolit uygulamaları makrofaj hücrelerine gözle görülür bir sitotoksik etki oluşturmadığı gözlemlenmiştir. 200 μ M atranorin, diffraktaik asit, evernik asit ve vulpinik asit uygulamalarının bile makrofaj hücreleri üzerinde oluşturduğu sitotoksikite

% 10'un altındaydı. Bu nedenle çalışmamızda atranorin, diffraktaik asit, evernik asit ve vulpinik asitin önemli bir sitotoksik etki oluşturmeyen 12,5-200 µM konsantrasyonları kullanılmıştır.

Yaptığımız çalışmada, RAW264.7 makrofaj hücrelerine uygulanan LPS konsantrasyonu 1 µg/mL olarak belirlenmiş olup bu konsantasyondaki LPS uygulamasının makrofaj hücreleri üzerinde yüksek sitotoksik etki göstermeden, enflamasyona bağlı nörodejenerasyon belirleçlerinde artışa sebep olabileceği yapılan önceki çalışmalarda gösterilmiştir. Liu ve ark (2018), 1 µg/mL LPS ile muamele edilen RAW264.7 hücrelerinde TNF-α seviyesinin indüklendiğini ve enflamatuvar hücre modelinin oluşturulduğunu bildirmişlerdir. LPS gibi iyi bilinen enflamatuvar uyarıcı ile aktif hale geçen makrofaj hücreler TNF-α, IL-1β ve IL-6 gibi pro-enflamatuvar sitokinler ve/veya NOx ve PGE₂ gibi sitotoksik aracı moleküller üretirler (Tang ve ark., 2019). Çalışmamızda LPS ile uyarılarak aktif hale geçirilen RAW264.7 makrofaj hücrelerine farklı konsantrasyonlardaki liken sekonder metabolitlerinin TNF-α, IL-1β, IL-6, IL-10, NOx ve PGE₂ düzeylerine etkileri incelenmiştir.

TNF-α, endotoksin kaynaklı sistemik enflamasyonda birincil enflamatuvar aracı olarak rol oynar ve IL-1β, IL-6 ve IL-10 gibi sitokinlerin salgılanmasını uyarır (Kanno ve ark., 2004). Öldürücü şokta etkili ana patojenik sebebin LPS ile etkinleşen makrofajlar tarafından üretilen TNF-α olduğu düşünülmektedir (Beutler ve Cerami, 1988). Ishikawa ve ark. (1998) farelere 300 µg/kg LPS'yi *i.p.* yolla uygulamışlar ve uygulamadan sonra 90. dakikada TNF-α'nın en yüksek seviyeye ulaştığını tespit etmişlerdir. Olinga ve ark. (2001) karaciğer parenkimal ve parenkimal olmayan hücre kültürleri üzerine çeşitli yoğunluklarda LPS uygulamışlar ve 24 saat sonra sadece 100 µg/mL yoğunluğunda LPS uygulanan hücre kültürlerinde kontrol grubuna göre TNF-α değerlerinin arttığını belirtmişlerdir. Kanno ve ark. (2004) da farelere 300 µg/kg LPS'nin *i.p.* verilmesinden 90 dakika sonra TNF-α değerlerinin kontrole göre önemli düzeyde arttığını saptamışlardır. Dutta ve Bishayi (2009), hiperlipidemik ve sağlıklı farelere 1 µg/kg *E. coli* kaynaklı endotoksini *i.p.* yolla vermişler ve LPS verilen grupta TNF-α değerlerinin her iki grupta da arttığını belirtmişlerdir. Nishio ve ark. (2013), LPS ile A549 insan akciğer kanser hücrelerinde uyarılan sitotoksositeye karşı çeşitli tokoferollerin yangı önleyici etkilerini incelemişler ve 0,6 mg/mL miktarında LPS'ye maruz bırakılan insan akciğer kanser hücrelerinde 6 saat sonra TNF-α değerinin kontrole göre 10 kat daha yüksek olduğunu

bildirmişlerdir. Al-amri ve ark. (2013), sıçanlarda LPS ile uyarılan Parkinson hastalığında enflamatuvar araçlar üzerine epigallokatektin-3 gallatin etkisini araştırmışlardır. LPS verilen grubun beyin dokularında TNF- α değerlerinde kontrole göre artış olduğunu tespit etmişlerdir. El-Kamouni ve ark. (2017) LPS ile uyarılan hasara karşı zeytinyağı ve argan yağının etkinliğini karşılaştırdıkları çalışmada, TNF- α değerlerinin LPS verilen grupta kontrole göre 2 kat daha yüksek olduğunu tespit etmişlerdir. Yaptığımız çalışmada LPS uygulaması RAW264.7 makrofaj hücrelerinden TNF- α salınımını arttırdığı, atranorin, difraktaik asit ve vulpinik asitin uygulanan tüm konsantrasyonlarda, evernik asitin ise 12,5 μ M hariç tüm konsantrasyonlarda TNF- α düzeyini azaltarak antienflamatuvar aktivite gösterdiği görülmüştür.

IL-1 β , enfeksiyon, enflamasyon, hücre yaralanması ve toksinler gibi çeşitli hücre dışı uyaranlara yanıt olarak çeşitli hücreler tarafından salınan, pro-enflamatuvar ve bağışıklık sistemini düzenleyici bir sitokindir (Sawano ve ark., 2002). IL-1 β hücre çoğalması, hücrelerin farklılaşması ve vücut ısısının yükselmesinde önemli rol oynar (Kumolosasi ve ark., 2014). Olinga ve ark. (2001), karaciğer parenkimal ve parenkimal olmayan hücre kültürleri üzerine LPS'nin enflamatuvar etkinliğini araştırmışlar ve sadece 100 μ g/mL dozunda LPS uygulanan grupta 24 saat sonra hücre kültürlerinde kontrol grubuna göre IL-1 β değerinin arttığını belirtmişlerdir. Lapara ve Kelly (2010), fare makrofaj hücre kültürleri üzerine 100 ng/mL LPS uygulamışlar, LPS uygulanan grupta IL-1 β 'nın 2. saatte artmaya başladığını bildirmişlerdir. Yaptığımız çalışmada LPS uygulaması RAW264.7 makrofaj hücrelerinden IL-1 β salınımını arttırdığı, atranorin, difraktaik asit, evernik asit ve vulpinik asitin uygulanan tüm konsantrasyonlarda IL-1 β düzeyini azaltarak antienflamatuvar aktivite gösterdiği görülmüştür.

IL-6, akut faz proteinlerinin sentezi ile T ve B lenfositlerinin olgunlaşmasında anahtar rol oynayan önemli bir sitokindir. Ayrıca yanıklardan sonra sürekli olarak arttığı tespit edilmiştir (Agay ve ark., 2008). Dutta ve Bishayi (2009), hiperlipidemik ve sağlıklı farelere 1 μ g/kg *E. coli* kaynaklı endotoksini *i.p.* yolla vermişler, LPS verilen her iki grupta IL-6 değerlerinin arttığını bildirmişlerdir. Endotoksin verilmesini takiben sitokinlerin (TNF- α ve IL-6) salgılandığını ve hiperlipidemi sırasında yangının ilerleyişini hızlandırdıklarını saptamışlardır. Dokladny ve ark. (2010), sı şok proteini 70'in (HSP70) yüksek ekspresyonunun LPS kaynaklı sitokin seviyeleri üzerine etkilerini araştırdıkları çalışmada, LPS (50 μ g/kg) uygulamasından 4 saat sonra plazma IL-6

değerinin yaklaşık olarak beş kat arttığını tespit etmişlerdir. El-Kamouni ve ark. (2017), LPS (100 µg/kg) ile uyarılan hasara karşı zeytinyağı ve argan yağının etkinliğini karşılaştırdıkları çalışmada, IL-6 değerlerinin LPS verilen grupta kontrole göre 16 kat daha yüksek olduğunu belirtmişlerdir. Lapara ve Kelly (2010), fare makrofaj hücre kültürleri üzerine 100 ng/mL LPS uygulama sonrası ve 2., 8. ve 19. saatlerde bazı sitokinlerin kinetiğini araştırmışlardır. LPS uygulanan grupta IL-6'nın 8. saatte önemli düzeyde artış gösterdiğini, 19. saatte ise en yüksek seviyeye ulaştığını tespit etmişlerdir. Araştırmacılar IL-6 değerlerinin LPS verilen grupta kontrol grubuna göre ölçüm yapılan saatlerde önemli düzeyde arttığını belirtmişlerdir. Yaptığımız çalışmada LPS uygulaması RAW264.7 makrofaj hücrelerinden IL-6 salınımını arttırdığı, atranorin, diffraktaik asit ve vulpinik asitin uygulanan tüm konsantrasyonlarda, evernik asitin ise 12,5 µM hariç tüm konsantrasyonlarda IL-6 düzeyini azaltarak antienflamatuvar aktivite gösterdiği görülmüştür.

Sitokin üretimini azaltıcı faktör olarak da adlandırılmış olan IL-10, yardımcı T lenfositler, B lenfositler, mast hücreleri, eozinofiller, monositler, makrofajlar ve keratinositler tarafından salgılanırlar (Lalani ve ark., 1997). IL-10'un iki önemli etkisi vardır; bunlardan birincisi makrofajlar tarafından sitokinlerin üretimini engellemek, ikincisi ise makrofajların T hücresi aktivasyonundaki işlevleri engellemektir. Bu etkilerin sonucunda T hücresi aracılığı ile gelişen bağışıklık yanıtı inhibe edilir (Gröschel ve ark., 2017). T hücrelerinin proliferasyonunu ve sitokin salgılamasını baskılar. Pro-enflamatuvar sitokinlerin salgılanmasını engeller. Ayrıca IL-15, IL-6, IL-12 ve TNF-α'yı baskılar. Nitrik oksit ve prostaglandin sentezinin baskılar, IFN-γ üretiminin baskılar, B hücrelerinin farklılaşması ve proliferasyonunu artırır, makrofajlarca IL-1 reseptör salgılanmasını artırarak enflamasyonu engelleyebilir (Lalani ve ark., 1997). Yaptığımız çalışmada LPS uygulaması RAW264.7 makrofaj hücrelerinden IL-10 salınımını değiştirmedeği, atranorinin 12,5 µM hariç tüm konsantrasyonlarda, evernik asit ve vulpinik asitin 12,5 ve 25 µM hariç tüm konsantrasyonlarda ve diffraktaik asitin 12,5, 25 ve 100 µM hariç tüm konsantrasyonlarda IL-10 düzeyini arttırarak antienflamatuvar aktivite gösterdiği görülmüştür.

Nitrik oksit, hücre içi ve hücreler arası sinyalizasyonda önemli bir moleküldür. Birçok organın fizyolojik ve patolojik fonksiyonuna katkıda bulunan pek çok hücre tipi tarafından üretilir. Nöronal sistemde nörotransmitterler gibi biyolojik mediyatör olarak

görev yapar. Vasküler sistemde ise kan damar tonunu düzenler ve bağışıklık hücreleri için önemli bir savunma molekülüdür. iNOS tarafından üretilen nitrik oksit, makrofajların antimikrobiyal aktivitesine katkıda bulunur. Bununla birlikte nitrik oksit ve onun peroksinitrit ve azot dioksit gibi reaktif türlerinin yüksek konsantrasyonları karsinogenezis ve enflamasyonda önemli rol oynadığı bilinmektedir (Tsai ve ark., 1999). Bakteriyel LPS veya sitokinlere yanıt olarak üretilen yüksek nitrik oksit düzeyi endotoksemi ve enflamasyonda önemli bir rol oynamaktadır (Stoclet ve ark., 1998). iNOS ile indüklenen nitrik oksit üretiminin inhibisyonu enflamasyona karşı ilaçların etkinliğini değerlendirmek için bir ölçüm sağlayabilir (Chen ve ark., 2001). Okamoto ve ark. (1998) LPS'nin beyinde iNOS ekspresyonunu ve iNOS'tan sentezlenen NO_x metabolitlerinin beyin hiperemisine ne derece yol açtığını değerlendirmek için sıçanlarda farklı deney grupları oluşturarak beyin içi ventriküllere LPS uygulamasından sonra, deney hayvanlarının bölgesel beyin kan akımını 4 saat süreyle lazer-Doppler akış ölçer ile izlemişler ve serebral kortikal doku sıvısında iNOS'a ait mRNA ve protein seviyelerini ölçmüşlerdir. LPS uygulamasından 2 saat sonra, iNOS mRNA seviyelerinin biraz yükseldiğini, LPS uygulamasından 4 saat sonra ise iNOS etkinliğinde daha büyük bir artış olduğunu ve iNOS enzim aktivitesi ile iNOS protein seviyelerinin de önemli ölçüde arttığını tespit etmişlerdir. Hori ve ark. (2001), sıçan bağırsaklarında LPS'nin iNOS indüksiyonu üzerindeki etkisini incelemek için erkek Wistar sıçanlardan alınan ileum kas dokularını in situ LPS'ye (100 µg/mL) maruz bırakmışlardır. LPS'e maruz bırakılan dokularda kontrole kıyasla iNOS mRNA düzeylerinin güçlü bir şekilde eksprese olduğunu, iNOS etkinliğinin 90. dakikada artmaya başladığını ve 4. saatte en yüksek değere ulaştığını bildirmişlerdir. Choi ve ark. (2012), LPS uygulanan sıçanların böbrek dokularında iNOS'un ekspresyonunu araştırmışlar ve bu amaçla sıçanlara i.p. yolla LPS uygulamışlardır. iNOS mRNA indüksiyonunun, LPS uygulamasından 1 saat sonra başladığını, 6 ile 8 saat arasında en yüksek düzeye ulaştığını ve daha sonra hızla azaldığını saptamışlardır. Doursout ve ark. (2013), sıçanlarda LPS ile deneysel olarak oluşturulan nörodejenerasyonda 1., 3., 6., 12., 24. ve 48. saatlerde iNOS'un doku içeriğinde ciddi ve hızlı artışlar gösterdiğini ve nitrik oksit düzeyinin LPS uygulamasını takiben 1. saatte artmaya başladığını, 6. saatte en yüksek düzeye ulaştığını, 12. saatte bir miktar düştüğünü ve 48. saatte önemli ölçüde azaldığını bildirmişlerdir. Yaptığımız çalışmada LPS uygulaması RAW264.7 makrofaj hücrelerinden nitrik oksit salınımını arttırdığı,

atranorin, diffraktaik asit ve evernik asitin uygulanan tüm konsantrasyonlarda, vulpinik asitin ise 12,5, 25 ve 50 µM hariç tüm konsantrasyonlarda nitrik oksit düzeyini azaltarak antienflamatuvar aktivite gösterdiği görülmüştür.

PGE₂, araşidonik asitin prostanoid yağ asitleri türevidir. COX-2 enzimi enflamasyon sırasında hücrelerde indüklenir ve enflamasyon boyunca PGE₂'nin oluşumunda rol oynar. COX-2, bakteriyel LPS dâhil olmak üzere pro-enflamatuvar uyarıcılar tarafından indüklenir ve enflamasyon yerinde pro-enflamatuvar prostaglandileri üretir (Takeda ve Akira, 2005). COX-2'nin enflamasyondaki rolü dışında, aynı zamanda kolon kanseri, Alzheimer hastalığı, kalp yetmezliği ve hipertansiyon gibi hastalıkların patojenezinde önemli rol oynar (Chen ve ark., 2001). Okamoto ve ark. (1998), LPS'nin beyinde COX-2 ekspresyonunu ve COX-2'den sentezlenen COX metabolitlerinin beyin hiperemisine olan etkilerini araştırmışlar ve bu amaçla sıçanlarda beyin içi ventriküllere LPS uygulamasından sonra, deney hayvanlarının bölgesel beyin kan akımını 4 saat süreyle lazer-Doppler ile izlemişler ve serebral kortikal sıvıda COX-2 mRNA ve protein seviyelerini ölçmüşlerdir. LPS uygulamasından 2 saat sonra COX-2 mRNA seviyelerinin biraz yükseldiğini, 4 saat sonra ise COX-2 mRNA seviyelerinde daha büyük bir artış görüldüğünü ve COX enzim aktivitesinin önemli ölçüde arttığını tespit etmişlerdir. Hori ve ark. (2001), sıçan bağırsaklarında LPS'nin COX-2 indüksiyonu üzerindeki etkisini incelemişler ve bu amaçla erkek Wistar sıçanlardan alınan ileum kas dokularına in situ LPS uygulamışlardır. LPS uygulanan dokularda kontrole kıyasla COX-2 mRNA'larının güçlü bir şekilde eksprese olduğunu, COX-2 mRNA düzeyinin 30. dakikada artmaya başladığını ve 1. saatte en yüksek düzeye ulaştığını bildirmişlerdir. Lugarini ve ark. (2002), LPS ile oluşturulan anoreksiyada COX-2 ekspresyonunun arttığını bildirmişlerdir. Kanno ve ark. (2006), RAW 264.7 makrofajlarda LPS ile oluşturdukları endotoksik şok durumunda doza bağımlı olarak LPS ile RAW 264.7 hücrelerinde COX-2 etkinliğinin arttığını bildirmişlerdir. Font-Nieves ve ark. (2012), LPS ile uyarımdan sonra COX-2 indüksiyonu ve LPS'nin prostanoidlerin oluşumundaki rolünü araştırdıkları çalışmada, sıçan ve farelere LPS'yi stereotaksik olarak uygulamışlardır. Araştırmacılar kemirgenlerde LPS'nin beyin içi uygulamasının, özellikle astroglia ve mikrogli'a'da COX-2'yi güçlü bir şekilde indüklediğini bildirmişlerdir. Yaptığımız çalışmada LPS uygulaması RAW264.7 makrofaj hücrelerinden PGE₂ salınımını arttırdığı, vulpinik asit ve evernik asitin

uygulanan tüm konsantrasyonlarda, atranorin ve diffraktaik asitin ise 12,5 µM hariç tüm konsantrasyonlarda nitrik oksit düzeyini azaltarak antienflamatuvar aktivite gösterdiği görülmüştür.

Çalışmamızda liken sekonder metabolitlerinden atranorin, diffraktaik asit, evernik asit ve vulpinik asitin LPS uyarımı ile RAW264.7 makrofaj hücrelerinde oluşturulan enflamatuvar yanıtı karşı antienflamatuvar etkinlikleri araştırılmıştır. Elde ettiğimiz bulgulara göre, bu maddelerin sub-toksik konsantrasyonlarda bile makrofaj hücrelerinde pro-enflamatuvar sitokinlerin ve mediyatörlerin seviyesinde düşüşe, antienflamatuvar sitokin seviyesinde ise artışa neden olarak, meydana gelen enflamasyonu baskıladığı ve antienflamatuvar etkinlik gösterdiği görülmektedir. Bu sonuçlar doğrultusunda liken sekonder metabolitlerinin LPS kaynaklı enflamatuvar hastalıkların tedavisinde önemli bir değere sahip olabileceğini düşündürmektedir. Bu nedenle, zengin bir liken florasına sahip olan ülkemizde liken sekonder metabolitlerinin LPS'nin neden olduğu enflamasyon hastalıklarının tedavilerine yönelik yeni ilaçların geliştirilmesinde daha ileri çalışmalara yön vereceğini ve özellikle antienflamatuvar etkisi yüksek olan türlerin biyolojik kökenli ilaç hammaddesi olarak endüstriyel üretimlerinin gerçekleştirilmesi halinde ülke ekonomisine katkı sağlayabileceğini söylemek mümkündür.

KAYNAKLAR

- Aalbers J. Benefit versus risk in the use of non-selective NSAIDs and selective COX-2 inhibitors. *Cardiovasc J Afr.* 2012;23(6):356.
- Agay D, Andriollo-Sanchez M, Claeysen R, et al. Interleukin-6, TNF-alpha and interleukin-1 beta levels in blood and tissue in severely burned rats. *Eur Cytokine Netw.* 2008;19(1):1-7.
- Agrawal I, Sharma N, Saxena S, et al. Protocol for induction and characterization of microglia extracellular traps in murine and human microglia cells. *STAR Protoc.* 2021;2(3):100678.
- Akira S, Takeda K. Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol.* 2004;4(7):499-511.
- Aktan F. iNOS-mediated nitric oxide production and its regulation. *Life Sci.* 2004;75(6):639-53.
- Al-Amri JS, Hagraas MM, Mohamed I M. Effect of epigallocatechin-3-gallate on inflammatory mediators release in LPS-induced Parkinson's disease in rats. *Indian J Exp Biol.* 2013;51(5):357-62.
- Almatroodi SA, McDonald CF, Darby IA, Pouniotis DS. Characterization of M1/M2 Tumour-Associated Macrophages (TAMs) and Th1/Th2 Cytokine Profiles in Patients with NSCLC. *Cancer Microenviron.* 2016;9(1):1-11.
- Asplund J, Gauslaa Y. Mollusc grazing limits growth and early development of the old forest lichen *Lobaria pulmonaria* in broadleaved deciduous forests. *Oecologia.* 2008;155(1):93-9.
- Beutler B, Cerami A. Tumor necrosis, cachexia, shock, and inflammation: a common mediator. *Annu Rev Biochem.* 1988;57:505-18.
- Bingle L, Brown NJ, Lewis CE. The role of tumour-associated macrophages in tumour progression: implications for new anticancer therapies. *J Pathol.* 2002;196(3):254-65.
- Biswas SK, Chittechath M, Shalova IN, Lim JY. Macrophage polarization and plasticity in health and disease. *Immunol Res.* 2012;53(1-3):11-24.
- Biswas SK, Sica A, Lewis CE. Plasticity of macrophage function during tumor progression: regulation by distinct molecular mechanisms. *J Immunol.* 2008;180(4):2011-7.
- Bone RC, Grodzin CJ, Balk RA. Sepsis: a new hypothesis for pathogenesis of the disease process. *Chest.* 1997;112(1):235-43.
- Bouwens L. Proliferation and phenotypic expression of non-parenchymal liver cells. *Scand J Gastroenterol.* 1988;23:46-51.
- Brunauer G, Hager A, Grube M, Türk R, Stocker-Wörgötter E. Alterations in secondary metabolism of aposymbiotically grown mycobionts of *Xanthoria elegans* and cultured resynthesis stages. *Plant Physiol Biochem.* 2007;45(2):146-51.
- Byeon HE, Park BK, Yim JH, et al. Stereocalpin A inhibits the expression of adhesion

molecules in activated vascular smooth muscle cells [published correction appears in *Int Immunopharmacol*. 2019 Jan;66:389]. *Int Immunopharmacol*. 2012;12(2):315-25.

Calcott MJ, Ackerley DF, Knight A, Keyzers RA, Owen JG. Secondary metabolism in the lichen symbiosis. *Chem Soc Rev*. 2018;47(5):1730-60.

Cardile V, Graziano ACE, Avola R, Piovano M, Russo A. Potential anticancer activity of lichen secondary metabolite physodic acid. *Chem Biol Interact*. 2017;263:36-45.

Carter TS, Clark CM, Fenn ME, et al. Mechanisms of nitrogen deposition effects on temperate forest lichens and trees. *Ecosphere*. 2017;8(3):10.

Chen YC, Shen SC, Chen LG, Lee TJ, Yang LL. Wogonin, baicalin, and baicalein inhibition of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 gene expressions induced by nitric oxide synthase inhibitors and lipopolysaccharide. *Biochem Pharmacol*. 2001;61(11):1417-27.

Chen YC, Shen SC, Chen LG, Lee TJ, Yang LL. Wogonin, baicalin, and baicalein inhibition of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 gene expressions induced by nitric oxide synthase inhibitors and lipopolysaccharide. *Biochem Pharmacol*. 2001;61(11):1417-27.

Chen YC, Shen SC, Lee WR, Hou WC, Yang LL, Lee TJ. Inhibition of nitric oxide synthase inhibitors and lipopolysaccharide induced inducible NOS and cyclooxygenase-2 gene expressions by rutin, quercetin, and quercetin pentaacetate in RAW 264.7 macrophages. *J Cell Biochem*. 2001;82(4):537-48.

Choi HS, Yim JH, Lee HK, Pyo S. Immunomodulatory effects of polar lichens on the function of macrophages in vitro. *Mar Biotechnol (NY)*. 2009;11(1):90-8.

Choi JY, Nam SA, Jin DC, Kim J, Cha JH. Expression and cellular localization of inducible nitric oxide synthase in lipopolysaccharide-treated rat kidneys. *J Histochem Cytochem*. 2012;60(4):301-15.

Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature*. 2002;420(6917):860-7.

Cvetanovic M, Ucker DS. Innate immune discrimination of apoptotic cells: repression of proinflammatory macrophage transcription is coupled directly to specific recognition. *J Immunol*. 2004;172(2):880-9.

de Groot AE, Pienta KJ. Epigenetic control of macrophage polarization: implications for targeting tumor-associated macrophages. *Oncotarget*. 2018;9(29):20908-27.

de Groot AE, Pienta KJ. Epigenetic control of macrophage polarization: implications for targeting tumor-associated macrophages. *Oncotarget*. 2018;9(29):20908-27.

de Haas AH, Boddeke HW, Biber K. Region-specific expression of immunoregulatory proteins on microglia in the healthy CNS. *Glia*. 2008;56(8):888-94.

de Vries JE. The role of IL-13 and its receptor in allergy and inflammatory responses. *J Allergy Clin Immunol*. 1998;102(2):165-9.

Desalegn G, Pabst O. Inflammation triggers immediate rather than progressive changes in monocyte differentiation in the small intestine. *Nat Commun*. 2019;10(1):3229.

- Diegelmann RF, Evans MC. Wound healing: an overview of acute, fibrotic and delayed healing. *Front Biosci.* 2004;9:283-9.
- Dinarello CA. Proinflammatory cytokines. *Chest.* 2000;118(2):503-8.
- Dokladny K, Lobb R, Wharton W, Ma TY, Moseley PL. LPS-induced cytokine levels are repressed by elevated expression of HSP70 in rats: possible role of NF-kappaB. *Cell Stress Chaperones.* 2010;15(2):153-63.
- Doursout MF, Schurdell MS, Young LM, et al. Inflammatory cells and cytokines in the olfactory bulb of a rat model of neuroinflammation; insights into neurodegeneration? *J Interferon Cytokine Res.* 2013;33(7):376-83.
- Dutta K, Bishayi B. Escherichia coli lipopolysaccharide administration alters antioxidant profile during hypercholesterolemia. *Indian J Clin Biochem.* 2009;24(2):179-83.
- Dutta K, Bishayi B. Escherichia coli lipopolysaccharide administration alters antioxidant profile during hypercholesterolemia. *Indian J Clin Biochem.* 2009;24(2):179-83.
- El-Kamouni S, El Kebbj R, Andreoletti P, et al. Protective Effect of Argan and Olive Oils against LPS-Induced Oxidative Stress and Inflammation in Mice Livers. *Int J Mol Sci.* 2017;18(10):2181.
- Engel K, Schmidt U, Reuter J, Weckesser S, Simon-Haarhaus B, Schempp CM. Usnea barbata extract prevents ultraviolet-B induced prostaglandin E2 synthesis and COX-2 expression in HaCaT keratinocytes. *J Photochem Photobiol B.* 2007;89(1):9-14.
- Fernández-Moriano C, Divakar PK, Crespo A, Gómez-Serranillos MP. Protective effects of lichen metabolites evernic and usnic acids against redox impairment-mediated cytotoxicity in central nervous system-like cells. *Food Chem Toxicol.* 2017;105:262-77.
- Fernández-Moriano C, Gómez-Serranillos MP, Crespo A. Antioxidant potential of lichen species and their secondary metabolites. A systematic review. *Pharm Biol.* 2016;54(1):1-17.
- Font-Nieves M, Sans-Fons MG, Gorina R, et al. Induction of COX-2 enzyme and down-regulation of COX-1 expression by lipopolysaccharide (LPS) control prostaglandin E2 production in astrocytes. *J Biol Chem.* 2012;287(9):6454-68.
- Funes SC, Rios M, Escobar-Vera J, Kalergis AM. Implications of macrophage polarization in autoimmunity. *Immunology.* 2018;154(2):186-95.
- Gabay C. Interleukin-6 and chronic inflammation. *Arthritis Res Ther.* 2006;8 Suppl 2(Suppl 2):S3.
- Gauslaa Y, Bidussi M, Solhaug KA, Asplund J, Larsson P. Seasonal and spatial variation in carbon based secondary compounds in green algal and cyanobacterial members of the epiphytic lichen genus *Lobaria*. *Phytochemistry.* 2013;94:91-8.
- Genin M, Clement F, Fattaccioli A, Raes M, Michiels C. M1 and M2 macrophages derived from THP-1 cells differentially modulate the response of cancer cells to etoposide. *BMC Cancer.* 2015;15:577.

- Giuliano F, Warner TD. Origins of prostaglandin E2: involvements of cyclooxygenase (COX)-1 and COX-2 in human and rat systems. *J Pharmacol Exp Ther.* 2002;303(3):1001-6.
- Gleissner CA. Macrophage Phenotype Modulation by CXCL4 in Atherosclerosis. *Front Physiol.* 2012;3:1.
- Gordon S, Taylor PR. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Rev Immunol.* 2005;5(12):953-64.
- Gordon S. The macrophage: past, present and future. *Eur J Immunol.* 2007;37(1):9-17.
- Gouinaud H, Leclerc L. Color segmentation of MGG colored cytological images using non linear opponent color spaces. *Image Anal Stereol.* 2013;32(3):167-74.
- Goverman J. Autoimmune T cell responses in the central nervous system. *Nat Rev Immunol.* 2009;9(6):393-407.
- Gratchev A, Schledzewski K, Guillot P, Goerdts S. Alternatively activated antigen-presenting cells: molecular repertoire, immune regulation, and healing. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol.* 2001;14(5):272-9.
- Gröschel C, Sasse A, Röhrborn C, et al. T helper cells with specificity for an antigen in cardiomyocytes promote pressure overload-induced progression from hypertrophy to heart failure. *Sci Rep.* 2017;7(1):15998.
- Guan YS, He Q. A current update on the role of alternative and complementary medicine in the treatment of liver diseases. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2013;2013:321234.
- Hamano T, Tong V, Mutai M, Hayashi M, Tanaka E. Kupffer cell-mediated cytotoxicity induced by lipopolysaccharide0111:B4 is greater in dogs than in rats and monkeys. *J Toxicol Sci.* 2002;27(1):1-9.
- Hao NB, Lü MH, Fan YH, Cao YL, Zhang ZR, Yang SM. Macrophages in tumor microenvironments and the progression of tumors. *Clin Dev Immunol.* 2012;2012:948098.
- Harrisson PM, Walton DWH, Rothery P. The effects of temperature and moisture on CO₂ uptake and total resistance to water loss in the antarctic foliose lichen *Umbilicaria antarctica*. *New Phytol.* 1989;111(4):673-82.
- Harvey R, Champe P. *Pharmacology*. Lippincot Williams, Philadelphia, 1998:401-8.
- Hata AN, Breyer RM. Pharmacology and signaling of prostaglandin receptors: multiple roles in inflammation and immune modulation. *Pharmacol Ther.* 2004;103(2):147-66.
- Hauck M, Huneck S. Lichen substances affect metal adsorption in *Hypogymnia physodes*. *J Chem Ecol.* 2007;33(1):219-23.
- Hauck M. Metal homeostasis in *Hypogymnia physodes* is controlled by lichen substances. *Environ Pollut.* 2008;153(2):304-8.
- Hehlgans T, Pfeffer K. The intriguing biology of the tumour necrosis factor/tumour necrosis factor receptor superfamily: players, rules and the games. *Immunology.*

2005;115(1):1-20.

Hori M, Kita M, Torihashi S, et al. Upregulation of iNOS by COX-2 in muscularis resident macrophage of rat intestine stimulated with LPS. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2001;280(5):930-8.

Huang KT, Kuo L, Liao JC. Lipopolysaccharide activates endothelial nitric oxide synthase through protein tyrosine kinase. *Biochem Biophys Res Commun*. 1998;245(1):33-7.

Huneck S. The significance of lichens and their metabolites. *Naturwissenschaften*. 1999;86(12):559-70.

Ishikawa M, Kanno S, Takayanagi M, Takayanagi Y, Sasaki K. Thalidomide promotes the release of tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) and lethality by lipopolysaccharide in mice. *Biol Pharm Bull*. 1998;21(6):638-40.

Ivashkiv LB. Epigenetic regulation of macrophage polarization and function. *Trends Immunol*. 2013;34(5):216-23.

Ivashkiv LB. Epigenetic regulation of macrophage polarization and function. *Trends Immunol*. 2013;34(5):216-23.

Jin JQ, Li CQ, He LC. Down-regulatory effect of usnic acid on nuclear factor-kappaB-dependent tumor necrosis factor-alpha and inducible nitric oxide synthase expression in lipopolysaccharide-stimulated macrophages RAW 264.7. *Phytother Res*. 2008;22(12):1605-09.

Ju C, Tacke F. Hepatic macrophages in homeostasis and liver diseases: from pathogenesis to novel therapeutic strategies. *Cellular and Molecular Immunology*. 2016;13(3):316-27.

Kanno S, Shouji A, Hirata R, Asou K, Ishikawa M. Effects of naringin on cytosine arabinoside (Ara-C)-induced cytotoxicity and apoptosis in P388 cells. *Life Sci*. 2004;75(3):353-65.

Kılıç N, Aras S, Cansaran-Duman D. Determination of Vulpinic Acid Effect on Apoptosis and mRNA Expression Levels in Breast Cancer Cell Lines. *Anticancer Agents Med Chem*. 2018;18(14):2032-41.

Kleinert H, Wallerath T, Fritz G, et al. Cytokine induction of NO synthase II in human DLD-1 cells: roles of the JAK-STAT, AP-1 and NF-kappaB-signaling pathways. *Br J Pharmacol*. 1998;125(1):193-201.

Koparal AT. Anti-angiogenic and antiproliferative properties of the lichen substances (-)-usnic acid and vulpinic acid. *Z Naturforsch C J Biosci*. 2015;70(5-6):159-64.

Kosecka M, Guzow-Krzemińska B, Černajová I, Škaloud P, Jabłońska A, Kukwa M. New lineages of photobionts in Bolivian lichens expand our knowledge on habitat preferences and distribution of *Asterochloris* algae. *Sci Rep*. 2021;11(1):8701.

Kudo I, Murakami M. Prostaglandin E synthase, a terminal enzyme for prostaglandin E2 biosynthesis. *J Biochem Mol Biol*. 2005;38(6):633-8.

Kumar J, Dhar P, Tayade AB, et al. Antioxidant capacities, phenolic profile and cytotoxic effects of saxicolous lichens from trans-Himalayan cold desert of Ladakh. *PLoS One*. 2014;9(6):e98696.

- Kumolosasi E, Salim E, Jantan I, Ahmad W. Kinetics of intracellular, extracellular and production of pro-inflammatory cytokines in lipopolysaccharide- stimulated human peripheral blood mononuclear cells. *Trop J Pharm Res.* 2014;13(4):536-43.
- Kwon IS, Yim JH, Lee HK, Pyo S. Lobaric Acid Inhibits VCAM-1 Expression in TNF- α -Stimulated Vascular Smooth Muscle Cells via Modulation of NF- κ B and MAPK Signaling Pathways. *Biomol Ther (Seoul).* 2016;24(1):25-32.
- Lahti A, Kankaanranta H, Moilanen E. P38 mitogen-activated protein kinase inhibitor SB203580 has a bi-directional effect on iNOS expression and NO production. *Eur J Pharmacol.* 2002;454(2-3):115-23.
- Lalani I, Bhol K, Ahmed AR. Interleukin-10: biology, role in inflammation and autoimmunity. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 1997;79(6):469-83.
- Lapara NJ 3rd, Kelly BL. Suppression of LPS-induced inflammatory responses in macrophages infected with *Leishmania*. *J Inflamm (Lond).* 2010;7(1):8.
- Lawrence T, Natoli G. Transcriptional regulation of macrophage polarization: enabling diversity with identity. *Nat Rev Immunol.* 2011;11(11):750-61.
- Li Z, Chen J, Lei T, Zhang H. Tamoxifen induces apoptosis of mouse microglia cell line BV-2 cells via both mitochondrial and death receptor pathways. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci.* 2012;32(2):221-6.
- Liu X, Yin S, Chen Y, et al. LPS-induced proinflammatory cytokine expression in human airway epithelial cells and macrophages via NF- κ B, STAT3 or AP-1 activation. *Mol Med Rep.* 2018;17(4):5484-91.
- Lo V, I-Chun Lai J, Sunde M. Fungal Hydrophobins and Their Self-Assembly into Functional Nanomaterials. *Adv Exp Med Biol.* 2019;1174:161-85.
- Lucas M, Stuart LM, Savill J, Lacy-Hulbert A. Apoptotic cells and innate immune stimuli combine to regulate macrophage cytokine secretion. *J Immunol.* 2003;171(5):2610-5.
- Lugarini F, Hrupka BJ, Schwartz GJ, Plata-Salaman CR, Langhans W. A role for cyclooxygenase-2 in lipopolysaccharide-induced anorexia in rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2002;283(4):862-8.
- Macías FA, Molinillo JM, Varela RM, Galindo JC. Allelopathy--a natural alternative for weed control. *Pest Manag Sci.* 2007;63(4):327-48.
- McDonald B, Jenne CN, Zhuo L, Kimata K, Kubes P. Kupffer cells and activation of endothelial TLR4 coordinate neutrophil adhesion within liver sinusoids during endotoxemia. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2013;305(11):G797-G806.
- Medzhitov R. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature.* 2008;454(7203):428-35.
- Mohammadi M, Bagheri L, Badreldin A, et al. Biological Effects of Gyrophoric Acid and Other Lichen Derived Metabolites, on Cell Proliferation, Apoptosis and Cell Signaling pathways. *Chem Biol Interact.* 2022;351:109768.
- Molnár K, Farkas E. Current results on biological activities of lichen secondary metabolites: a review. *Z Naturforsch C J Biosci.* 2010;65(3-4):157-73.

- Momose I, Terashima M, Nakashima Y, et al. Phorbol ester synergistically increases interferon regulatory factor-1 and inducible nitric oxide synthase induction in interferon-gamma-treated RAW 264.7 cells. *Biochim Biophys Acta*. 2000;1498(1):19-31.
- Moore KW, O'Garra A, Malefyt RW, et al. Interleukin 10. *Ann Review of Immunology*. 1993;11:165-90
- Mosser DM, Edwards JP. Exploring the full spectrum of macrophage activation [published correction appears in *Nat Rev Immunol*. 2010 Jun;10(6):460]. *Nat Rev Immunol*. 2008;8(12):958-69.
- Mosser DM, Edwards JP. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol*. 2008;8(12):958-69.
- Mosser DM, Zhang X. Interleukin-10: new perspectives on an old cytokine. *Immunol Rev*. 2008;226:205-18.
- Mun SK, Kang KY, Jang HY, et al. Atraric Acid Exhibits Anti-Inflammatory Effect in Lipopolysaccharide-Stimulated RAW264.7 Cells and Mouse Models. *Int J Mol Sci*. 2020;21(19):7070.
- Murray PJ, Wynn TA. Obstacles and opportunities for understanding macrophage polarization. *J Leukoc Biol*. 2011;89(4):557-63.
- Nardin A, Abastado JP. Macrophages and cancer. *Front Biosci*. 2008;13:3494-3505. Published 2008 May 1. doi:10.2741/2944
- Nathan C. Metchnikoff's Legacy in 2008. *Nat Immunol*. 2008;9(7):695-8.
- Nguyen KH, Chollet-Krugler M, Gouault N, Tomasi S. UV-protectant metabolites from lichens and their symbiotic partners. *Nat Prod Rep*. 2013;30(12):1490-508.
- Nishio K, Horie M, Akazawa Y, et al. Attenuation of lipopolysaccharide (LPS)-induced cytotoxicity by tocopherols and tocotrienols. *Redox Biol*. 2013;1(1):97-103.
- Odabasoglu F, Cakir A, Suleyman H, et al. Gastroprotective and antioxidant effects of usnic acid on indomethacin-induced gastric ulcer in rats. *J Ethnopharmacol*. 2006;103(1):59-65.
- Ohri CM, Shikotra A, Green RH, Waller DA, Bradding P. Macrophages within NSCLC tumour islets are predominantly of a cytotoxic M1 phenotype associated with extended survival. *Eur Respir J*. 2009;33(1):118-26.
- Okamoto H, Ito O, Roman RJ, Hudetz AG. Role of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 in endotoxin-induced cerebral hyperemia. *Stroke*. 1998;29(6):1209-18.
- Okuyama E, Umeyama K, Yamazaki M, Kinoshita Y, Yamamoto Y. Usnic acid and diffractaic acid as analgesic and antipyretic components of *Usnea diffracta*. *Planta Med*. 1995;61(2):113-5.
- Olinga P, Merema MT, de Jager MH, et al. Rat liver slices as a tool to study LPS-induced inflammatory response in the liver. *J Hepatol*. 2001;35(2):187-94.
- Olinga P, Merema MT, de Jager MH, et al. Rat liver slices as a tool to study LPS-induced inflammatory response in the liver. *J Hepatol*. 2001;35(2):187-94.

- Osyczka P, Lenart-Boroń A, Boroń P, Rola K. Lichen-forming fungi in postindustrial habitats involve alternative photobionts. *Mycologia*. 2021;113(1):43-55.
- Palecanda A, Paulauskis J, Al-Mutairi E, et al. Role of the scavenger receptor MARCO in alveolar macrophage binding of unopsonized environmental particles. *J Exp Med*. 1999;189(9):1497-506.
- Paloneva J, Manninen T, Christman G, et al. Mutations in two genes encoding different subunits of a receptor signaling complex result in an identical disease phenotype. *Am J Hum Genet*. 2002;71(3):656-62.
- Park B, Yim JH, Lee HK, Kim BO, Pyo S. Ramalin inhibits VCAM-1 expression and adhesion of monocyte to vascular smooth muscle cells through MAPK and PADI4-dependent NF- κ B and AP-1 pathways. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2015;79(4):539-52.
- Qi HY, Shelhamer JH. Toll-like receptor 4 signaling regulates cytosolic phospholipase A2 activation and lipid generation in lipopolysaccharide-stimulated macrophages. *J Biol Chem*. 2005;280(47):38969-75.
- Quero L, Hanser E, Manigold T, Tiaden AN, Kyburz D. TLR2 stimulation impairs anti-inflammatory activity of M2-like macrophages, generating a chimeric M1/M2 phenotype. *Arthritis Res Ther*. 2017;19(1):245.
- Quinn JM, Gillespie MT. Modulation of osteoclast formation. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005;328(3):739-45.
- Redente EF, Dwyer-Nield LD, Merrick DT, et al. Tumor progression stage and anatomical site regulate tumor-associated macrophage and bone marrow-derived monocyte polarization. *Am J Pathol*. 2010;176(6):2972-85.
- Ristic S, Rankovic B, Kosanić M, et al. Biopharmaceutical Potential of Two Ramalina Lichens and their Metabolites. *Curr Pharm Biotechnol*. 2016;17(7):651-8.
- Rouzer CA, Marnett LJ. Cyclooxygenases: structural and functional insights. *J Lipid Res*. 2009;50 Suppl(Suppl):S29-S34.
- Rubio C, Munera-Maravilla E, Lodewijk I, et al. Macrophage polarization as a novel weapon in conditioning tumor microenvironment for bladder cancer: can we turn demons into gods?. *Clin Transl Oncol*. 2019;21(4):391-403.
- Salek-Ardakani S, Croft M. Tumor necrosis factor receptor/tumor necrosis factor family members in antiviral CD8 T-cell immunity. *J Interferon Cytokine Res*. 2010;30(4):205-18.
- Sawano H, Haneda M, Sugimoto T, Inoki K, Koya D, Kikkawa R. 15-Deoxy-Delta12,14-prostaglandin J2 inhibits IL-1beta-induced cyclooxygenase-2 expression in mesangial cells. *Kidney Int*. 2002;61(6):1957-67.
- Schmeda-Hirschmann G, Tapia A, Lima B, et al. A new antifungal and antiprotozoal depside from the Andean lichen *Protosnea poeppigii*. *Phytother Res*. 2008;22(3):349-55.
- Sica A, Allavena P, Mantovani A. Cancer related inflammation: the macrophage connection. *Cancer Lett*. 2008;267(2):204-15.
- Sica A, Mantovani A. Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. *J Clin*

Invest. 2012;122(3):787-95.

Sigurbjörnsdóttir MA, Andrésson ÓS, Vilhelmsson O. Nutrient scavenging activity and antagonistic factors of non-photobiont lichen-associated bacteria: a review. *World J Microbiol Biotechnol.* 2016;32(4):68.

Simon A, Goffinet B, Magain N, Sérusiaux E. High diversity, high insular endemism and recent origin in the lichen genus *Sticta* (lichenized Ascomycota, Peltigerales) in Madagascar and the Mascarenes. *Mol Phylogenet Evol.* 2018;122:15-28.

Smythies LE, Sellers M, Clements RH, et al. Human intestinal macrophages display profound inflammatory anergy despite avid phagocytic and bacteriocidal activity. *J Clin Invest.* 2005;115(1):66-75.

Solhaug KA, Gauslaa Y. Parietin, a photoprotective secondary product of the lichen *Xanthoria parietina*. *Oecologia.* 1996;108(3):412-8.

Spribille T, Resl P, Stanton DE, Tagirdzhanova G. Evolutionary biology of lichen symbioses. *New Phytol.* 2022;10.1111/nph.18048.

Stocker-Wörgötter E. Metabolic diversity of lichen-forming ascomycetous fungi: culturing, polyketide and shikimate metabolite production, and PKS genes. *Nat Prod Rep.* 2008;25(1):188-200.

Stoclet JC, Muller B, Andriantsitohaina R, Kleschyov A. Overproduction of nitric oxide in pathophysiology of blood vessels. *Biochemistry (Mosc).* 1998;63(7):826-32.

Stout RD, Suttles J. Immunosenescence and macrophage functional plasticity: dysregulation of macrophage function by age-associated microenvironmental changes. *Immunol Rev.* 2005;205:60-71.

Stout RD, Suttles J. T cell signaling of macrophage function in inflammatory disease. *Front Biosci.* 1997;2:197-206.

Strauss-Ayali D, Conrad SM, Mosser DM. Monocyte subpopulations and their differentiation patterns during infection. *J Leukoc Biol.* 2007;82(2):244-52.

Studzinska-Sroka E, Galanty A, Bylka W. Atranorin - An Interesting Lichen Secondary Metabolite. *Mini Rev Med Chem.* 2017;17(17):1633-45.

Sun J, Zhang X, Broderick M, Fein H. Measurement of nitric oxide production in biological systems by using griess reaction assay. *Sensors.* 2003;3:276-84.

Szabó C, Ohshima H. DNA damage induced by peroxynitrite: subsequent biological effects. *Nitric Oxide.* 1997;1(5):373-85.

Takeda K, Akira S. Toll-like receptors. *Curr Protoc Immunol.* 2015;109:1-10.

Tanaka J, Toku K, Matsuda S, et al. Induction of resting microglia in culture medium devoid of glycine and serine. *Glia.* 1998;24(2):198-215.

Tang J, Diao P, Shu X, Li L, Xiong L. Quercetin and Quercitrin Attenuates the Inflammatory Response and Oxidative Stress in LPS-Induced RAW264.7 Cells: In Vitro Assessment and a Theoretical Model. *Biomed Res Int.* 2019;2019:7039802.

Thune PO, Solberg YJ. Photosensitivity and allergy to aromatic lichen acids, Compositae oleoresins and other plant substances. *Contact Dermatitis.* 1980;6(1):64-71.

- Toledo Marante FJ, García Castellano A, Estévez Rosas F, Quintana Aguiar J, Bermejo Barrera J. Identification and quantitation of allelochemicals from the lichen *Lethariella canariensis*: phytotoxicity and antioxidative activity. *J Chem Ecol*. 2003;29(9):2049-71.
- Tsai SH, Lin-Shiau SY, Lin JK. Suppression of nitric oxide synthase and the down-regulation of the activation of NFkappaB in macrophages by resveratrol. *Br J Pharmacol*. 1999;126(3):673-80.
- Tsai SH, Lin-Shiau SY, Lin JK. Suppression of nitric oxide synthase and the down-regulation of the activation of NFkappaB in macrophages by resveratrol. *Br J Pharmacol*. 1999;126(3):673-80.
- Van Deventer SJ. Immunotherapy of Crohn's disease. *Scand J Immunol*. 2000;51(1):18-22.
- Van Ginderachter JA, Movahedi K, Hassanzadeh Ghassabeh G, et al. Classical and alternative activation of mononuclear phagocytes: picking the best of both worlds for tumor promotion. *Immunobiology*. 2006;211(6-8):487-501.
- Van Herreweghe F, Festjens N, Declercq W, Vandenabeele P. Tumor necrosis factor-mediated cell death: to break or to burst, that's the question. *Cell Mol Life Sci*. 2010;67(10):1567-79.
- Varin A, Gordon S. Alternative activation of macrophages: immune function and cellular biology. *Immunobiology*. 2009;214(7):630-41.
- Varol C, Mildner A, Jung S. Macrophages: development and tissue specialization. *Annu Rev Immunol*. 2015;33:643-75.
- Vijayakumar CS, Viswanathan S, Reddy MK, Parvathavarthini S, Kundu AB, Sukumar E. Anti-inflammatory activity of (+)-usnic acid. *Fitoterapia*. 2000;71(5):564-6.
- Wang H, Yang T, Cheng X, et al. Simultaneous determination of usnic, diffractaic, evernic and barbatic acids in rat plasma by ultra-high-performance liquid chromatography-quadrupole exactive Orbitrap mass spectrometry and its application to pharmacokinetic studies. *Biomed Chromatogr*. 2018;32(3):10.
- White PA, Oliveira RC, Oliveira AP, et al. Antioxidant activity and mechanisms of action of natural compounds isolated from lichens: a systematic review. *Molecules*. 2014;19(9):14496-527.
- Wrede D, Taha M, Miranda AF, et al. Co-cultivation of fungal and microalgal cells as an efficient system for harvesting microalgal cells, lipid production and wastewater treatment. *PLoS One*. 2014;9(11):e113497.
- Wu J, Li J, Cai Y, et al. Evaluation and discovery of novel synthetic chalcone derivatives as anti-inflammatory agents. *J Med Chem*. 2011;54(23):8110-23.
- Xia YF, Liu LP, Zhong CP, Geng JG. NF-kappaB activation for constitutive expression of VCAM-1 and ICAM-1 on B lymphocytes and plasma cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001;289(4):851-6.
- Yamate J, Izawa T, Kuwamura M. Histopathological Analysis of Rat Hepatotoxicity Based on Macrophage Functions: in Particular, an Analysis for Thioacetamide-

induced Hepatic Lesions. Food Safety. 2016;4(3):61-73.

Zhang JM, An J. Cytokines, inflammation, and pain. Int Anesthesiol Clin. 2007;45(2):27-37.



Ek 2. Tez Orijinallik Raporu



T.C.
VAN YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü



G19 –TEZ ORJİNALLİK RAPORU

Tez Başlığı / Konusu	Bazı Liken Sekonder Metabolitlerinin Lipopolisakkarit ile İndüklenmiş RAW264.7 Makrofaj Hücrelerindeki Antienflamatuvar Etkinliklerinin İncelenmesi			
İntihal taraması yapılan bölümler ve sayfa sayıları				
Kapak sayısı	Giriş	Ana bölümler	Sonuç bölümleri	Toplam sayfa sayısı
				90
İntihal taraması yapılan program		Taramanın yapıldığı tarih	Benzerlik oranı %	
Turnitin		31 / 05 / 2022	% 14	
*Uygulanan filtreler aşağıda verilmiştir:				
- Kabul ve onay sayısı hariç, - Teşekkür hariç, - İçindekiler hariç, - Simge ve kısaltmalar hariç, - 7 kelimeden daha az örtüşme içeren metin kısımları hariç (Limit match size to 7 words) - Gereç ve yöntemler hariç, - Kaynakça hariç, - Alıntılar hariç, - Tezden çıkan yayınlar hariç,				
Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Lisansüstü Tez Orijinallik Raporu Alınması ve Kullanılmasına İlişkin Yönergeyi inceledim ve bu yönergede belirtilen azami benzerlik oranlarına göre tez çalışmamın herhangi bir intihali içermediğini; aksinin tespit edileceği muhtemel durumda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabulettiğimi ve yukarıda vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim. Gereğini bilgilerinize arz ederim. Y. L. Öğrencisi Mesud KAPLAN				

Öğrencinin Adı Soyadı	Mesud KAPLAN
Anabilim Dalı	Temel Eczacılık Bilimleri Anabilim Dalı
Öğrenci No	19930006031
Programı	☒ Yüksek Lisans ☐ Doktora

DANIŞMAN ONAYI UYGUNDUR	ENSTİTÜ ONAYI UYGUNDUR
Dr. Öğr. Üyesi Mehmet BERKÖZ	(Unvan, Ad Soyad, İmza)