T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

GİNSENG VE EKİNEZYANIN RATLARDA BAZI PLAZMA SİTOKİN DÜZEYLERİ İLE BUNLARA AİT m RNA EKSPRESYONLARI ÜZERİNE ETKİLERİ

Deniz ULUIŞIK

DOKTORA TEZİ

FİZYOLOJİ (VET) ANABİLİM DALI

Danışman
Prof. Dr. Ercan KESKİN

KONYA-2010

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

GİNSENG VE EKİNEZYANIN RATLARDA BAZI PLAZMA SİTOKİN DÜZEYLERİ İLE BUNLARA AİT m RNA EKSPRESYONLARI ÜZERİNE ETKİLERİ

Deniz ULUIŞIK

DOKTORA TEZİ

FİZYOLOJİ (VET) ANABİLİM DALI

Danışman
Prof. Dr. Ercan KESKİN

Bu araştırma Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 06102036 proje numarası ile desteklenmiştir.

KONYA-2010

ÖNSÖZ

Son yıllarda, bitkiler alemindeki doğal ürünlerin enfeksiyöz ve neoplastik hastalıklara karşı immunomodülatör etkileri üzerine araştırmalara sıklıkla rastlanmaktadır. Bitkisel tedavi veya phytomedicine, bitki, bitkinin bir bölümü veya bitkiden türeyen maddelerle bitkilerin terapötik kullanımı ve genel olarak tamamlayıcı tıbbın bir şekli olarak adlandırılmaktadır. Bitkisel ajanlar bitkinin bileşenleri ya da tamamından da oluşabilir: Bunların yaprak, çiçek, gövde, tohum, kök, meyve, kabuk veya diğer parçaları besin tatlandırıcısı veya güzel kokular katılarak terapötik amaçla kullanılmaktadır. Geleneksel tedavi inancına göre farklı bitki kısımlarının spesifik tıbbi özelliklere sahip olduğuna inanılır. Bu özellikler arasında vücudun hastalıklarla savaşma mekanizmalarını destekleme yönü ön planda yer almaktadır.

Dünya popülasyonunda, bitkisel ajanların terapötik ve koruyucu potansiyeline olan ilgi her geçen gün artmaktadır. İstatistiklere göre 1993'den 1998'e kadar bitkisel tıbbın önemli olduğuna inanan Amerikalı kesimin oranı %10.2'den %15.1'e yükselmiştir. Halk sağlığında potansiyel etkisi her ne kadar kesin olarak bilinmese de, bu ürünler yasal gıda marketlerinde, eczanelerde ve süpermarketlerde yaygın bir ilgi görmektedir. Bu ilginin tüketici talebinin çok güçlü olduğu ve bitkisel ajanların tıbbi profesyoneller tarafından da geniş çapta onaylandığı Almanya ve diğer Avrupa ülkelerinde de çok yüksek olduğu görülmektedir. Ginseng ve ekinezya geniş çapta kullanıldığı bildirilen bitkiler arasındadır.

Batı bitkisel tıp perspektifinde, immun sistemi etkileyen bitkisel ilaçlar adaptojenler ve immunostimülanlar ya da her iki ad altında sınıflandırılmaktadır. Adaptojenler, fiziksel, kimyasal ve biyolojik streslere karşı vücut direncini artırdığına inanılan maddeleri içerirken, immunostimülanlar, immunosup resörlere zıt olarak neoplastik hücrelere karşı veya enfeksiyöz organizmalara karşı (özellikle viral ve bakteriyel patojenler) vücudun nonspesifik savunma mekanizmalarını aktive eden ajanlardır. İmmunoterapinin temel amacı neoplastik hücreler veya enfeksiyöz ajanlar ile direk temas eden immunolojik hücrelerin aktivitesini stimüle etmektedir. Genelde, bitkisel immunostimülanların hücre aracılı immun cevabı düzelttiği ve güçlendirdiğine inanılmaktadır.

Bitkisel ajanların üst solunum yolu enfeksiyonlarından (Upper Respiratory Infection, URI) otoimmun ve neoplastik hastalıklar da dahil birçok immun sistem problemine karşı terapötik etkinliğe sahip olduğu bildirilmektedir. Daha önceden yapılan çalışmalar temel alınarak, bitki ekstraktlarının bazılarının humoral bağışıklığı, çoğunun ise sellüler bağışıklığı artırdığı ifade edilmektedir. Humoral bağışıklıktaki değişiklikler B lenfositler ve antikorların spesifik tiplerinin üretimi üzerine mitojenik etkileri kapsamaktadır. Bitkisel tedavi çalışmalarındaki yaygın sonuçlara göre hücre aracılı bağışıklıktaki değişiklikler, doğal katil hücre (Natural Killer, NK) miktarı ve aktivitesi ile lenfokinle aktive öldürücü (Lymphokine-Activated Killer, LAK) hücre aktivitesi, makrofaj aktivasyonu, fagositik aktivite ve spesifik T lenfosit alt kümelerinin proliferasyonunu kapsamaktadır. Kanser hastaları yaygın olarak immun sistemi güçlendirdiği ve bazen tümör büyümesini durdurduğu inancıyla tamamlayıcı alternetif tıp (Complementary Alternative Medicine, CAM) ilaçlarına yönelmektedirler. Bununla birlikte, son zamanlarda sağlıklı bireylerde de immun direnci artırmak, anti-aging ve yaşam konforunu iyileştirmek amacıyla ekinezya ve ginseng dahil birçok bitkisel destek maddeleri daha bilinçli olarak kullanılmaya başlanmıştır. Bu bilgilerden hareketle bu çalışmada ginseng ve ekinezyanın sağlıklı ratlarda immun sistemin önemli komponentlerinden olan sitokinlerden İnterlökin-10 (IL-10), Tümör Nekrozis Faktör-alfa (TNF-α), Tümör Büyüme Faktörü-beta1 (Tumor Growth Factor-beta1, TGF-β1)'in plazma seviyeleri ile bu sitokinlerin mRNA ekspresyonları üzerine etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Doktora tez çalışmamda başta Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi sayın hocam Prof. Dr. ERCAN KESKİN'e, yardımlarını gördüğüm Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. ZAFER DURGUN ve Anabilim Dalımız Öğretim Üyelerine ve çalışmalarım boyunca bana destek olan eşim BURAK ULUIŞIK'a teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

SİMGELER VE KISALTMALAR ……...v

1. GİRİŞ…… ……..….1

1.1. Ekinezya…….……1

1.1.1. Botaniği……...……1

1.1.2. Tarihsel ve Popüler Kullanımı……1

1.1.3. Kimyasal Bileşimi……...……1

1.1.4. İmmunomodülasyon……...……3

1.1.5. Antiinflamatuar Etkileri……...……4

1.1.6. Antimikrobiyal Etki……5

1.1.7. Üst Solunum Yolları Enfeksiyonları ……...……5

1.1.8. Antikarsinojenik Etki……...……6

1.2. Ginseng……...……6

1.2.1. Botaniği……...……6

1.2.2. Tarihsel ve Popüler Kullanımı……7

1.2.3. Kimyasal Bileşimi……..……7

1.2.4. İmmunomodülasyon ve Antiinflamatuar Etki……..……..……8

1.2.5. Ginsengin Antikarsinojenik Etkisi ……10

1.2.6. Ginsengin Kardiyovasküler Etkileri ……..……10

1.2.7. Ginsengin Afrodizyak Etkisi ……..……11

1.2.8. Güvenlik……11

1.3. Sitokinler…… ……...…12

1.3.1. Sitokinlerin Genel Özellikleri ……...……13

1.4. IL-10……14

1.4.1. IL-10 Gen ve Proteini……...……14

1.4.2. IL-10 Reseptörü ve Sinyal Transdüksiyonu ……..……14

1.4.3. İmmun Hücreler Üzerine Etkileri ……..……15

1.4.4. Enfeksiyöz Hastalıklar ve Otoimmunite……...……16

1.4.5. Kanser……...18

1.5. TGF-β1……..…19

1.5.1. Moleküler Genetiği ve Sinyal Transdüksiyonu……19

1.5.2. İmmun Hücreler ve TGF-β……...……20

1.5.3. Otoimmun ve İnflamatör Hastalıklarla TGF-β İlişkisi…….……21

1.5.4. TGF-β ve Tümör Büyümesi……..……22
1.6. TNF-α……..……22
1.6.1. Moleküler Genetiği……...……22
1.6.2. TNF Reseptörü ve Sinyal Transdüksiyonu……...……23
1.6.3. İmmun Hücreler Üzerine Etkileri…….……23
1.6.4. İnflamasyon, Otoimmunite ve Enfeksiyöz Hastalıklar…….……25
1.6.5. Antitümör Ajan Olarak TNF…….……26
2. GEREÇ ve YÖNTEM…… ……... ……27
2.1. Plazma Sitokin Düzeylerinin Belirlenmesi……..……28
2.1.1 IL-10……..……28
2.1.2 TGF-β1……..……29
2.1.3 TNF-α…… ……29
2.2. mRNA Ekspresyonlarının Belirlenmesi……..……30
2.2.1. Lökosit İzolasyonu…….…….…….....30
2.2.2. Total RNA İzolasyonu……..……30
2.2.3. cDNA Sentezi……...……31
2.2.4. PCR ……..……32
IL-10……...……32
TGF-β1……33
TNF-α……..……34
Housekeeping Gen …….……35
2.2.5. İstatistik…….……36
3. BULGULAR…… …….. 37
4.TARTIŞMA……..……..61
5.SONUÇ ve ÖNERİLER……70
6. ÖZET……71
7. SUMMARY…….……...72
8. KAYNAKLAR……..……73
9. ÖZGEÇMİŞ……..89

SİMGELER VE KISALTMALAR

(AIDS)	Acquired Immune Deficiency Syndrome
(APC)	Antigen Presenting Cell
(BCG)	Basil Calmette-Guerin
(CAM)	Complementary Alternative Medicine
(CB2)	Cannabinoid Tip 2
(CCL20)	Makrofaj İnflamatuar Protein-3 Alfa
(CSF)	Koloni Stimüle Edici Faktör
(COX-2)	Siklooksijenaz-2
(CP)	Crossing Point
(CSIF)	Sitokin Sentez İnhibitör Faktör
(CTL)	Cytotoxic T Lymphocyte
(DC)	Dendritic Cell
(DNA)	Deoksiribonükleik Asit
(EAE)	Experimental Autoimmune Encephalomyelitis
(ERK)	Ekstrasellüler Protein Kinaz
(G-CSF)	Granülosit Koloni Stimüle Edici Faktör
(GM-CSF)	Granülosit Makrofaj Koloni Stimüle Edici Faktör
(HIV)	Human Immunodeficiency Virus
(HLA)	Human Leukocyte Antigen
(IDDM)	Insulin-Dependent Diabetes Mellitus
(IFN-γ)	İnterferon-γ
(IgA)	İmmunglobulin A
(IgE)	İmmunglobulin E
(IκB)	İnhibitör Protein
(IKK)	IκB Kinaz
(IL)	İnterlökin
(iNOS)	Nitrik Oksit Sentaz
(kD)	Kilodalton
(LAK)	Lymphokine-Activated Killer
(LC)	Langerhans Cell
(LPS)	Lipopolysaccharide
(M.Ö.)	Milattan Önce

(M-CSF)	Makrofaj Koloni Stimüle Edici Faktör
(MAPK)	Mitojenle-Aktive Protein Kinaz
(MCF-10A)	İnsan Göğüs Epitel Hücresi
(MCP)-1	Monocyte Chemoattractant Protein-1
(MHC)	Major Histocompatibility Complex
(MIP-1α)	Makrofaj İnflamatör Protein-1alfa
(MnSOD)	Mn-süperoksit Dismutaz
(mRNA)	Messenger RNA
(NF-$_K$B)	Nükleer Faktör Kappa Beta
(NK)	Natural Killer
(NO)	Nitrik Oksit
(ODC)	Ornitin Dekarboksilaz
(PAF)	Platelet Aktive Eden Faktör
(PBMC)	Peripheral Blood Mononuclear Cell
(PMN)	Polimorfonükleer Hücre
(RA)	Romatoid Artrit
(RBCLB)	Red Blood Cell Lysis Buffer
(SOCS)	Supresör Sitokin Sinyali
(TAA)	Tumor Associated Antigen
(TACA)	TNF-α Converting Aktivitesi
(TACE)	TNF-α Converting Enzim
(TGF-β1)	Tumor Growth Factor-beta1
(TNF-α)	Tümör Nekrozis Faktör-alfa
(TPA)	12-O-tetradekanoilforbol-13-asetat
(URI)	Upper Respiratory Infection

1. GİRİŞ

1.1. Ekinezya

1.1.1. Botaniği

Yunanca “echinos” teriminden gelen ekinezya, konik olarak dönen tohum başından dolayı kirpi veya deniz-afacanı anlamına gelmektedir (Mistrikova ve Vaverkova 2007). Asteraceae/Compositae ailesine ait Ekinezya angustifolia (dar yapraklı mor koni çiçeği), E. pallida (solgun mor koni çiçeği) ve E. purpurea (mor koni çiçeği) olmak üzere üç önemli türü bulunan (Bauer ve ark 1990, Mistrikova ve Vaverkova 2007) ekinezyanın bunlardan başka 6 türü identifiye edilmiştir (Bauer ve ark 1990). Bu bitki halk arasında çeşitli ülkelerde Siyah Sampson, Horoz Şapkası, Tarak Çiçeği, Hint Tarağı, Kansas Yılankökü, Kansas Koniçiçeği, Mor Koniçiçeği, Kırmızı Koniçiçeği, Kırmızı Ayçiçeği, Rudbeckia, İskorbüt Kökü, Yılankökü ve Sonnenhutkraut (Almanca) isimleriyle adlandırılmaktadır (Berkner ve Sioris 2007).

1.1.2. Tarihsel ve Popüler Kullanımı

Tarihte birçok ülkede ve özellikle Amerika yerlileri tarafından yılan ısırığı, böcek sokması, enfekte yara, egzema, büyümüş glandlar, kabakulak, kuduz ve karın ağrısından epilepsiye kadar çeşitli durumlar için terapötik amaçlı olarak kullanılan ekinezyaya olan ilgi 1930-1970’lerde antibiyotiğin yaygın kullanımı ile birlikte azalmış 1980’lerde faydalarına olan inanç nedeniyle tekrar artmaya başlamış (Alt Med Rev 2001) ve özellikle Amerika’da marketlerde ve daha sonra Avrupa’da bitkisel immun stimülatör olarak ve soğuk algınlığına karşı yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır (Mark ve ark 2001).

1.1.3. Kimyasal Bileşimi

Ekinezyada karbonhidrat, glikozid, alkaloid, alkilamid ve poliasetilen yapısına sahip birçok etken madde olduğu bildirilmektedir. Karbonhidrat sınıfında arabinogalaktan, ksiloglikan, echinacin, inülin, Glikozid sınıfında, kafeik asitler ve derivatları olan cichoric asit, ekinakozit, cynarin, Alkaloid sınıfında isotussilagine,

tussilagine, Alkilamid sınıfında alkamidler (örneğin echinacein), Poliasetilen sınıfında ise germacrene sesquiterpene alkol yer alırken, bunların dışında yağ asitleri, esansiyel yağlar, fitosterollerden de bahsedilmektedir.

Adı geçen kimyasal bileşenleri içeren ekinezyanın aktif immunomodülatör bileşeninin hangisi olduğuna yönelik ortak bir karara henüz varılamamıştır (Goldhaber-Fiebert ve Kemper 1999).

Bununla birlikte bazı otoriteler polisakkaritlerin immunomodülatör etkiye sahip olduğunu ileri sürmektedirler (Wagner ve ark 1988, Bone 1997). Bir polisakkarit olan Arabinogalaktanın fare makrofajlarında seçici olarak sitokin üretimini (TNF-α, IL-1, interferon-B) indüklediği ve intrasellüler parazitler ile bazı tümör hücrelerinde spesifik toksisiteye neden olduğu belirtilmektedir (Stimpel ve ark 1984). Yine bir polisakkarit olan Echinacin'in yara iyileşmesi üzerine olumlu etkilerine inanılmaktadır. Bunu muhtemelen hyaluronidazı inhibe ederek ve fibroblastların büyümesini stimüle ederek yaptığı ifade edilmektedir (Kindscher 1989). Cichoric asit polar bir kafeik asit derivatıdır, E. purpurea kök ve çiçeklerinde yoğun olarak bulunur (Bauer ve ark 1988). Çoğu ekinezya ürünleri ekinakozid içeriği ile standardize edilmektedir (Bone 1997). Amidler E. angustifolia ve E. purpurea köklerinin temel lipofilik bileşenidir (He ve ark 1998). İzobütilamidler ekinezyanın topikal etkilerine neden olduğu düşünülen bileşenlerdir (Bauer ve Remiger 1989). İzobütilamidler araşidonik asit metabolizmasını inhibe ederek ekinezyanın antiinflamatuar etkilerine neden olurlar (Wagner ve ark 1989). Poliasetilenler ve polienler E. pallida köklerinin önemli lipofilik bileşenleridirler ve düşük konsantrasyonlarda amidleride içerirler (Schulte ve ark 1967).

Biçimsel olarak değerlendirilmemekle birlikte, geleneksel bitkisel destek maddelerinin kullanımına ilişkin etkilerin içerdikleri birçok kimyasal maddenin kompleks etkileşiminden kaynaklandığı ileri sürülmektedir (Goldhaber-Fiebert ve Kemper 1999).

1.1.4. İmmunomodülasyon

Ekinezya purpurea'nın makrofajlar, monositler ve NK hücreler gibi çeşitli immun hücrelerin stimülasyonuna neden olduğu in vitro çalışmalarda gösterilmiştir (Stimpel ve ark 1984, Wagner ve ark 1988, Luettig ve ark 1989, Burger ve ark 1997). İmmunosupresyon alerjenlere, hastalıklara, kötü beslenmeye, ilaçlara, toksinler ile psikolojik ya da sosyal streslere karşı korunmasızlıktan meydana gelen bir olay olarak kabul edilmektedir. Ekinezyanın zayıflamış immun sistemi güçlendirebildiği ifade edilmektedir (Schellenberg 2001). "İmmunomodülasyon" ekinezyanın etkileri için çok iyi seçilmiş bir terim olarak kabul edilmektedir, çünkü ekinezyanın stimüle ettiği bildirilen immun sistem multi-komponent bir sistemdir. Bazı immun aktiviteler yararlı diğerleri ise zararlı olabilmektedir. Yararlı immunomodülasyon, uygun olmayan irritasyon veya inflamasyon gibi zararlı konak cevabının azalmasını içine alan bir kavramdır (Abbas ve ark 1997).

İnflamasyon; vazodilatasyon ve kapiller sızıntıya bağlı doku şişliği ve lökositlerin infiltrasyonunu kapsar. Bu sürecin makrofajlar tarafından salınan maddeler ile ilk olarak tetiklendiği bilinmektedir: Bunlar arasında toksik oksijen radikalleri, peroksit, nitrik oksit (NO), IL-1, IL-6, IL-8, IL-12, TNF-α, lökotrienler ve platelet aktive eden faktör sayılabilir (Kushner 1998). C-reaktif protein ve çeşitli kininlerin de üst solunum yolu inflamasyonunda işe karıştığı bildirilmektedir (Korppi and Kröger 1992). Ekinezyanın in vitro sitokin sekresyonunu etkilediği ve makrofajları aktive ettiği bilinirken, in vivo mekanizmalar ve yollar henüz yeterli şekilde araştırılmamıştır (Baraniuk 1992, Kaliner 1992).

Ekinezyanın immun sistem üzerine bilinen etkisinin direk fagositik aktivite, makrofaj aktivasyonu ve NK hücre aktivitesi üzerine olan nonspesifik immun mekanizmalar olduğu düşünülmektedir. E. purpurea'nın saflaştırılan polisakkaritlerinin farelerde in vitro ve in vivo fagositik aktiviteyi artırdığı ve makrofaj aktivasyonunu indüklediği belirtilmektedir (Stimpel ve ark 1984).

Ekinezyanın immun fonksiyonu artırıcı etkileri makrofajlardan salınan IL-1, IL-6, IL-10 ve TNF-α'yı da içeren birçok sitokinlere bağlanmaktadır. (Burger ve ark 1997). Echinacin adlı preparatın 4 gün boyunca günlük 2 ml enjeksiyonu sonucu 12

genç erkekte yapılan çalışmada Candida albicansa karşı makrofaj fagositozisinin önemli oranda arttığı, NK hücre aktivitesinde ise bir etkinin gözlenmediği bildirilmektedir (Möse 1983). Barrett (2003) ise 1-2 hafta boyunca 0,45 mg/gün dozunda ekinezya purpurea kök ekstraktı yedirdikleri farelerde NK ve monosit miktarlarında önemli artış belirlerken, granülosit, lenfosit ve diğer prekürsörlerde bu etkinin gözlenmediğini bildirmektedir. Benzer olarak Luettig ve ark (1989) da ekinezya purpureadan ekstrakte edilen polisakkaritleri n B ve T hücre aktivasyonunu indüklemediğini ifade etmektedirler.

Bir diğer çalışmada 5 sağlıklı yetişkine 5 mg ekinezya polisakkarit enjeksiyonu sonucu polimorfonükleer lökosit (PMNL)'lerin kan damarlarına marjinasyonunun, kemik iliğinden PMNL ve monos itlerin kana geçişinin ve C reaktif protein serum seviyelerinin arttığı bildirilirken, TNF-α, IL-1β, C3 ve IL-6'daki artışın önemli olmadığı belirtilmektedir (Roesler ve ark 1991). Bununla birlikte, ekinezya ekstraktı kullanılan sağlıklı bireylerde yapılan bir çalışmada (Schwarz ve ark 2002) TNF-α ve IL-1β'nın üretiminin etkilenmediği, monosit ve PMNL'lerin fagositik aktivitesi üzerine bir etki görülmediği ifade edilmektedir.

1.1.5. Antiinflamatuar Etkileri

Ekinezyanın antiinflamatuar etki mekanizmasının başında hyaluronidaz enzim inhibisyonu gelmektedir (Berkner ve Sioris 2007). Hyaluronidaz, hyaluronik asiti ve kondroitini hidrolize eder. Proinflamatuar sitokinleri içeren sıvıların yangısel alanlara penetrasyonuna izin verir. Ekinezyaya bağlı fibroblast aktivitesi ve kollajen yapımının inhibisyonu da antiinflamatuar etkisine ilişkin özellikler arasında verilmektedir (Barrett 2003). Wagner (1989) ekinezya purpureanın içerdiği izobütilamidlerin lipoksijenaz inhibisyonuna yol açtığını ve antiinflamatuar etk inin buna bağlanabileceğini ileri sürmektedir. Yine Rininger ve ark (2000) ekinezya purpurea ürünleri ile yaptıkları çalışmada siklooksijenaz ve 5-lipoksijenazın inhibisyonu ile araşidonik asit metabolizması ve prostaglandin E2 üretiminde bir azalmadan söz etmektedirler.

1.1.6. Antimikrobiyal Etki

İnsanlarda ya da hayvanlarda bakteriyel enfeksiyonların tedavisine ilişkin herhangi bir ekinezya türü ya da ürününün etkinliğini gösteren ya da çürüten kontrollü denemelerin olmadığı ifade edilirken (Goldhaber-Fiebert ve Kemper 1999), ekinezya türlerini içeren karışımın E. coli, P. mirabilis, P. aeroginose, S. aereus gibi bakterilere karşı in vitro olarak etkili olduğu ileri sürülmektedir (Voaden ve Jacobson 1972).

İn vitro olarak influenza ve herpes virusa maruz kalmadan 4-6 saat önce ekinezya purpurea ekstraktı uygulanan fare hücre kültürlerinin bu enfeksiyonlara karşı dirençlerinin %50-80 oranında arttığı ifade edilmektedir (Wacker ve Hilbig 1978). Yine ekinezya purpurea ekstraktının hücre kültür modellerinde viral replikasyonu inhibe ettiği ileri sürülürken (Hermann ve ark 2003), insan hücre modelinde ekinezya purpureadan türeyen fitokimyasalların herpes virusa karşı antiviral aktiviteye sahip olduğu bildirimler arasındadır (Thompson 1998).

1.1.7. Üst Solunum Yolları Enfeksiyonları

Üst solunum yolları enfeksiyonlarında ve özellikle de soğuk algınlığında ekinezyanın yararlı etkisi olduğu inancı yüksektir (Barrett 2003). Goldhaber-Fiebert ve Kemper (1999) 180 solunum yolu enfeksiyonlu hastada günlük 900 ve 450 mg olmak üzere ekinezya purpurea ekstraktı verilmesinin plasebo verilen gruplarla karşılaştırıldığında yüksek dozun semptom şiddetini kişisel bildirimlere dayanarak azalttığını, düşük dozun yarar eğilimi gösterdiğini belirtmektedirler. Bir diğer çalışmada (Scaglione ve Lund 1995) 32 soğuk algınlığı olan yetişkinde ekinezya kök ekstraktının hastalık süresini önemli oranda azalttığı belirtilmektedir. Block ve Mead (2003)'de 4 gün boyunca günlük 15 ml, 2 gün boyunca günlük 30 ml ekinezya ekstraktı verilmesinin akut gribal enfeksiyonlu hastalarda plasebo alanlara göre semptomların çözülme süresinin anlamlı olarak kısaldığını bildirmektedirler.

Buna karşılık Melchart ve ark (1998), 12 hafta boyunca günde iki kez E. purpurea kök ekstraktı alınmasının üst solunum yolu enfeksiyonlarını önlemede etkili olmadığını belirtirlerken, Grimm ve Muller (1999) aynı yöndeki yaptıkları çalışmada

ekinezyanın soğuk algınlığı gelişiminin önlenmesinde anlamlı bir yarar göstermediğini bildirmektedirler.

1.1.8. Antikarsinojenik Etki

Kanser tedavisinde ekinezyanın yararları üzerine araştırmalar oldukça yetersiz olmasına rağmen, immunostimülatör özelliklerine olan yaygın inanç nedeniyle geleneksel kanser terapilerine destek olması amacıyla kullanılabileceği belirtilmektedir (Stimpel ve ark 1984).

Farelerde ekinezya purpurea polisakkaritlerinin intravenöz uygulanmasının total lökosit ve PMNL miktarı ile makrofaj aktivitesini artırdığı bildirilmektedir (Steinmuller ve ark 1993). Lenfositik lösemili fare ve Walker karsinomalı ratlarda ekinezya uygulamasının tümör gelişimini inhibe ettiği bildirilmektedir (Voaden ve Jacobson 1972). Ekinezya uygulaması ile ratlarda IL-1, IL-6 ve TNF-α da artış elde edilirken, sözü edilen sitokinler üzerine olan bu etki, günlük 3 ml ekinezya kompleksinin oral olarak verildiği 23 tümör hastasında belirlenememiştir (Elsasser-Beile ve ark 1996, Rininger et al 2000). Diğer yandan, karaciğer ve kolon kanserli hastalarda ekinezya purpurea suyunun NK hücreler, lenfokin aktive eden T hücreler ve PMNL'lerin aktivitelerinde artış gösterdiği, ama hasta yararı açısından dramatik bir gelişme olmadığı belirtilmektedir (Lersch ve ark 1990, Lersch ve ark 1992).

1.2. Ginseng

1.2.1. Botaniği

Ginseng, panax cinsi bitkilerin bazı türlerinin köklerini ifade etmek için kullanılır. Bunlar arasında en yaygın olarak kullanılan panax ginseng'dir ve uzak doğu ülkelerinde özellikle Çin ve Kore'de yetiştirilmektedir. Panax cinsinin diğer türleri Panax quinquefolius (Güney Kanada ve Amerika'da bulunur), Panax Japonicus (Japonya'da yetişir) ve daha az sıklıkla Panax notoginseng (Çin'de yetişir), Panax pseudoginseng (Nepal ve Doğu Himalayalar'da yetişir) ve Panax vietnamensi (Vietnam'da yetişir)'dir (Yun 2001a). Bu türlerden en çok kullanılan,

Asia veya Kore ginseng, Amerika ginseng ve Siberian ginsengdir. (Block ve Mead 2003).

1.2.2. Tarihsel ve Popüler Kullanımı

Bu bitki binlerce yıldır yaygın olarak geleneksel çin reçetesinin önemli bir unsuru olarak kullanılmıştır (Himi ve ark 1989, Wen ve ark 1996). Günümüzde de bu bitki çok satan bitkisel destek maddeleri listelerinde ilk sıralardaki yerini korumaktadır (Ernst 2002). İlk olarak M.Ö. 11 yılları civarında üretilmeye başlanmış olan panax ginsengin 5 bin yıldan daha fazla bir tıbbi geçmişe sahip olduğu ileri sürülmektedir. Çin'de, bu bitki 3-6 yıllık veya daha fazla olduğunda kökleri toplanır, kuru havada bekletilir (beyaz ginseng) veya buharda pişirilir (kırmızı ginseng). Uygulanan bu iki yoldan sonra köklerin saponin içeriklerinin ve etkilerinin de farklılaştığı belirtilmektedir (Nocerino ve ark 2000).

Ginseng ürünleri genellikle homeostazisi korumak ve vücudu fiziksel, kimyasal ve biyolojik her türlü olumsuz yönde etkileyen faktörlere karşı desteklemek amacıyla kullanılan bir tonik ve adaptojen olarak kabul edilmektedir (Nocerino ve ark 2000, Seo ve ark 2008). Ginsengin bu tonik ve adaptojenik etkilerinin yaşlanma sürecinin olumsuz etkilerini azalttığına, sağlıklı bireylerde fiziksel performansı ve genel zindeliği artırdığına, stresle ve hastalıklara karşı vücut fonksiyonlarını güçlendirerek vücudu desteklediğine inanılmaktadır (O'Hara ve ark 1998).

1.2.3. Kimyasal Bileşimi

Sadece fiziksel performansı artığı inancıyla değil kavramaya ilişkin mental faydalarından dolayı da tercih edilen bu bitkinin temel aktif komponentleri ginsenozidler olarak bilinen glikosidal saponinler (glikosilat steroidler)'dir. P. ginsengin kök, gövde ve yapraklardan 36 farklı ginsenozid ve bir çok bileşen (esansiyel yağlar, fitosteroller, amino asitler, peptidler, vitaminler ve mineraller) ekstrakte edilmiştir (Wilkie ve Cordess 1994). Cui ve ark (1994) 44 farklı ginseng ürününün ginsenozid miktarlarının 4 kattan daha fazla oranda değişebildiğini bildirmektedir. Benzer olarak satılan ginseng ürünlerinin her bir kapsülündeki ginseng içeriklerinin 6 kat ve ginsenozid bileşimlerinin de 20 kattan daha fazla

değiştiği belirlenmiştir (Block ve Mead 2003). Standardize bir ginseng ürününde aksi bir bildirim yok ise bu ürünün %4 oranında ginsenozid içerdiği kabul edilir ve bu miktarlar karşılaştırma standardı olarak kullanılır (Hall ve ark 2001).

Ginsenozidler panax türlerine özgü maddelerdir, çok küçük miktarlarda var olan bu maddelerin ginsengin etkilerinin çoğundan sorumlu olduğuna inanılır (Attele ve ark 1999). Ginsenozidler gittikleri dokulara spesifik olarak değişik mekanizmalarla etkilerini gösterirler (Murphy ve Lee 2002). Ginsenozidlerin temel yapısı birbirine benzerdir. 4 halkada düzenli bir şekilde yerleşmiş 17 karbon atomu ile bir çekirdek içerir. Her bir ginsenozidin biyolojik karakteri C-3 ve C-6'ya glikozitik bağ ile bağlanmış şeker sayısı ve pozisyonuna atfedilir (Byun ve ark 1997). Ginsenozidler: panaxadiol grup (Rb1, Rb2, Rb3, Rc, Rd, Rg3, Rh2, Rs1), panaxatriol grup (Re, Rf, Rg1, Rg2, Rh1) ve oleanolik asit grup (Ro) olmak üzere üç kategoride ele alınmaktadırlar (Wen ve ark 1996). Ginsengin içerdiği ginsenozidler panax türlerine, bitki yaşına, bitkinin bölümüne, saklama metoduna, ürün toplama sezonuna ve ekstraksiyon metoduna göre değişmektedir (Liberti ve Der Mardersian 1978, Phillipson ve Anderson 1984).

1.2.4. İmmunomodülasyon ve Antiinflamatuar Etki

Son zamanlarda, ginsengin yangı ve alerjik süreçlerdeki rolü üzerine yapılan çalışmalarda bu maddenin immunostimülasyon, antitümör aktivitede artış, kardiyovasküler fonksiyonlarda düzelme, vazodilatasyon ve platelet agregasyonunda düşme, antioksidan aktivite, hipofiz-böbrek üstü bezi korteksi sisteminde stimülasyon (steroidal etki) gibi yararlarından bahsedilmektedir (Block ve Mead 2003).

Ratlarda kronik inflamasyona karşı ginseng kök saponinlerinin IL-1β ve IL-6 gen ekspresyonu üzerine inhibe edici etkiye sahip olduğu (Yu ve Li 2000), ginsenozid Rb1 ve Rg1'in fare makrofajlarında TNF-α üretimini azalttığı bildirilmektedir (Cho ve ark 1998). Fare derisinde 12-O-tetradekanoilforbol-13-asetat (TPA)'a karşı cevap olarak siklooksijenaz-2 (COX-2) ekspresyonunun ginsenozid Rg3 ile önlendiği (Keum ve ark 2003), ginsenozid Rb1 ve Rc'nin in vitro olarak kobay akciğer mast hücrelerinin aktivasyonu süresince histamin ve lökotrien

salınımını baskıladığı ifade edilmektedir (Ro ve ark 1998). Bunlara ek olarak, farelerle yapılan bir denemede interferon üretimi, fagositoz aktivitesi, NK hücre ile B ve T lenfositlerde görülen artışlar ginsengin immunostimülan etkiye sahip olduğuna referans gösterilmektedir (Ohtani ve ark 1987). Hu ve ark (2001) da ginsengin süt sığırlarında immun sistemi uyardığına ve mastitisten kurtulma oranını artırdığına dair bulgular sunmuşlardır.

Siklofosfamid uygulaması ile immunosupresyon oluşturulan farelerde ginsengin NK hücre fonksiyonunu artırdığı bildirilirken (Kim ve ark 1990), bu çalışmalarda mitojenle indüklenen T lenfosit proliferasyonu üzerine bir etkiye sahip olmadığı ifade edilmektedir (Jie ve ark 1984). Benzer olarak viral enfeksiyon süresince hücre aracılı immun yanıta etki etmediği ve hatta in vitro olarak T lenfosit proliferasyonunu baskıladığı da bildirimler arasındadır (Chong ve ark 1984). Fare makrofaj kültürlerinde ginseng uygulamasının IL-2 seviyesinde bir artışa neden olduğu gözlenirken, IL-1β, IL-15, TNF-α ya da makrofaj inflamatuar protein-1alfa (MIP-1α) mRNA'sında herhangi bir değişiklik gözlenilmediği bunun sebebinin de IL-2'deki artışın biyolojik olarak anlamsız olmasından kaynaklanabileceği belirtilmektedir (Wang ve ark 2003). Ratlarda yapılan bir çalışmada (Liu ve Zhang 1995) ve hücre kültürlerinde (Liu ve Zhang 1996) ginsenozid Rg1'in bir T hücre proliferasyon stimülatörü olan IL-2'yi artırdığı vurgulanırken, bir diğer in vitro çalışmada (Niu ve ark 2001) ginsenozid Rg1 ve Rb1'in insan granülosit ve makro faj progenitör hücrelerde proliferasyonu uyardığı bildirilmektedir.

Ginsengin immunomodülatör etkisine ilişkin olarak, 10 genç ve 19 yaşlı kişiden alınan lenfositlerde ginsenozid Rg1'in lenfosit proliferasyonuna yol açtığı, aynı zamanda bu bireylerde lenfosit membran esnekliğini artırdığı (Liu ve ark 1995), bu artışında ginsenozidlerin antioksidan aktivitesine atfedilebileceği ileri sürülmektedir (Eze 1992, Wu ve ark 1999). 20 sağlıklı kişide ginseng ekstraktlarının periferal kan mononükleer hücre (Peripheral Blood Mononuclear Cell, PBMC)'lerde kemotaksis ve fagositik aktiviteyi önemli oranda artırdığı bildirilirken (Scaglione ve ark 1990), bu etkinin ginseng ekstraktı uygulanan kronik yorgunluk sendromlu ve kazanılmış immun yetmezlik sendrom (Acquired Immune Deficiency Syndrome, AIDS)'lu hastalarda da gözlendiği belirtilmektedir (See ve ark 1997).

Başka bir çalışmada (Ahn ve ark 2006), ginsengin stafilokokkus auerus ile enfekte farelerde makrofaj fagositoz aktivitesini artırdığı, TNF -α, IL-1β, IL-6, IL-12 ve IL-18'i ise belirgin şekilde azalttığı bildirimler arasındadır. Liou ve ark (2006) farelerde kısa süreli oral ginseng ekstraktı uygulamasının IL -2, interferon-γ (IFN-γ) ve IL-10 miktarını artırdığını belirlemişlerdir.

1.2.5. Ginsengin Antikarsinojenik Etkisi

Panax ginsengin uzun süre alımının akciğer, gastrik, karaciğer ve kolorektal kanser insidansında azalmaya yol açtığı ifade edilmektedir (Yun 1996, Yun 2001). Ginsenozid Rh2'nin sadece hayvanlarda değil insanlarda da göğüs, prostat, karaciğer ve bağırsak kanser türleri dahil hücre proliferasyonunu baskıladığı ileri sürülmektedir (Lee ve ark 1996, Park ve ark 1997, Kim ve ark 1999, Oh ve ark 1999). Ginsenozid Rh1'in fare fibroblast hücre hattında proliferasyonu inhibe ettiği bildirilirken (Byun ve ark 1997), ginsenozid Rb1, Rb2 ve Rc'nin tümor anjiogenezisi ve metastazını önlediği öne sürülmektedir (Mochizuki ve ark 1995).

Ginsengin kansere karşı bahsedilen bu olumlu etkilerinin altında yatan mekanizmaların ve süreçlerin ne olduğu konusunda da çalışmalar mevcuttur. Surh ve ark (2001) ginsenozid Rg3'ün fare derisi ve insan göğüs epitel hücrelerinde (MCF-10A) TPA indüklü COX-2 ekspresyonunu baskıladığını belirtmektedirler. Araştırıcılar aynı zamanda, bu hücrelerde ekstrasellüler protein kinaz (ERK) ve nükleer faktör kappa beta ($NF\text{-}_KB$) üzerine benzer bir supresif etki gözlediklerini ileri sürmüşlerdir. Keum ve ark (2000) TPA uygulamasından önce ginseng ekstraktının topikal uygulamasının fare derisinde papillom şekillenmesini önemli oranda azalttığını, epidermal ornitin dekarboksilaz (ODC) aktivitesinde de belirgin bir düşüşe neden olduğunu ve aynı zamanda mRNA ekspresyonunu da baskıladığını ifade etmektedirler.

1.2.6. Ginsengin Kardiyovasküler Etkileri

Ginseng uygulamasının rat (Kim ve ark 1994) ve tavşanlarda (Lei ve Chiou 1986) kan basıncını azalttığı, bu etkinin de ginsengdeki aktif bileşenlerin endotelyal hücrelerde NO salınımına neden olmasından kaynaklandığı ileri sürülmektedir. Bir

çalışmada (Kang ve ark 1995), ginsenozidlerin süperoksit anyonları gibi oksijen radikalleri tarafından NO yıkımını önlemelerinin indirekt olarak vazodilatasyona yol açtığı ifade edilmektedir. Ginsenozidlerin yine NO üretimine bağlı olarak kardiyomyosit kontraksiyonu üzerine depresan bir etkiye sahip olduğu vurgulanmaktadır (Scott ve ark 2001). Bir diğer çalışmada da (Sung ve ark 2000), Kore ginsenginin hipertansiyonlu kişilerde yine muhtemelen NO artışına bağlı olarak vasküler ve endotelyal fonksiyon üzerine yararlı etkiye sahip olduğu belirtilmektedir. Li ve ark (2001) ginsenozidlere bağlı vazodilatasyonun vasküler düz kas hücrelerindeki Ca^{2+} ile aktive edilen K^{+} kanalları ile ilgili olduğunu bildirmektedirler.

1.2.7. Ginsengin Afrodizyak Etkisi

Geleneksel Çin tıbbında ginsengin cinsel iktidarsızlığın tedavisinde önemli bir yer tuttuğu bildirilmektedir (Nocerino ve ark 2000). Panax ginseng ve Panax quinquefoliumun ratlarda erkek çiftleşme davranışlarını artırdığı bildirilirken (Murphy ve ark 1998), bu sonuçlara Choi ve ark (1995a)'da Kore ginsenginin erektil disfonksiyonlu 30 hastada olumlu etkiye neden olduğu yolundaki bulgularıyla destek vermişlerdir. Ginsengin bu etkisi korpus kavernozum endotelyal hücrelerinde nitrik oksit salınımının artırmasına bağlanmakla birlikte (Chen ve Lee 1995), Fahim ve ark (1982) Panax ginsengin ratlarda serum testesteron seviyelerini artırdığını da ileri sürmektedirler.

1.2.8. Güvenlik

Ekinezyaya ilişkin bazı alerjik reaksiyonların olduğu bilgileri olmakla birlikte buna bağlı ölüm olayları bildirilmemiş (Barrett 2003, Block ve Mead 2003), doza bağlı olumsuz etkilerle bitki-ilaç etkileşimlerinin yol açtığı olumsuz vakalara rastlanmamıştır (Izzo ve Ernst 2001, Barrett 2003).

Genel olarak ginsengin nadiren olumsuz etkilere neden olduğu bilinmektedir (Chang ve ark 2003). Panax ginseng kökünün insan, köpek ve ratlarda nontoksik olduğu bildirilmektedir (Hess ve ark 1983). Yanlış kullanıma bağlı görülebilen semptomlar arasında hipertansiyon, diyare, uykusuzluk, deri döküntüsü ve vajinal

kanama sayılabilir. İlaç etkileşimleri arasında ise warfarin, fenelzin ve alkol gibi maddelerin adı geçmektedir (Coon ve Ernst 2002).

1.3. Sitokinler

Doğal ve spesifik bağışıklıktan büyük oranda sitokin adı verilen protein hormonlar sorumludur. Doğal bağışıklıkta etkin olan sitokinler çoğunlukla mononükleer fagositler tarafından üretilirler ve bu nedenle monokinler olarak adlandırılırlar. Monokinler, doğrudan mikroplarla uyarılma sonucu salınırlar. Bunlar kısmen spesifik bağışıklıkta da antijenle uyarılmış T lenfositlere cevap olarak mononükleer fagositler tarafından salınmaktadırlar. Spesifik bağışıklıktaki sitokinlerin çoğu aktive edilmiş T lenfositler tarafından üretilirler ve bunlar lenfokin olarak adlandırılırlar (Abbas ve ark 1997).

T lenfositlerin ürettiği ve çeşitli lenfosit popülasyonlarının büyüme ve farklılaşmasını ayarlayan bazı sitokinler T lenfositlere bağlı immun yanıtın aktivasyon fazında önemli rol oynarlar. T lenfositlerce üretilen diğer bir kısım sitokin ise başlıca mononükleer fagositler, nötrofiller ve eozinofiller olmak üzere yangısel hücrelerin aktivasyonunun düzenlenmesinden sorumludurlar. T lenfositlerce üretilen bu sitokinler hücresel immunitenin etkin fazında rol alırlarken, yangısel sistem ve bağışıklık hücreleri arasındaki iletişimden de sorumludurlar. Sonuç olarak, lenfositler ve mononükleer fagositler yangı esnasında tüketilen hücrelerin takviyesini sağlamak amacı ile kemik iliğindeki olgunlaşmamış lökositlerin gelişim ve farklılaşmasını uyarmakla görevli koloni stimüle eden faktör (colony-stimulating factor, CSF) gibi sitokinleri üretirler. Bu sitokinlerin bir çoğu, kan lökosit (T hücreleri veya monositler) popülasyonlarının bazıları tarafından üretildiklerinden ve diğer lökosit popülasyonları (monositler, nötrofiller veya eozinofiller) üzerine de etkili olduklarından interlökin olarak da anılırlar. Moleküler olarak yeni sitokinler karakterize edilirken, araştırıcılar arasında paylaşılan nomenklatürde birliği sağlamak için interlökin numarasına (IL-1, IL-2 gibi) göre tanımlanırlar (Abbas ve ark 1997).

1.3.1. Sitokinlerin Genel Özellikleri

Sitokinlerin farklı yapı ve fonksiyonel özelliklerinin çoğundan protein yapısında bulunan moleküller sorumludur. Sitokin sekresyonu kısa süreli olup, depo edilmezler ve bunların sentezi yeniden gen ekspresyonu ile başlar. mRNA transkripsiyonunu sağlayan sitokinlerin dayanıksız oluşu ve buna bağlı transkripsiyonunun da kısa periyotlu olması sitokin sentezinin de geçici olduğunu ifade etmektedir. Bazı sitokinler ise inaktif prekürsörden proteolitik enzimlerce aktif ürüne dönüştürülme gibi post-transkripsiyonel mekanizmalarla kontrol edilirler. Bir sitokinin diğerlerinin sentezini artırması ya da baskılaması yangısel cevap ve immun mekanizmaların düzenlenmesinde negatif ya da pozitif rol almaları açısından önemlidir. İki sitokin birbirinin etkilerini antagonize edecek tarzda hareket edebildikleri gibi biri diğerinin etkisini güçlendirebilmektedir. Bazı durumlarda bu etki umulandan veya birinin tek başına etkisinden çok daha büyük olabilmektedir (Abbas ve ark 1997).

Hücresel savunmada çok önemli rolü olan sitokinler fonksiyonel olarak iki grupta sınıflandırılırlar. Bunlardan proinflamatuar olarak nitelendirilenlerden bazıları TNF-α, IFN-γ, IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, IL-12, IL-18 ve antiinflamatuar olarak nitelendirilenlerden bazıları ise IL-4, IL-10, TGF-β'dır (Elenkov ve Chrousos 2002, Paramalingam ve ark 2007).

Salındıkları hücre tipine göre ise sitokinler Th1 ve Th2 olarak sınıflandırılmaktadır. Th1 grubunda İnterferon (IFN)-γ, IL-2, TNF-β ve TNF-α, Th2 grubunda ise IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 ve IL-13 bulunmaktadır (Ng ve ark 2003).

Bir diğer sınıflandırmaya göre ise, sitokinler aracılık ettikleri ve düzenledikleri bağışıklık türüne göre doğal ve spesifik bağışıklıkta görevli sitokinler ile hematopoiezisi uyaranlar olmak üzere üçe ayrılmaktadırlar. Doğal bağışıklıkla ilgili sitokinler arasında Tip 1 interferonlar, IL-12, IL-15, TNF, IL-1, IL-6, Kemokinler ve IL-10, spesifik bağışıklıkta ise IL-2, IL-4, TGF-β, IFN-γ, Lenfotoksin, IL-5, IL-13, IL-16, IL-17, Migrasyon inhibitör faktör, hematopoiezisi uyaranlar ise c-kit ligant, IL-7, IL-3, IL-9, IL-11, granülosit makrofaj koloni stimüle

edici faktör (GM-CSF), makrofaj koloni stimüle edici faktör (M-CSF), granülosit koloni stimüle edici faktör (G-CSF) yer almaktadır (Abbas ve ark 1997).

1.4. IL-10

1.4.1. IL-10 Gen ve Proteini

IL-10, aktive makrofajlar, bazı lenfositler ve non-lenfositik hücre tipleri tarafından üretilen 18 kD'luk bir sitokindir (Abbas ve ark 1997). İnsan IL-10'u kromozom 1'de 5 ekson tarafından kodlanır. Bu kodlama 178 aminoasitlik protein sekresyonuna neden olur ve bu diziliş interferonlara benzer α-helikal bir yapı gösterir (Sumikawa ve ark 1998). Yakın zamandaki çalışmalar IL-10 transkripsiyonunun çeşitli hücre tiplerinde Sp1 ve Sp3 transkripsiyon faktörleri tarafından düzenlendiğini ortaya koymaktadır (Tone ve ark 2000).

1.4.2. IL-10 Reseptörü ve Sinyal Transdüksiyonu

IL-10 reseptörü interferon reseptör ailesinin bir üyesi olan iki alt üniteden oluşur. Bu alt ünite (IL-10R1 veya IL-10Rα) IL-10'u yüksek bir affinite ile bağlar ve birçok hematopoietik hücre tarafından ekspre edilir (Ho ve ark 1993). IL-10R'ü IFNγR ve IFNαβR gibi sinyal iletimine hizmet eden ek bir alt ünite kullanır [IL-10R2 (veya IL-10Rβ)] (Moore ve ark 2001).

IL-10/ IL-10R etkileşimi Jak1 ve Tyr2 tirozin kinazlarını harekete geçirir (Abbas ve ark 1997), tirozin fosforilasyonuna ve latent transkripsiyon faktörleri STAT1 ve STAT3'ün aktivasyonuna neden olur (Finbloom ve Winestock 1995). T hücrelerdeki STAT aktivasyonu ve IL-10 immunomodülatör etkisi arasındaki moleküler bağlanma tam olarak karakterize edilmemiştir. Bazı bilgiler, supresör sitokin sinyali-1 (SOCS-1) ve SOCS-3'ün IL-10 ile aktive edilen STAT proteinlerince hedeflenmiş iki gen olduğunu göstermektedir (Ito ve ark 1999, Matsumoto ve ark 2003). Bu genler güçlü olarak immun hücreler tarafından sitokin üretimini baskılar ve böylece immun yanıtta potansiyel bir düzenlemeye katkı sağlamış olurlar (Alexander 2002).

NF_KB da sitokinler gibi bağışıklıkla ilgili birçok genin ekspresyonunu düzenleyen bir transkripsiyon faktörü olarak bilinir (Hanada ve Yoshimura 2002). IL-10'un NF_KB üzerine etkileri hedef hücrelere bağlı olarak değişebilmektedir. Nitekim, IL-10'a bağlı $CD8^+$ T hücrelerinde NF_KB aktivasyonu gözlenirken (Hurme ve ark 1994), makrofajlar ve $CD4^+$ T hücrelerinde NF_KB inhibisyonuna yol açtığı ifade edilmektedir (Moore ve ark 2001). Bu da IL-10'a karşı farklı hücre tiplerinde farklı reaksiyonların görülmesinin nedeni olarak sayılmaktadır.

1.4.3. İmmun Hücreler Üzerine Etkileri

IL-10'un B hücrelerinin yaşam süresini uzattığı, bununda anti-apoptotik protein BCL-2'nin ekspresyonu ile ilgili olduğu bildirilmektedir (Levy ve Brouet 1994). IL-10, B hücre proliferasyonu için önemli bir faktördür (Rousset ve ark 1992). IL-2 ile güçlendirilen bu olay, B hücrelerinde bulunan yüksek affiniteli IL-2 reseptörünün IL-10'a bağlı olarak aşırı ekspresyonu ile açıklanmaktadır (Fluckiger ve ark 1993). Sonuçta, B hücrelerden salınan ya da ekzojen IL-10, B hücre farklılaşmasına ve izotip değişimine neden olmaktadır (Burdin ve ark 1995, Malisan ve ark 1996). Anti-CD40 ya da foliküler dentritik hücreler (Dendritic cell, DC) ve IL-10 ile uyarılan B hücrelerin uzun süreli kültürünün B lenfositlerin plazma hücrelerine farklılaşması ile sonuçlandığı bildirilmektedir. IL-10'nun, $CD27^+$ memory B hücrelerinin plazma hücrelerine farklılaşmasını indükleyen CD27/CD70 ile sinerjik olarak hareket ettiği de belirtilmektedir (Agematsu ve ark 1998).

IL-10, ilk zamanlar murin Th1 hücrelerinde IL-2, IFN-γ ve TNF-α üretimini azalttığı için (Fiorentino ve ark 1989, Abbas ve ark 1997) sitokin sentez inhibitör faktör (CSIF) olarak isimlendirilmiştir. Th1 hücrelerden IL-2 ve IFN-γ'nın üretimini azalttığı gibi (De Waal Malefyt ve ark 1993, Del Prete ve ark 1993) bu hücrelerin proliferasyon ve kemotaksisini de önlediği ileri sürülmektedir (Taga ve ark 1993, Jinquan ve ark 2000). IL-10, antijen sunan hücre (Antigen Presenting Cell, APC)'ler tarafından Th1 hücrelerinin aktivasyonunu baskılama ve IFN-γ'nın etkilerini antagonize etme yeteneğini diğer Th2 tip sitokinler ile paylaşmaktadır (Fiorentino ve ark 1991). Bundan başka, $CD8^+$ ve $CD4^+$ hücre yanıtlarının in vitro olarak IL-10 tarafından engellendiği bildirilmektedir (Groux ve ark 1996). İn vitro olarak bu güçlü anti-inflamatuar/immunosupresif özellikleri gösterdiği ve B hücre fonksiyonunu

uyardığı için (Rousset ve ark 1992), IL-10'dan humoral immun cevabı başlatan ve T hücre aracılı bağışıklığı sonlandırıcı fizyolojik rolü ile Th2 tip sitokin olarak söz edilir (Romagnani 2000). Bununla birlikte araştırmalar arttıkça IL-10'un kazanılmış hücresel bağışıklık mediatörleri üzerine hem immunosupresif hem de immunostimülatör etkilerinden de söz edilmektedir (Mocellin ve ark 2004).

IL-10'nun, T hücre aktivasyonunda makrofajların yardımcı rollerini önlediği, bu etkilerini de B7-1 ve B7-2 gibi kostimülatörler ile doku uygunluk kompleksi (Major Histocompatibility Complex, MHC) class II moleküllerinin ekspesyonunu azaltma yoluyla gerçekleştirdiği ileri sürülmektedir (Abbas ve ark 1997).

T lenfosit aktivitesinin dentritik hücrelerle yakından ilgili olduğu bilinmektedir (Lanzavecchia ve Sallusto 2001). IL-10'un T hücreler üzerine olan immunosupresif etkisinin bu sitokinin DC'ler üzerine olan etkileriyle oluştuğu ileri sürülmektedir (De Waal-Malefyt ve ark 1991, De Smedt ve ark 1997). IL-10'un DC'lerde bulunan insan lökosit antijen (Human Leukocyte antigen, HLA) class II moleküllerinin ekspresyonunu azalttığı ve böylece antijen sunma özelliklerini zayıflattığı bildirimler arasındadır (Peguet-Navarro ve ark 1994, Koch ve ark 1996). IL-10'un NK'lar tarafından IFN-γ ve TNF-α üretimini negatif olarak etkilediği bildirilmesine rağmen (Moore ve ark 2001), bu sitokinin NK'lar üzerine stimülatör etkisinden de söz edilmektedir (Shibata ve ark 1998, Mocellin ve ark 2003).

1.4.4. Enfeksiyöz Hastalıklar ve Otoimmunite

Çeşitli hayvan modellerinde rekombinant IL-10 uygulamasının anti-patojen cevabı zayıflattığı belirtilirken, IL-10'dan yoksun farelerde IL-10 kullanımının enfeksiyondan arınma ya da kontrolünde önemli faydal ar sağladığı vurgulanmaktadır (Mocellin ve ark 2004).

İnsanlarda, leprosy (Yamamura ve ark 1991), ülseral leismania (Ghalib ve ark 1993), malarya (Peyron ve ark 1994), kandidiazis (Roilides ve ark 1998) ve AIDS (Clerici ve ark 2000) gibi çok sayıda kronik enfeksiyonla plazma ve doku IL-10 seviyeleri arasında sıkı bir ilişki olduğu belirtilmektedir. İlginç olarak, bu seviyelerin başarılı ilaç terapisi ile azalması bu görüşü destekler niteliktedir. IL-10'un insan ve

farelerde koruyucu immuniteyi zayıflattığı, IL-10 antikoru kullanılarak yapılan çalışmalarda patojene spesifik T hücre yanıtının artması ile gösterilmiştir (Ghalib ve ark 1993, Sieling ve ark 1993, Carvalho ve ark 1994, Clerici ve ark 1994). IL-10'un enfeksiyon durumlarında patojene karşı gelişen immun yanıtı hafifletmesi önemli bir fonksiyon olarak kabul edilebilir. Gerçekte de immun sistem tarafından yürütülen güçlü antimikrobiyel mekanizmalar doku ya da konakçıya daha önemli zararlara yol açabilmektedir. Hayati önem taşıyan kardiyak kaslar, sen tral ve periferal sinir sistemi gibi dokularda küçük alanların bile yıkımı enfeksiyonun kendisinden daha tehlikeli sonuçlara yol açabilmektedir. Başarılı bir immun yanıt doku patolojisi ve patojen invazyonu arasındaki dengeyi korumaktır. IL-10 bu dengenin sağlanmasında üstlendiği rol ile önemlidir (Mocellin ve ark 2004). IL-4, IL-5 ve IL-13 salgılayan Th2 hücreler immunglobulin E (IgE) üretiminin artması ve yukarıda bahsedilen yangısel hücrelerin aktivasyonu ile alerjik yanıtın da gereğinden fazla abartılma sına yol açabilmektedirler (Umetsu ve DeKruyff 1997). IL-10'un, Th2 hücrelerin sitokin üretimini ve aktivitelerini baskıladığı (Grunig ve ark 1997, Adachi ve ark 1999), bunu da bu hücreler üzerine direk etki yaparak ya da DC ve Tr1 hücreler gibi diğer immun hücrelerin aktiviteleri yoluyla gerçekleştirdikleri bildirilmektedir (Bellinghausen ve ark 2001, Herrick ve Bottomly 2003). Nitekim, hayvanlarda IL-10 uygulamasının alerjik durumlarda yararlı etkilere sahip olduğu belirtilmektedir (Zuany-Amorim ve ark 1995, Stampfli ve ark 1999, Hall ve ark 2003).

Deneysel otoimmun ensefalomyelitis (Experimental Autoimmune Encephalomyelitis, EAE), insüline bağlı diabetes mellitus (Insulin-Dependent Diabetes Mellitus, IDDM) ve romatoid artrit (RA) gibi kronik otoimmun hastalıklarda patojenite IL-2, IFN-γ, lenfotoksin ve TNF-α gibi proinflamatuar sitokinleri üreten Th1 hücrelere atfedilmektedir (O'Garra ve ark 1997, Hill ve Sarvetnick 2002). Buna karşın, koruyucu rol ise IL-4, TGF-β ve IL-10 gibi sitokinleri üretme kabiliyetine sahip Th2, Th3 ve Tr1 hücrelerle ilgili görülmektedir (Seddon ve Mason 1999, McGuirk ve Mills 2002). Bu sitokinlerin genç Th1 hücrelerin fonksiyonlarını baskıladıkları ifade edilmektedir (Groux ve ark 1996, Asseman ve ark 1999, Hill ve Sarvetnick 2002). IL-10'un Th1 hücrelerin Tr ve DC üzerine etkilerini baskılayarak kendi antijenlerine toleransta önemli bir rol oynayabileceği ileri sürülmektedir. (Groux ve ark 1996, Asseman ve ark 1999).

IL-10'un Th1 hücreler üzerine inhibitör etkisi ve Th1 sitokin lerin (TNF-α, IL-2, IFN-γ gibi) RA'nın patogenezindeki öneminden hareketle (Andreakos ve ark 2002) hayvan modellerinde bu hastalığın indüklenmesinden önce ve sonra IL-10 uygulamasının koruyucu olduğu elde edilmiştir (Kasama ve ark 1995, Joosten ve ark 1997). Aynı güvenli profil ve bu etkiye eğilim RA'lı hastalarda da gözlenmiştir (Keystone ve ark 1998). Benzer yararlı etkiler psoriasisli 10 hastada da bildirilmektedir (Asadullah ve ark 1998, Asadullah ve ark 1999).

1.4.5. Kanser

IL-10'un kansere karşı kazanılmış bağışıklıktaki rolü en çok tartışılan konular arasında yer almaktadır (Mocellin ve ark 2003). Malignant hücrelerin IL-10 üretebileceği görüşü oldukça karışık ve spekülatif bir konu olarak durmaktadır (Mocellin ve ark 2001). Malignant hücrelere karşı etkin immun yanıt ile T hücrelerin ve DC'lerin tümörlere (Tumor Associated Antigen, TAA) ilişkin antijen sunumunu engellemesi nedeniyle birçok otorite IL-10'u tümörlerin immun gözetimden kaçmasına yol açan bir immunosupresif molekül olarak değerlendir me fikrine sahip olmuşlardır (Marincola ve ark 2000). Bazı in vivo ve in vitro tümör modelleri bu görüşü desteklemektedir. IL-10 uygulanmasının $CD8^+$ T hücrelerin melanom antijenlerine karşı etkinliğinin zayıflamasına yol açtığı bildirilmektedir (Steinbrink ve ark 2002, Yang ve Lattime 2003). İnsan bazal ve skuamoz hücre karsinomlarınca IL-10 üretiminin, in vitro olarak lenfositlerin tümör hücrelerini lize etme yeteneklerini önlediği ileri sürülmektedir (Kim ve ark 1995). IL-10'un çeşitli peptitlerin transportu ve MHC class I ekspresyonunu [(TAP)-1/2] azaltmasına bağlı olarak TAA'ların $CD8^+$ T hücreler tarafından tanınmasını önlediği belirlenmiştir (Petersson ve ark 1998).

Bununla birlikte, IL-10'un fare karsinomları ve melanoma hücre hatlarının tümör oluşturma yeteneklerini azalttığı, antikor bağımlı immun bellek ve güçlü lenfosit yanıtı ile takip edilen immuniteyi artırdığı bildirilmektedir (Giovarelli ve ark 1995, Adris ve ark 1999). Bazı yazarlar murin tümörlerin IL-10 sekresyonu yapmadığını bildirmekle birlikte, IL-10'un Th1 hücrelerde gözlenen bulguların aksine sitotoksik T lenfosit (Cytotoxic T lymphocyte, CTL)'lerden IFN-γ üretimini önlemediğini vurgulamaktadırlar (Barth ve ark 1996). Bununla birlikte, vIL-10 tümör

rejeksiyonunu inhibe ederken, cIL-10'un kanser hücrelerinin eradikasyonunu artırmasının bu sitokinin moleküler farklılığına bağlı olarak multi fonksiyonel olduğu görüşünü desteklemektedir (Suzuki ve ark 1995).

1.5. TGF-β1

Organizmada epitelyal, endotelyal, hematopoietik, nöron al ve konnektif doku hücreleri gibi hemen hemen her hücre tipinde TGF-β üretilir ve reseptörü bulunur. TGF-β'lar hücre büyümesi ve farklılaşması, kemotaksis, apoptozis, anjiogenezis, immun cevap, ekstrasellüler matriks üretimi ve hematopoiezis gibi önemli hücre ve doku fonksiyonlarıyla ilgilidirler (Govinden ve Bhoola 2000).

1.5.1. Moleküler Genetiği ve Sinyal Transdüksiyonu

Beş izoformu olan TGF-β'nin 1-3 formları memelilerde eksprese edilmiştir (Burt ve Law 1994, Abbas ve ark 1997). Bu üç izoformu kodlayan genler sırasıyla 19q13, 1q41 ve 14q24 kromozomlarda lokalize olmuşlardır (Le ve ark 2005). TGF-β1, TGF-β2 ve TGF-β3 hücrelerden salınan latent TGF-β komplekslerinin üretilmesini sağlayan prekürsör proteinlerden yapılırlar (Munger ve ark 1997). TGF-β'lar sekresyondan önce ya da sonra daha yüksek moleküler ağırlıklı kompleksleri oluşturmak için bazı proteinler ile birleştirilirler (Miyazono ve ark 1991). Aktivasyona ilişkin işlemler tam anlaşılmamakla birlikte, plazmin, katepsin ve trombospondin-1 gibi proteolitik enzimlerin latent TGF-β1 kompleksinin aktivasyonuna karıştıkları ileri sürülmektedir (Lyons ve ark 1990, Taipale ve ark 1995). Doğal TGF-β1 yaklaşık 28 kD'luk homodimerik bir proteindir (Abbas ve ark 1997). Birçok hücre tipi TGF-β1'i latent formda üretirken, en zengin kaynaklar insan platelet ve memeli kemik iliğidir (Fontana ve ark 1992, Abbas ve ark 1997). İlave olarak antijene spesifik T hücreleri ve aktive edilmiş makrofajlar aktif ve latent formda bolca TGF-β1 üretmektedirler (Kehrl ve ark 1986, Abbas ve ark 1997).

TGF-β'nin biyolojik aktivitelerine tip I(RI) ve tip II(RII) gibi alt üniteleri olan heterodimerik bir transmembran reseptör kompleksi aracılık etmektedir (Abbas ve ark 1997, Govinden ve Bhoola 2000). TGF-β1'in RI ve RII reseptörlerine bağlanması transforsforilasyon olayına yol açar, bu da Smad2 veya Smad3 gibi

adaptör proteinlerin fosforilasyonunun takip ettiği protein kinazları aktive eder. Bu şekilde çeşitli transkripsiyon faktörleri TGF-β cevabının oluşumuna yol açarlar. Bu reseptörlerin aktivasyonu aynı zamanda, doğrudan ya da lipopolisakkarit (Lipopolysaccharide, LPS) bağlı mitojenle-aktive protein kinaz (MAPK) ve NF-$_K$B gibi diğer stimülanların aktivasyonunu hafifleterek regüle ederler (Le ve ark 2004).

1.5.2. İmmun Hücreler ve TGF-β

TGF-β, Smad3 yolunu kullanarak nitrik oksit sentaz (iNOS) ve monosit kemoatraktant protein-1 [Monocyte Chemoattractant Protein-1, (MCP)-1] oluşumunu azaltarak LPS ya da proinflamatuar sitokinlere bağlı olarak gelişen monosit/makrofaj aktivasyonunu önleyebilmektedir (Feinberg ve ark 2004, Feinberg ve ark 2004a). Aynı zamanda, TGF-β makrofajlardan NO ve süperoksit radikallerinin üretimini inhibe ederken (Vodovotz ve ark 1993), IL-10 gibi antiinflamatuar sitokinlerin üretimini artırmakta (Maeda ve ark 1995) ve makrofajları apoptozisten korumaktadır (Chin ve ark 1999).

TGF-β, T hücrelerin proliferasyon, farklılaşma ve yaşam süresini etkilemektedir. Bu sitokin transkripsiyonel düzeyde mitojenik sitokin olan IL-2'nin ekspresyonunu inhibe etmek suretiyle T hücre proliferasyonunu bloke etmektedir. TGF-β aynı zamanda Th1 ve Th2 hücrelerin farklılaşmasını önlemekte, bunların sitokin üretimini de böylece baskılamış olmaktadır (Gorelik ve Flavell 2002, Li ve ark 2006). TGF-β'nın etkilediği hücreler arasında B lenfosit, NK, DC ve plateletler de bulunmaktadır. TGF-β, B hücre proliferasyon ve aktivasyonunu önlerken, latent ya da immature B hücrelerinin apoptozisini de uyarmaktadır (Lebman ve Edmiston 1999, Cazac ve Roes 2000). NK hücreler için güçlü bir inhibitör olan TGF-β, IFN-γ üretimini ve sitolitik aktiviteyi artırmaktadır (Rook ve ark 1986, Bellone ve ark 1995). TGF-β DC'lerdeki kemokin reseptör ekspresyonunu artırmakta, bu da kemotaktik migrasyonu ve diğer bağlantıları güçlendirmektedir (Sato ve ark 2000). TGF-β fibrinojen reseptörleri üzerine nontranskripsiyonel tarzda etki ederek platelet agregasyonunu da artırmaktadır (Hoying ve ark 1999).

1.5.3. Otoimmun ve İnflamatör Hastalıklarla TGF-β İlişkisi

Kemik iliğinden türeyen immature DC'lere benzeyen epidermal langerhans hücreleri (Langerhans cell, LC) yabancı antijenlerin yakalanması ve işlenmesinde önemli bir rol oynar. Bu olay bölgesel lenf düğümlerine göç kapasitesine sahip LC'lerin buralarda olgunlaşması ve T hücrelerine antijen sunmasını gerektirir. LC'nin gelişimi ve farklılaşması TGF-β1'e bağlıdır. İn vitro çalışmalarda TGF-β1'in $CD34^+$ hemopoietik progenitör hücrelerin LC'ye dönüşümü için gerekli olduğu gösterilmiştir (Strobl 2003).

TGF-β1 bir stimülan olarak hareket ederken, B ve T hücre hatları dahil bir çok immun sistem hücrelerinin farklılaşması ve gelişimini baskılar. İmmun hücrelerin çoğu tarafından üretilen TGF-β monosit/makrofajlar için bir kemoatraktant rolü oynarken, interlökinlerin üretimi ve/veya antijen sunumunun blokasyonu yoluyla immun hücre aktivasyonunu baskılar (Letterio ve Roberts 1998). TGF-β1'den yoksun farelerin otoantikorların aşırı üretimi ile karakterize ve lenfositlerce aracılık edilen derin yangısel cevap nedeni ile daha erken öldükleri bildirilmektedir (Yaswen ve ark 1996). Bu olayın karakteristiği T hücrelerin proliferasyonu ve farklılaşmasının TGF-β1 tarafından kontrolünün eksikliğidir (Gorelik ve ark 2000, Gorelik ve Flavell 2000). Apoptotik T hücreler de bir TGF-β kaynağıdır (Chen ve ark 2001). Ayrıca B hücre proliferasyonunu ve maturasyonunu kontrol eden TGF-β seçici olarak immunglobulin A (IgA) ekspresyonunu da artırır (Abbas ve ark 1997, Cazac ve Roes 2000). Bu yüzden, TGF-β'nın başlıca fonksiyonu patolojik durumlar esnasında uygun immun hücre popülasyonunu regüle etmek ve zararlı otoimmun yanıtlara neden olan lenfosit proliferasyon ve farklılaşmasını baskılamaktır (Datto ve ark 1999, Yang ve ark 1999).

TGF-β1, değişik in vivo ve in vitro şartlarda pro ya da anti inflamatuar olarak hareket edebilmektedir (Le ve ark 2005). RA'da diğer sitokinlerle birlikte ya da tek başına hastalığın ilerlemesinde rolü olduğu bildirilmektedir. Gerek RA'da gerekse astım vakalarında TGF-β1'in TNF-α ve IL-1β gibi proinflalamtuar sitokinlerin salınımını artırdığı (Cheon ve ark 2002), inflamatuar hücrelerin kemotaksisini güçlendirdiği (Fava ve ark 1991) ve fibroblast proliferasyonunu hızlandırdığı bildirilmektedir (Kawakami ve ark 1996).

1.5.4. TGF-β ve Tümör Büyümesi

TGF-β tümörün hücresel yapısı ve gelişim safhasına bağlı olarak baskılayıcı ya da hızlandırıcı etkiler gösterebilmektedir. Epitelyal tümörlerin erken safhalarında, primer tümör gelişimini inhibe ettiği ve apoptozisi indüklediği bildirilmektedir (Le ve ark 2005). Bununla birlikte, tümör gelişiminin geç safhalarında, tümör hücreleri TGF-β'nın inhibe edici etkisinden hücre siklusu ve sinyal yollarındaki inaktivasyondan dolayı kurtulabilmektedirler (Le ve ark 2005).

TGF-β birçok hücre tipi için güçlü bir gelişim inhibitörü olmasına rağmen, sinyalizasyon işlemindeki herhangi bir bozukluk ya da karışıklık malignant dönüşüm ve tümör ilerlemesiyle sonuçlanabilmektedir. Nitekim, TGF-β'ya ilişkin reseptör II (RII)'nin ekspresyonundaki azalmanın epitelyal hücrelerde malignant dönüşümde etkili olduğu, bunun da APC mutasyonları ve Ras protein aktivasyonundan kaynaklandığı ileri sürülmektedir (Olschwang ve ark 1997, Tannergard ve ark 1997). Farelerde RII yokluğunun kolon kanserlerinin gelişim ve ilerlemesinde etkili olduğu da bildirimler arasındadır (Biswas ve ark 2004).

1.6. TNF-α

1.6.1. Moleküler Genetiği

1975 yılında Lloyd Old ve arkadaşları fare ve tavşanlarda "Basil Calmette - Guerin" (BCG) ile retiküloendotelyal sistemin uyarılması ve takiben LPS enjeksiyonu sonucu dolaşıma bir proteinin salındığını bulmuşlar ve bunu da Tümör Nekrozis Faktör veya TNF olarak adlandırmışlardır (Carswell ve ark 1975). TNF-α membrana bağlı olarak ve çözünebilir formda bulunur. Bu formu biyolojik olarak dinamiktir. TNF-α converting enzim (TACE) ya da TNF-α converting aktivitesi (TACA) 233-amino asitlik bir prekürsör proteinin parçalanmasına ve aynı zamanda 26 kD'luk bir bölümün ayrılmasına yol açarak 17 kD'luk çözünür TNF -α oluşumuna neden olur. Bu TNF-α monomeri membrandan salınırken, 3 tane 17 kD'luk ünitenin kombine olması ile 51 kD'luk trimoleküler kompleksi oluşturur (Babu 2004). Bu moleküler yapı üçgen bir koniye benzer ve her bir alt ünite jelly roll -b yapısındadır

(Ysebaert ve ark 1980, Babu 2004). Bu yapı reseptörlerine bağlanmaları açısından önemlidir (Babu 2004).

1.6.2. TNF Reseptörü ve Sinyal Transdüksiyonu

TNF-RI ve TNF-RII olarak adlandırılan iki çeşit TNF reseptörü bilinmektedir (Abbas ve ark 1997, Babu 2004). Bu reseptörlerin hemen hemen bütün hücre tiplerinde var olduğu gösterilmiştir (Abbas ve ark 1997, Babu 2004). Bu reseptörler TNF-α'yı bağladığı gibi TNF-β'yı da bağlarlar (Smith ve ark 1990).

TNF-α'nın başlıca sinyal yolu NF-κB'nin aktivasyonu aracılığı ile başlar. NF-κB heterodimer yapıda (Beg ve ark 1993) ve sitozolde inaktif olarak bulunur (Loop 2003). Aktif bir sinyal oluşması için yapısında bulunan inhibitör proteinin (IκB) ayrılması gerekir. Böylece TNF-α'nın membrana bağlanması ile TNF-α'nın trimerik yapısı ile karşılaşacak olan reseptörler agrege ve multimerize olurlar. Bu TNF-α ve reseptör etkileşimi IκB kinaz (IKK)'ı aktive eder ve inhibitör rezidünün ayrılmasına yol açar. Bu ayrılmadan sonrada serbest NF-κB çekirdeğe doğru hareket eder ve DNA'ya bağlanmak suretiyle gen transkripsiyonunu başlatır. NF-κB akut faz proteinleri, büyüme faktörleri ve reseptörleri ile hücre adezyon molekülleri, enkode edici reseptörler ve sitokin üreten genleri içeren bir çok kompleks inflamatuar cevabının regülasyonuyla ilgilidir (Loop 2003).

1.6.3. İmmun Hücreler Üzerine Etkileri

TNF-α tümör ve mikrop öldürücü etkileri yanı sıra birçok hücre tipi ve diğer sitokinler üzerine değişik etkiler gösteren önemli bir sitokindir.

Birçok hücre tipinde TNF araşidonik asit salınımına neden olur (Suffys ve ark 1991) ve uygun enzimlerin varlığında bu olay özellikle prostaglandin E2 olmak üzere prostaglandinler ve diğer eicosanoidler ile NO sekresyonuna yol açar (Yang ve ark 2005). Böylece, doku perfüzyonunun artmasına neden olur. Endotelyal hücrelerden lökosit aktivasyonuna ve migrasyonuna yardımcı olan sitokinlerin sekresyonunu başlatır (Malaguarnera ve ark 2005). Endotelyal hücrelerin TNF'den etkilenmesi aynı zamanda platelet aktive eden faktör (PAF) sentezine neden olur (Bussolino ve

ark 1988). Nötrofillerde ise birkaç dakika içerisinde hücre solunumunun artmasına yol açarken, degranülasyon sonucu elastaz, lizozim ve diğer enzimlerin salınmasına neden olmaktadır (Gamble ve ark 1985, Klebanoff ve ark 1986).

Birçok hücre tipinde TNF ilavesi transkripsiyonun aktivasyonu vasıtasıyla çeşitli genlerin faaliyetine yol açar. Bu genlerin aktivasyonu ile oluşan ürünler c -fos ve c-jun gibi çekirdekte, Mn-süperoksit dismutaz (MnSOD) gibi mitokondride, sitoplazmada, membran üzerinde veya sekresyon ortamında bulunurlar (Fiers 1991).

TNF, endotelyal hücrelerde GM-CSF, M-CSF, IL-1 ve IL-6 salınımını artırmaktadır (Matsushima ve Oppenheim 1989). TNF-α, IL-8 ekspresyonunun stimülasyonu yoluyla nötrofillerin akümülasyonunu artırır. Psoriatik deri lezyonlarında nötrofillerin başlıca IL-8 kaynağı olduğu gösterilmiştir (Duan ve ark 2001).

TNF-α nitrik oksit üretiminin, proinflamatuar sitokinlerin ve kemokin üretiminin artışına bağlı olarak makrofajların en önemli aktivatörü durumundadır. TNF-α'nın makrofaj inflamatuar protein-3 alfa (CCL20) ve bunun reseptörü (Homey ve ark 2000) ile vasküler endotelyal büyüme faktörü ve heme oksijenaz-1'in ekspresyonunun upregülasyonuna yol açtığı belirtilmektedir (Malaguarnera ve ark 2005).

IL-1'de TNF gibi birçok hücreyi uyaran bir sitokindir. IFN-γ'la TNF'nin kombinasyonu malignant hücre sitolizisini artırmasına rağmen IL-1'de böyle bir etki görülmediği bildirilmektedir (Fiers 1991). Diğer taraftan IL-1 hematopoiezisteki prokürsör hücreler için erken evrede bir büyüme faktörü iken, TNF'nin bu etkisi yoktur (Ehrke ve ark 1988, Ranges ve ark 1988). TNF ve IL-1, IL-6'nın güçlü indükleyicileridir. Makrofaj, lenfosit, endotelyal hücreler ve fibroblastlar IL-6 üreten hücrelerdir. IL-6 üretimi ve vücuda yayılması ile çeşitli reaksiyonların etkinliği başlamış olur. Bunlara ise kemik iliğindeki koloni-stimüle eden faktörler yardımcı olurlar. Bu sitokinler T ve B lenfositler üzerine etki ederken, myeloid hücrelerin diferansiyonuna yol açarlar. IL-6 aynı zamanda hipotalamusu etkileyerek ateşe sebep olur ve sinir hücrelerini uyarır. Dolaylı olarak IL-6'nın akut faz proteinlerinin salınımına yol açtığı da bildirimler arasındadır (Hirano ve ark 1990, Van Snick

1990). Aynı zamanda TNF, rat/farelerde IL-2 reseptör ekspresyonunu artırarak bazı T hücre hatlarının proliferasyonunu uyarmaktadır (Plaetinck ve ark 1987).

1.6.4. İnflamasyon, Otoimmunite ve Enfeksiyöz Hastalıklar

TNF'nin in vivo ve in vitro olarak en önemli indükleyicilerinden birinin LPS olduğu bilinmektedir. Yüksek dozda LPS veya gram negatif bakteriyel enfeksiyonlar septik şoka neden olmaktadır. Septik şokta TNF'nin hayati bir rol oynadığı TNF ile ön uygulama ya da TNF'ye karşı antikor kullanılarak fare ve baboonlarda gösterilmiştir (Waage ve ark 1987, Cerami ve Beutler 1988, Tracey ve Cerami 1989).

Malaria gibi insanlarda ve özelliklerde çocuklarda serebral komplikasyonlara ve ölümlere yol açabilen paraziter hastalıklarda ve plazmodium enfeksiyonlarında dolaşımdaki TNF seviyesinin arttığı, anti-TNF antikorları ile yapılan uygulamaların komplikasyonları hafiflettiği bildirilmektedir (Grau ve ark 1987).

Bakteriyel ve paraziter enfeksiyonlarda koruyucu olan TNF'nin bazı viral enfeksiyonlarda (İnsan immun yetmezlik virusu (Human Immunodeficiency Virus, HIV), AIDS) düzeyinin artmasının viral replikasyonu artırmak suretiyle enfeksiyonun ilerlemesi ile ilişkili olduğu ileri sürülmektedir (Mintz ve ark 1989). Adı geçen viral enfeksiyonlardaki bildirimlere karşın TNF-α'nın paraziter, bakteriyel ve viral enfeksiyonlarda koruyucu bir mediatör olduğuna ilişkin birçok bulgu vardır. TNF'nin enfeksiyonla savaştaki rolü nötrofil ve platelet aktivasyonu, makrofaj ve NK öldürme fonksiyonunun artırılması ile desteklenmektedir. TNF ile immun sistemin aktivasyonu, bakteri ya da virusla enfekte hücre tiplerinin çoğunun TNF'nin sitotoksik etkisine daha duyarlı olmasıyla da açıklanmaktadır (Waage ve ark 1987).

TNF otoimmun hastalıkların birçoğunun fizyopatolojisinde de rol oynar. TNF, kompleks bir şekilde immun sistem ve vasküler sistemde çeşitli sitokinlerin, yüzey determinantlarının ve diğer mediatörlerin üretimi ile yakından ilişkilidir (Bonavida 1991). Romatoid artrit gibi bazı vakalarda yangısel alanlarda sıklıkla bulunur (Cheon ve ark 2002). Organ transplantasyonu, işemi, reperfüzyon durumlarında olumsuz etkileri olan TNF'nin bu etkisi TNF antikorlarınca hafifletilebilmektedir (Kunkel ve ark 1991). Bundan başka organ reddinin anti-TNF

terapisi ile önlenebildiği ya da geciktirilebildiği ileri sürülmektedir. (Alegre ve ark 1990**,** Alegre ve ark 1991).

1.6.5. Antitümör Ajan Olarak TNF

TNF'ye olan ilgi başlıca malignant hücrelere karşı seçici toksik etkisinden kaynaklanmıştır (Espevik ve Nissen-Meyer 1986). TNF adı farelerde metilkolanteren ile oluşturulan sarkomalarda gözlenen hızlı nekrozdan dolayı verilmiştir (Carswell ve ark 1975). Bu sarkoma tek düşük doz ve nontoksik konsantrasyonlarda TNF enjeksiyonu ile tam olarak elimine edilebilmiştir. Bu sarkoma türünün hücre kültürlerinde ise TNF uygulamasına daha dirençli olduğu bildirilmektedir. Her tümör tipinde olmasa da TNF'nin doğrudan bu hücreleri sitotoksik etki ile öldürdüğü ya da bu dokuların damarlanmasını engelleyerek nekroz oluşumuna yol açtığı ifade edilmektedir (Vanhaesebroeck ve ark 1991). TNF-α'nin bu etkisinin IFN ile arttırıldığı ve bir sinerjizmaya sahip oldukları bildirilmektedir (Williamson ve ark 1983). TNF'nin anti tümör etkisi bütünüyle konakçı aracılı bir olaydır ve bunda endotelyumun bu etkileri güçlendirmesinin önemli katkısı vardır. Bu anti tümör etki antikoagulantların uygulanması ile engellenebilmektedir. TNF tümör nekrozisinde etkili olmakla birlikte, immun sistemin kompleks olarak olmadığı yada baskılandığı modellerde bu etkisi belirlenememiştir. Yardımcı T hücrelerinin tümör eliminasyonunda önemli rol oynadıkları bilinmektedir. Bu hücrelerle yapılan uygulamalarda aynı tip tümör hücrelerine karşı farelerin daha dirençli oldukları bildirilmektedir (Palladino ve Figari 1988). İnsan göğüs ve bağırsak karsinomlarından derive edilen hücrelerin deri altı uygulandığı hastalarda intratümöral TNF uygulamasının olumlu yanıt ve tam bir regresyona yol açtığı bildirilirken, intraperitoneal uygulamasının olumlu etki gösterdiği, bazı kanser türlerinde IFN-γ ile kombinasyonun daha göze çarpıcı iyileşme sağladığı ifade edilmektedir (Balkwill ve ark 1986). Bununla ilgili olarak, fare ve insanlarda oluşturulan B16BL6 melanom tümör tipinde hücre kültürü ortamlarında TNF etkisiz kalırken, IFN-γ varlığında daha etkin olduğu bulunmuştur (Fransen ve ark 1986).

2. GEREÇ ve YÖNTEM

Araştırmada 6 haftalık, sağlıklı, 48 erkek Fischer 344 rat kullanıldı. Ratlar Gülhane Askeri Tıp Akademisi Araştırma ve Geliştirme Merkezi' nden temin edildi. Hayvanlar deneme süresi boyunca, S.Ü. Veteriner Fakültesi Deneme Hayvanları Ünitesi'nde her bir kafeste 5 rat olacak şekilde barındırıldı. Araştırma süresi boyunca ratlar için öngörülen yaşam şartları (ısı, nem ve ışık) sağlandı. Hayvanl ar ağırlıkları birbirine yakın olacak şekilde, Kontrol (K), Ginseng (G) ve Ekinezya (E) olmak üzere üç eşit gruba ayrıldı. Kontrol grubundaki hayvanlar 40 gün süre ile standart rat yemi (Purina®) ile ad libitum olarak beslenirken, G grubundaki hayvanlara 0,5 g/kg yem olacak şekilde Panax Ginseng tozu (Voces ve ark 2004), E grubundaki hayvanlara ise 0,75 g/kg yem olacak şekilde Ekinezya tozu (Skaudickas ve ark 2003, Skaudickas ve ark 2004) içeren aynı yem verildi. Toz halindeki bu bitkiler öğütülmüş yemle karıştırılıp, pelet haline getirilerek uygulandı. Araştırmada üç gruptaki ratların 8'er tanesinden 20. gün, 8'er tanesinden ise 40. gün sonunda uygun yöntemle kalpten yeterli oranda antikoagulanlı (Sodyum sitrat) ve antikoagulansız kan alındı. Alınan kan örneklerinin bir kısmının plazmaları ayrılarak bunlarda IL-10, TNF-α ve TGF-β1'in plazma düzeyleri belirlenirken, tam kandan total RNA ekstraksiyonu yapılarak bu sitokinlerin mRNA ekspresyonlarının düzeyine bakıldı. Kan alınan hayvanlar boyun dislokasyonu yoluyla itlaf edildi.

*Rat yemi içeriği(%):

Kuru Madde	88	Metiyonin	0,45	
Ham Protein	23	Sistin	0,35	
Ham Selüloz	5	Vitamin A	15.000	(İ.Ü./kg)
Ham Kül	8	Vitamin D_3	3.300	(İ.Ü./kg)
HCL'de Çöz. Kül	1	Vitamin E	40	(mg/kg)
Kalsiyum	1-1,3	Vitamin B_2	5	(İ.Ü./kg)
Fosfor	0,9	Vitamin B_{12}	20	(mcg/kg)
Sodyum	0,5-0,6	Vitamin K_3	5	(mg/kg)
NaCL	1	Metabolik Enerji	3100	(Kcal/kg)
Lizin	1,35			

* Agribrands Purina Besin Maddeleri San. ve Tic. A.Ş. beya n bilgileridir.

Araştırmada kullanılan materyal ve uygulanan yöntemler Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Etik Kurulu (SUVEK) tarafından 13.07.2007 tarihli ve 2007/036 sayılı etik kurul kararı ile onaylanmıştır.

2.1. Plazma Sitokin Düzeylerinin Belirlenmesi

Plazma IL-10, TNF-α ve TGF-β1 düzeyleri sandwich enzyme-linked immunosorbent ölçüm metodu ile ticari rat kitleri (Biosource) kullanılarak prospektüslere uygun olarak ELISA cihazında belirlendi (Theumer ve ark 2003).

2.1.1 IL-10

Öncelikle düşük ve yüksek IL-10 kontrolleri hazırlandı. Düşük kontrole 1000µl, yüksek kontrole ise 500 µl distile su eklendi. Stok standart 1,7 ml standart dilüent eklenerek sulandırıldı. Hazırlanan 8 tane tüpten ilkine 30 µl sulandırılmış stok ve 570 µl standart dilüent buffer eklendi. Böylece 1000 pg/ml'lik standart hazırlanmış oldu. Sırası ile diğer tüplere 300 µl standart dilüent buffer eklenip 1:2'lik seri sulandırmalar yapıldı. Bu şekilde 1000; 500; 250; 125; 62,5; 31, 2 ve 15,6 pg/ml'lik standart dilüsyonları elde edilmiş oldu. Streptavidin HRP hazırlamak için de 12 ml streptavidin dilüentine 120 µl stok streptavidin HRP eklendi. Daha sonra plağa standartlardan 100'er µl eklendi, örnek ve kontrol kuyucuklarına önce 50 µl standart dilüent buffer, ardından örnek kuyucuklarına 50 µl plazma numuneleri ve kontrol kuyucuklarına ise kontroller eklendi. Daha sonra bütün kuyucuklara 50 µl biotin konjugat eklendikten sonra oda ısısında 2 saat beklendi. İki saat sonunda plak ELİSA yıkayıcı (ELx50 model Auto strip washer (Bio-Tek Instruments, Inc) marka) ile 2,5 lt distile suya 100 ml wash buffer ekleyerek hazırlanan yıkama solüsyonu ile 4 kez yıkandı. Yine tüm plağa önceden hazırlanan streptavidin HRP'den 100 µl eklendi ve 30 dakika bekledikten sonra tekrar 4 kez yıkama işlemine tabi tutuldu. Sonra Stabilize kromojenden 100 µl eklenerek 30 dakika beklendi. Bekleme süresinin sonunda 100 µl Stop solüsyon eklenerek 450 nm'de ELİSA okuyucu (ELx800 model Auto strip reader (Bio-Tek Instruments, Inc) marka) da okundu. Okunan absorbansa karşı standartlardan hesaplanan değerler pg/ml olarak elde edildi.

2.1.2 TGF-β1

İlk önce standart dilüsyonları hazırlandı. Stok standart 1,31 ml standart dilüent eklenerek sulandırıldı. Hazırlanan 8 tane tüpten ilkine 200 µl sulandırılmış stok ve 800 µl standart dilüent buffer eklendi. Böylece 2000 pg/ml'lik standart hazırlanmış oldu. Sırası ile diğer tüplere 500 µl standart dilüent buffer eklenip 1:2'lik seri sulandırmalar yapıldı. Bu şekilde 2000; 1000; 500; 250; 125; 62,5 ve 31,2 pg/ml'lik standart dilüsyonları elde edilmiş oldu. Streptavidin HRP hazırlamak için de 12 ml streptavidin dilüentine 120 µl stok streptavidin HRP eklendi. İlk önce plağa 200 µl standart ve plazma numuneleri eklendi. Daha sonra bütün kuyucuklara 50 µl biotin konjugat eklendikten sonra oda ısısında 3 saat beklendi. Üç saat sonunda plak ELİSA yıkayıcı (ELx50 model Auto strip washer (Bio-Tek Instruments, Inc) marka) ile 2,5 lt distile suya 100 ml wash buffer ekleyerek hazırlanan yıkama solüsyonu ile 4 kez yıkandı. Yine tüm plağa önceden hazırlanan streptavidin HRP'den 100 µl eklendi ve 30 dakika bekledikten sonra tekrar 4 kez yıkama işlemine tabi tutuldu. Sonra Stabilize kromojenden 100 µl eklenerek 30 dakika beklendi. Bekleme süresinin sonunda 100 µl Stop solüsyon eklenerek 450 nm'de ELİSA okuyucu (ELx800 model Auto strip reader (Bio-Tek Instruments, Inc) marka) da okundu. Okunan absorbansa karşı standartlardan hesaplanan değerler pg/ml olarak elde edildi.

2.1.3 TNF-α

IL-10'da olduğu gibi yine öncelikle düşük ve yüksek TNF-α kontrolleri hazırlandı. Düşük kontrole 600µl, yüksek kontrole ise 1500 µl distile su eklendi. Stok standart 1,2 ml standart dilüent eklenerek sulandırıldı. Hazırlanan 8 tane tüpten ilkine 100 µl sulandırılmış stok ve 400 µl standart dilüent buffer eklendi. Bö ylece 1000 pg/ml'lik standart hazırlanmış oldu. Sırası ile diğer tüplere 250 µl standart dilüent buffer eklenip 1:2'lik seri sulandırmalar yapıldı. Bu şekilde 1000; 500; 250; 125; 62,5; 31,2 ve 15,6 pg/ml'lik standart dilüsyonları elde edilmiş oldu. Streptavidin HRP hazırlamak için de 12 ml streptavidin dilüentine 120 µl stok streptavidin HRP eklendi. İlk önce plakın bütün kuyucuklarına 50 µl inkübasyon buffer'i eklendi. Daha sonra plağa 100'er µl standart ve kontroller eklendi, örnek kuyucuklarına önce 50 µl standart dilüent buffer eklendi ardından 50 µl örnek kuyucuklarına plazma numuneleri eklendi. Daha sonra bütün kuyucuklara 50 µl biotin konjugat eklendikten

sonra oda ısısında 90 dakika beklendi. Doksan dakika sonunda plak ELİSA yıkayıcı (ELx50 model Auto strip washer (Bio-Tek Instruments, Inc) marka) ile 2,5 lt distile suya 100 ml wash buffer ekleyerek hazırlanan yıkama solüsyonu ile 4 kez yıkandı. Yine tüm plağa önceden hazırlanan streptavidin HRP'den 100 µl eklendi ve 45 dakika bekledikten sonra tekrar 4 kez yıkama işlemine tabi tutuldu. Sonra Stabilize kromojenden 100 µl eklenerek 30 dakika beklendi. Bekleme süresinin sonunda 100 µl Stop solüsyon eklenerek 450 nm'de ELİSA okuyucu (ELx800 model Auto strip reader (Bio-Tek Instruments, Inc) marka) da okundu. Okunan absorbansa karşı standartlardan hesaplanan değerler pg/ml olarak elde edildi.

2.2. mRNA Ekspresyonlarının Belirlenmesi

2.2.1. Lökosit İzolasyonu

Lökosit izolasyonunu ROCHE marka Red Blood Cell Lysis Buffer (RBCLB) ile gerçekleştirildi. İlk önce 1,5 ml'lik steril ependorf tüpüne 1 ml Red Blood Cell Lysis Buffer eklendi. Üzerine 500 µl tam kan eklendikten sonra alt üst edilerek karıştırıldı. Daha sonra 10 dk peryodik olarak alt üst edilen örneklere (+15, +25ºC'de) 5 dk santrifüj (500 x g) işlemi uygulandı. Kırmızı süpernatant steril pipetle dikkatlice atıldı. Ependorf tüpünün dip kısmında kalan beyaz pelete 1 ml RBCLB eklendi. Resüspanse edilen örneklere tekrar 3 dk santrifüj (500 x g) işlemi uygulandı. Son olarak alyuvar tabakası kalmamasına dikkat ederek süpernatant kısmı atıldı ve böylece lökosit peleti elde edilmiş oldu.

2.2.2. Total RNA İzolasyonu

Total RNA izolasyonu ise ROCHE marka High Pure RNA Isolation Kiti ile yapıldı. Kit prospektüsüne uygun olarak DNase I, Wash Buffer I ve Wash Buffer II hazırlandı. Lökosit peletleri (izole ettiğimiz lökosit tabakasını) 200 µl PBS ile resüspanse edildi. Üzerlerine 400 µl Lysis/Binding Buffer eklenerek 15 saniye vortekslendi. Collection tüplerine filtreli tüpler yerleştirildi. Filtreli tüplerin üzerine örnekler pipetlendi. Bu tüpler 8000 x g'de 15 saniye santrifüj edildi. Collection tüplerinden filtreli tüpler ayrıldı ve yine filtreli tüpler yeni collection tüpleri ile kombine edildi. Her örnek için steril bir ependorf tüpüne 90 µl DNase inkübasyon

bufferi ve 10 µl DNase I koyuldu ve filtreli tüplere bu karışımdan 100 µl eklendi. Tüpler +15, +25ºC'de 15 dakika inkübe edildi. Daha sonra tüplere 500 µl Wash Buffer I eklenerek 8000 x g'de 15 saniye santrifüj edildi. Yine filtreli tüpler yenide n collection tüplerle kombine edildi. Tüplere 500 µl Wash Buffer II eklenerek 8000 x g'de 15 saniye santrifüj edildi. Yeniden collection tüplerle kombine edildiler. Sonra tüplere 200 µl Wash Buffer II eklendi ve 2 dakika herhangi bir kalıntı kalmaması için maksimum hızda santrifüj edildiler (yaklaşık 13000 x g). Collection tüplerinden ayrılan filtreli tüpler 1.5 ml'lik steril ependorflar ile kombine edildiler. Tüplere 50 µl Elution Buffer eklenerek 8000 x g'de 1 dakika santrifüj işlemi uygulandı. Bu işlemle ependorf içerisindeki elution buffer'de RNA'ların toplanması sağlanmış oldu.

2.2.3. cDNA Sentezi

cDNA sentezi için Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit kullanıldı. Kullanılacak olan bütün dondurulmuş kimyasallar çözdürüldü. Reaksiyon başlatıla na kadar kimyasallar buzda bekletildi. Steril ependorf tüplerine cDNA premixi aşağıdaki gibi hazırladı:

Total RNA	x	1µg total RNA
Random Hexamer Primer 600 pmol/µl	2µl	60 µM
PCR derecesinde su	y	13µl total volüm yapmak için
Total volüm	13 µl	

Isı bloğunda 65ºC'de 10 dakika tüpler ısıtıldı ve hemen buzda soğutuldu. Aşağıdaki reaktifler bir ependorf tüpünde belirtilen miktarlarda karış tırıldı ve kapiller tüplere eklendi:

Trans. Rev. Tra. Reak. Buf.	4µl	1x (8mMMgCl $_2$)
Koruyucu RNase inhibitör	0,5 µl	20U
Deoksinükleotid Mix	2 µl	1mM her biri
Trans. Rev. Transkriptaz	0,5 µl	10 U
Total volüm	7 µl	
Final volüm	20 µl	

Dikkatlice tüp içerisindeki kimyasallar karıştırıldı. Kenarlardakileri toplamak için tüp santrifüj edildi. PCR'ı önce 10 dakika 25ºC'ye ve 30 dakika 55ºC'ye ayarlanan PCR son olarak enzim inaktivasyonu için 85ºC'de 5 dakikaya ayarlandı. Tüpler soğutularak reaksiyon durduruldu. PCR işlemleri bittikten sonra kapillerlerden cDNA'lar ependorf tüplerine alındı.

2.2.4. PCR

IL-10

IL-10 PCR'ı için LightCycler®-Primer Set (Murine IL-10)'i kullanıldı. Örnek cDNA'ları 200-500 µl PCR derecesinde su ile 1:10 oranda dilüe edildi. Standart stabilizer solüsyon kullanarak standardın taze dilüsyon serileri hazırlandı:

1:10 = 7000 kopya/ µl
1:100 = 700 kopya/ µl
1:1000 = 70 kopya/ µl

LightCycler® FastStart DNA Master SYBR Green I kitinin premixi hazırlandı. Her bir örnek için soğutulan 1,5 ml'lik ependorfa aşağıdaki komponentler eklendi:

Su (beyaz kap)	6 µl
LC Primer Set (sarı kap)	2 µl
LC SYBR Green (premixi)	2 µl
Toplam volüm	10 µl

Önceden soğutulmuş LC kapillerlerine 10 µl PCR mixi pipetlendi ve üzerlerine örneklerin 10 µl cDNA kalıpları eklendi. Soğutulmuş 4 LC kapillerine 10 µl PCR mixi pipetlendi ve her bir kapillere dilüe edilmemiş ve taze dilüe edilmiş standartlardan 10 µl eklendi. Negatif ve pozitif kontroller için de iki tane kapiller hazırlandı, bunlara da 10'ar µl PCR mixi koyulup üzerlerine pozitif ve negatif (PCR derecesinde su) kontrol örneğinden 10 µl eklendi. Kapakları kapatılan kapillerler adaptöre yerleştirilerek santrifüj edildi (2000 rpm'de 30 saniye). Kapillerler rotora yerleştirildi ve kitte yer alan PCR parametreleri girilmiş olan PCR işlemi başlatıldı. Bu işlem sonucunda örneklere ait Crossing Point (CP) değerleri, melting eğrileri ve kopya sayıları belirlendi.

TGF-β1

TGF-β1 PCR'ı için LightCycler®-Primer Set (Murine TGF-β1)'i kullanıldı. Örnek cDNA'ları 200-500 µl PCR derecesinde su ile 1:10 oranda dilüe edildi. Standart stabilizer solüsyon kullanarak standardın taze dilüsyon serileri hazırlandı:

1:10 = 3500 kopya/ µl
1:100 = 350 kopya/ µl
1:1000 = 35 kopya/ µl

LightCycler® FastStart DNA Master SYBR Green I kitinin premixi hazırlandı. Her bir örnek için soğutulan 1,5 ml'lik ependorfa aşağıdaki komponentler eklendi:

Su (beyaz kap)	6 µl
LC Primer Set (sarı kap)	2 µl
LC SYBR Green (premixi)	2 µl
Toplam volüm	10 µl

Önceden soğutulmuş LC kapillerlerine 10 µl PCR mixi pipetlendi ve üzerlerine örneklerin 10 µl cDNA kalıpları eklendi. Soğutulmuş 4 LC kapillerine 10 µl PCR mixi pipetlendi ve her bir kapillere dilüe edilmemiş ve taze dilüe edilmiş standartlardan 10 µl eklendi. Negatif ve pozitif kontroller için de iki tane kapiller hazırlandı, bunlara da 10'ar µl PCR mixi koyulup üzerlerine pozitif ve negatif (PCR derecesinde su) kontrol örneğinden 10 µl eklendi. Kapakları kapatılan kapillerler adaptöre yerleştirilerek santrifüj edildi (2000 rpm'de 30 saniye). Kapillerler rotora yerleştirildi ve kitte yer alan PCR parametreleri girilmiş olan PCR işlemi başlatıldı. Bu işlem sonucunda örneklere ait CP değerleri, melting eğrileri ve kopya sayıları belirlendi.

TNF-α

TNF-α PCR'ı için LightCycler®-Primer Set (Murine TNF-alpha)'i kullanıldı. Örnek cDNA'ları 200-500 µl PCR derecesinde su ile 1:10 oranda dilüe edildi. Standart stabilizer solüsyon kullanarak standardın taze dilüsyon serileri hazırlandı:

1:10 = 6200 kopya/ µl
1:100 = 620 kopya/ µl
1:1000 = 62 kopya/ µl

LightCycler® FastStart DNA Master SYBR Green I kitinin premixi hazırlandı. Her bir örnek için soğutulan 1,5 ml'lik ependorfa aşağıdaki komponentler eklendi:

Su (beyaz kap)	6 µl
LC Primer Set (sarı kap)	2 µl
LC SYBR Green (premixi)	2 µl
Toplam volüm	10 µl

Önceden soğutulmuş LC kapillerlerine 10 µl PCR mixi pipetlendi ve üzerlerine örneklerin 10 µl cDNA kalıpları eklendi. Soğutulmuş 4 LC kapillerine 10 µl PCR mixi pipetlendi ve her bir kapillere dilüe edilmemiş ve taze dilüe edil miş standartlardan 10 µl eklendi. Negatif ve pozitif kontroller için de iki tane kapiller

hazırlandı, bunlara da 10'ar µl PCR mixi koyulup üzerlerine pozitif ve negatif (PCR derecesinde su) kontrol örneğinden 10 µl eklendi. Kapakları kapatılan kapillerler adaptöre yerleştirilerek santrifüj edildi (2000 rpm'de 30 saniye). Kapillerler rotora yerleştirildi ve kitte yer alan PCR parametreleri girilmiş olan PCR işlemi başlatıldı. Bu işlem sonucunda örneklere ait CP değerleri, melting eğrileri ve kopya sayıları belirlendi.

Housekeeping Gen

Normalizasyon işleminde housekeeping gen olarak LightCycler ®-Primer Set (Murine/Rat GAPDH)'i kullanıldı. Örnek cDNA'ları 200 -500 µl PCR derecesinde su ile 1:10 oranda dilüe edildi. Standart stabilizer solüsyon kullanarak sta ndardın taze dilüsyon serileri hazırlandı:

1:10 = 55000 kopya/ µl
1:100 = 5500 kopya/ µl
1:1000 = 550 kopya/ µl

LightCycler® FastStart DNA Master SYBR Green I kitinin premixi hazırlandı. Her bir örnek için soğutulan 1,5 ml'lik ependorfa aşağıdaki kompone ntler eklendi:

Su (beyaz kap)	6 µl
LC Primer Set (sarı kap)	2 µl
LC SYBR Green (premixi)	2 µl
Toplam volüm	10 µl

Önceden soğutulmuş LC kapillerlerine 10 µl PCR mix i pipetlendi ve üzerlerine örneklerin 10 µl cDNA kalıpları eklendi. Soğutulmuş 4 LC kapillerine 10 µl PCR mixi pipetlendi ve her bir kapillere dilüe edilmemiş ve taze dilüe edilmiş standartlardan 10 µl eklendi. Negatif ve pozitif kontroller için de iki tan e kapiller hazırlandı, bunlara da 10'ar µl PCR mixi koyulup üzerlerine pozitif ve negatif (PCR derecesinde su) kontrol örneğinden 10 µl eklendi. Kapakları kapatılan kapillerler adaptöre yerleştirilerek santrifüj edildi (2000 rpm'de 30 saniye). Kapillerler rotora

yerleştirildi ve kitte yer alan PCR parametreleri girilmiş olan PCR işlemi başlatıldı. Bu işlem sonucunda örneklere ait CP değerleri, melting eğrileri ve kopya sayıları belirlendi.

2.2.5. İstatistik

Elde edilen plazma sitokin düzeylerinin 20. ve 40. gün karşılaştırılmalarında t testi, gruplar arası değerlerin karşılaştırılmasında ise Duncan testi kullanıldı (SPSS). PCR verilerinin değerlendirilmesi ve analizinde REST software 2005 kullanıldı (Atencia ve ark 2007).

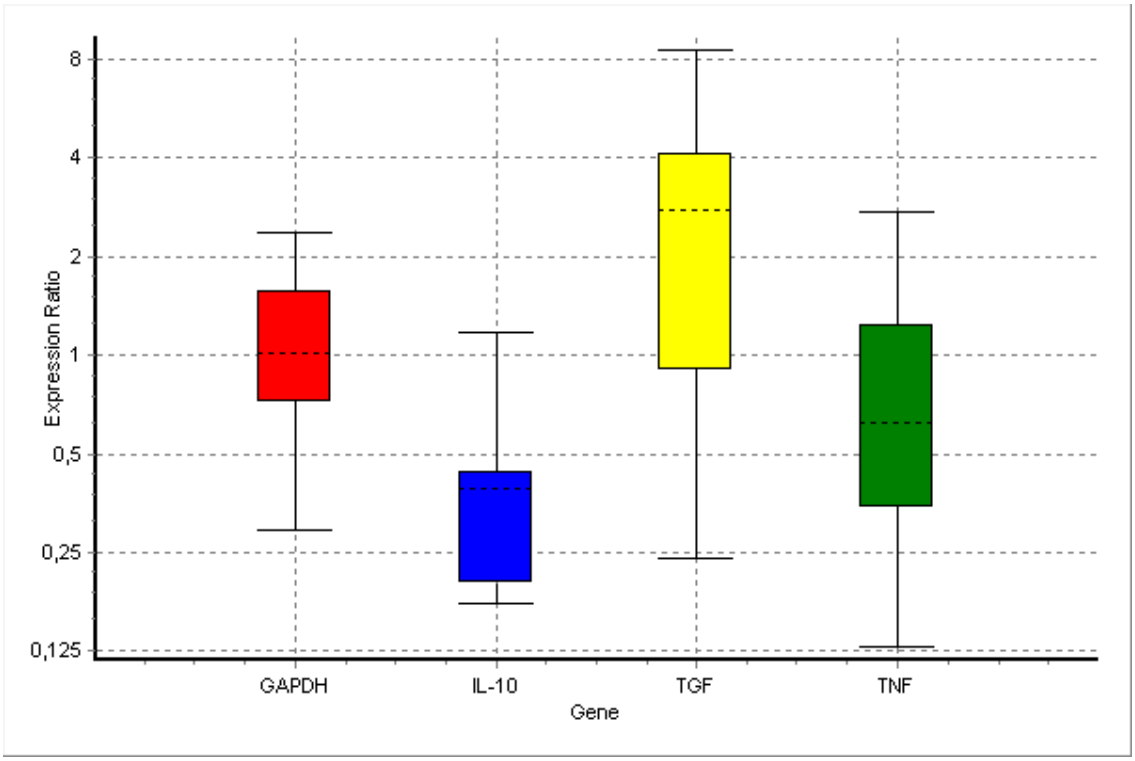
3. BULGULAR

3.1. Tüm gruplardan elde edilen 3 sitokine ait mRNA ekspresyon düzeyleri Çizelge 3.1-3.9 ve Şekil 3.1-3.33'de verilmiştir.

Çizelge 3.1: 20. gün Ginseng grubuna göre Ekinezya grubu mRNA ekspresyon düzeyleri

Gen	Tip	Reaksiyon Etkinliği	Ekspresyon	Std. Hata	95% C.I.	P(H1)	Sonuç
GAPDH	REF	0,91	1,000	0,577 - 1,769	0,368 - 2,281	1,000	
IL-10	TRG	0,91	0,329	0,191 - 0,523	0,174 - 1,156	0,090	
TGF	TRG	1,0	2,179	0,622 - 5,477	0,381 - 8,246	0,517	
TNF	TRG	0,91	0,595	0,195 - 1,494	0,146 - 2,565	0,799	

Bu parametrelerin analizinde kullanılan normalizasyon faktörü 2.23'dür.



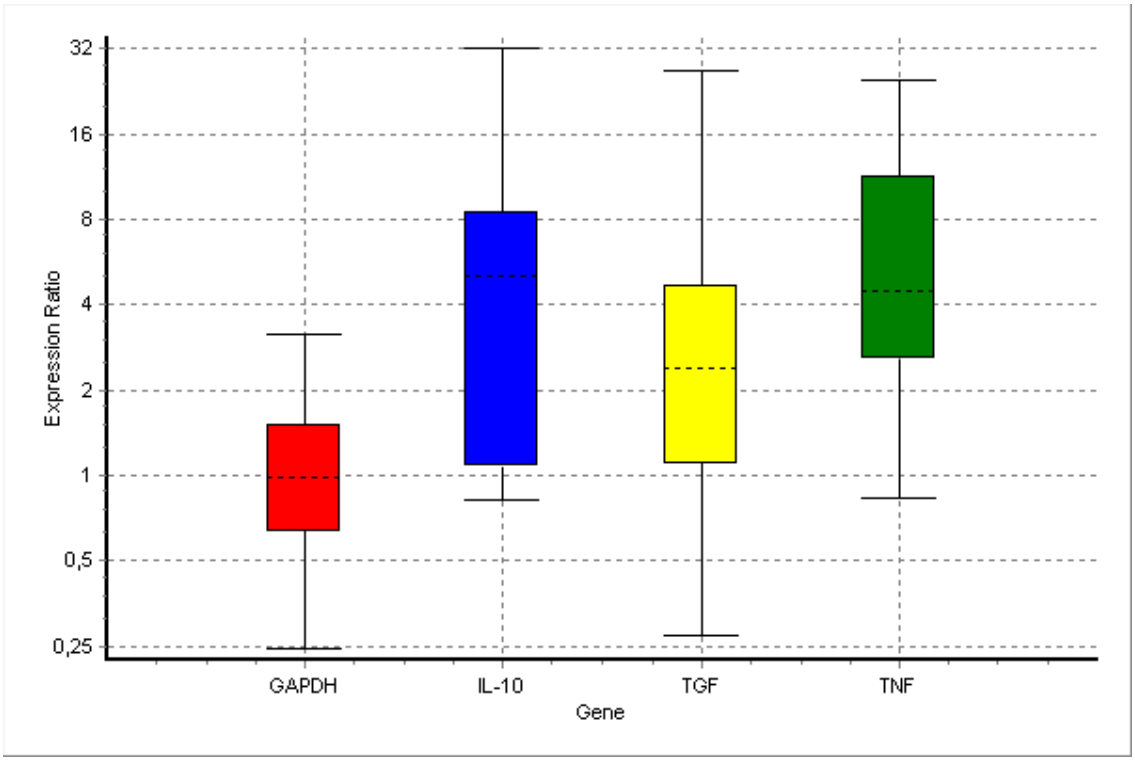
Şekil 3.1: 20. gün Ginseng grubuna göre Ekinezya grubu mRNA ekspresyon düzeyleri

Çizelge 3.2: 20. gün Kontrol grubuna göre Ekinezya grubu mRNA ekspresyon düzeyleri

Gen	Tip	Reaksiyon Etkinliği	Ekspresyon	Std. Hata	95% C.I.	P(H1)	Sonuç
GAPDH	REF	0,91	1,000	0,501 - 2,050	0,313 - 2,909	1,000	
IL-10	TRG	0,91	4,053	0,956 - 12,147	0,867 - 22,956	0,131	
TGF	TRG	1,0	2,569	0,715 - 8,246	0,334 - 19,656	0,472	
TNF	TRG	0,91	5,042	2,078 - 13,565	0,944 - 23,456	0,035	*

*: Kontrol grubundan farklı $p<0.05$

Bu parametrelerin analizinde kullanılan normalizasyon faktörü 0.40'dır.



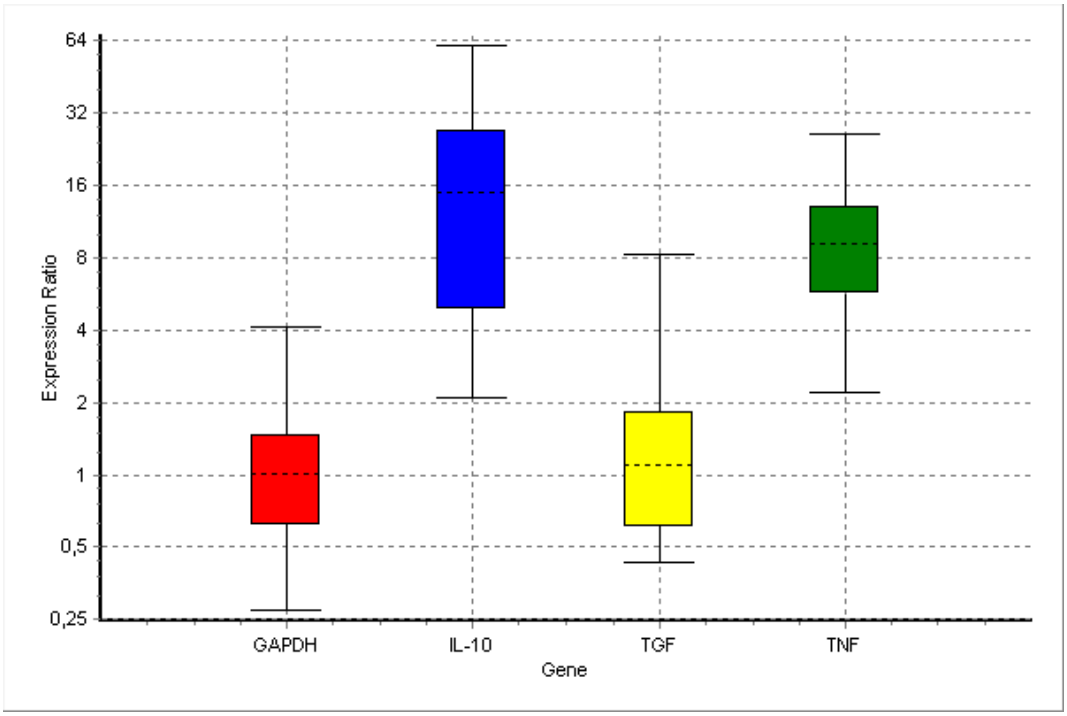
Şekil 3.2: 20. gün Kontrol grubuna göre Ekinezya grubu mRNA ekspresyon düzeyleri

Çizelge 3.3: 20. gün Kontrol grubuna göre Ginseng grubu mRNA ekspresyon düzeyleri

Gen	Tip	Reaksiyon Etkinliği	Ekspresyon	Std. Hata	95% C.I.	P(H1)	Sonuç
GAPDH	REF	0,91	1,000	0,497 - 1,970	0,295 - 3,419	1,000	
IL-10	TRG	0,91	12,304	4,545 - 33,116	2,140 - 61,238	0,041	*
TGF	TRG	1,0	1,179	0,556 - 2,755	0,464 - 4,988	1,000	
TNF	TRG	0,91	8,468	4,847 - 19,217	2,357 - 24,843	0,065	

*: Kontrol grubundan farklı $p<0.05$

Bu parametrelerin analizinde kullanılan normalizasyon faktörü 0.18'dir.

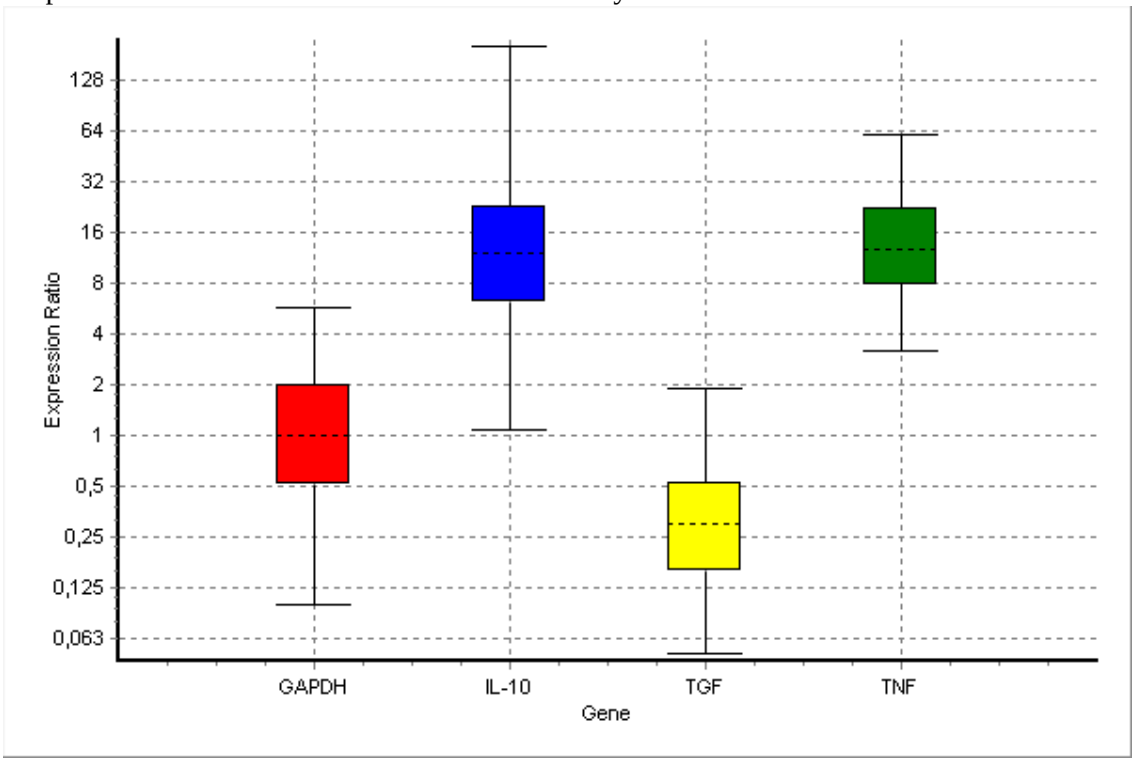


Şekil 3.3: 20. gün Kontrol grubuna göre Ginseng grubu mRNA ek spresyon düzeyleri

Çizelge 3.4: Kontrol grubu 20. güne göre 40. gün mRNA ekspresyon düzeyleri

Gen	Tip	Reaksiyon Etkinliği	Ekspresyon	Std. Hata	95% C.I.	P(H1)	Sonuç
GAPDH	REF	0,91	1,000	0,433 - 2,340	0,165 - 4,813	1,000	
IL-10	TRG	0,91	12,334	1,878 - 69,910	1,206 - 146,002	0,483	
TGF	TRG	1,0	0,294	0,133 - 0,695	0,063 - 1,739	0,887	
TNF	TRG	0,91	13,287	6,548 - 30,536	3,225 - 58,178	0,365	

Bu parametrelerin analizinde kullanılan normalizasyon faktörü 0.08'dir.

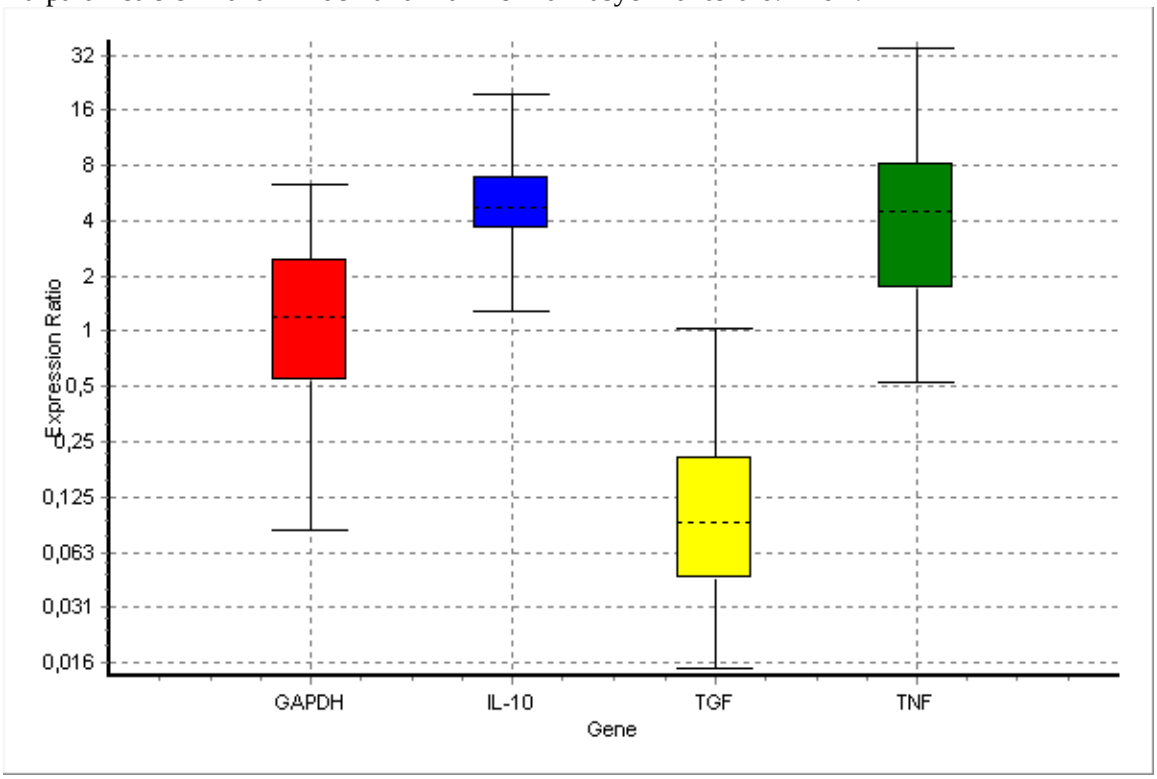


Şekil 3.4: Kontrol grubu 20. güne göre 40. gün mRNA ekspresyon düzeyleri

Çizelge 3.5: Ekinezya grubu 20. güne göre 40. gün mRNA ekspresyon düzeyleri

Gen	Tip	Reaksiyon Etkinliği	Ekspresyon	Std. Hata	95% C.I.	P(H1)	Sonuç
GAPDH	REF	0,91	1,000	0,256 - 3,126	0,098 - 5,361	1,000	
IL-10	TRG	0,91	5,195	2,501 - 16,485	1,478 - 18,873	0,407	
TGF	TRG	1,0	0,095	0,030 - 0,312	0,017 - 0,683	0,251	
TNF	TRG	0,91	4,182	1,348 - 14,842	0,729 - 29,886	0,640	

Bu parametrelerin analizinde kullanılan normalizasyon faktörü 0.21'dir.

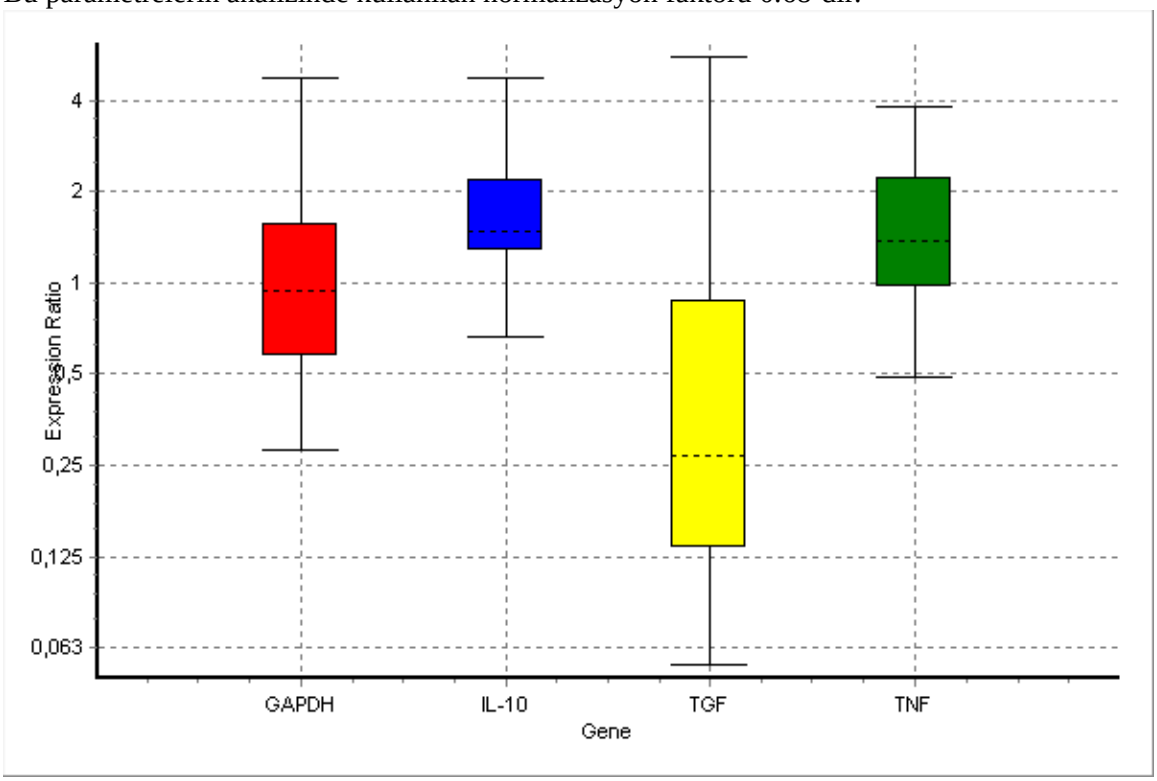


Şekil 3.5: Ekinezya grubu 20. güne göre 40. gün mRNA ekspresyon düzeyleri

Çizelge 3.6: Ginseng grubu 20. güne göre 40. gün mRNA ekspresyon düzeyleri

Gen	Tip	Reaksiyon Etkinliği	Ekspresyon	Std. Hata	95% C.I.	P(H1)	Sonuç
GAPDH	REF	0,91	1,000	0,465 - 1,941	0,328 - 4,412	1,000	
IL-10	TRG	0,91	1,537	0,694 - 2,955	0,659 - 4,659	0,430	
TGF	TRG	1,0	0,402	0,129 - 3,592	0,071 - 5,408	0,237	
TNF	TRG	0,91	1,407	0,770 - 2,682	0,529 - 3,554	0,594	

Bu parametrelerin analizinde kullanılan normalizasyon faktörü 0.68'dir.

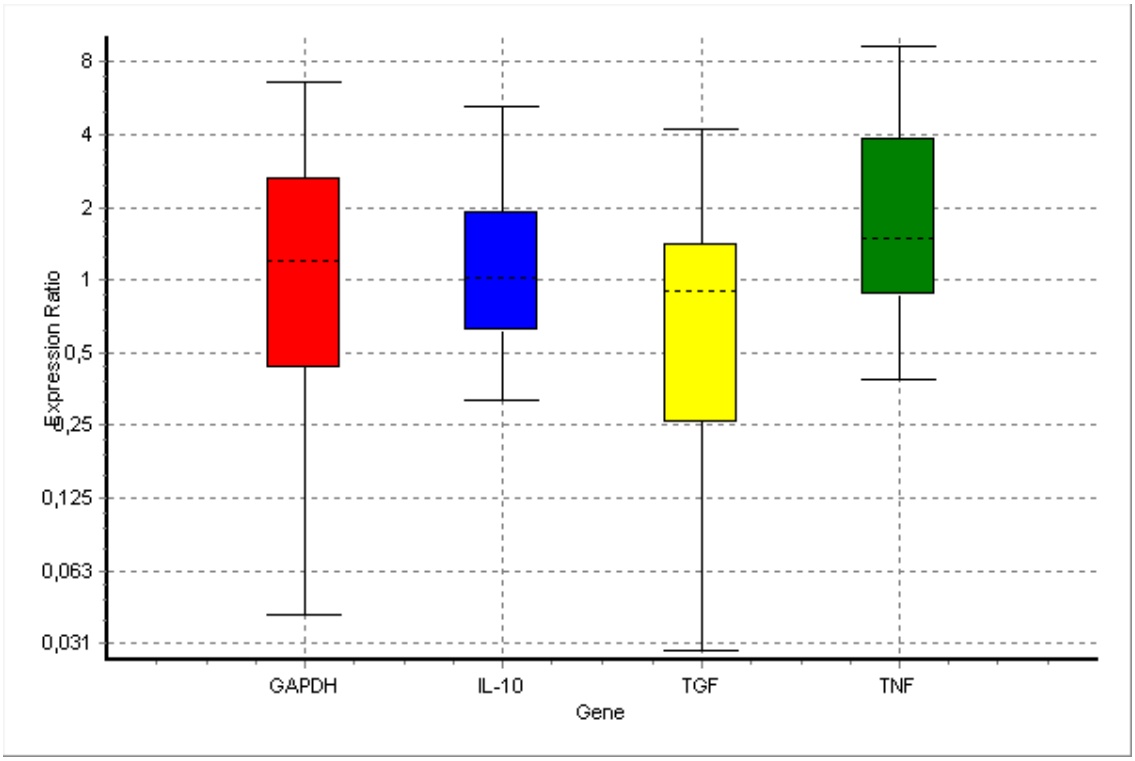


Şekil 3.6: Ginseng grubu 20. güne göre 40. gün mRNA ekspresyon düzeyleri

Çizelge 3.7: 40. gün Ginseng grubuna göre Ekinezya grubu mRNA ekspresyon düzeyleri

Gen	Tip	Reaksiyon Etkinliği	Ekspresyon	Std. Hata	95% C.I.	P(H1)	Sonuç
GAPDH	REF	0,91	1,000	0,244 - 3,935	0,085 - 6,061	1,000	
IL-10	TRG	0,91	1,114	0,523 - 2,501	0,377 - 5,127	0,870	
TGF	TRG	0,91	0,550	0,091 - 1,981	0,034 - 3,499	0,407	
TNF	TRG	0,91	1,770	0,656 - 4,714	0,460 - 8,316	0,298	

Bu parametrelerin analizinde kullanılan normali zasyon faktörü 0.68'dir.

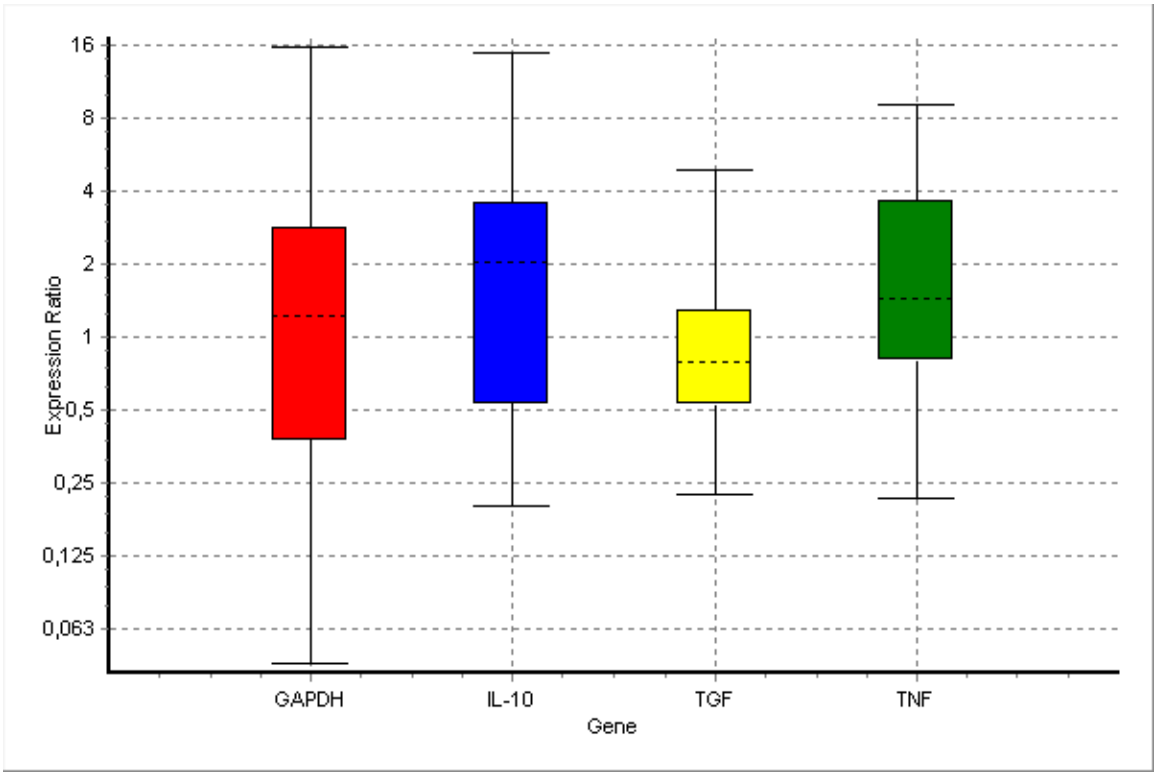


Şekil 3.7: 40. gün Ginseng grubuna göre Ekinezya grubu mRNA ekspresyon düzeyleri

Çizelge 3.8: 40. gün Kontrol grubuna göre Ekinezya grubu mRNA ekspresyon düzeyleri

Gen	Tip	Reaksiyon Etkinliği	Ekspresyon	Std. Hata	95% C.I.	P(H1)	Sonuç
GAPDH	REF	0,91	1,000	0,270 - 3,369	0,086 - 11,659	1,000	
IL-10	TRG	0,91	1,707	0,369 - 5,595	0,233 - 11,811	0,263	
TGF	TRG	0,91	0,837	0,404 - 1,686	0,248 - 3,303	0,508	
TNF	TRG	0,91	1,587	0,583 - 4,967	0,307 - 8,978	0,241	

Bu parametrelerin analizinde kullanılan normalizasyon faktörü 1.00'dir.

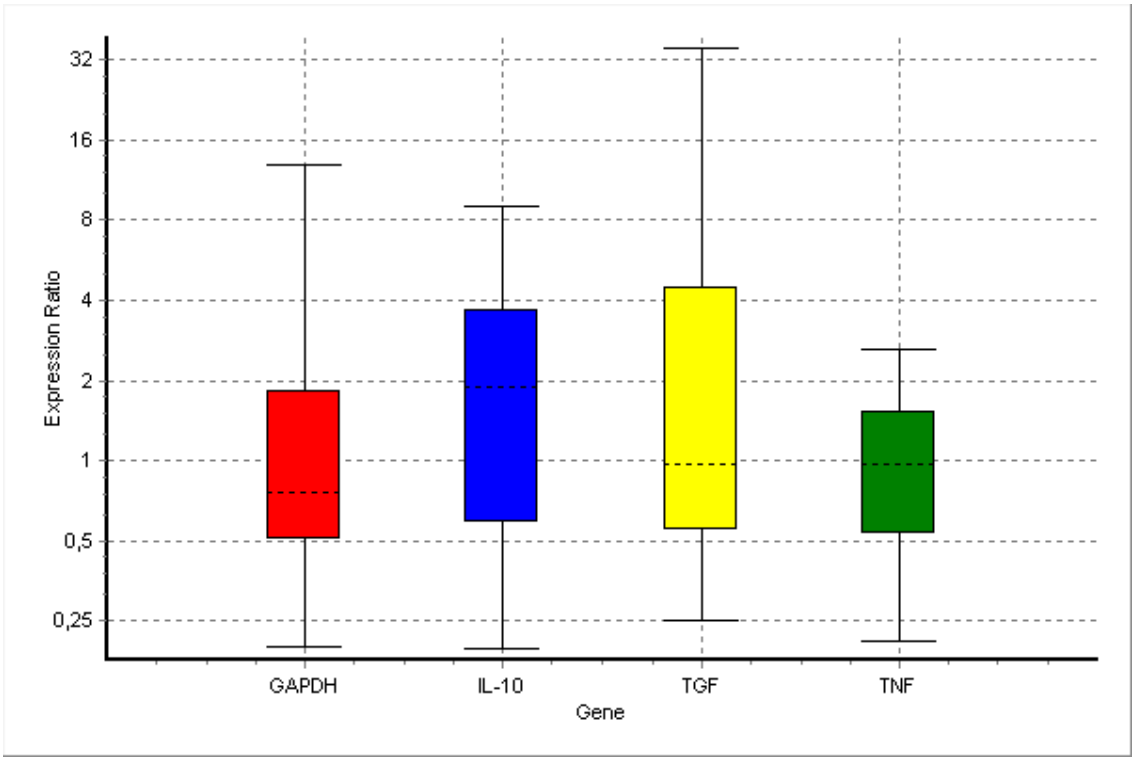


Şekil 3.8: 40. gün Kontrol grubuna göre Ekinezya grubu mRNA ekspresyon düzeyleri

Çizelge 3.9: 40. gün Kontrol grubuna göre Ginseng grubu mRNA ekspresyon düzeyleri

Gen	Tip	Reaksiyon Etkinliği	Ekspresyon	Std. Hata	95% C.I.	P(H1)	Sonuç
GAPDH	REF	0,91	1,000	0,443 - 2,742	0,230 - 7,522	1,000	
IL-10	TRG	0,91	1,533	0,394 - 4,632	0,200 - 6,599	0,502	
TGF	TRG	0,91	1,522	0,446 - 8,461	0,263 - 25,741	0,565	
TNF	TRG	0,91	0,897	0,463 - 1,689	0,246 - 2,596	0,876	

Bu parametrelerin analizinde kullanılan normalizasyon faktörü 1,46 ’dir.

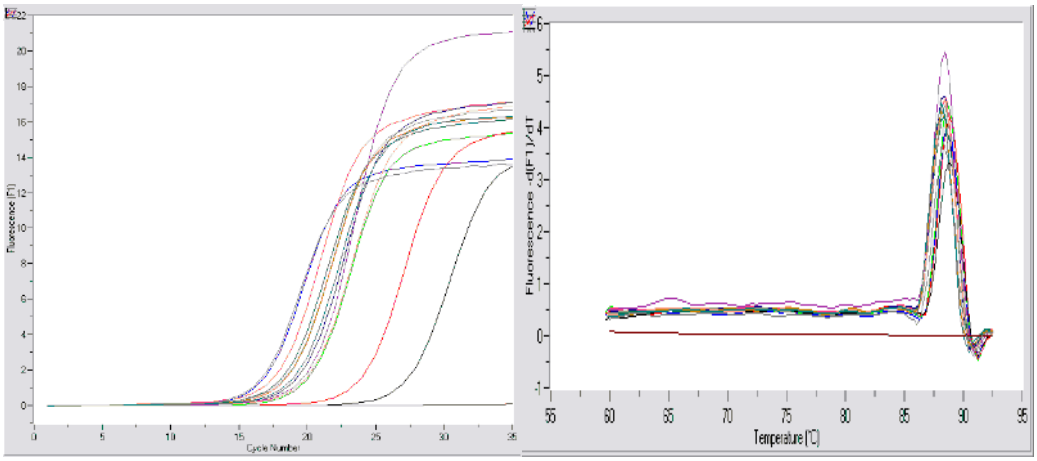


Şekil 3.9: 40. gün Kontrol grubuna göre Ginseng grubu mRNA ekspresyon düzeyleri

HOUSEKEEPİNG GEN (GAPDH)

20. gün KONTROL

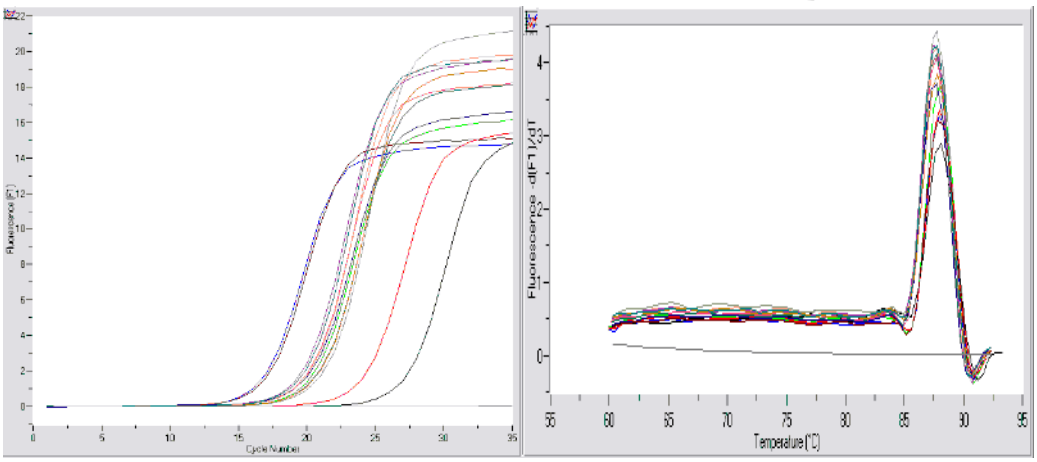
A **B**



Şekil 3.10: 20. gün Kontrol grubu GAPDH crossing point (A) ve melting eğrileri (B)

20. gün EKİNEZYA

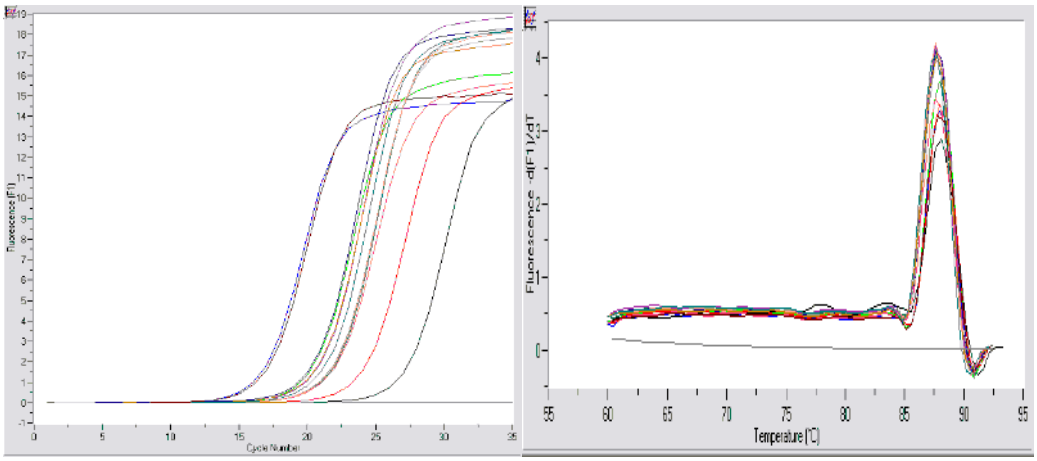
A **B**



Şekil 3.11: 20. gün Ekinezya grubu GAPDH crossing point (A) ve melting eğrileri (B)

20. gün GİNSENG

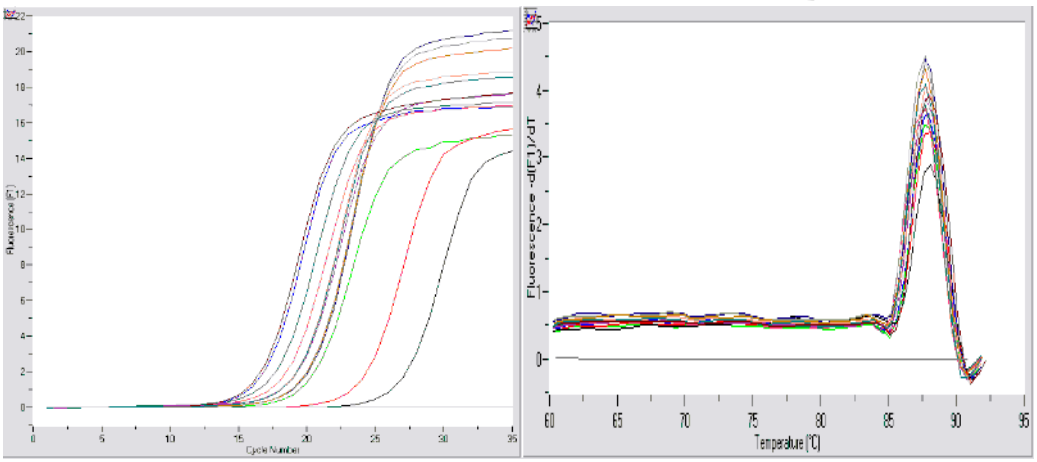
A **B**



Şekil 3.12: 20. gün Ginseng grubu GAPDH crossing point (A) ve melting eğrileri (B)

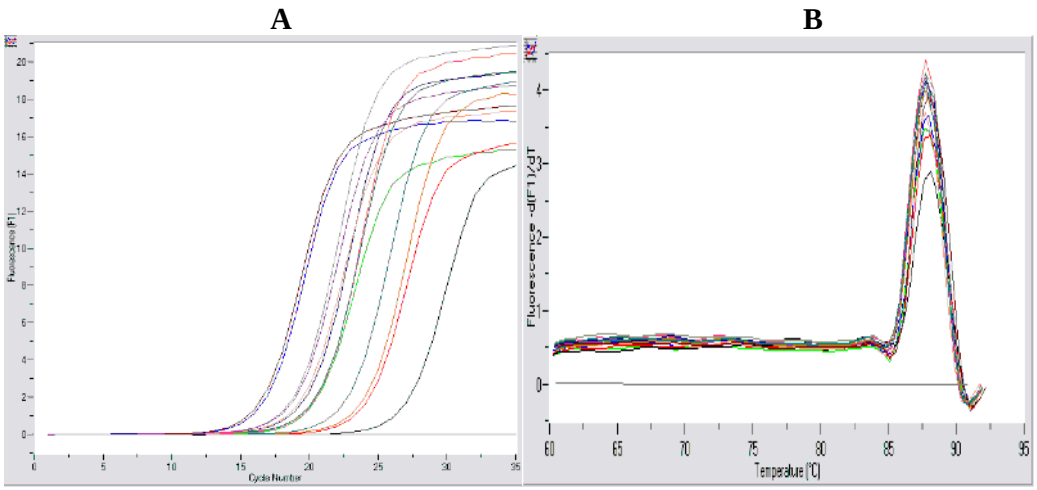
40. gün KONTROL

A **B**



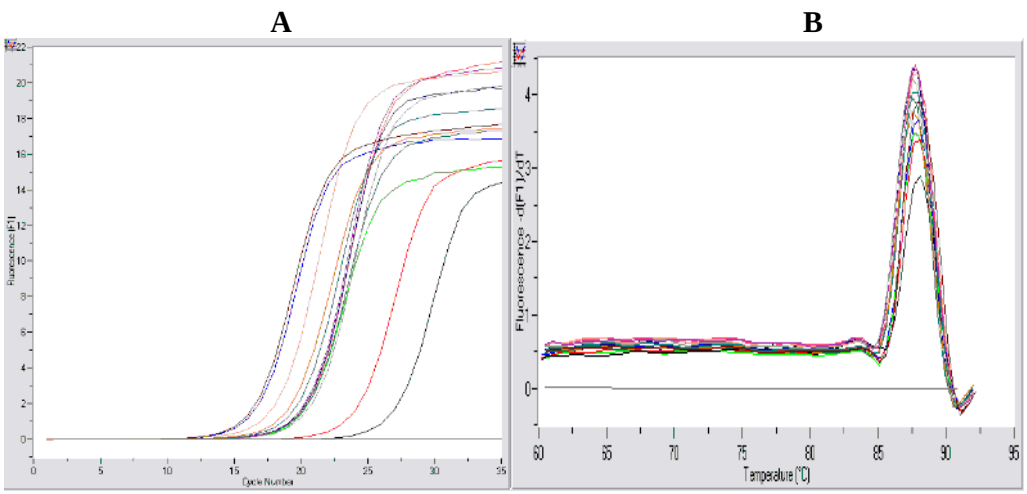
Şekil 3.13: 40. gün Kontrol grubu GAPDH crossing point (A) ve melting eğrileri (B)

40. gün EKİNEZYA



Şekil 3.14: 40. gün Ekinezya grubu GAP DH crossing point (A) ve melting eğrileri (B)

40. gün GİNSENG

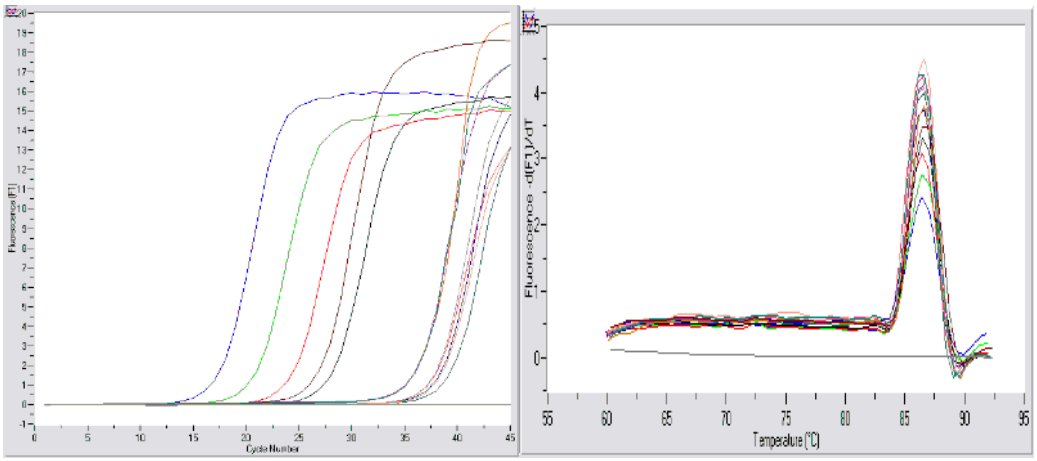


Şekil 3.15: 40. gün Ginseng grubu GAPDH crossing point (A) ve melting eğrileri (B)

IL-10

20. gün KONTROL

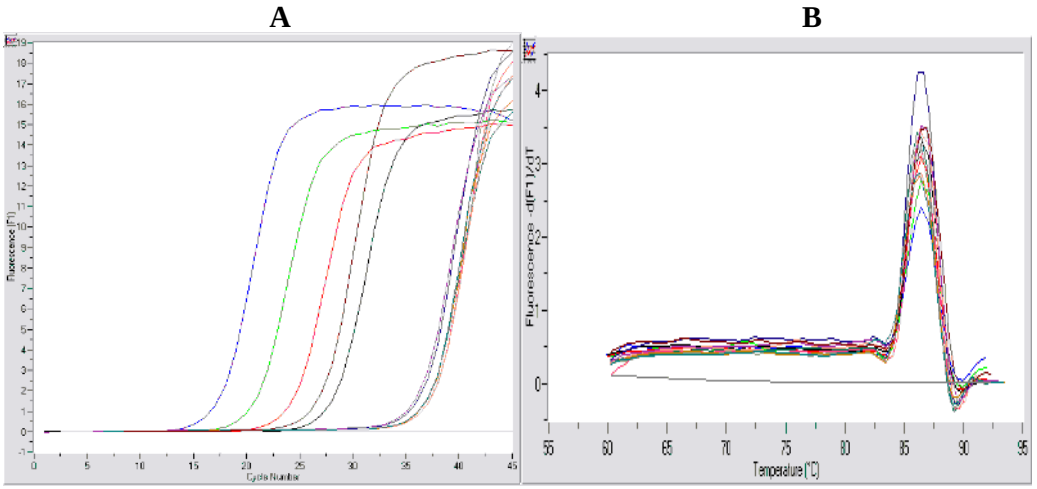
A **B**



Şekil 3.16: 20. gün Kontrol grubu IL -10 crossing point (A) ve melting eğrileri (B)

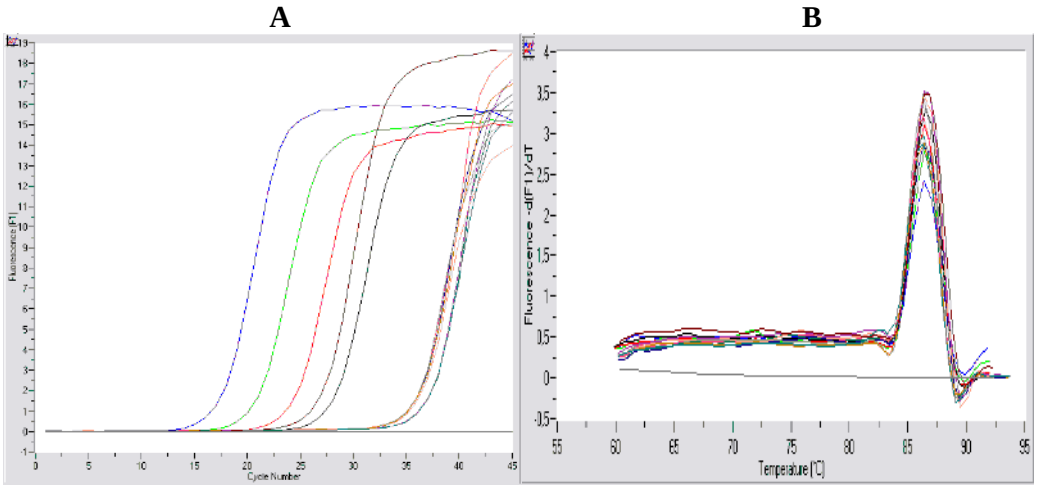
20. gün EKİNEZYA

A **B**



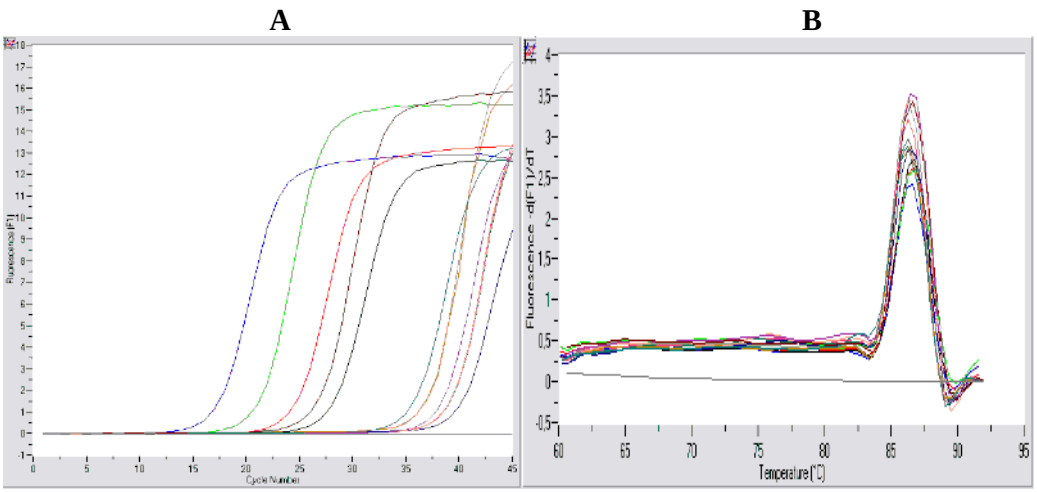
Şekil 3.17: 20. gün Ekinezya grubu IL -10 crossing point (A) ve melting eğrileri (B)

20. gün GİNSENG



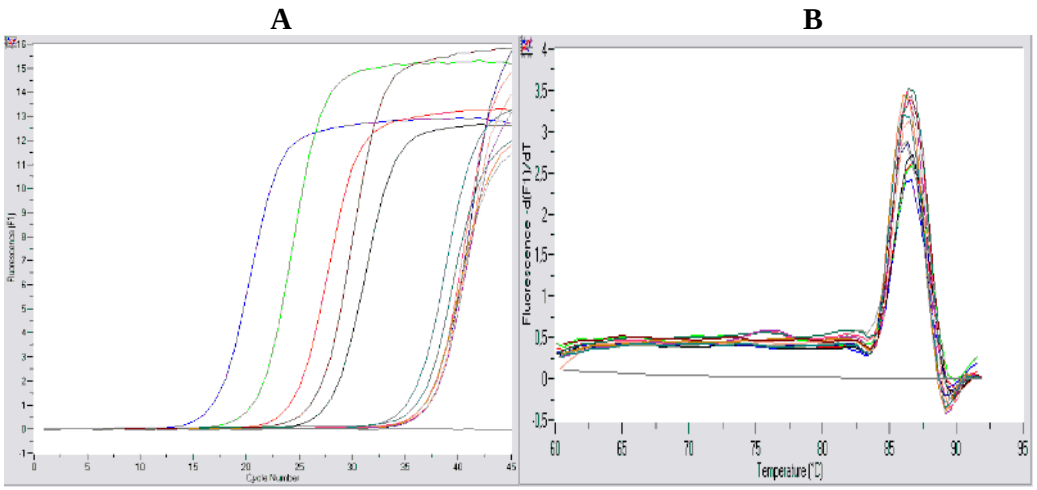
Şekil 3.18: 20. gün Ginseng grubu IL -10 crossing point (A) ve melting eğrileri (B)

40 gün KONTROL



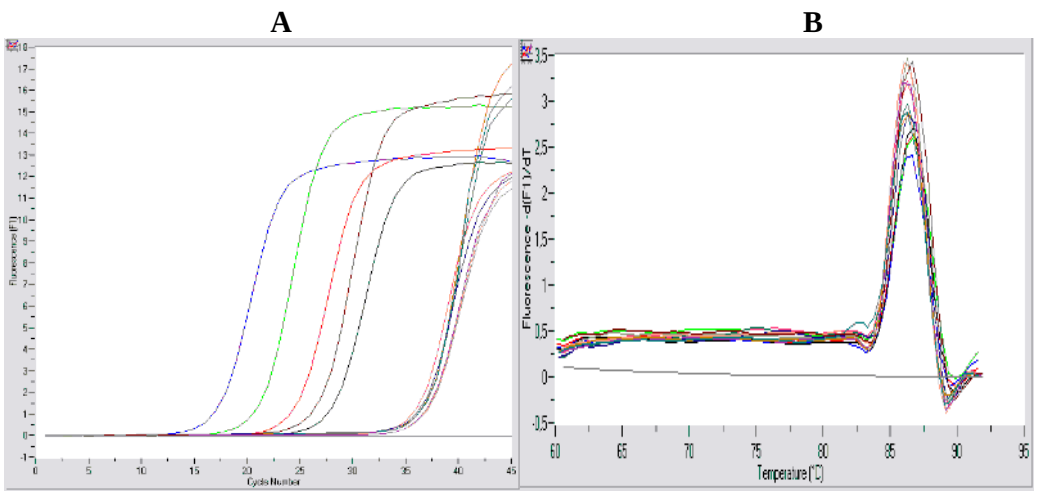
Şekil 3.19: 40. gün Kontrol grubu IL -10 crossing point (A) ve melting eğrileri (B)

40. gün EKİNEZYA



Şekil 3.20: 40. gün Ekinezya grubu IL -10 crossing point (A) ve mel ting eğrileri (B)

40. gün GİNSENG

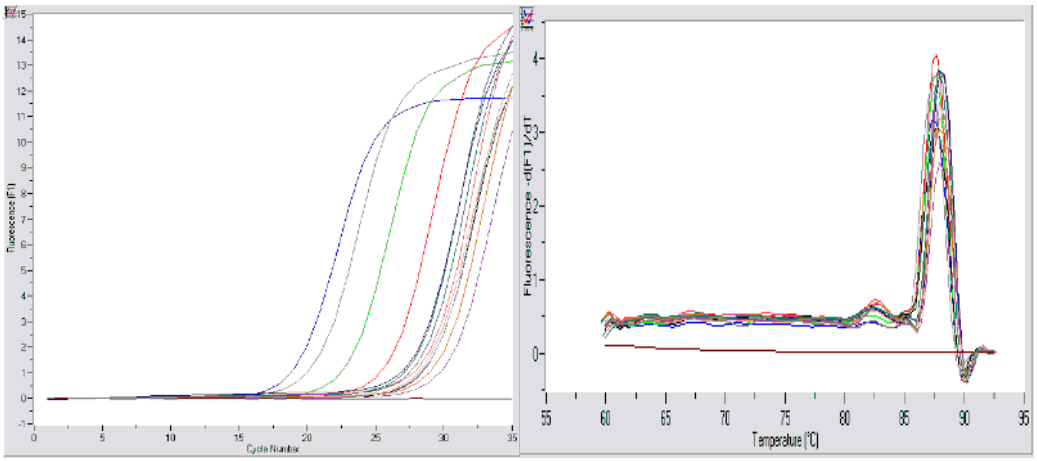


Şekil 3.21: 40. gün Ginseng grubu IL -10 crossing point (A) ve melting eğrileri (B)

TGF-β

20. gün KONTROL

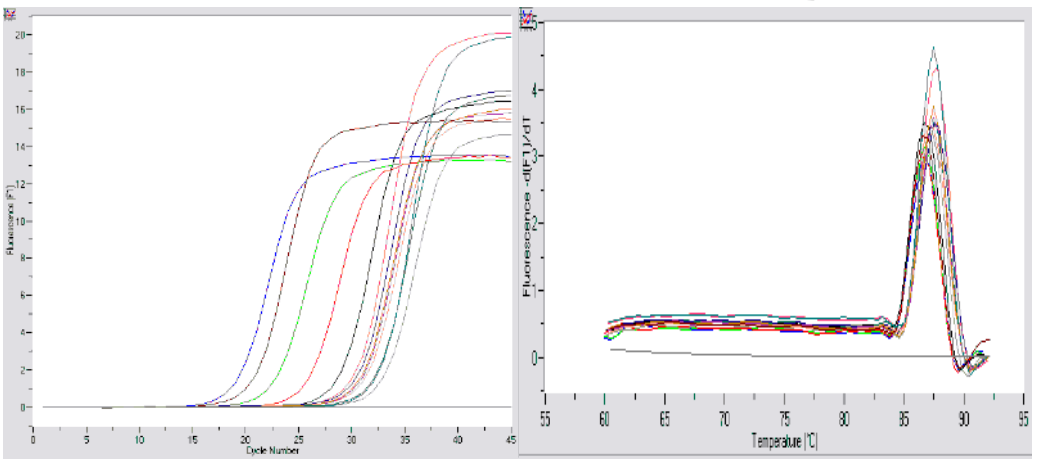
A **B**



Şekil 3.22: 20. gün Kontrol grubu TGF -β1 crossing point (A) ve melting eğrileri (B)

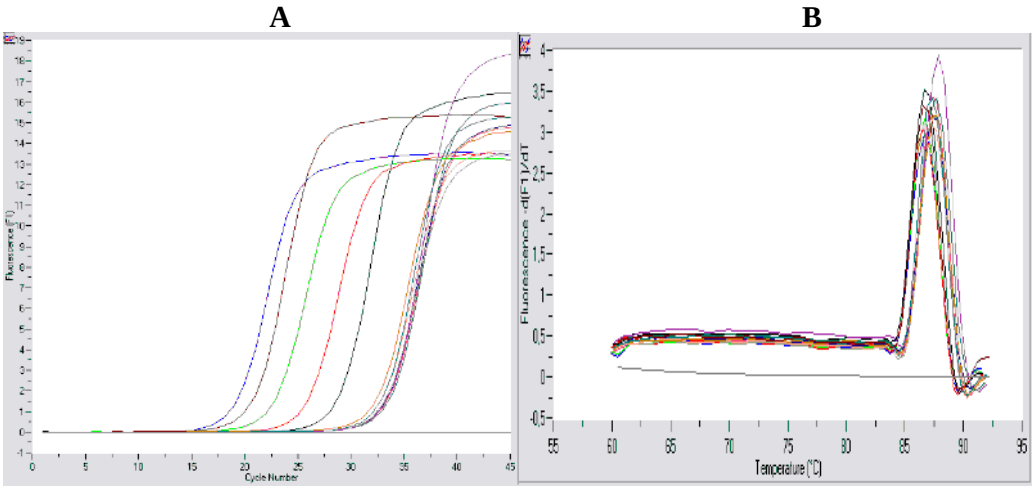
20. gün EKİNEZYA

A **B**



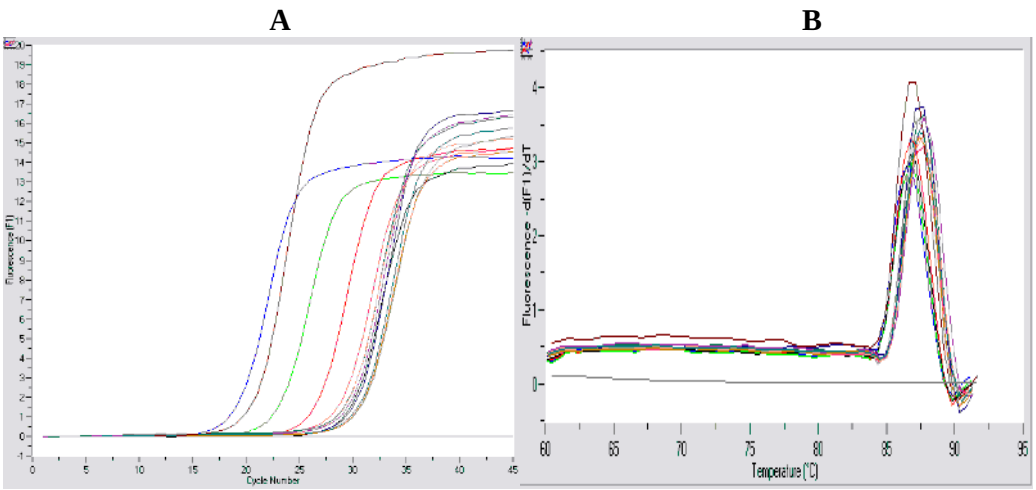
Şekil 3.23: 20. gün Ekinezya grubu TGF -β1 crossing point (A) ve melting eğrileri (B)

20. gün GİNSENG



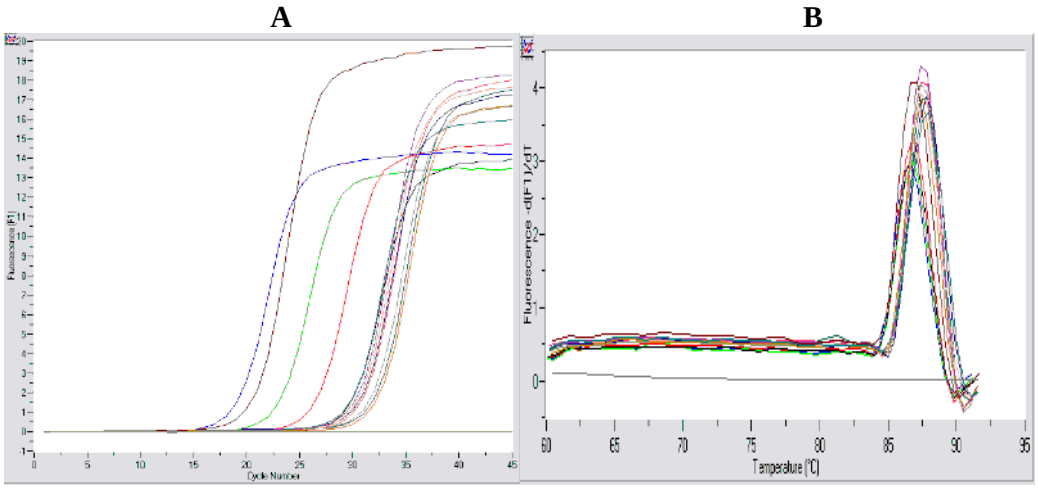
Şekil 3.24: 20. gün Ginseng grubu TGF -β1 crossing point (A) ve melting eğrileri (B)

40. gün KONTROL



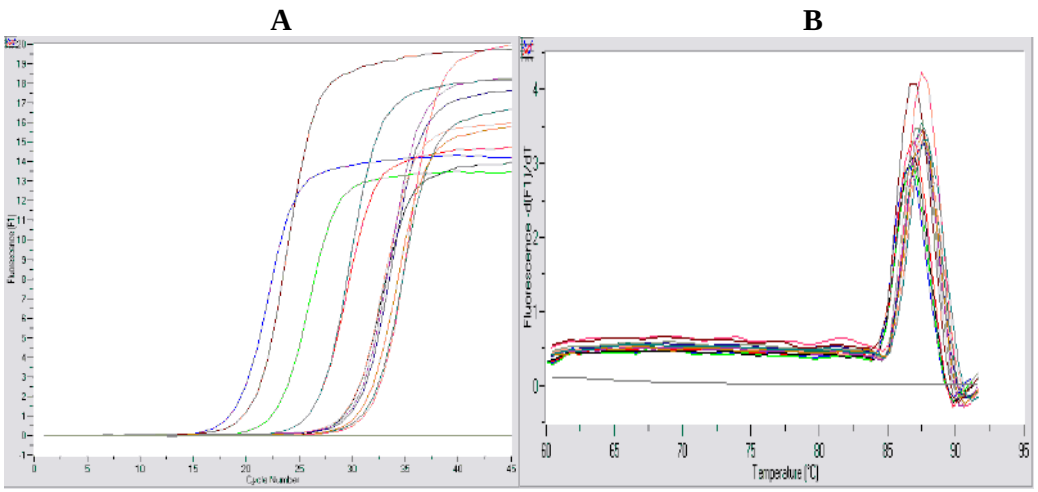
Şekil 3.25: 40. gün Kontrol grubu TGF -β1 crossing point (A) ve melting eğrileri (B)

40. gün EKİNEZYA



Şekil 3.26: 40. gün Ekinezya grubu TGF -β1 crossing point (A) ve melting eğrileri (B)

40. gün GİNSENG

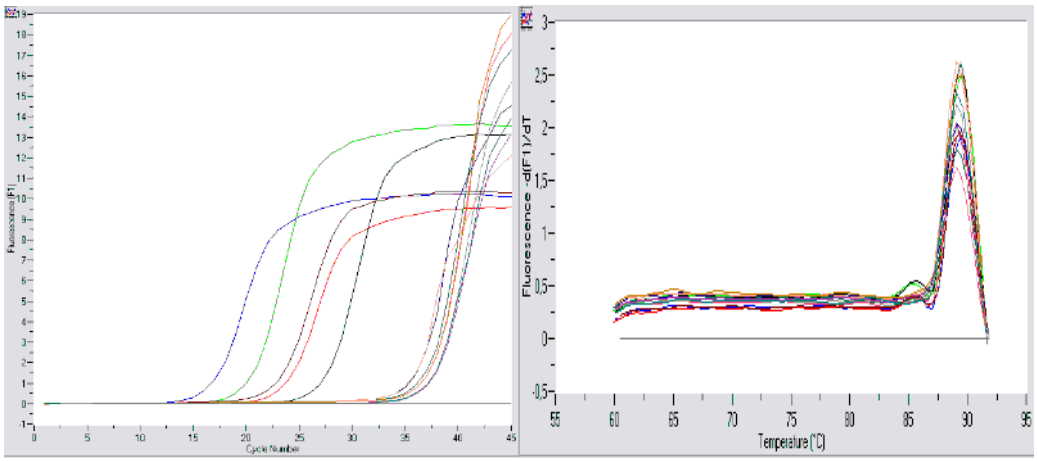


Şekil 3.27: 40. gün Ginseng grubu TGF -β1 crossing point (A) ve melting eğrileri (B)

TNF-α

20. gün KONTROL

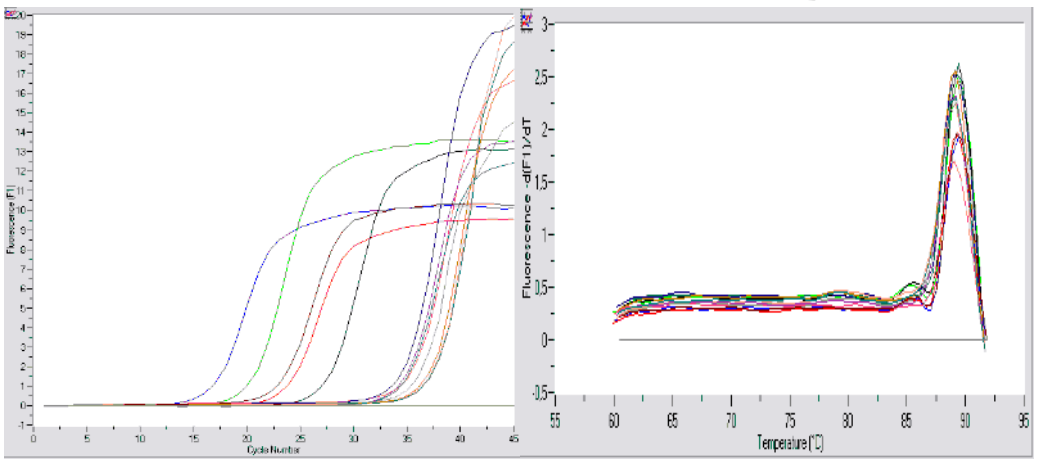
A **B**



Şekil 3.28: 20. gün Kontrol grubu TNF -α crossing point (A) ve melting eğrileri (B)

20. gün EKİNEZYA

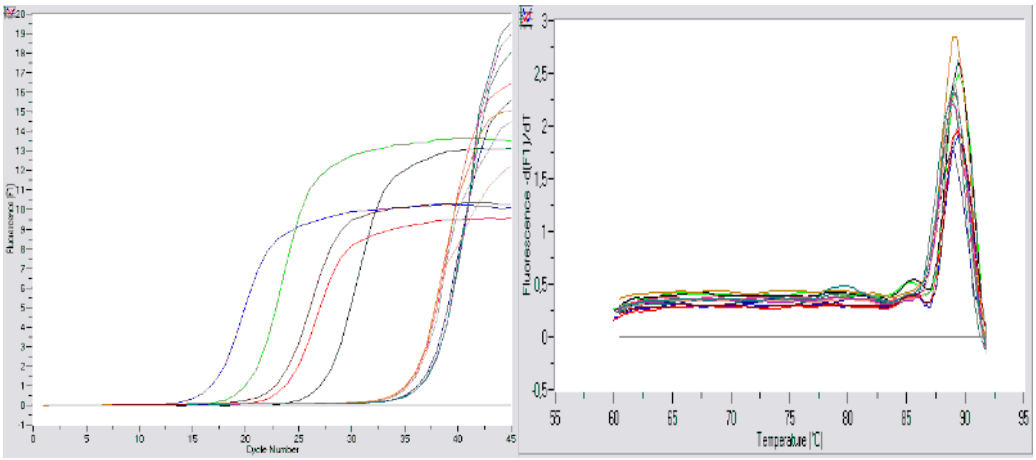
A **B**



Şekil 3.29: 20. gün Ekinezya grubu TNF -α crossing point (A) ve melting eğrileri (B)

20. gün GİNSENG

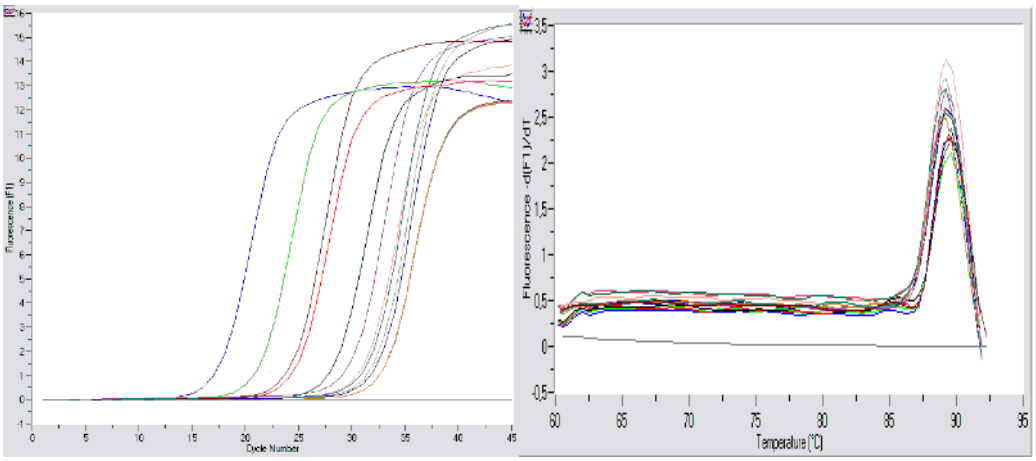
A **B**



Şekil 3.30: 20. gün Ginseng grubu TNF -α crossing point (A) ve melting eğrileri (B)

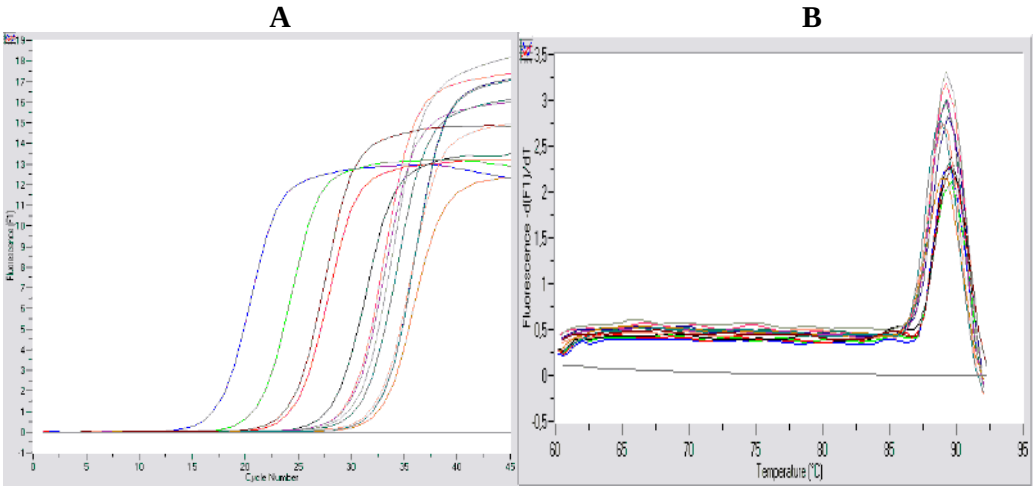
40. gün KONTROL

A **B**



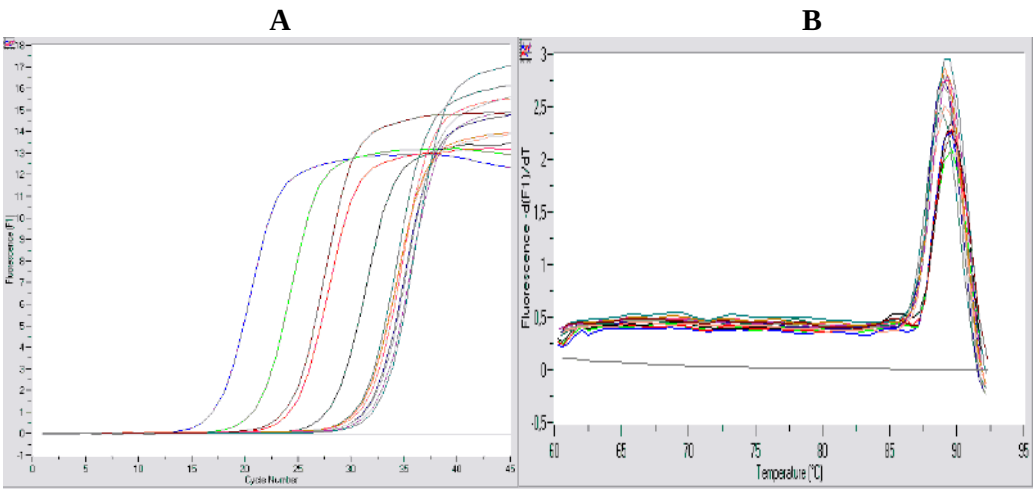
Şekil 3.31: 40. gün Kontrol grubu TNF -α crossing point (A) ve melting eğrileri (B)

40. gün EKİNEZYA



Şekil 3.32: 40. gün Ekinezya grubu TNF -α crossing point (A) ve melting eğrileri (B)

40. gün GİNSENG



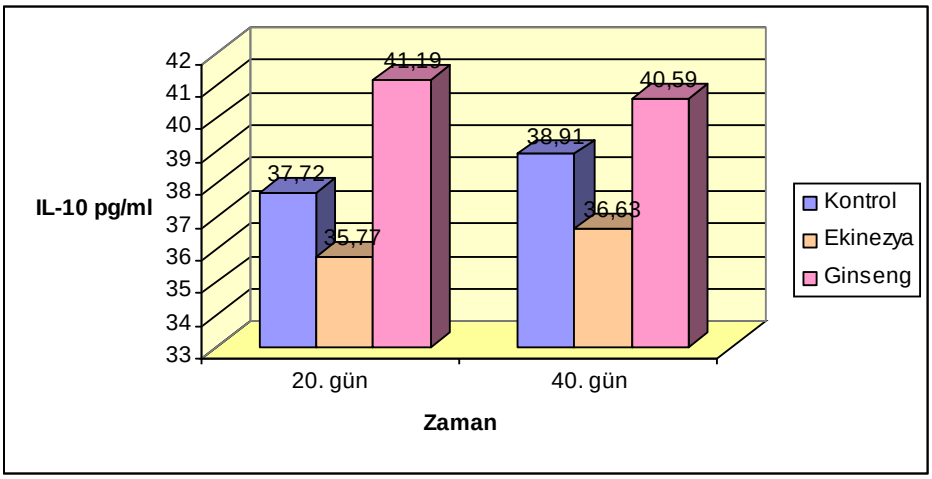
Şekil 3.33: 40. gün Ginseng grubu TNF -α crossing point (A) ve melting eğrileri (B)

3.2. Tüm gruplardan elde edilen plazma sitokin düzeylerine ait değerler Çizelge 3.10-3.12 ve Şekil 3.34-3.39'da verilmiştir.

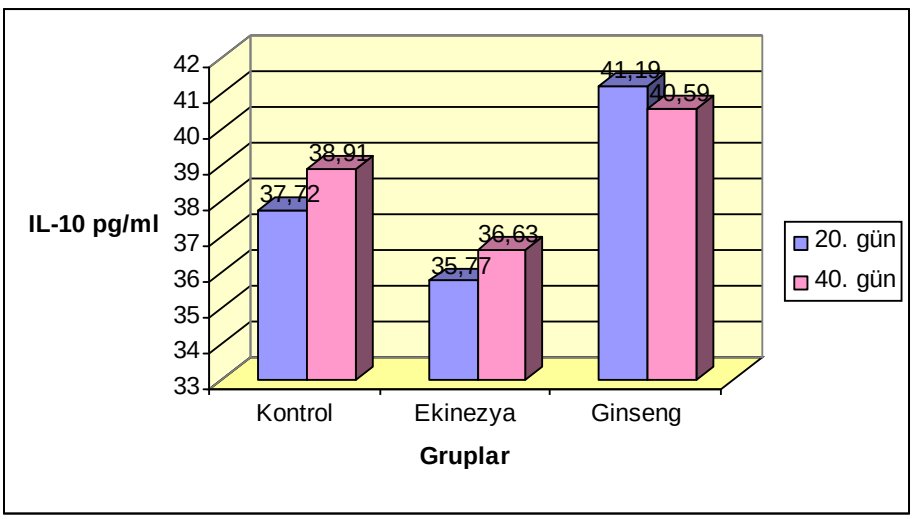
Çizelge 3.10: Tüm gruplara ait 20. ve 40. gün IL-10 düzeyleri (X±SEM, n=8)

IL-10	**20. gün**	**40. gün**
Gruplar	Mean±SD	Mean±SD
Kontrol	37, 72±0,94b	38, 91±1,33
Ekinezya	35, 77±1,39b	36, 63±1,58
Ginseng	41, 19±0,88a	40, 59±1,17

a, b: Aynı sütunda farklı harf taşıyan gruplar arası farklılık önemlidir (p<0,05)



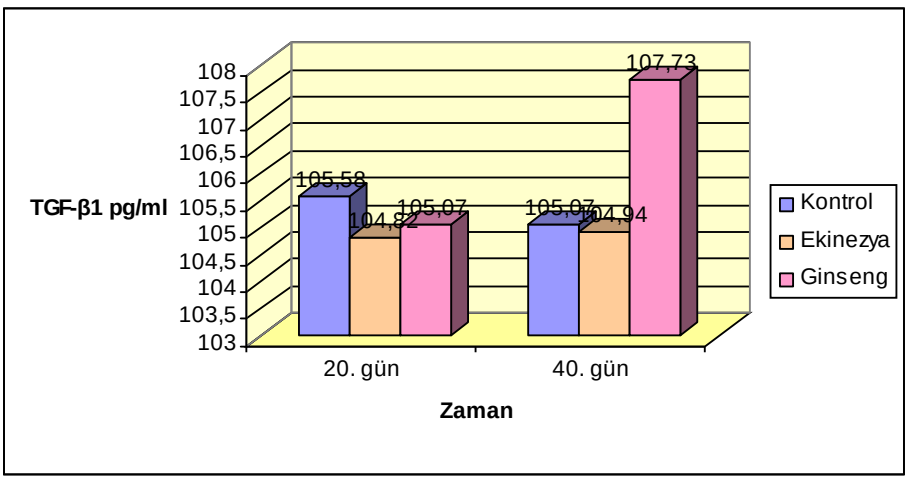
Şekil 3.34: Gruplar arası IL-10 düzeyleri (pg/ml)



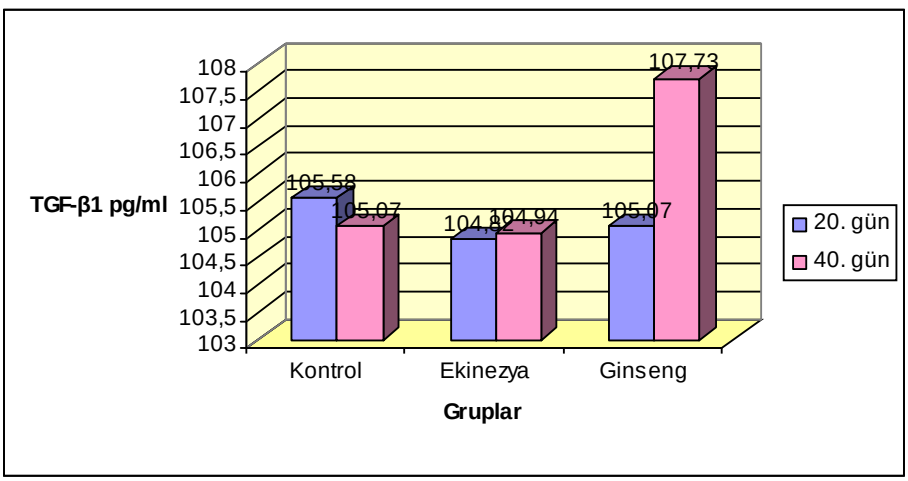
Şekil 3.35: Tüm gruplara ait 20. ve 40. gün IL-10 düzeyleri (pg/ml)

Çizelge 3.11: Tüm gruplara ait 20. ve 40. gün TGF-β1 düzeyleri (X±SEM, n=8)

TGF-β1	**20. gün**	**40. gün**
Gruplar	Mean±SD	Mean±SD
Kontrol	105, 58±1,70	105, 07±2,82
Ekinezya	104, 82±1,75	104, 94±2,61
Ginseng	105, 07±2,07	107, 73±2,92



Şekil 3.36: Gruplar arası TGF-β1 düzeyleri (pg/ml)

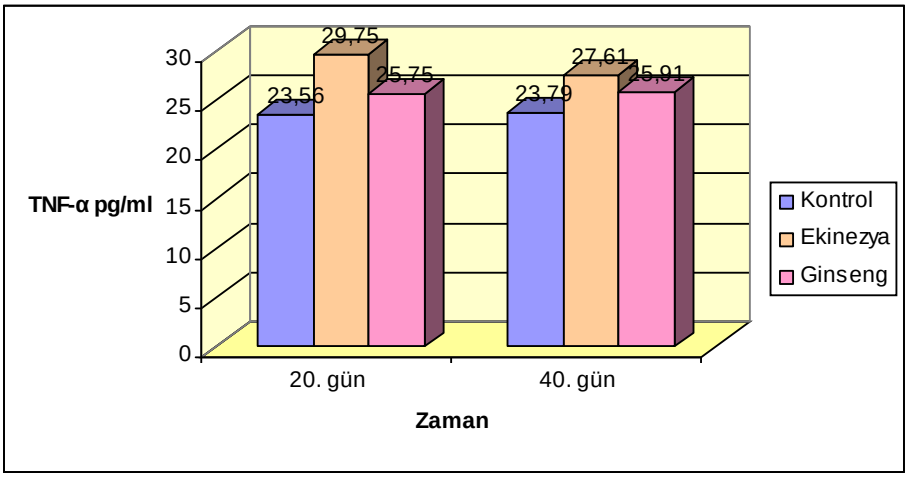


Şekil 3.37: Tüm gruplara ait 20. ve 40. gün TGF-β1 düzeyleri (pg/ml)

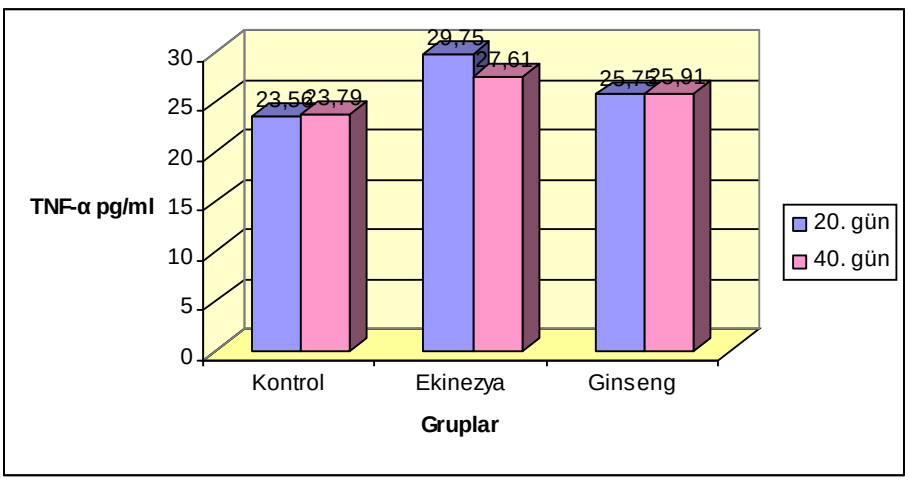
Çizelge 3.12: Tüm gruplara ait 20. ve 40. gün TNF-α düzeyleri (X±SEM, n=8)

TNF-α	**20. gün**	**40. gün**
Gruplar	Mean±SD	Mean±SD
Kontrol	23, 56±1,04b	23, 79±1,03b
Ekinezya	29, 75±0,65a	27, 61±1,20a
Ginseng	25, 75±0,88b	25, 91±0,99ab

a, b: Aynı sütunda farklı harf taşıyan gruplar arası farklılık önemlidir (p<0,05)



Şekil 3.38: Gruplar arası TNF-α düzeyleri (pg/ml)



Şekil 3.39: Tüm gruplara ait 20. ve 40. gün TNF-α düzeyleri (pg/ml)

4. TARTIŞMA

Son yıllarda gerek sağlıklı bireylerde gerekse çeşitli hastalık durumlarında immun sistemi güçlendirmek, anti-aging ve yaşam kalitesini iyileştirmek amacı ile birçok bitkisel destek maddeleri bilinçli olarak kullanılmaya başlanmıştır (Block ve Mead 2003). Bunlardan ekinezya ve ginseng bitkilerine ait ürünler sözü edilen amaçlarla yaygın şekilde kullanıldığından bu çalışmada sağlıklı ratlarda ginseng ve ekinezya kökü tozlarının immunomodülasyonda önemli rolleri olan sitokinlerden IL-10, TGF-β1 ve TNF-α'nın plazma değerleri ve mRNA ekspresyon düzeyleri üzerine etkileri belirlendi.

Çalışmada ginseng ve ekinezyanın insan ve ratlarda yapılan araştırmalarda optimal düzey olarak belirlenen miktarlar ile ticari ürünlerde insanlar için belirtilen dozların ratlara uyarlanan düzeyleri kullanıldı. Yeme katılan ginseng ve ekinezya oranları ratların ortalama yem tüketimlerinin miktarları göz önüne alınarak belirlendi.

Materyal ve metot bölümünde belirtilen oranlarda ginseng ve ekinezya içeren yemlerle 20 gün süreyle beslemenin sonunda hayvanlarda belirlenen IL-10 mRNA ekspresyon düzeyleri incelendiğinde ekinezya grubunda kontrole göre fark olmadığı (Çizelge 3.2), ginsengde (Çizelge 3.3) ise kontrole göre önemli oranda arttığı ($p<0,05$), aynı sitokinin ginseng ve ekinezya grupları arasında mRNA ekspresyon düzeyi açısından (Çizelge 3.1) farklılık göstermediği belirlendi.

Çalışmada 20. günde belirlenen üç gruba ait plazma IL-10 değerlerinin (Çizelge 3.10) Rivera ve ark (2005)'nın yine ratlarda belirlediği miktarlara yakın düzeylerde olduğu dikkati çekti.

20. gün plazma IL-10 düzeylerinin (Çizelge 3.10) ginseng grubunda diğer gruplara oranla önemli oranda yüksek olduğu ($p<0,05$) belirlenirken, kontrol ve ekinezya grupları arasında farklılığın olmadığı görüldü.

Belirtilen oranlarda ginseng ve ekinezya içeren yemlerle 40 gün süreyle beslemenin sonunda ratlarda belirlenen IL-10 mRNA ekspresyon düzeyleri

incelendiğinde ekinezya ve ginseng gruplarında kontrol grubuna göre fark olmadığı (Çizelge 3.8, 3.9), yine benzer şekilde aynı sitokinin m RNA ekspresyon düzeyi açısından ginseng ve ekinezya grupları (Çizelge 3.7) arasında da önemli bir farklılığın olmadığı belirlendi. Diğer yandan, herhangi bir grubun 20. ve 40. gün IL -10 mRNA ekspresyon düzeyleri (Çizelge 3.4, 3.5, 3.6) arasında bir farklıl ık belirlenemedi.

Ginseng grubunda 40. gün plazma IL -10 düzeylerinin (Çizelge 3.10) istatistiksel olarak önemli olmamakla birlikte diğer gruplara oranla yüksek olduğu gözlendi. 20. ve 40. gün plazma IL -10 düzeylerinin de (Çizelge 3.10) birbirine yakın olduğu saptandı.

Bu çalışmada ginseng uygulaması ile 20. gün elde edilen IL -10'nun plazma değerleri ile mRNA ekspresyon düzeyindeki artış, Liou ve ark (2006)'nın 5 gün süre ile ginseng ekstraktı uyguladıkları farelerden elde ettikleri hücre kültürlerinde belirledikleri IL -10 mRNA ekspresyon ve serum düzeylerindeki artışa paralellik göstermektedir. IL -10 düzeyinde belirlenen bu artış, Yang ve ark (2007)'nın ginsenozid Rd uygulamasıyla farelerde bazı antijenlere karşı gelişen immun yanıtta IL-10 ekspresyon düzeyindeki artışın daha belirgin olduğu görüşü ile, Huang ve ark (2001)'nın insan lenfosit hücre kültürlerinde ginseng ekstraktı uygulamasının IL -10 ekspresyonunda artışa yol açtığı yönündeki bulgularıyla da uyum göstermektedir. Yine Rivera ve ark (2005)'nın farelerde parvovirusa karşı ginseng uygulaması ile serum IL-10 düzeyinde belirledikleri artışla ve Wang ve ark (2006)'nın fare hücre kültürü uygulamalarında ginsengin IL -10 mRNA ekspresyonunu artırdığını belirten bulguları bu çalışmadaki artışı destekle r niteliktedir.

Larsen ve ark (2004), ginseng ekstraktı ile yapmış oldukları çalışmada polimorf nükleer lökositlerde IL -10 üretiminde herhangi bir değişiklik olmadığını belirtirlerken, Ahn ve ark (2006) S. aureus ile enfekte farelerde ginseng uygulamasının IL-10 düzeyini azalttığını bildirmektedirler. Yine Lee ve ark (2008) E. Coli lipopolisakkariti ile muamele edilen insan monositik hücre kültürlerine ginseng ekstraktı uygulaması ile IL -10 ekspresyon düzeyinde azalma meydana geldiğini ifade etmektedirler. Adı geçen çalışmalarda ginseng uygulamasının bir antiinflamatuar sitokin olan IL -10 düzeyinde azalmadan bahsetmelerine karşın, bu

çalışmada belirlenen artış çeşitli araştırıcılarca (Lee ve ark 2008) ifade edildiği gibi bu bitkinin immuniteyi artırması ve çeşitli hastalıklarda inflamasyonu önleyici etkiye sahip olması ya da hafifletmesi yanında bir immunomodülatör sitokin olmasına da atfedilebilir. Çeşitli enfeksiyon ve yangılarda pro ve anti inflamatuar sitokinler arasında olması gereken denge konakçının s avunma mekanizması açısından oldukça kritik bir durumdur. Çünkü immun sistemde kontrolsüz ve aşırı cevap canlının maruz kaldığı enfeksiyon ya da çeşitli ajanların oluşturduğu tehlikeden daha ağır sonuçlar doğurabilmektedir (Mocellin ve ark 2004). Bununla ilgili olarak, ginseng uygulamasının IL-10 düzeyini artırması ve T hücrelerden IL-2 üretimini baskılaması ile buna bağlı olarak B ve T hücre hattında proliferasyonun sınırlanması ve dolayısıyla B hücrelerde immunglobulin üretiminin azaldığı bulgusu bu görüş ü destekler niteliktedir (Liou ve ark 2006)

Çalışmada ginseng grubunun 40. gün plazma IL-10 ve mRNA ekspresyon düzeylerinin diğer gruplara göre farklılığının ortadan kalkışı dikkati çekmekle beraber bu konuda uygulama süresine bağlı artış ya da azalma şek linde bir değişimin olduğu yönünde bir bulguya rastlanmadığından izahı güç görülmektedir.

Genel olarak bütün araştırmalarda olduğu gibi ekinezya ve IL-10 ile ilgili yapılan çalışmalarda da oldukça farklı uygulama ve sonuçlara rastlamak mümkündür. Nitekim, Gertsch ve ark (2004) insan periferal mononükleer hücre kültürlerine ekinezya ekstraktı uygulamasının IL-10 ekspresyonunu artırdığını, yine Hwang ve ark (2004) fare splenosit hücre kültürlerinde ekinezya preparatı uygulamasının IL-10 ekspresyonunu artırdığını ifade ederlerken, Raduner ve ark (2006) da insan perifer tam kan hücre kültürlerinde ekinezya alkalamid uygulamasının IL-10 ekspresyonunu artırdığını belirtmektedirler. Benzer olarak, Rininger ve ark (2000) murin makrofajları ve insan periferal kan mo nonükleer hücre kültürlerine ekinezya ekstraktı uygulamasının serum IL-10 miktarını artırdığını belirtirlerken, Burger ve ark (1997) endotoksinle stimüle edilen insan periferal kan makrofaj kültürlerine ekinezya ekstraktı uygulaması ile endotoksin uygulanmayanlara göre serum IL-10 miktarında artış belirlemişlerdir. Randolph ve ark (2003) da insan monositik hücre kültürüne ekinezya ekstraktı uygulaması sonucu IL-10 mRNA ekspresyon düzeyinde bir artış elde etmişlerdir.

Diğer yandan insanlarda çeşitli dozlarda oral ekinezya uygulamasının IL-10 ekspresyon düzeyini azalttığı (Guiotto ve ark 2008), insan tam kan hücre kültürlerine ekinezya ekstraktı uygulamasının yaşlılardan alınan hücrelerde IL-10 üretimini baskıladığı, gençlerden alınan hücrelerde ise herhangi bir etki göstermediği hatta artırdığı belirtilmektedir (Senchina ve ark 2006). Zhai ve ark (2007) da oral olarak ekinezya ekstraktı uygulaması yapılan farelerden elde edilen mononükleer lökosit hücre kültürlerinde LPS uygulamasına karşı IL-10 düzeyinde kontrole göre farklılık olmadığını ifade etmektedirler.

Ekinezya uygulanan in vivo çalışmalarda ekinezyanın yangısel mekanizmalarla ilişkili çeşitli mediatörlere ait genlerin ekspresyonunu artırdığı belirtilmektedir. IL-10 gibi antiinflamatuar sitokinlerin artışlarının soğuk algınlığı ve grip gibi durumlarda semptomların azalması ve daha az şiddetli geçirilmesi ile ilgili olduğu ileri sürülürken, ekinezyanın ya da içeriğindeki alkilamidlerin ilk önce proinflamatuar yanıtı takibende antiinflamatuar yanıtı uyardığı, zamana bağlı bu bimodal etkinin immunomodülasyonda önemli olduğu vurgulanmaktadır (Randolph ve ark 2003). Bu çalışmada gerek 20. gün gerekse 40. günde IL-10'un mRNA ekspresyon ve plazma düzeylerinin ekinezya uygulaması ile kontrol grubundan farklı olmadığından bu sonucun belirtilen çalışmalardaki farklı bulgular ışığında çalışma dizaynı, uygulanan doz, yol ve süre ile birlikte değerlendirilmesi gerekmektedir.

Çalışmada hem büyüme faktörü hem de bir antiinflamatuar sitokin olarak bilinen TGF-β1'in ratlarda elde edilen plazma düzeylerinin (Çizelge 3.11) Waiser ve ark (2002)'nın ratlarda belirledikleri değerlerin değişim sınırları içerisinde olduğu görüldü.

Çalışmada gerek 20 gerekse 40 gün süreyle ginseng ve ekinezya uygulamasını takiben TGF-β1'in plazma düzeyleri (Çizelge 3.11) ve mRNA ekspresyon değerleri (Çizelge 3.1, 3.2, 3.3, 3.7, 3.8, 3.9) gruplararasında herhangi bir farklılık göstermedi. Çalışmada herbir grubun 40. gün değerleri ve 20. gün değerlerinin (Çizelge 3.4, 3.5, 3.6) karşılaştırılması sonucunda istatistiki olarak herhangi bir farklılığın olmadığı belirlendi.

Bu çalışmada ginseng uygulaması ile TGF-β düzeyinde önemli artış ya da azalma görülmemekle birlikte, bu bitki kökü ya da bu bitkinin içerdiği ve aktif olduğu ileri sürülen çeşitli saponinlerin tek veya birlikte uygulanması ile yapılan araştırmalarda TGF-β1 düzeyinin arttığı ya da azaldığı yönünde farklı bildirimler bulunmaktadır.

Bu çalışmalardan biri olan Kanzaki ve ark (1998)'nın yaptığı araştırmada insan derisindeki fibroblast kültürlerine ginseng saponini uygulamasının TGF-β1 düzeyini arttırdığı ifade edilmektedir. Bu çalışmada (Kanzaki ve ark 1998) ginseng saponinlerinin fibroblastlarda büyük multifonksiyonel bir glikoprotein olan fibronektin sentezini uyardığını, bunu da fibroblastlardaki TGF-β reseptörlerinin ekspresyonunu artırarak yaptığını ifade etmektedirler. Saponine bağlı fibronektin sentezinin TGF düzeyindeki artışla beraber TGF-β1 yolunun aktivasyonu ile ilgili olduğu anti-TGF-β1 antikoru uygulanarak önlenebilmesinin bu görüşü desteklediğini ileri sürmektedirler. Bu şekilde yara iyileşmesi ve doku tamirini saponinlere bağlı TGF-β1 ve dolayısıyla fibronektin gibi ekstrasellüler matriks oluşumuna etkili maddelere bağlamaktadırlar (Kanzaki ve ark 1998).

Han ve ark (2005) farelere irradyasyon uygulamasından 24 saat önce intraperitoneal olarak ginseng ekstraktı uygulamasının TGF-β1 mRNA ekpresyonunu azalttığını, bunun da antioksidan aktiviteyi olumlu yönde etkilediğini ifade ederlerken, bu görüşü TGF-β'nın ROS ve HO gibi oksidatif hasara yol açabilecek radikalleri artırdığı yolundaki çalışmaların (Chang ve ark 1995, Martin ve ark 2000) bulguları ile desteklemektedirler. Bu bulguya paralel olarak, Lee ve ark (2008) da insan lenfosit hücre kültürlerine LPS uygulaması ile meydana gelen sitokin üretimi üzerine ginseng ekstraktı uygulamasının TGF-β ekspresyon düzeyinde azalmaya yol açtığını belirtmektedirler.

Kanzaki ve ark (1998)'nın bildirimlerinin aksine Chen ve ark (2005) ginseng ihtiva eden bitki karışımının safra kanalı ligantı uygulanan ratlarda yine TGF-β1 ekspresyonunu azalttığını ve TNF-α ekspresyonunu artırdığını ifade etmektedirler. TGF-β1 düzeyindeki azalmanın aşırı ekstraselüler matriks oluşumuna yol açabilecek selüler proliferasyon ve kollajen formasyonunun önüne geçtiği ifade edilirken, bu olayların da karaciğer fibrozisinin gelişimine engel olabilecek bir mekanizma olarak

değerlendirilmesi gerektiği öne sürülmektedir (Armendariz-Borunda ve ark 1992, Chen ve ark 2005).

Randolph ve ark (2003) ise insan Th1 hücre kültürlerine çeşitli ekinezya türlerinin ekstraktlarının (E. Purpurea, E. Angustifolia) uygulanmasının TGF-β mRNA ekspresyonunu azalttığını ifade etmektedirler. Ekinezya polisakkaritleri ve suyunun insan PMNL fagositozisi ve spontan motiliteyi arttırdığı (Stotzem ve ark 1992), doza bağımlı olarak insan makrofajlarında TNF-α, IL-1, IL-6 ve IL-10 üretimini artırdığı bildirilmektedir. Başka bir çalışmada, ekinezya ekstraktının Stafilokok ölümünü ve lökosit mobilitesini artırdığı ve in vitro olarak non-spesifik T hücre aktivasyonunu uyardığı belirtilirken (Stimpel ve ark 1984, Roesler ve ark 1991, Burger ve ark 1997), interferon seviyelerini artırdığı da bildirilmektedir (Zhai ve ark 2007).

Rininger ve ark (2000)'nın çeşitli ekinezya türleri ile farelerde yaptığı araştırmada ekinezya purpurea ekstraktının doz bağımlı olarak TNF-α, NO, IL-1, IL-1β ve IL-6 seviyelerinde artışlara neden olduğu, TNF-α düzeyinin 30. saatte pik yaptığı, diğer adı geçen sitokinlerin birkaç günü aşkın süre içerisinde daha artışa devam ettiği bildirilmektedir. Bu sonuçlara dayanılarak ekinezyaya bağlı sitokin üretiminin ve B lenfosit antikor üretiminin uyarılmasının immun aktiviteyi artırdığı bununda soğuk algınlığı ve grip semptomlarının süre ve şiddetinin hafiflemesine yardımcı olduğu ileri sürülmektedir.

Periferal kan lenfositlerindeki cannabinoid tip 2 (CB2) reseptörlerin uyarılmasının TGF-β1 üretimini artırdığı bununda lenfosit fonksiyon ve sitokin salınımının regülasyonuna yardımcı olduğu ifade edilmektedir (Ashton ve Glass 2007). Ekinezya içerisinde bulunan alkilamidlerin de bir CB2 reseptör uyarıcısı olduğu ve bu yolla sitokin üretimini etkilediği ileri sürülmekle birlikte (Raduner ve ark 2006), bu çalışmada belirtilen miktarda ekinezya uygulamasıyla TGF-β1 düzeyinde önemli bir değişikliğin görülmemesinin nedenini diğer çalışmaların farklı dizayn, materyal ve uygulamalarına bağlı olarak değerlendirmek doğru olur.

Çalışmada 20 gün süreyle ekinezya ve ginseng uygulamasını takiben üç grupta belirlenen plazma TNF-α düzeylerinin (Çizelge 3.12) Yang ve ark (2007)'nın farelerde elde ettikleri değerlere yakın olduğu görüldü.

TNF-α'nın, çalışmanın 20. gün elde edilen plazma düzeyleri incelendiğinde (Çizelge 3.12) ekinezya uygulanan gruptaki plazma TNF-α düzeyinin kontrol ve ginseng gruplarına göre önemli oranda yüksek olduğu ($p<0,05$) belirlendi. TNF-α mRNA ekspresyon değerleri açısından ise ekinezya grubuna ait düzeyin kontrol grubundan (Çizelge 3.2) anlamlı oranda yüksek olduğu görülürken ($p<0,05$), ginseng ve ekinezya grupları arasında (Çizelge 3.1) farklılığın olmadığı belirlendi.

Çalışmada 40. gün TNF-α (Çizelge 3.7, 3.8, 3.9) mRNA ekspresyon düzeyleri açısından gruplararasında önemli bir farklılık olmadığı belirlendi. Plazma TNF-α düzeyinin 40. gün değerleri (Çizelge 3.12) açısından ise ekinezya grubunun kontrol grubuna göre önemli oranda yüksek olduğu görülürken ($p<0,05$), ekinezya grubu değerinin yine ginseng grubundan farklı olmadığı dikkat çekti. Diğer yandan, çalışmada 20. ve 40. gün elde edilen değerler karşılaştırıldığında TNF-α mRNA ekspresyon (Çizelge 3.4, 3.5, 3.6) ve plazma düzeylerinin (Çizelge 3.12) üç grupta da zamana bağlı anlamlı bir farklılık göstermediği belirlendi.

Rivera ve ark (2005) parvovirus aşılaması yapılan farelerden elde edilen lenfosit kültürlerinde bir ginsenozid olan Rb1'in erken dönemde IL-4 ve IL-10'un salınımını artırdığını daha sonraki dönemlerde ise IFN-γ, TNF-α ve IL-2 titrelerindeki artışın devam ettiğini bildirirlerken, bunu da Rb1'in Th1 ve Th2 sitokinleri ile ilişkili olarak immun yanıt dengesinin sağlanmasına yönelik etkisiyle açıklamaktadırlar. Yine Yang ve ark (2007) ginsenozid Rd uygulamasının farelerde TNF-α düzeyini artırdığını ifade ederlerken, Pannacci ve ark (2006) oral olarak ginseng ekstraktı verilen fare peritoneal eksudat hücre kültürlerinde TNF-α düzeyinin arttığını belirtmektedirler. Benzer olarak, Song ve ark (2002) murine peritoneal makrofaj hücre kültürlerine ginseng ekstraktı uygulamasıyla TNF-α mRNA ekspresyon düzeyinde artış meydana geldiğini bildirmektedirler.

Diğer yandan, Wang ve ark (2006) yanık oluşturulmuş fare peritoneal makrofaj kültürlerinde yanığı takiben TNF-α düzeyinde artış IL-10 da ise azalma

meydana geldiğini, bu hücrelere ginseng saponini uygulamasının TNF-α'daki anormal artışı baskıladığını ifade ederlerken, saponinlerin yanık ya da yangısel olaylarda ciddi organ yetersizliğine yol açabilecek şiddetli sistemik yangısel cevabın oluşumunu önlemeye yönelik dengeyi sağlayabileceğini belirtmektedirler. Ahn ve ark (2006) stafilokokkus aureus ile enfekte farelerde ginseng uygulamasının TNF-α düzeyini azalttığını ifade ederlerken, Huang ve ark (2001) insanlarda lenfosit hücre kültürlerine ginseng ekstraktı uygulamasıyla TNF-α ekspresyonunda azalma elde etmişlerdir. Kim ve ark (2007) da adı geçen çalışmalara paralel olarak insan periferal kan mononükleer hücre kültürlerinde ginsenozid Rb1 uygulamasının TNF-α'yı azalttığı ve artritisli farelere oral olarak verilmesi ile de TNF-α düzeyinde bir azalma olduğunu belirlemişlerdir.

Diğer yandan, Shin ve ark (2006) oral olarak ginseng ekstraktı verilen fare T hücre kültürü ve peritoneal makrofaj kültürlerinin TNF-α üretim düzeylerinde herhangi bir değişiklik belirleyemezlerken, yine Wang ve ark (2003) ginseng ekstraktı uygulamasının fare makrofajlarında TNF-α mRNA ekspresyon düzeyinde herhangi bir farklılığa yol açmadığını ifade etmektedirler.

Bu çalışmada ginseng kök tozu uygulamasıyla TNF-α'da önemli bir değişikliğin olmadığı yönündeki bulgularla uyum içerisinde olan çalışmalar bulunmakla birlikte, ginseng uygulamasıyla TNF-α'da gerek artış gerekse baskılanma olduğu yönünde bulgular içeren çalışmalar da oldukça fazla sayıdadır. Bu nedenle uygulanan ginseng içeriği, materyal, uygulama süresi gibi birçok faktör dikkate alınarak farklı sonuçları değerlendirmek daha sağlıklı bir yaklaşım olarak düşünülmektedir.

Çalışmada ekinezya grubu TNF-α mRNA ekspresyon ve plazma düzeylerinde belirlenen artışa paralel olarak, Hwang ve ark (2004) fare splenosit hücre kültürlerine ekinezya ekstraktı uygulamasının TNF-α düzeyini artırdığını ifade ederlerken, Senchina ve ark (2006) da insan periferal kan mononükleer hücre kültürlerine ekinezya ekstraktı uygulamasının TNF-α düzeyini artırdığını belirtmektedirler. Randolph ve ark (2003)'nın insan monositik hücre kültürüne ekinezya ekstraktı uygulaması ile Gertsch ve ark (2004)'nın insan makforaj hücre kültürlerine ekinezya alkilamidi uygulanmasının TNF-α mRNA ekspresyonunu arttırdığı yolundaki

bulgular bu çalışmada ekinezya grubunda elde edilen TNF-α mRNA ekspresyon ve plazma düzeylerindeki artışı destekler niteliktedir.

Ekinezya ekstraktı ya da kök tozlarının LPS ile muamele edilmiş hücre kültürleri (Zhai ve ark 2007) ve enfekte hücre kültürlerinde (Rininger ve ark 2000) TNF-α düzeyini artırdığı belirtilmektedir. Buna karşın, insanlarda çeşitli dozlarda oral ekinezya uygulaması (Guiotto ve ark 2008) ile insan perifer tam kan kültürü (Raduner ve ark 2006) ve fare makrofaj hücre kültürlerine (Stevenson ve ark 2005) ekinezya ekstraktı katılmasının TNF-α düzeyini azalttığı da bildirimler arasındadır.

Ekinezya ekstraktı ya da preparatlarının TNF-α gibi bazı sitokinleri azalttığı yolundaki bulguları içeren çalışmalarda bu maddenin hem stimülatör hem de inhibitör etkileri ile immun sistem üzerine modülatör bir etki gösterdiği ileri sürülmekle birlikte, yine de soğuk algınlığı, akut yangı ve çeşitli enfeksiyöz hastalıklarda kullanımının yararlı olacağı hakkında kesin bir şey söylemenin mümkün olmadığı bildirilmektedir (Raduner ve ark 2006).

Buna karşın, çeşitli araştırıcılar (Burger ve ark 1997) ekinezyanın içerdiği fruktofronozitler yoluyla immunostimülatör aktivitesini yerine getirdiğini, makrofaj sitokin sentezi açısından fruktofronozitlerin bakteriyel endotoksinden daha güçlü uyarıcı olduğunu ifade etmekle birlikte, alkilamidlerin monositler üzerindeki CB2 reseptörlere bağlanarak mitojen etkili protein kinazları uyardığı ve nihai olarak TNF-α ekspresyonuna yol açtığını bildirmektedirler (Gertsch ve ark 2004). Ekinezyanın makrofaj kökenli TNF-α, IL-1, IL-6 ve NO gibi maddelerin salınmasına yol açmasının immun hücre hattında T ve B lenfosit gibi hücrelerde MHC reseptörlerinin uyarılmasına ve IFN-γ gibi ilave sitokinlerin salınımına neden olduğu belirtilmektedir (Roesler ve ark 1991, Steinmuller ve ark 1993, Burger ve ark 1997, Rininger ve ark 2000). Bu cevabında özellikle soğuk algınlığı başta olmak üzere çeşitli enfeksiyonlara karşı immun sistemin direncini artırdığı daha yaygın bir kanaat olarak ortaya çıkmaktadır (Block ve Mead 2003).

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Çalışmada ginseng uygulaması ile plazma IL-10 ve mRNA ekspresyon düzeylerindeki önemli artışlar dikkate alındığında, bu bitkinin immunomodülasyonda etkili olduğu söylenebilir. Ekinezya grubunda plazma TNF-α ve mRNA ekspresyon değerlerinde belirlenen önemli artış bu çalışmada ölçülmeyen bazı sitokinlerle (IL-1, IL-6, NO, IFN-γ) ele alındığında, immun sistemi modüle ve stimüle ettiği yolundaki görüşleri destekler niteliktedir. Çalışmada gerek ginseng gerekse ekinezyanın belirtilen miktarlarda uygulaması ile plazma TGF-β1 ve mRNA ekspresyon düzeylerinde herhangi bir farklılığın meydana gelmemesi, uygulanan bitkilerin bu sitokin üzerine kesin bir etki göstermedikleri sonucunu akla getirmemelidir.

İmmun sistemin kompleksliği, diğer sistemlerle olan etkileşimi ve ölçülen sitokinlerin multifonksiyonel olmaları dikkate alındığında, bu çalışmada yukarda belirtilen sonuç ve yargıların net ifade edilebilmesi için daha detaylı ve farklı çalışmaların yapılması gereği ortaya çıkmaktadır.

6.ÖZET

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Ginseng ve Ekinezyanın Ratlarda Bazı Plazma Sitokin Düzeyleri ile Bunlara Ait mRNA Ekspresyonları Üzerine Etkileri

Deniz ULUIŞIK

Fizyoloji Anabilim Dalı

DOKTORA TEZİ / KONYA-2010

Bu çalışmada sağlıklı ratlarda ginseng ve ekinezyanın İnterlökin-10 (IL-10), Tümör Nekrozis Faktör-alfa (TNF-α), Tümör Büyüme Faktörü-beta1 (Tumor Growth Factor-beta1, TGF-β1)'in plazma seviyeleri ile bu sitokinlerin mRNA ekspresyonları üzerine etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Araştırmada 6 haftalık, sağlıklı, 48 erkek Fischer 344 rat kullanıldı. Hayvanlar Kontrol (K), Ginseng (G) ve Ekinezya (E) olmak üzere üç eşit gruba ayrıldı. Kontrol grubundaki hayvanlar 40 gün süre ile standart rat yemi (Purina®) ile ad libitum olarak beslenirken, G grubundaki hayvanlara 0,5 g/kg yem olacak şekilde Panax Ginseng tozu, E grubundaki hayvanlara ise 0,75 g/kg yem olacak şekilde Ekinezya tozu içeren aynı yem verildi. Araştırmada üç gruptaki ratların 8'er tanesinden 20. ve 40. gün sonunda kan örnekleri alındı. Alınan kan örneklerinde IL-10, TNF-α ve TGF-β1'in plazma düzeyleri ve mRNA ekspresyonları belirlendi.

Çalışmada 20. gün belirlenen plazma IL-10 düzeyi ginseng grubunda kontrol ve ekinezya grubuna göre yüksek bulunurken ($p<0,05$), ginseng grubu IL-10 mRNA ekspresyon düzeyi sadece kontrol grubundan farklıydı ($p<0,05$). Ginseng grubunda 20. gün belirlenen IL-10 değerlerindeki farklılıklar 40. günde ortadan kalkarken, diğer gruplarda da herhangi bir değişiklik belirlenmedi. Çalışmada ginseng ve ekinezya uygulamasına bağlı olarak TGF-β1'in plazma ve mRNA ekspresyon değerleri açısından gruplar ve örnekleme zamanları arasında herhangi bir farlılık görülmedi. Çalışmada 20. gün belirlenen plazma TNF-α düzeyinin ekinezya grubunda kontrol ve ginseng grubuna göre yüksek olduğu ($p<0,05$) görülürken, ekinezya grubu TNF-α mRNA ekspresyon düzeyinin kontrolden yüksek ($p<0,05$), ginseng grubundan farksız olduğu belirlendi. Çalışmanın 40. gününde plazma TNF-α düzeyinin ekinezya grubunda kontrole göre yüksek olduğu ($p<0,05$), TNF-α mRNA ekspresyon düzeylerinin ise gruplararasında farklılık göstermediği görüldü.

Çalışmada ginseng uygulaması ile plazma IL-10 ve mRNA ekspresyon düzeylerindeki önemli artışlar ile ekinezya grubunda belirlenen plazma TNF-α ve mRNA ekspresyon değerlerindeki önemli artışlar bu çalışmada ölçülmeyen bazı sitokinlerle ele alındığında bu bitkilerin immun sistemi modüle ve/veya stimüle ettiği yolundaki görüşleri destekler niteliktedir. Çalışmada plazma TGF-β1 ve mRNA ekspresyon düzeylerinde herhangi bir farklılık meydana gelmemekle birlikte, uygulanan bitkilerin bu sitokinler üzerine etkilerine dair daha detaylı çalışmaların yapılması gerekmektedir.

Anahtar Sözcükler: Ginseng; Ekinezya; Sitokin; Rat; mRNA

7. SUMMARY

The Effects of Ginseng and Echinacea on Some Plasma Cytokine Levels and Their mRNA Expressions in Rats

In this study, it was aimed to determine the effect of ginseng and echinacea on plasma levels of Interleukin-10 (IL-10), Tumor Necrosis Factor-alpha (TNF-α), Tumor Growth Factor-beta1 (TGF-β1) and their mRNA expression in healty rats.

In this research, 6-week old, healthy, 48 male Fischer 344 rats were used. The animals were divided in to three equal groups as Control (K), Ginseng (G) and Echinacea (E). While animals in the control group were fed the standart rat diet (Purina ®) as ad libitum for a period of 40 days, G and E groups animals received the same diet containing 0.5 g/kg bw Panax Ginseng root powder and 0.75 g/kg bw Echinacea purpurea root powder, respectively. In this study, the blood samples were withdrawn from 8 rats of each group at the end of 20th and 40th days. In the blood samples, plasma levels and mRNA expression of the IL-10, TNF-α, TGF- β1 were assessed.

In the 20th day of the study, while plasma IL-10 levels in the ginseng group was found to be higher ($p < 0.05$) when compared to the control and the echinacea group, IL-10 mRNA expression level in the ginseng group was just different than the control group's level ($p < 0.05$). While variations in the IL - 10 that were specified in the 20th day in the ginseng group to the other groups were lacking in the 40th day, also there weren't any change in the other groups. Depending on application of ginseng and echinacea, there wasn't seen any difference between 20th and 40th days and among the groups in concern with TGF- β1 mRNA expression and its plasma levels. In the 20th day, while level of plasma TNF-α determined in the echinacea group was obtained as high ($p < 0.05$) compared to that of the ginseng and the control group levels, TNF-α mRNA expression level in the echinecea group was higher ($p < 0.05$) than the control group and not different the ginseng group. In the 40th day of study, level of TNF-α plasma in the echinacea group was higher ($p < 0.05$) than the control group, levels of TNF-α mRNA expression were similar to each other among the groups.

In this study, the increases in plasma IL-10 and its mRNA expression levels with ginseng application and observed increases in plasma TNF-α and its mRNA expression levels in the echinacea group as considered with some cytokines which were not assessed here have supported the view of these plants modulate the immune system. However, there is no difference in the level of plasma TGF-β1 and its mRNA expression in this study, it requires to make more detailed study about the effects of these plants on these cytokines.

Key Words: Ginseng; Echinacea; Cytokine; Rat; mRNA

8. KAYNAKLAR

1. Echinacea. Alt Med Rev. 2001;6(4):411-4.

2. Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. Cellular and molecular i mmunology. Third Edition. W.B. Saunders: Philadelphia, 1997; 250-77.

3. Adachi M, Oda N, Kokubu F, Minoguchi K. IL-10 induces a Th2 cell tolerance in allergic asthma. Int Arch Allergy Immunol. 1999;118:391-4.

4. Adris S, Klein S, Jasnis M, Chuluyan E, Le dda M, Bravo A, et al. IL-10 expression by CT26 colon carcinoma cells inhibits their malignant phenotype and induces a T cell -mediated tumor rejection in the context of a systemic Th2 response. Gene Ther. 1999;6: 1705 -12.

5. Agematsu K, Nagumo H, Oguchi Y , Nakazawa T, Morimoto C, Komiyama A. Generation of plasma cells from peripheral blood memory B cells: synergistic effect of interleukin -10 and CD27/CD70 interaction. Blood. 1998;91:173-80.

6. Ahn JY, Choi IS, Shim JY, Yun EK, Yun YS, Jeong G, et al. The immunomodulator ginsan induces resistance to experimental sepsis by inhibiting Toll -like receptormediated inflammatory signals. Eur. J. Immunol. 2006;36:37-45.

7. Alexander W. Suppressors of cytokine signalling (SOCS) in the immune system. Nat Rev Immunol . 2002;2:410-6.

8. Alegre M, Vandenabeele P, Flamand V, Moser M, Leo O, Abramowicz D, et al. Hypothermia and hypoglycemia induced by anti-CD3 monoclonal antibody in mice: Role of tumor necrosis factor. Eur. J. Immunol. 1990;20:707-10.

9. Alegre ML, Vande nabeele P, Depierreux M, Florquin S, Deschodt -Lanckman M, Flamand, V et al. Cytokine release syndrome induced by the 145-2c11 anti-Cd3 monoclonal antibody in mice: Prevention by high doses of methylprednisolone. J. Immunol. 1991;146 (4):1184 -91.

10. Andreakos E, Foxwell B, Brennan F, Maini R, Feldman M. Cytokines and anti -cytokine biologicals in autoimmunity: present and future. Cytokine Growth Factor Rev. 2002;13:299 -313.

11. Armendariz-Borunda J, Katayamall K, Seyer JM. Transcriptional Mechanisms of Typ e I Collagen Gene Expression Are Differentially Regulated by Interleukin -1β, Tumor Necrosis Factorα, and Transforming Growth Factor β in Ito Cells. The Journal of Biological Chemistry. 1992;267: 14316-21.

12. Asadullah K, Sterry W, Stephanek K, Jasulaitis D, Leupold M, Audring H, et al. IL-10 is a key cytokine in psoriasis. Proof of principle by IL-10 therapy: a new therapeutic approach. J Clin Invest. 1998;101:783-94.

13. Asadullah K, Docke W, Ebeling M, Friedrich M, Belbe G, Audring H, et al. Interleuki n 10 treatment of psoriasis: clinical results of a phase II trial. Arch Dermatol. 1999;135:187 -92.

14. Ashton JC, Glass M, The Cannabinoid CB2 Receptor as a Target for Inflammation -Dependent Neurodegeneration. Current Neuropharmacology. 2007; 5: 73-80.

15. Asseman C, Mauze S, Leach M, Coffman R, Powrie F. An essential role for interleukin 10 in the function of regulatory T cells that inhibit intestinal inflammation. J Exp Med. 1999;190:995 -1004.

16. Atencia R, Bustamante FJ, Valdivieso A, Arrieta A, Rino n M, Prada A, et al. Differential expression of viral PAMP receptors mRNA in peripheral blood of patients with chronic hepatitis C infection. BMC Infectious Diseases. 2007;7:136.

17. Attele AS, Wu JA, Yuan CS. Ginseng Pharmacology: Multiple Constituents and Multiple Actions. Biochemical Pharmacology. 1999; 58: 1685-93.

18. Babu KS. Role of tumor necrosis factor alpha in asthma. Immunol Allergy Clin North Am. 2004;24(4):583-97.

19. Balkwill FR, Lee A, Aldam G, Moodie E, Thomas JA, Tavernier J, et al. Human tumour xenografts treated with recombinant human tumour necrosis factor alone or in combination with interferons. Cancer Res. 1986;46:3990-93.

20. Baraniuk JN. Sensory, parasympathetic, and sympathetic neural influences in the nasal mucosa. J Allergy Clin İmmunol. 1992;90:1045-50.

21. Barrett B. Medicinal properties of echinacea: A critical review. Phytomedicine. 2003;10:66-86.

22. Barth Jr RJ, Coppola MA, Green WR. In vivo effects of locally secreted IL-10 on the murine antitumor immune response. Ann Surg Oncol. 1996;3:381-6.

23. Bauer V, Remiger P, Wagner H. Echinacea: vergleichende DC - und HPLC-analyse der herba-drogen von Echinacea purpurea, E pallida, und E. Angustifolia (3. Mitt.). Dtsch Apoth Ztg. 1988;128:174-80.

24. Bauer R, Remiger P. TLC and HPLC analysis of alkamides in echinacea drugs. Planta Medica. 1989; 55:367-71.

25. Bauer R, Remiger P, Alstat E. Alkamides and caffeic acid derivatives from the roots of Echinacea tennesseensis. Planta Medica. 1990;56:533-34.

26. Beg AA, Finco TS, Nantermet PV, Baldwin AS Jr. Tumor necrosis factor and interleukin-1 lead to phosphorylation and loss of IκBα: A mechanism for NF-κB activation. Mol Cell Biol. 1993;13:3301-10

27. Bellinghausen I, Brand U, Steinbrink K, Enk A, Knop J, Saloga J. Inhibition of human allergic T cell responses by IL-10-treated dendritic cells: differences from hydrocortisone-treated dendritic cells. J Allergy Clin Immunol. 2001;108:242-9.

28. Bellone G, Aste-Amezaga M, Trinchieri G, Rodeck U. Regulation of NK cell functions by TG F-β1. J Immunol. 1995;155:1066-73.

29. Berkner D, Sioris L. Herbal Products: Toxicology and Clinical Pharmacology. Echinacea. Second Edition. Humana Press Inc., Totowa. 2007; 97-109.

30. Biswas S, Chytil A, Washington K, Romero-Gallo J, Gorska AE, Wirth PS, et al. Transforming growth factor beta receptor type II inactivation promotes the establishment and progression of colon cancer. Cancer Res. 2004;64:4687-92.

31. Block KI, Mead MN. Immune System Effects of Echinacea, Ginseng, and Astragalus: A Review. Integrative Cancer Therapies. 2003;2(3):247-67.

32. Bonavida B. Immunomodulatory effect of tumor necrosis factor. Biotherapy. 1991;3:127-33.

33. Bone K. Echinacea: What Makes It Work? Alt Med Rev. 1997; 2(2):87-93.

34. Burdin N, Van Kooten C, Galibert L, Abrams J, Wijdenes J, Banchereau J, et al. Endogenous IL-6 and IL-10 contribute to the differentiation of CD40-activated human B lymphocytes. J Immunol. 1995;154:2533-44.

35. Burger R, Torres A, Warren R, Caldwell V, Hughes B. Echinacea-induced cytokine production by human macrophages. International Journal Of Immunopharmacology. 1997;19:371-9.

36. Burt DW, Law AS. Evolution of the transforming growth factor -beta superfamily. Prog Growth Factor Res. 1994;5:99-118.

37. Bussolino F, Camussi G, Baglioni C. Synthesis and release of platelet-activating factor by human vascular endothelial cells treated with tumor necrosis factor or interleukin -1α. J. Biol. Chem. 1988;263:11856-61.

38. Byun BH, Shin I, Yoon YS, Kim SI, Joe CO. Modulation of protein kinase C activity in NIH 3T3 cells by plant glycosides from Panax ginseng. Planta Med. 1997;63:389-92.

39. Carswell EA, Old LJ, Kassel RL, Green S, Fiore N, Williamson B. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1975;72:3666-70.

40. Carvalho E, Bacellar O, Brownell C, Regis T, Coffman R, Reed S. Restoration of IFN -gamma production and lymphocyte proliferation in visceral leishmaniasis. J Immunol. 1994;152:5949 -56.

41. Cazac BB, Roes J. TGF-beta receptor controls B cell responsiveness and induction of IgA in vivo. Immunity. 2000;13:443-51.

42. Cerami A, Beutler B. The role of cachetin/TNF in endotoxic shock and cachexia. Immunol. Today. 1988; 9:28-31.

43. Chang CM, Lirnanni A, Baker WH, Dobson ME, Kalinich JF, Jackson W, et al. Bone Marrow and Splenic Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor and Transforming Growth Factor-β mRNA Levels in Irradiated Mice. Blood. 1995; 86 (6): 2130-6.

44. Chang YS, Seo E, Gyllenhaal C, Block KI. Panax ginseng: a role in cancer therapy? Int Cancer Ther. 2003;2(1):13-33.

45. Chen MH, Chen JC, Tsai CC, Wang WC, Chang DC, Tu DG, et al. The role of TGF-β1 and cytokines in the modulation of liver fibrosis by Sho-saiko-to in rat's bile duct ligated model. Journal of Ethnopharmacology. 2005; 97: 7-13.

46. Chen X, Lee TJ. Ginsenosides-induced a nitric oxide-mediated relaxation of the rabbit corpus cavernosum. Br. J. Pharmacol. 1995;115:15-8.

47. Chen W, Frank ME, Jin W, Wahl SM. TGF-beta released by apoptotic T cells contributes to an immunosuppressive milieu. Immunity. 2001;14:715 -25.

48. Cheon H, Yu SJ, Yoo DH, Chae IJ, Song GG, Sohn J. Increased expression of pro -inflammatory cytokines and metalloproteinase-1 by TGF-beta1 in synovial fibroblasts from rheumatoid arthritis and normal individuals. Clin Exp Immunol. 2002;127:547 -52.

49. Chin BY, Petrache I, Choi AM, Choi ME. Transforming growth factor -b1 rescues serum deprivation-induced apoptosis via the mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway in macrophages. J Biol Chem. 1999;274:11362-8.

50. Cho JY, Park J, Yoo ES, Baik KU, Park MH. Effect of ginseng saponin on tumor necrosis factor -α production and T cell proliferation. Yakhak Hoeji. 1998;43:296-301.

51. Choi HK, Seong DH, Rha KH. Clinical efficacy of Korean red ginseng for erectile dysfunction. Int J Impot Res. 1995a;7:181-6.

52. Chong SK, Brown HA, Rimmer E, Oberholzer V, Hindocha P, Walker -Smith JA. In vitro effect of Panax ginseng on phytohaemagglutinin-induced lymphocyte transformation. Int Arch Allergy Appl Immunol. 1984;73(3):216-20.

53. Clerici M, Wynn T, Berzofsky J, Blatt S, Hendrix C, Sher A, et al. Role of interleukin -10 (IL-10) in T helper cell dysfunction in asymptomatic individuals infected with human immunodeficiency virus (HIV-1). J Clin Invest. 1994;93:768-75.

54. Clerici M, Galli M, Bosis S, Gervasoni C, Moroni M, Norbiato G. Immunoendocrinologic abnormalities in human immunodeficiency virus infection. Ann N Y Acad Sci. 2000;917:956 -61.

55. Coon JT, Ernst E. Panax ginseng: a systematic review of adverse effects and drug interactions. Drug Saf. 2002;25:323-44.

56. Cui J, Garle M, Eneroth P, Bjorkhem I. What do commercial ginseng preparations contain? Lancet. 1994;344(8915):134.

57. Datto MB, Frederick JP, Pan L, Borton AJ, Zhuang Y, Wang XF. Targeted disruption of Smad3 reveals an essential role in transforming growth factor beta -mediated signal transduction. Mol Cell Biol. 1999;19:2495-504.

58. De Smedt T, Van Mechelen M, De Becker G, Urbain J, Leo O, Moser M. Effect of interleukin -10 on dendritic cell maturation and function. Eur J Immunol. 1997;27:1229 -35.

59. De Waal Malefyt R, Yssel H, de Vries J. Direct effects of IL -10 on subsets of human CD4+ T cell clones and resting T cells. Specific inhibition of IL -2 production and proliferation. J Immunol. 1993;150:4754-65.

60. De Waal-Malefyt R, Haanen J, Spits H, Roncarolo M, te Velde A, Figdor C, et al. Interleukin 10 (IL -10) and viral IL-10 strongly reduce antigen-specific human T cell proliferation by diminishing the antigen-presenting capcity of monocytes via downregulation of class II major histocompatibility complex expression. J Exp Med. 1991;174:915 -24.

61. Del Prete G, De Carli M, Almerigogna F, Giudizi M, Biagiotti R, Romagnani S. Human IL -10 is produced by both type 1 helper (Th1) and type 2 helper (Th2) T cell clones and inhibits their antigen -specific proliferation and cytokine production. J Immunol. 1993;150:353 -60.

62. Duan H, Koga T, Kohda F, Hara H, Urabe K, Furue M. Interleukin -8-positive neutrophils in psoriasis. J Dermatol Sci. 2001;26(2):119-24.

63. Ehrke MJ, Ho RLX, Hori K. Species -specific TNF induction of thymocyte proliferation, Cancer Immunol. Immunother. 1988;27:103 -8.

64. Elenkov IJ, Chrousos GP. Stress hormones, proinflammatory and antiinflammatory cytokines and autoimmunity. Ann. N.Y. Acad. Sci. 2002;966:290-303.

65. Elsasser-Beile U, Willenbacher W, Bartsch HH, Gallati H, Schulte Monting J, von Kleist S. Cytokine production in leukocyte cultures during therapy with Echinacea extract. Journal of Clinical Laborator y Analysis. 1996;10:441-5.

66. Ernst E. The Risk–Benefit Profile of Commonly Used Herbal Therapies: Ginkgo, St. John's Wort, Ginseng, Echinacea, Saw Palmetto, and Kava. Ann Intern Med. 2002;136: 42-53.

67. Espevik T, Nissen-Meyer J. A highly sensitive cell line, WEHI 164 clone 13, for measuring cytotoxic factor/tumor necrosis factor from human monocytes. J Immunol Methods. 1986;95:99-105.

68. Eze MO. Membrane fluidity, reactive oxygen species, and cellmediated immunity: implications in nutrition and disease. Med Hypotheses. 1992;37(4):220-224.

69. Fahim MS, Fahim Z, Harman JM. Effect of Panax ginseng on testosterone level and prostate in male rats. Arch Androl. 1982;8:261-263.

70. Fava RA, Olsen NJ, Postlethwaite AE, Broadley KN, Davidson JM, Nanney LB , et al. Transforming growth factor beta 1 (TGF-beta 1) induced neutrophil recruitment to synovial tissues: implications for TGF-beta-driven synovial inflammation and hyperplasia. J Exp Med. 1991;173(5):1121 -32.

71. Feinberg MW, Shimizu K, Lebedeva M, Haspel R, Takayama K, Chen Z, et al. Essential role for Smad3 in regulating MCP-1 expression and vascular inflammation. Circ Res. 2004;94:601-8.

72. Feinberg MW, Watanabe M, Lebedeva MA, Depina AS, Hanai J, Mammoto T, et al. Transforming growth factor-β1 inhibition of vascular smooth muscle cell activation is mediated via Smad3. J Biol Chem. 2004a;279:16388-93.

73. Fiers W. Tumor necrosis factor. Characterization at the molecular, cellular and in vivo level. Federation of European Biochemical Societies. 1991;289(2):199-212.

74. Finbloom D, Winestock K. IL-10 induces the tyrosine phosphorylation of tyk2 and jak1 and the differential assembly of STAT1 and STAT3 complexes in human T cells and monocytes. J Immunol. 1995;155:1079-90.

75. Fiorentino DF, Bond MW, Mosmann TR. Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. J Exp Med. 1989;170:2081-95.

76. Fiorentino DF, Zlotnik A, Vieira P, Mosmann TR, Howard M, Moore KW, et al. IL-10 acts on the antigen-presenting cell to inhibit cytokine production by Th1 cells. J Immunol. 1991;146:3444-51.

77. Fluckiger A, Garrone P, Durand I, Galizzi J, Banchereau J. Interleukin 10 (IL-10) upregulates functional high affinity IL-2 receptor on normal and leukemic B lymphocytes. J Exp Med. 1993;178:1473-81.

78. Fontana A, Constam DB, Frei K, Malipiero U, Pfister HW. Modulation of the immune response by transforming growth factor beta. Int Arch Allergy Immunol. 1992;99:1-7.

79. Fransen L, Ruysschaert MR, Van der Heyden J, Fiers W. Recombinant tumor necrosis factor: species specificity for a variety of human and murine transformed cell lines. Cell. Immunol. 1986;100(1): 260-7.

80. Gamble JR, Harlan JM, Klebanoff SJ, Vadas MA. Stimulation of the adherence of neutrophils to umbilical vein endothelium by human recombinant tumor necrosis factor. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1985;82:8667-71.

81. Gertsch J, Schoop R, Kuenzle U, Suter A. Echinacea alkylamides modulate TNF-a gene expression via cannabinoid receptor CB2 and multiple signal transduction pathways. FEBS Letters. 2004; 577: 563-9.

82. Ghalib H, Piuvezam M, Skeiky Y, Siddig M, Hashim F, El-Hassan A, et al. Interleukin 10 production correlates with pathology in human Leishmania donovani infections. J Clin Invest. 1993;92:324–9.

83. Giovarelli M, Musiani P, Modesti A, Dellabona P, Casorati G, Allione A, et al. Local release of IL-10 by transfected Mouse mammary adenocarcinoma cells does not suppress but enhances antitumor reaction and elicits a strong cytotoxic lymphocyte and antibody-dependent immune memory. J Immunol. 1995;155:3112-23.

84. Goldhaber-Fiebert S, Kemper KJ. Echinacea (E. angustifolia, E. pallida, and E. purpurea). The Longwood Herbal Task Force (http://www.mcp.edu/herbal/default.htm). 1999;1-24

85. Gorelik L, Flavell RA. Transforming growth factor-β in T-cell biology. Nat Rev Immunol. 2002;2:46-53.

86. Gorelik L, Flavell RA. Abrogation of TGFbeta signaling in T cells leads to spontaneous T cell differentiation and autoimmune disease. Immunity. 2000;12:171-81.

87. Gorelik L, Fields PE, Flavell RA. Cutting edge: TGF-beta inhibits Th type 2 development through inhibition of GATA-3 expression. J Immunol. 2000;165:4773-7.

88. Govinden R, Bhoola KD. Genealogy, expression, and cellular function of transforming growth factor-beta. Pharmacol Ther. 2000;98:257-65.

89. Grau GE, Fajardo LF, Piguet PF, Allet B, Lambert PH, Vassalli P. Tumor necrosis factor (cachectin) as an essential mediator in murine cerebral malaria. Science. 1987;237:1210-12.

90. Grimm W, Muller HH. A randomized controlled trial of the effect of fluid extract of Echinacea purpurea on the incidence and severity of colds and respiratory infections. Am J Med. 1999;106:138-43.

91. Groux H, Bigler M, de Vries JE, Roncarolo MG. Interleukin-10 induces a long-term antigen-specific anergic state in human CD4+ T cells. J Exp Med. 1996;184:19-29.

92. Grunig G, Corry D, Leach M, Seymour B, Kurup V, Reenick D. Interleukin-10 is a natural suppressor of cytokine production and inflammation in a murine model of allergic bronchopulmonary apergillosis. J Exp Med. 1997;185:1089-99.

93. Guiotto P, Woelkart K, Grabnar I, Voinovich D, Perissutti B, Invernizzi S, et al. Pharmacokinetics and immunomodulatory effects of phytotherapeutic lozenges (bonbons) with Echinacea purpurea extract. Phytomedicine. 2008; 15: 547-54.

94. Hall T, Lu ZZ, Yat PN, Fitzloff JF, Arnason JT, Awang DVC, et al. Evaluation of consistency of standardized Asian ginseng products in the Ginseng Evaluation Program. HerbalGram. 2001;52:31-45.

95. Hall G, Houghton C, Rahbek J, Lamb J, Jarman E. Suppression of allergen reactive Th2 mediated responses and pulmunary eosinophilia by intranasal administration of an immunodominant peptide is linked to IL-10 production. Vaccine. 2003;21:549-61.

96. Han Y, Son SJ, Akhalaia M, Platonov A, Son HJ, Lee KH. Modulation of Radiation-Induced Disturbances of Antioxidant Defense Systems by Ginsan. eCAM. 2005;2(4):529-36.

97. Hanada T, Yoshimura A. Regulation of cytokine signaling and inflammation. Cytokine Frowth Factor Rev. 2002;13:413-21.

98. He X, Lin L, Bernart M, Lian L. Analysis of alkamides in roots and achenes of Echinacea purpurea by liquid chromatography-electron mass spectrometry. J Chromatography. 1998;815:205-11.

99. Hermann JR, Honeyman MS, Zimmerman JJ, Thacker BJ, Holden PJ, Chang CC. Effect of dietary Echinacea purpurea on viremia and performance in porcine reproductive and respiratory syndrome virus-infected nursery pigs. J Anim Sci. 2003; 81: 2139-44.

100. Herrick C, Bottomly K. To respond or not to respond: T cells in allergic asthma. Nat Rev Immunol. 2003;3:405-12.

101. Hess FG, Parent RA, Stevens KR, Cox GE, Becci PJ. Effects of subchronic feeding of ginseng extract G115 in beagle dogs. Food Chem Toxicol. 1983;21:95-7.

102. Hill N, Sarvetnick N. Cytokines: promoters and dampeners of autoimmunity. Curr Opin Immunol. 2002;14:791-7.

103. Himi T, Saito H, Nishiyama N. Effects of ginseng saponins on the survival of cerebral cortex neurons in cell cultures. Chem Pharm Bull (Tokyo). 1989;37:481-4.

104. Hirano T, Akira S, Taga T, Kishimoto T. Biological and clinical aspects of interleukin 6. Immunol Today. 1990;11:443-9.

105. Ho AS, Liu Y, Khan TA, Hsu DH, Bazan JF, Moore KW. A receptor for interleukin 10 is related to interferon receptors. Proc Natl Acad Sci USA. 1993;90:11267–71.

106. Homey B, Dieu-Nosjean MC, Wiesenborn A, Massacrier C, Pin JJ, Oldham E, et al. Up-regulation of macrophage inflammatory protein-3 alpha/CCL20 and CC chemokine receptor 6 in psoriasis. J Immunol. 2000;164(12):6621-32.

107. Hoying JB, Yin M, Diebold R, Ormsby I, Becker A, Doetschman T. Transforming growth factor b1 enhances platelet aggregation through a non-transcriptional effect on the fibrinogen receptor. J Biol Chem. 1999;274:31008-13.

108. Hu S, Concha C, Johannisson A, Meglia G, Waller KP. Effect of subcutaneous injection of ginseng on cows with subclinical Staphylococcus aureus mastitis. J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health. 2001;48:519-28.

109. Huang XX, Yamashiki M, Nakatani K, Nobori T, Mase A. Semi-Quantitative Analysis of Cytokine mRNA Expression Induced by the Herbal Medicine Sho-saiko-to (TJ-9) Using a Gel Doc System. Journal of Clinical Laboratory Analysis. 2001; 15:199-209.

110. Hurme M, Henttinen T, Karppelin M, Varkila K, Matikainen S. Effect of interleukin-10 on NF-kB and AP-1 activities in interleukin-2 dependent CD8 T lymphoblasts. Immunol Lett. 1994;42:129-33.

111. Hwang SA, DasguptA, Actor JK. Cytokine production by non-adherent mouse splenocyte cultures to Echinacea extracts. Clinica Chimica Acta. 2004; 343: 161-6.

112. Ito S, Ansari P, Sakatsume M, Dickensheets H, Vazquez N, Donnelly R, et al. Interleukin-10 inhibits expression of both interferon-alpha and interferon-gamma induced genes by suppressing tyrosine phosphorilation of STAT1. Blood. 1999;93:1456-63.

113. Izzo AA, Ernst E. Interactions between herbal medicines and prescribed drugs:a systematic review. Drugs. 2001;61(15):2163-75.

114. Jie YH, Cammisuli S, Baggiolini M. Immunomodulatory effects of Panax ginseng C.A. Meyer in the mouse. Agents Actions. 1984;15(3-4):386-91.

115. Jinquan T, Quan S, Jacobi H, Madsen H, Glue C, Skov P, et al. CXC chemokine receptor 4 expression and stromal cell-derived factor 1 alpha-induced chemotaxis in CD4+ T lymphocytes are regulated by interleukin-4 and interleukin-10. Immunology. 2000;99:402-10.

116. Joosten L, Lubberts E, Durez P, Helsen M, Jacobs M, Goldman M, et al. Role of interleukin-4 and interleukin-10 in murine collagen-induced arthritis. Protective effect of interleukin-4 and interleukin-10 treatment in cartilage destruction. Arthritis Rheum. 1997;40:249-60.

117. Kaliner MA. The physiology and pathophysiology of the parasympathetic nervous system in nasal disease: An overview. J Allergy Clin Immunol. 1992;90:1044-5.

118. Kang SY, Kim SH, Schini VB, Kim ND. Dietary ginsenosides improve endothelium-dependent relaxation in the thoracic aorta of hypercholesterolemic rabbit. Gen Pharmacol. 1995;26:483-7.

119. Kanzaki T, Morisaki N, Shiina R, Saito Y. Role of transforming growth factor-b pathway in the mechanism of wound healing by saponin from Ginseng Radix rubra. British Journal of Pharmacology. 1998; 125: 255-62.

120. Kasama T, Strieter R, Lukacs N, Lincoln P, Burdick M, Kunkel S. Interleukin-10 expression and chemokine regulation during the evolution of murine type II collagen-induced arthritis. J Clin Invest. 1995;95:2868-76.

121. Kawakami A, Eguchi K, Matsuoka N, Tsuboi M, Kawabe Y, Aoyagi T, et al. Inhibition of Fas antigen-mediated apoptosis of rheumatoid synovial cells in vitro by transforming growth factor beta 1. Arthritis Rheum. 1996;39:1267-76.

122. Kehrl JH, Wakefield LM, Roberts AB, Jakowlew S, Alvarez-Mon M, Derynck R, et al. Production of transforming growth factor beta by human T lymphocytes and its potential role in the regulation of T cell growth. J Exp Med. 1986;163:1037-50.

123. Keum YS, Park KK, Lee JM, Chun KS, Park JH, Lee SK, et al. Antioxidant and anti-tumor promoting activities of the methanol extract of heat-processed ginseng. Cancer Lett. 2000;150:41-8.

124. Keum YS, Han SS, Chun KS, Park KK, Park JH, Lee SK, et al. Inhibitory effects of the ginsenoside Rg3 on phorbol ester-induced cyclooxygenase-2 expression, NF-kappaB activation and tumor promotion. Mutat Res. 2003;523-524:75-85.

125. Keystone E, Wherry J, Grint P. IL-10 as a therapeutic strategy in the treatment of rheumatoid arthritis. Rheum Dis Clin North Am. 1998;24:629-39.

126. Kim JY, Germolec DR, Luster MI. Panax ginseng as a potential immunomodulator: studies in mice. Immunopharmacol Immunotoxicol. 1990;12(2):257-76.

127. Kim ND, Kang SY, Schini VB. Ginsenosides evoke endothelium-dependent vascular relaxation in rat aorta. Gen Pharmacol. 1994;25:1071-7.

128. Kim J, Modlin RL, Moy RL, Dubinett SM, McHugh T, Nickoloff BJ, et al. IL-10 production in cutaneous basal and squamous cell carcinomas. A mechanism for evading the local T cell immune response. J Immunol. 1995;155:2240-7.

129. Kim HE, Oh JH, Lee SK, Oh YJ. Ginsenoside Rh2 induces apoptotic cell death in rat C6 glioma via a reactive oxygen- and caspase-dependent but Bcl-X(L)-independent pathway. Life Sci. 1999;65:33-40.

130. Kim SJ, Jeong HJ,Yi BJ,Kang TH,An NH,Lee EH, et al. Transgenic Panax ginseng Inhibits the Production of TNF-α, IL-6, and IL-8 as well as COX-2 Expression in Human Mast Cells. The American Journal of Chinese Medicine (AJCM). 2007; 35: 329-39.

131. Kindscher K. Ethnobotany of Purple Coneflower (Echinacea angustifolia, Asteraceae) and Other Echinacea Species. Economic Botany. 1989;43(4):498-507

132. Klebanoff SJ, Vadas MA, Harlan JM, Sparks LH, Gamble JR, Agosti JM, et al. Stimulation of neutrophils by tumor necrosis factor. J. lmmunol. 1986;136:4220-5.

133. Koch F, Stanzl U, Jennewein P, Janke K, Heufler C, Kampgen E, et al. High level IL-12 production by murine dendritic cells: upregulation via MHC class II and CD40 molecules and downregulation by IL-4 and IL-10. J Exp Med. 1996;184:741-6.

134. Korppi M, Kröger L. C-reactive protein in viral and bacterial respiratory infection in children. Scand J Infec Dis. 1992;25:207-13.

135. Kunkel SL, Strieter RM, Chensue SW, Campbell DA, Remick DG. The role of TNF in diverse pathologic processes. Biotherapy. 1991;3:135-41.

136. Kushner I. Semantics, Inflammation, Cytokines and Common Sense. Cytokine & Growth Factor Reviews. 1998; 9: 191-6.

137. Lanzavecchia A, Sallusto F. Regulation of T cell immunity by dendritic cells. Cell. 2001;106:263-6.

138. Larsen MW, Moser C, Høıby N, Song Z, Kharazmı A. Ginseng modulates the immune response by induction of interleukin-12 production. APMIS. 2004; 112: 369-73.

139. Le Y, Iribarren P, Gong W, Cui Y, Zhang X, Wang JM. TGF-β1 disrupts endotoxin signaling in microglial cells through Smad3 and MAPK pathways. J Immunol. 2004;173: 962-8.

140. Le Y, Yu X, Ruan L, Wang O, Qi D, Zhu J et al. The immunopharmacological properties of transforming growth factor beta. International Immunopharmacology. 2005;5:1771-82.

141. Lebman DA, Edmiston JS. The role of TGF-β in growth, differentiation, and maturation of B lymphocytes. Microbes Infect. 1999;1:1297-304.

142. Lee YN, Lee HY, Chung HY, Kim SI, Lee SK, Park BC, et al. In vitro induction of differentiation by ginsenoides in F9 teratocarcinoma cells. Eur J Cancer. 1996;32:1420-8.

143. Lee HC, Vinodhkumar R, Yoon JW, Park SK, Lee CW , Kim HY. Enhanced Inhibitory Effect of Ultra -Fine Granules of Red Ginseng on LPS -induced Cytokine Expression in the Monocyte -Derived Macrophage THP-1 Cells. Int. J. Mol. Sci. 2008; 9: 1379-92.

144. Lei XL, Chiou GC. Cardiovascular pharmacology of Panax notoginseng. Am J Chin Med. 1986;14:145-52.

145. Lersch C, Zeuner M, Bauer A, et al. Stimulation of the immune response in outpatients with hepatocellular carcinomas by low doses of cyclophosphamide (LDCY), ech inacea purpurea extracts (Echinacin) and thymostimulin. Arch Geschwulstforsch. 1990;60:379 -83.

146. Lersch C, Zeuner M, Bauer A, Siemens M, Hart R, Drescher M, et al. Nonspecific ımmunomodulation with low doses of cyclphosphamide (ldcy), thymostimulin, a nd echinacea purpurea extracts (echinacin) ın patients with far advanced colorectal cancers: preliminary results. Cancer Investigation. 1992;10:343-8.

147. Letterio JJ, Roberts AB. Regulation of immune responses by TGF -beta. Annu Rev Immunol. 1998;16:137-61.

148. Levy Y, Brouet JC. Interleukin-10 prevents spontaneous death of germinal center B cells by induction of the bcl-2 protein. J Clin Invest. 1994;93:424-8.

149. Li Z, Chen X, Niwa Y, Sakamoto S, Nakaya Y. Involvement of Ca^{2+} -activated K+ channels in ginsenosides-induced aortic relaxation in rats. J Cardiovasc Pharmacol. 2001;37:41-7.

150. Li MO, Wan YY, Sanjabi S, Robertson AK, Flavell RA. Transforming growth factor -β regulation of immune responses. Annu Rev Immunol. 2006;24:99 -146.

151. Liberti LE, Der Mardersian A. Evaluation of commercial ginseng products. J Pharm Sci. 1978;10:1487-9.

152. Liou CJ, Huang WC, Tseng J. Short-Term Oral Administration of Ginseng Extract Induces Type -1 Cytokine Production. Immunopharmacology and Immunotoxicology. 2006;28:227-40.

153. Liu J, Wang S, Liu H, Yang L, Nan G. Stimulatory effect of saponin from Panax ginseng on immune function of lymphocytes in the elderly. Mech Ageing Dev. 1995;83(1):43-53.

154. Liu M, Zhang JT. Studies on the mechanisms of immunoregu latory effects of ginsenoside Rg1 in aged rats. Acta Pharmacol Sin. 1996;31(2):95-100.

155. Liu M, Zhang JT. Immunoregulatory effects of ginsenoside Rg1 in aged rats. Acta Pharmacol Sin. 1995;30(11):818-23.

156. Loop T. Thiopental inhibits tumor necrosis factor alpha-induced activation of nuclear factor kappaB through suppression of kappaB kinase activity. Anesthesiology. 2003;99(2):360-7.

157. Luettig B, Steinmuller C, Gifford GE, Wagner H, Lohmann -Matthes ML. Macrophage activation by the polysaccharide arabinogalactan isolated from plant cell cultures of Echinacea purpurea. Journal National Cancer Inst. 1989;81(9):669-75.

158. Lyons RM, Gentry LE, Purchio AF, Moses HL. Mechanism of activation of latent recombinant transforming growth factor beta 1 by p lasmin. J Cell Biol. 1990;110:1361-7.

159. Maeda H, Kuwahara H, IchimuraY, Ohtsuki M, Kurakata S, Shiraishi A. TGF -β enhances macrophage ability to produce IL-10 in normal and tumor-bearing mice. J Immunol. 1995;155:4926 -32.

160. Malaguarnera L, Imbesi R, Di Rosa M, Scuto A, Castrogiovanni P, Messina A, et al. Action of prolactin, IFN-gamma, TNF-alpha and LPS on heme oxygenase-1 expression and VEGF release in human monocytes/macrophages. Int Immunopharmacol. 2005;5(9):1458-69.

161. Malisan F, Briere F, Bridon J, Harindranath N, Mills F, Max E, et al. Interleukin-10 induces immunoglobulin G isotype switch recombination in human CD40-activated naive B lymphocytes. J Exp Med. 1996;183:937-47.

162. Marincola FM, Jaffee EM, Hicklin DJ, Ferrone S. Escape of human solid tumors from T cell recognition: molecular mechanisms and functional significance. Adv Immunol. 2000;74:181-273.

163. Mark JD, Grant KL, Barton LL. The use of dietary supplements in pediatrics: A study of Echinacea. Clinical Pediatrics. 2001;40:265-9.

164. Martin M, Lefaix JL, Delanian S. TGF-β1 and radiation fibrosis: a master switch, a specific therapeutic target?. Int J Radiat Oncol Biol Phys. 2000;47:277-90.

165. Matsumoto A, Seki Y, Watanabe R, Hayashi K, Johnston J, Harada Y, et al. A role of suppressor of cytokine signaling 3 (SOCS3/CIS3/SSI3) in CD28-mediated interleukin 2 production. J Exp Med. 2003;197:425-36.

166. Matsushima K, Oppenheim JJ. Interleukin 8 and MCAF: novel inflammatory cytokines inducible by IL1 and TNF. Cytokine. 1989;1:2-13.

167. McGuirk P, Mills K. Pathogen-specific regulatory T cells provoke a shift in the Th1/Th2 paradigm in immunity to infectious diseases. Trends Immunol. 2002;23:450-5.

168. Melchart D, Walther E, Linde K, Brandmaier R, Lersch C. Echinacea root extracts for the prevention of upper respiratory tract infections: a double-blind, placebo-controlled randomized trial. Archives of Family Medicine. 1998;7:541-5.

169. Mintz M, Rapaport R, Oleske JM, Connor EM, Koenigsberger MR, Denny T, et al. Elevated serum levels of tumor necrosis factor are associated with progressive encephalopathy in children with acquired immunodeficiency syndrome. Am. J. Dis. Child. 1989;143:771-4.

170. Mistrikova I, Vaverkova S. Morphology and anatomy of Echinacea purpurea, E. angustifolia, E. pallida and Parthenium integrifolium. Biologia. 2007; 62(1): 2-5.

171. Miyazono K, Olofsson A, Colosetti P, Heldin CH. A role of the latent TGF-beta 1-binding protein in the assembly and secretion of TGF-beta 1. EMBO J. 1991;10:1091-101.

172. Mocellin S, Wang E, Marincola FM. Cytokines and immune response in the tumor microenvironment. J Immunother. 2001;24:392-407.

173. Mocellin S, Panelli MC, Wang E, Nagorsen D, Marincola FM. The dual role of IL-10. Trends Immunol. 2003;24:36-43.

174. Mocellin S, Marincola F, Rossi CR, Nitti D, Lise M. The multifaceted relationship between IL-10 and adaptive immunity: putting together the pieces of a puzzle. Cytokine & Growth Factor Reviews. 2004;15:61-76.

175. Mochizuki M, Yoo YC, Matsuzawa K, Sato K, Saiki I, Tono-oka S, et al. Inhibitory effect of tumor metas-tasis in mice by saponins, ginsenoside-Rb2, 20(R)- and 20(S)-ginsenoside-Rg3, of red ginseng. Biol Pharm Bull. 1995;18:1197-1202.

176. Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffman RL, O'Garra A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. Annu Rev Immunol. 2001;19:683-765.

177. Möse JR. [The effect of Echinacin® on phagocytic activity and natural killer cells. Translator unknown. Original German article not available]. Med Welt. 1983;34:1463-7.

178. Munger JS, Harpel JG, Gleizes PE, Mazzieri R, Nunes I, Rifkin DB. Latent transforming growth factor-beta: structural features and mechanisms of activation. Kidney Int. 1997;51:1376-82.

179. Murphy LL, Cadena RS, Chavez D, Ferraro JS. Effect of American ginseng (Panax quinquefolium) on male copulatory behaviour in the rat. Physiology & Behavior. 1998;64:445-50.

180. Murphy LL, Lee TJ. Ginseng, sex behavior and nitric oxide. Ann NY Acad Sci. 2002;962:372-7.

181. Ng PC, Li K, Wong RPO, Chui K, Wong E, Li G, et al. Proinflammatory and anti-inflammatory cytokine responses in preterm infants with systemic infections. Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed. 2003;88:209-13.

182. Niu YP, Jin JM, Gao RL, Xie GL, Chen XH. Effects of ginsenosides Rg1 and Rb1 on prolif eration of human marrow granulocyte-macrophage progenitor cells. Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi. 2001;9(2):178-80.

183. Nocerino E, Amato M, Izzo AA. The aphrodisiac and adaptogenic properties of ginseng. Fitoterapia. 2000;71:1-5.

184. O'Garra A, Steinman L, Gijbels K. CD4+ T cell subsets in autoimmunity. Curr Opin Imnmunol. 1997;9:872-83.

185. Oh M, Choi YH, Choi S, Chung H, Kim K, Kim SI, et al. Anti-proliferating effects of ginsenoside Rh2 on MCF-7 human breast cancer cells. Int J Oncol. 1999;14:869-75.

186. O'Hara M, Kiefer D, Farrell K, Kemper K. A review of 12 commonly used medicinal herbs. Arch Fam Med. 1998;7:523-36.

187. Ohtani K, Mizutani K, Kasai R. Reticuloendothelial system activating polysacchrides from Panax species: P. notoginseng, P. ginseng and P. japonicus. J Pharmacobio dyn. 1987;10:63.

188. Olschwang S, Hamelin R, Laurent-Puig P, Thuille B, De Rycke Y, Li YJ, et al. Alternative genetic pathways in colorectal carcinogenesis. Proc Natl Acad Sci USA. 1997;94:12122-7.

189. Palladino MA, Figari IS. In vivo anti-tumour activity of recombinant human tumour necrosis factor-alpha against Meth-A sarcoma requires L3T4-positive T cells. Ann. Inst. Pasteur Immunol. 1988;139(3):299-301.

190. Pannacci M, Lucini V, Colleoni F, Martucci C, Grosso S, Sacerdote P, et al. *Panax ginseng* C.A. Mayer G115 modulates pro-inflammatory cytokine production in mice throughout the increase of macrophage toll-like receptor 4 expression during physical stres. Brain, Behavior, and Immunity. 2006; 20: 546-51.

191. Paramalingam SS, Thumboo J, Vasoo S, Thio ST, Tse C, Fong KY. In vivo pro- and anti-inflammatory cytokines in normal and patients with rheumatoid arthritis. Ann Acad Med Singapore. 2007;36:96-9

192. Park J, Lee KY, Oh YJ, Kim KW, Lee SK. Activation of cas-pase-3 protease via a Bcl-2-insensitive pathway during the process of ginsenoside Rh2-induced apoptosis. Cancer Lett. 1997;121:73-81.

193. Peguet-Navarro J, Moulon C, Caux C, Dalbiez-Gauthier C, Banchereau J, Schmitt D. Interleukin-10 inhibits the primary allogeneic T cell response to human epidermal Langerhans cells. Eur J Immunol. 1994;24:884-91.

194. Petersson M, Charo J, Salazar-Onfray F, Noffz G, Mohaupt M, Qin Z, et al. Constitutive IL-10 production accounts for the high NK sensitivity, low MHC class I expression, and poor transporter associated with antigen processing (TAP)-1/2 function in the prototype NK target YAC-1. J Immunol. 1998;161:2099-105.

195. Peyron F, Burdin N, Ringwald P, Vuillez J, Rousset F, Banchereau J. High levels of cir culating IL-10 in human malaria. Clin Exp Immunol. 1994;95:300-3.

196. Phillipson JD, Anderson LA. Ginseng-quality safety and efficacy? Pharm J. 1984;232:161-5.

197. Plaetinck G, Declercq W, Tavernier I, Nabholz M, Fiers W. Recombinant tumor necrosis factor can induce interleukin 2 receptor expression and cytolytic activity in a rat × mouse T cell hybrid. Eur. J. lmmunol. 1987;17:1835-8.

198. Raduner S, Majewska A, Chen JZ, Xie XQ, Hamon J, Faller B, Altmann KH, Gertsch J. Alkylamides from Echinacea Are a New Class of Cannabinomimetics. Cannabinoid Type 2 Receptor-Dependent And -Independent Immunomodulatory Effects. The Journal Of Biological Chemistry. 2006; 281 (20): 14192-206.

199. Randolph Rk, Gellenbeck K, Stonebrook K, Brovelli E, Qian Y, Bankaitis-Davis D, Cet al. Regulation of Human Immune Gene Expression as Influenced by a Commercial Blended Echinacea Product: Preliminary Studies. Exp Biol Med. 2003; 228:1051-6.

200. Ranges GE, Zlotnik A, Espevik T, Dinarello CA, Cerami A, Palladino Jr MA. Tumor necrosis factor alpha/cachectin is a growth factor for thymocytes. Synergistic interactions with other cytokines, J. Exp. Med. 1988;167:1472-8.

201. Rininger JA, Kickner S, Chigurupati P, McLean A, Franck Z Immunopharmacological activity of Echinacea Preparations following simulated digestion on murine macrophages and human peripheral blood mononuclear cells. Journal of Leukocyte Biology. 2000;68:503 -10.

202. Rivera E, Ekholm Pettersson F, Inganas M, Paulie S, Grönvik KO. The Rb1 fraction of ginseng elic its a balanced Th1 and Th2 immune response. Vaccine. 2005; 23: 5411 –9.

203. Ro JY, Ahn YS, Kim KH. Inhibitory effect of ginsenoside on the mediator release in the guinea pig lung mast cells activated by specific antigen-antibody reactions. Int J Immunopharmacol. 1998;20:625-41.

204. Roesler J, Emmendorfer A, Steinmuller C, Luettig B, Wagner H, Lohmann -Matthes M-L. Application of purified polysaccharides from cell cultures of the plant echinacea purpurea to test subjects mediates activation of the phagocyte system. International Journal of Immunopharmacology. 1991;13:931 -41.

205. Roilides E, Sein T, Schaufele R, Chanock S, Walsh T. Increased serum concentratrions of interleukin -10 in patients with hepatosplenic candidiasis. J Infect Dis. 1998;178:589 -92.

206. Romagnani S. T cell subsets (Th1 versurs Th2). Ann Allergy Asthma Immunol. 2000;85:9 -18.

207. Rook AH, Kehrl JH, Wakefield LM, Roberts AB, Sporn MB, Burlington DB, et al. Effects of transforming growth factor-β on the functions of natural killer cells: depressed cytosolic activity and blunting of interferon responsiveness. J Immunol. 1986;136:3916 -20.

208. Rousset F, Garcia E, Defrance T, Peronne C, Vezzio N, Hsu DH, et al. Interleukin 10 is a potent growth and differentiation factor for activated human B lymphocytes. Proc Natl Acad Sci USA. 1992;89:1890-3.

209. Sato K, Kawasaki H, Nagayama H, Enomoto M, Morimoto C, Tadokoro K, et al. TGF -β1 reciprocally controls chemotaxis of human peripheral blood monocyte-derived dendritic cells via chemokine receptors. J Immunol. 2000;164:2285-95.

210. Scaglione F, Ferrara F, Dugnani S, Falchi M, Santoro G, Fraschini F. Immunomodulatory effects of two extracts of Panax ginseng C.A. Meyer. Drugs Exper Clin Res. 1990;16(10):537-42.

211. Scaglione F, Lund B. Efficacy in the treatment of the common cold of a preparation containing an Echinacea extract. International Journal of Immunotherapy. 1995;11:163 -6.

212. Schellenberg R. Treatment for the premenstrual syndrome with agnus castus fruit extract: Prospective, randomised, placebo controlled study. BMJ. 2001;322:134 -7.

213. Schulte V, Rucker G, Perlick J. The presence of polyacetylene compounds in Echinacea purpurea and Echinacea angustifolia. ArzneimForsch. 1967;17:825 -9.

214. Schwarz E, Metzler J, Diedrich JP, Freudenstein J, Bode C, Bode JC. Oral administration of freshly expressed juice of Echinacea purpurea herbs fail to stimulate the nonspecific immune response in healthy young men:results of a doubleblind, placebo-controlled crossover study. J Immunother. 2002;25(5):413-20.

215. Scott GI, Colligan PB, Ren BH, Ren J. Ginsenosides Rb1 and Re decrease cardiac contraction in adult rat ventricular myocytes: role of nitric oxide. Br J Pharmacol. 2001;134:1159-65.

216. Seddon B, Mason D. Regulatory T cells in the control of autoimmunity: the essential role of transforming growth factor b and interleukin 4 in the prevention of autoimmune thyroiditis in rats by peripheral CD4+ CD45RC-cells and CD4+ CD8-thymocytes. J Exp Med. 1999;189:279-88.

217. See DM, Broumand N, Sahl L, Tilles JG. In vitro effects of echinacea and ginseng on natural killer and antibody-dependent cell cytotoxicity in healthy subjects and chronic fatigue syndrome or acquired immunodeficiency syndrome patients. Immunopharmacology. 1997;35:229-35.

218. Senchina DS, Flagel LE, Wendel JF, Kohut ML. Phenetic Comparison Of Seven Echinacea Species Based On Immunomodulatory Characteristics. Economic Botany. 2006; 60(3): 205-11.

219. Seo YJ, Kwon MS, Choi HW, Jang JE, Lee JK, Sun Y, et al. Intracerebroventricular Gisenosides are Antinociceptive in Proinflammatory Cytokine-Induced Pain Behaviors of Mice. Arch Pharm Res. 2008; 31: 364-9.

220. Shibata Y, Foster LA, Kurimoto M, Okamura H, Nakamura RM, Kawajiri K, et al. Immunoregulatory roles of IL-10 in innate immunity: IL-10 inhibits macrophage production of IFN-gamma-inducing factors but enhances NK cell production of IFN-gamma. J Immunol. 1998;161:4283-8.

221. Shin HY, Jeong HJ, An HJ, Hong SH, Um JY, Shin TY , et al. The effect of *Panax ginseng* on forced immobility time & immune function in mice. Indian J Med Res. 2006; 124: 199-206.

222. Sieling P, Abrams J, Yamamura M, Salgame P, Bloom B, Rea T, et al. Immunosuppressive roles for IL-10 and IL-4 in human infectgion. In vitro modulation of T cell responses in leprosy. J Immunol. 1993;150:5501-10.

223. Skaudickas D, Kondrotas AJ, Baltrušaitis K, Vaitiekaitis G. Effect of Echinacea (Echinacea Purpurea L. Moench) preparations on experimental prostate gland. Medicina. 2003;39(8):761-6.

224. Skaudickas D, Kondrotas A, Baltrušaitis K. The effect of Echinacea purpurea extract on sexual glands of male rats. Medicina (Kaunas). 2004;40(12):1211-8.

225. Smith CA, Davis T, Anderson D, Solam L, Beckmann MP, Jerzy R, et al. A receptor for tumor necrosis factor defines an unusual family of cellular and viral proteins. Science. 1990;248:1019-23.

226. Song JY, Han SK, Son EH, Pyo SN, Yun YS, Yi SY. Induction of secretory and tumoricidal activities in peritoneal macrophages by ginsan. International Immunopharmacology. 2002; 2: 857-65.

227. SPSS (1988) SPSS/PC + V.2.0. Base Manual for IBM PC/XT/AT and PC/2.Marija and Morusis. Soil Science Society of America, Inc, Chicago, IL

228. Stampfli M, Cwiartka M, Gajewska B, Alvarez D, Ritz S, Inman M, et al. Interleukin-10 gene transfer to the airway regulates allergic mucosal sensitization in mice. Am J Respir Cell Mol Biol. 1999;21:586-96.

229. Steinbrink K, Graulich E, Kubsch S, Knop J, Enk A. CD4(+) and CD8(+) anergic T cells induced by interleukin-10-treated human dendritic cells display antigen-specific suppressor activity. Blood. 2002;99:2468-76.

230. Steinmuller C, Roesler J, Grottrup E, Franke G, Wagner H, Lohmann-Matthes M-L. Polysaccharides ısolated from plant cell cultures of echinacea purpurea enhance the resistance of ımmunosuppressed

mice against systemic ınfections with candida albicans and listeria monocytogenes. Int J of Immunopharm. 1993;15:605-14.

231. Stevenson LM, Matthias A, Banbury L, Penman KG, Bone KM, Leach D, et al. Modulation of macrophage immune responses by Echinacea. Molecules. 2005; 10: 1279-85.

232. Stimpel M, Proksch A, Wagner H, Lohmann-Matthes ML. Macrophage activation and ınduction of macrophage cytotoxicity by purified polysaccharide fractions from the plant echinacea purpurea. Infection and Immunity. 1984;46(3):845-9.

233. Stotzem CD, Hungerland U, Mengs U. Influence of echinacea purpurea on the phagocytosis of human granulocytes. Med Sci Res. 1992;20:719-20.

234. Strobl H. Molecular mechanisms of dendritic cell sublineage development fro m human hematopoietic progenitor/stem cells. Int Arch Allergy Immunol. 2003;131:73-9.

235. Suffys P, Beyaert R, De Valck D, Vanhaesebroeck B, Van Roy F, Fiers W. Tumour-necrosis-factor-mediated cytotoxicity is correlated with phospholipase-A2 activity, but not with arachidonic acid release per se. Eur. J. Biochem. 1991;195:465-75.

236. Sumikawa H, Suzuki E, Fukuhara K, Nakajima Y, Kamiya K, Umeyama H. Dynamic structures of granulocyte colony-stimulating factor proteins studied by normal mode analysis: two domain-type motions in low frequency modes. Chem Pharm Bull (Tokyo). 1998;46:1069-77.

237. Sung J, Han KH, Zo JH, Park HJ, Kim CH, Oh BH. Effects of red ginseng upon vascular endothelial function in patients with essential hypertension. Am J Chin Med. 2000;28:205-16.

238. Surh YJ, Na HK, Lee JY, Keum YS. Molecular mechanisms underlying anti-tumor promoting activities of heat-processed Panax ginseng C.A. Meyer. J Korean Med Sci. 2001;16:38-41.

239. Suzuki T, Tahara H, Narula S, Moore KW, Robbins PD, Lo tze MT. Viral interleukin 10 (IL-10), the human herpes virus 4 cellular IL-10 homologue, induces local anergy to allogeneic and syngeneic tumors. J Exp Med. 1995;182:477-86.

240. Taga K, Mostowski H, Tosato G. Human interleukin-10 can directly inhibit T cell growth. Blood. 1993;81:2964-71.

241. Taipale J, Lohi J, Saarinen J, Kovanen PT, Keski-Oja J. Human mast cell chymase and leukocyte elastase release latent transforming growth factor-beta 1 from the extracellular matrix of cultured human epithelial and endothelial cells. J Biol Chem. 1995;270:4689-96.

242. Tannergard P, Liu T, Weger A, Nordenskjold M, Lindblom A. Tumorigenesis in colorectal tumors from patients with hereditary non-polyposis colorectal cancer. Hum Genet. 1997;101:51 – 5.

243. Theumer MG, Lopez AG, Masih DT, Chulze SN, Rubinstein HR. Immunobiological effects of AFB1 and AFB1/FB1 mixture in experimental subchronic mycotoxicoses in rats. Toxicology. 2003;186:159-70.

244. Thompson KD. Antiviral activity of Viracea® (TM) against acyclovir s usceptible and acyclovir resistant strains of Herpes simplex virus. Antiviral Res. 1998;39:55-61.

245. Tone M, Powell MJ, Tone Y, Thompson SA, Waldmann H. IL-10 gene expression is controlled by the transcription factors Sp1 and Sp3. J Immunol. 2000;165:28 6-91.

246. Tracey KJ, Cerami A. Cachectin/tumor necrosis factor and other cytokines in infectious disease. Curr. Opin. lmmunol. 1989;1(3):454-61.

247. Umetsu D, DeKruyff R. Th1 and Th2 CD4+ T cells in human allergic diseases. J Allergy Clin Immunol. 1997;100:1-6.

248. Van Snick J. Interleukin-6: an overview. Annu. Rev. Immunol. 1990;8:253-78.

249. Vanhaesebroeck B, Mareel M, Van Roy F, Grooten J, Fiers W. Expression of the tumor necrosis factor gene in tumor cells correlates with reduced tumorigenicity and reduced ınvasiveness in vivo. Cancer Res. 1991;51:2229-38.

250. Voaden DJ, Jacobson M. Tumor Inhibitors. 3. Identification and synthesis of an oncolytic hydrocarbon from American coneflower roots. Journal of Medicinal Chemistry. 1972;15:619 -23.

251. Voces J, Cabral de Oliveira AC, Prieto JG, Vila L, Perez AC, Duarte IDG et al. Ginseng administration protects skeletal muscle from oxidative stres induced by acute exercise in rats. Braz J Med Biol Res. 2004;37(12):1863-71.

252. Vodovotz Y, Bogdan C, Paik J, Xie QW, Nathan C. Mechanisms of suppression of macrophage nitric oxide release by transforming growth factor β. J Exp Med. 1993;178:605 -13.

253. Waage A, Halstensen A, Espevik T. Association between tumour necrosis factor in serum and fatal outcome in patients with meningococcal disease. Lancet. 1987;1(8529):355-7.

254. Wacker A, Hilbig W. Virus-inhibition by Echinacea purpurea. Planta Medica. 1978;33:89 -102.

255. Wagner H, Stuppner H, Schafer W, Zenk M, Immunologically active polysaccharides of e chinacea purpurea cell cultures. Phytochemistry. 1988;27:119 -26.

256. Wagner H, Breu W, Willer F, Wierer M, Remiger P, Schwenker G. In vitro inhibition of arachidonate metabolism by some alkamides and prenylated phenols. Planta Medica. 1989;55(6):566-7.

257. Wagner H. Search for new plant constituents with potential antiphlogistic and antiallergic activity. Planta Medica. 1989;55:235-41.

258. Waiser J, Dell K, Böhler T, Dogu E, Gaedeke J, Budde K. Cyclosporine A up-regulates the expression of TGF-*b*1 and its receptors type I and type II in rat mesangial cells. Nephrol Dial Transplant. 2002; 17: 1568-77.

259. Wang H, Actor JK, Indrigo J, Olsen M, Dasgupta A. Asian and Siberian ginseng as a potential modulator of immune function: an in vitro cytokine study using mouse macrophages. Clin Chim Acta. 2003;327(1-2):123-8.

260. Wang Y, Peng D, Huang W, Zhou X, Liu J, Fang Y. Mechanism of altered TNF -a expression by macrophage and the modulatory effect of Panax notoginseng saponins in scald mice. Burns. 2006; 32: 846–52.

261. Wen TC, Yoshimura H, Matsuda S, Lim JH, Sakanaka M. Ginseng root prevents learning disability and neuronal loss in gerbils with 5-minute forebrain ischaemia. Acta Neuropathol. 1996;91:15-22.

262. Wilkie A, Cordess C. Ginseng-a root just like a carrot? J R Soc Med. 1994;87(10):594-5.

263. Williamson BD, Carswell EA, Rubin BY, Prendergast JS, Old LJ. Human tumor necrosis factor produced by human B-cell lines: Synergistic cytotoxic interaction with human interferon Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1983;80:5397-401.

264. Wu D, Meydani M, Leka LS, Nightingale Z, Handelman GJ, Blumberg JB, et al . Effect of dietary supplementation with black currant seed oil on the immune response of healthy elderly subjects. Am J Clin Nutr. 1999;70(4):536-43.

265. Yamamura M, Uyemura K, Deans R, Weinberg K, Rea T, Bloom B, et al. Defining protective responses to pathogens: cytokine profiles in leprosy lesions. Science. 1991;254:277 -9.

266. Yang Z, Chen A, Sun H, Ye Y, Fang W. Ginsenoside Rd elicits Th1 and Th2 immun e responses to ovalbumin in mice. Vaccine. 2007; 25: 161 -9.

267. Yang L, Froio RM, Sciuto TE, Dvorak AM, Alon R, Luscinskas FW. ICAM-1 regulates neutrophil adhesion and transcellular migration of TNF-{alpha} activated vascular endothelium under flow. Blood. 2005;5106:584-9.

268. Yang A, Lattime E. Tumor-induced interleukin 10 suppresses the ability of splenic dendritic cells to stimulate CD4 and CD8 T cell responses. Cancer Res. 2003;63:2150-7.

269. Yang X, Letterio JJ, Lechleider RJ, Chen L, Hayman R, Gu H, et al. Targeted disruption of SMAD3 results in impaired mucosal immunity and diminished T cell responsiveness to TGF-beta. EMBO J. 1999;18:1280-91.

270. Yaswen L, Kulkarni AB, Fredrickson T, Mittleman B, Schiffman R, Payne S, et al. Autoimmune manifestations in the transforming growth factor-beta 1 knockout mouse. Blood. 1996;87:1439-45.

271. Ysebaert M, Van Emmelo J, Fiers W. Total nucleotide sequence of a nearly full-size DNA copy of satellite tobacco necrosis virus RNA. J. Mol. Biol. 1980;143(3):273-87.

272. Yu SC, Li XY. Effect of ginsenoside on IL-1 beta and IL-6 mRNA expression in hippocampal neurons in chronic inflammation model of aged rats. Acta Pharmacol Sin. 2000;21:915-8.

273. Yun TK. Brief introduction of Panax ginseng C.A. Meyer. J Korean Med Sci. 2001a;16:53-5.

274. Yun TK. Experimental and epidemiologic evidence of cancer preventive effects of Panax ginseng C.A. Meyer. Nutr Rev. 1996;54:71-81.

275. Yun TK. Panax ginseng- a non-organ-specific cancer preventive? Lancet Oncol. 2001;2:49-54.

276. Zhai Z, Haney D, Wu L, Solco A, Murphy PA, Wurtele ES. Alcohol extracts of Echinacea inhibit production of nitric oxide and tumor necrosis factor-alpha by macrophages in vitro. Food and Agricultural Immunology. 2007; 18(3-4): 221-36.

277. Zuany-Amorim C, Haile S, Ledue D, Dunarey C, Huerre M, Vargaftig B, et al. Interleukin-10 inhibits antigen-induced cellular recruitment into the airways of sensitized mice. J Clin Invest. 1995;95:2644-51.

9. ÖZGEÇMİŞ

1980 yılında Konya'da doğdu. İlk, orta ve lise eğitimini Konya'da tamamladı. 2003 yılında Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi'nden mezun oldu. 2004 yılında Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı'nda doktora eğitimine başladı. 2005 yılında Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı'na Araştırma Görevlisi olarak atandı. Halen aynı Anabilim Dalı'nda Araştırma Görevlisi olarak çalışmaktadır. Evli ve 1 çocuk annesidir.