T.C.
HATAY MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MİKROBİYOLOJİ (TIP) ANABİLİM DALI

KONAK MAKROFAJLARINDA MİKOBAKTERİYEL ENFEKSİYONLARA KARŞI DOĞAL VE SENTETİK TERAPÖTİK BİLEŞİKLERİN ANTİMİKOBAKTERİYEL AKTİVİTESİNİN VE MOLEKÜLER MEKANİZMALARININ DEĞERLENDİRİLMESİ

DOKTORA TEZİ

Sibel DAĞLI

Danışman

Prof. Dr. Nizami DURAN

HATAY- 2024

T.C.
HATAY MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MİKROBİYOLOJİ (TIP) ANABİLİM DALI

KONAK MAKROFAJLARINDA MİKOBAKTERİYEL ENFEKSİYONLARA KARŞI DOĞAL VE SENTETİK TERAPÖTİK BİLEŞİKLERİN ANTİMİKOBAKTERİYEL AKTİVİTESİNİN VE MOLEKÜLER MEKANİZMALARININ DEĞERLENDİRİLMESİ

DOKTORA TEZİ

Sibel DAĞLI

Danışman

Prof. Dr. Nizami DURAN

Bu tez, Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi **22.D.026** nolu proje olarak desteklenmiştir.

HATAY – 2024

Kabul ve Onay

T.C.
HATAY MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MİKROBİYOLOJİ (TIP) ANABİLİM DALI

KONAK MAKROFAJLARINDA MİKOBAKTERİYEL ENFEKSİYONLARA KARŞI DOĞAL VE SENTETİK TERAPÖTİK BİLEŞİKLERİN ANTİMİKOBAKTERİYEL AKTİVİTESİNİN VE MOLEKÜLER MEKANİZMALARININ DEĞERLENDİRİLMESİ

Doktora Tezi
Sibel DAĞLI

Bu tez aşağıda isimleri yazılı tez jürisi tarafından 05 /12 /2024 tarihinde sözlü olarak yapılan tez savunma sınavında oybirliği ile kabul edilmiştir.

Tez Jürisi:	Jüri Başkanı	: Prof. Dr. Nizami DURAN
	Üye	: Prof. Dr. Özkan ASLANTAŞ
	Üye	: Prof. Dr. Cemil TÜMER
	Üye	: Doç. Dr. Tülin GÜVEN GÖKMEN
	Üye	: Dr. Öğr. Üyesi Pınar ETİZ

Bu tez, Enstitümüz (Tıp) Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda hazırlanmıştır.

…./ …./2024
Prof. Dr. İbrahim Halil ÇERÇİ
Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Hayatımın bu zorlu ama bir o kadar da anlamlı yolculuğunda, hayallerimin peşinden koşarken her anımda yanımda olan ve bana rehberlik eden kıymetli danışman hocam Prof. Dr. Nizami DURAN'a, ilgi, sabır ve engin bilgisiyle bana kattığı her şey için en derin şükranlarımı sunuyorum.

Doktora sürecimde bilgi birikimleriyle ufkumu genişleten, desteğini her daim hissettiğim ve yolumu aydınlatan değerli hocalarım Prof. Dr. Özkan ASLANTAŞ, Prof. Dr. Burçin ÖZER ve Prof. Dr. Akın YAKAN'a, gönülden teşekkür ediyorum.

Bu süreçte, dostluklarıyla bana güç veren, en zor zamanlarımda destekleri ve samimiyetleri ile yanımda duran sevgili arkadaşlarım Elif Yaprak ÇOLAK, Mücella Bayırlı NACAROĞLU, Emrah AY ve Hasan KEÇELİ'ye bu yolculukta yanımda olduğunuz için müteşekkirim.

Ve kelimelerin kifayetsiz kaldığı bir teşekkür, varlıklarıyla hayatıma anlam katarak her daim yanımda olan, sevgileri ve fedakârlıklarıyla beni ben yapan canım aileme... Babam Mehmet DAĞLI, annem Selvi DAĞLI ve kıymetli kardeşlerim; sizler olmasaydınız, bu başarı mümkün olamazdı. Her anımda beni desteklediğiniz ve inandığınız için yüreğimin en derin köşesinden teşekkür ediyorum.

Hayatımda yer alan, bana ilham ve güç veren herkese sonsuz teşekkürlerimle...

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY II
TEŞEKKÜR III
İÇİNDEKİLER IV
ÇİZELGELER DİZİNİ VI
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ XI
ÖZET XIV
ABSTRACT XVI
1. GİRİŞ 1
2. GENEL BİLGİLER 5
2.1 *Mycobacterium tuberculosis* ve Tüberküloz Enfeksiyonu 5
2.2 *Mycobacterium tuberculosis*-Makrofaj İlişkisi 8
2.3. Anti Tüberküloz İlaçlar 11
2.3.1. Rifampisin 11
2.3.2. İzoniyazid 11
2.4 Fitokimyasallar 12
2.4.1. Likopen 12
2.4.2. Linalool 16
2.4.3. Rosmarinik Asit 19
2.4.4. Rosuvastatin 22
2.4.5. Oleik Asit 23
3. GEREÇ VE YÖNTEM 25
3.1 Araç ve Gereçler 25
3.2 Kimyasal maddeler ve Suşlar 26
3.3 *Mycobacterium avium* Kültürü 27
3.3.1. ARB Boyama 33
3.4. Solüsyon ve Bileşiklerinin Hazırlanması 33
3.4.1.RPMI-1640 Besiyeri 33
3.4.2. Tripsin Solüsyonunun Hazırlanması 33
3.4.3. PBS hazırlanması 34
3.5. Standart İlaçlar 34

3.5.1. İzoniyazid *34*
3.5.2. Rifampisin *34*
3.5.3. Likopen *34*
3.5.4. Rosmarinik Asit *34*
3.5.5. Rosuvastatin *35*
3.5.6. Oleik Asit *35*
3.5.7. Linalool *35*
3.6. HÜCRE KÜLTÜRÜ ÇALIŞMALARI 35
3.6.1.Sitotoksite Testleri *36*
3.6.2.Non-Toksik Konsantrasyonların Belirlenmesi *36*
3.6.3.DMSO'nun Non-Toksik Konsantrasyonunun Belirlenmesi *37*
3.6.4.Anti-tüberküloz ilaçların Non-Toksik Konsantrasyonunun Belirlenmesi *37*
3.6.5.MTT(3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) Yöntemi *38*
3.6.6.Tripan Mavisi ile Hücre Canlılığının Belirlenmesi *39*
3.6.7.RAW 264.7 Hücrelerinin M. avium ile Enfekte Edilmesi ve Deney Grupları *39*
3.7 Gen Ekpsresyon Çalışmaları 40
3.7.1RNA İzolasyonu *41*
3.7.2Komplementer DNA (cDNA) Sentezi *42*
3.7.3İnflamatuar Sitokin Genlerinin Ekspresyon Seviyelerinin qPCR ile Belirlenmesi *42*
3.7.4. İstatistik Analizler *43*
4. BULGULAR 44
4.1. Aktivite Çalışmaları 44
4.2. Gen Ekspresyon Analizi Sonuçları 55
4.3. Analiz Sonuçları 56
5. TARTIŞMA 85
6. SONUÇ VE ÖNERİLER 99
6.1. SONUÇLAR 99
6.2. ÖNERİLER 102
7. KAYNAKLAR 104

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3-1. Sitotoksite çalışmaları deney grupları ve tekrar sayıları. 38
Çizelge 3-2. *M. avium* ile enfekte edilmiş RAW 264.7 hücrelerinde ekspresyon çalışması deney grupları. 40
Çizelge 3-3. Çalışmada kullanılan oligonükleotit dizileri. 42

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 3.1. *Mycobacterium avium (ATCC 15769)* liyofilize suşu, BD MGIT kültür tüpleri, BD BBL MGIT PANTA antimikrobiyal ajanlar. 28
Şekil 3.2. *Mycobacterium avium* (ATCC 15769) suşunun BD MGIT kültür tüplerine ekimini takiben BD BACTEC MGIT 960 cihazına inkübasyon için yerleştirilmesi. 29
Şekil 3.3. İnkübasyonun 72. saatinde üreme tespit edilen kültür örnekleri. 29
Şekil 3.4. Pozitiflik sinyali alınan örneklerin ARB yöntemiyle boyanması. 30
Şekil 3.5. *Mycobacterium avium* (ATCC 15769) suşu, x100 büyütmede ışık mikroskobu görünümü. 30
Şekil 3.6. Vero ve Raw 264.7 hücre hatlarının 37 ^{0} C'de %5 CO_2'li etüvde inkübasyonu. 31
Şekil 3.7. Raw 264.7 hücreleri ile oluşturulan çalışma gruplarına *M. avium* eklenmesi. 31
Şekil 3.8. Raw 264.7 hücrelerinin *M. avium* ile inkübasyon sonrası invert mikroskop altında incelenmesi. 32
Şekil 3.8. RT-PCR gen ekspresyon çalışmaları. 32
Şekil 4.1. Hücrelerin 96. saat inkübasyonundaki hücre morfolojileri, A: Vero, B: RAW 264.7 (10×). 44
Şekil 4.2. Vero hücre hattında izoniyazidin <234 µg/ml konsantrasyonda hücrelerde toksik etki tespit edilmezken, >234 µg/ml konsantrasyonda İzoniyazid toksik etki oluşturmuştur. Hücrelerde agregasyon, hücre yuvarlaklaşması, nükleer büyüme gibi sitopatolojik değişimler görülmektedir. 45
Şekil 4.3. Vero hücre hattında rifampisinin <59 µg/ml konsantrasyonda hücrelerde toksik etki tespit edilmezken, >59 µg/ml konsantrasyonda toksik etki oluşturmuştur. Yüksek konsantrasyonlarda hücrelerde genel bir atipik görünüm ile izoniyazid testlerine benzer şekilde hücrelerde agregasyon, hücre yuvarlaklaşması, nükleer büyüme gibi sitopatolojik değişimler saptanmıştır. 46
Şekil 4.4. Vero hücre hattında likopenin <63 µg/ml (0.12 mM) konsantrasyonda hücrelerde toksik etki tespit edilmezken, >63 µg/ml konsantrasyonda toksik etki oluşturmuştur. Hücrelerde agregasyon, hücre yuvarlaklaşması, nükleer büyüme gibi sitopatolojik değişimler saptanmıştır. 47

Şekil 4.5. Vero hücre hattında rosmarinik asitin <16 µg/ml (0.04) konsantrasyonda hücrelerde toksik etki tespit edilmezken, >16 µg/ml konsantrasyonda toksik etki oluşturmuştur. Hücrelerde agregasyon, hücre yuvarlaklaşması, nükleer büyüme gibi sitopatolojik değişimler saptanmıştır. 48
Şekil 4.6. Vero hücre hattında rosuvastatinin <8 µg/ml (7,6 mM) konsantrasyonda hücrelerde toksik etki tespit edilmezken, >8 µg/ml konsantrasyonda rosuvastatin toksik etki oluşturmuştur. Hücrelerde agregasyon, hücre yuvarlaklaşması, nükleer büyüme gibi sitopatolojik değişimler görülmektedir. 49
Şekil 4.7.Vero hücre hattında oleik asitin <0.6 µg/ml (0.002 mM) konsantrasyonda hücrelerde toksik etki tespit edilmezken, >0.6 µg/ml konsantrasyonda oleik asit toksik etki oluşturmuştur. Hücrelerde agregasyon, hücre yuvarlaklaşması, nükleer büyüme gibi sitopatolojik değişimler görülmektedir. 50
Şekil 4.8. Vero hücre hattında linaloolün <57 µg/ml (0.4 mM) konsantrasyonda hücrelerde toksik etki tespit edilmezken, >57 µg/ml konsantrasyonda linalool toksik etki oluşturmuştur. Hücrelerde agregasyon, hücre yuvarlaklaşması, nükleer büyüme gibi sitopatolojik değişimler görülmektedir. 51
Şekil 4.9. *M. avium* ile enfekte edilmiş Vero ve RAW 264.7 hücrelerin 96 saat inkübasyon sonundaki hücre morfolojileri, A: Vero+*M. avium*, B: RAW+*M. avium*, (10×). 52
Şekil 4.10. *M. avium* ile enfekte edilen RAW 264.7 hücrelerinde A:İZO (234 µg/ml) B:İZO+*M. avium* ve C:RİF (59 µg/ml), D:RİF+*M. avium* hücre morfolojileri üzerinde meydana getirdiği sitopatolojik değişiklikler. 52
Şekil 4.11. *M. avium* ile enfekte edilen RAW 264.7 hücrelerinde A:LİK, B:LİK+*M. avium* (63 µg/ml) hücre morfolojileri üzerinde meydana getirdiği sitopatolojik değişiklikler. 53
Şekil 4.12. *M. avium* ile enfekte edilen RAW 264.7 hücrelerinde A:RA, B:RA+*M. avium* (16 µg/ml) hücre morfolojileri üzerinde meydana getirdiği sitopatolojik değişiklikler. 53
Şekil 4.13. *M. avium* ile enfekte edilen RAW 264.7 hücrelerinde A:RS, B:RS+*M. avium* (8 µg/ml) hücre morfolojileri üzerinde meydana getirdiği sitopatolojik değişiklikler. 53

Şekil 4.14. *M. avium* ile enfekte edilen RAW 264.7 hücrelerinde A:OA, B:OA+*M. avium* (0.6 µg/ml) hücre morfolojileri üzerinde meydana getirdiği sitopatolojik değişiklikler. 54
Şekil 4.15. *M. avium* ile enfekte edilen RAW 264.7 hücrelerinde A:LİN, B:LİN+*M. avium* (57 µg/ml) hücre morfolojileri üzerinde meydana getirdiği sitopatolojik değişiklikler. 54
Şekil 4.16. RNA izolasyonu sonrası RAW 264.7 hücrelerinden elde edilen total RNA'nın agaroz jel görüntüsü. 55
Şekil 4.17. İzoniazid, rifampisin ve likopenin Vero hücrelerindeki sitotoksisite değerlendirmesi. 56
Şekil 4.18. Linalool, rosmarinik asit ve rosuvastatinin Vero hücrelerindeki sitotoksisite değerlendirmesi. 57
Şekil 4.19. Raw 264.7 hücre kültüründe IL-6, IL-8 (CXCL1), IL-1β ve TNF-α gen ekspresyonlarının Beta-aktin ile karşılaştırmalı analizi. 59
Şekil 4.20. Raw 264.7 hücre kültüründe proenflamatuar sitokin gen (IL-6, IL-8 (CXCL1), IL-1β ve TNF-α) ekspresyonlarının linalool, rosmarinik asit, rosuvastatin ve oleik asit ile modülasyonu. 60
Şekil 4.21. Raw 264.7 hücre kültüründe IL-12 geni ekspresyon seviyelerinin Beta-aktin geni ile karşılaştırmalı analizi. 62
Şekil 4.22. Raw 264.7 hücre hattında izoniazid, rifampisin ve likopenin CYP1A1, COX-2, iNOS ve Egr-1 gen ekspresyon oranlarına etkisinin Beta-aktin geniyle karşılaştırmalı analizi. 63
Şekil 4.23. Raw 264.7 hücre hattında linalool, rosmarinik asit, rosuvastatin ve oleik asitin CYP1A1, COX-2, iNOS ve Egr-1 gen ekspresyon oranlarına etkisinin Beta-aktin geni ile karşılaştırmalı analizi. 65
Şekil 4.24. Raw 264.7 hücre kültüründe izoniazid, rifampisin, likopen, linalool, rosmarinik asit, rosuvastatin ve oleik asitin IL-10 gen ekspresyon seviyeleri üzerindeki etkisinin Beta-aktin geni referansı ile karşılaştırmalı analizi. 67
Şekil 4.25. Raw 264.7 hücre kültüründe izoniazid, rifampisin, likopen, linalool, rosmarinik asit, rosuvastatin ve oleik asitin IL-12 gen ekspresyon seviyeleri üzerindeki etkisinin Beta-aktin geni referansı ile karşılaştırmalı analizi. 69

Şekil 4.26. Raw 264.7 hücrelerinde *M. avium* enfeksiyonu sonrası proenflamatuar sitokin genlerinin (IL-6, IL-8, IL-1β ve TNF-α) ekspresyonunun izoniazid, rifampisin, linalool, rosmarinik asit, rosuvastatin ve oleik asit ile modüle edilmesi.....71
Şekil 4.27. Raw 264.7 hücrelerinde *M. avium* enfeksiyonu sonrası proenflamatuar sitokin genlerinin (IL-6, IL-8, IL-1β ve TNF-α) ekspresyonunun linalool, rosmarinik asit, rosuvastatin ve oleik asit ile modüle edilmesi. 73
Şekil 4.28. Raw 264.7 hücrelerinde *M. avium* enfeksiyonu sonrası IL-12 geni ekspresyonunun izoniazid, rifampisin, linalool, rosmarinik asit, rosuvastatin ve oleik asit ile modüle edilmesi. 75
Şekil 4.29. Raw 264.7 hücrelerinde *M. avium* enfeksiyonu sonrası izoniazid, rifampisin ve likopenin CYP1A1, COX-2, iNOS ve Egr-1 gen ekspresyon oranlarına etkisinin Beta-aktin geniyle karşılaştırmalı analizi. 77
Şekil 4.30. Raw 264.7 hücrelerinde *M. avium* enfeksiyonu sonrası linalool, rosmarinik asit, rosuvastatin ve oleik asitin CYP1A1, COX-2, iNOS ve Egr-1 gen ekspresyon oranlarına etkisinin Beta-aktin geniyle karşılaştırmalı analizi. 79
Şekil 4.31. Raw 264.7 hücrelerinde *M. avium* enfeksiyonu sonrası izoniazid, rifampisin, likopen, linalool, rosmarinik asit, rosuvastatin ve oleik asitin IL-10 gen ekspresyon seviyeleri üzerindeki etkisinin Beta-aktin geni referansı ile karşılaştırmalı analizi. 81
Şekil 4.32. Raw 264.7 hücrelerinde *M. avium* enfeksiyonu sonrası izoniazid, rifampisin, likopen, linalool, rosmarinik asit, rosuvastatin ve oleik asitin IL-27 gen ekspresyon seviyeleri üzerindeki etkisinin Beta-aktin geni referansı ile karşılaştırmalı analizi. 83

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Ag :Antijen

Ab :Antikor

ABD/USA :Amerika Birleşik Devletleri (United States of America)

AM : Alveolar Makrofajlar

ANOVA :Varyans Analizi (Analysis of Variance, istatistiksel hipotez testi)

APC :Antijen Sunan Hücreler

ATCC :Amerikan Tip Kültür Koleksiyonu (American Type Cultre Collection)

ARB :Asit Dirençli Basil

BD BACTEC MGIT 960 :Mikobakterilerin Büyümesini Tespit Eden Otomatik Sistem (Becton Dickinson firması tarafından geliştirilmiştir).

BMDC : Kemik İliği Kaynaklı Dendritik Hücre

CD4+ :Cluster of Differentiation 4 (T lenfosit hücrelerinde makrofaj aktivasyonu sağlar)

cDNA :Komplementer DNA (Complementary DNA, ters transkriptaz enzimi ile RNA'dan sentezlenir)

COX-2 :Siklooksijenaz-2 (İnflamasyonda görevli enzim)

CXCL1 :C-X-C Motif Ligandı 1 (Kemokin ailesinden; inflamasyon ve kemotakside görevli)

CYP1A1 :Sitokrom P450 1A1 (İlaç metabolizması ve toksinlerin detoksifikasyonunda görevli enzim)

DC : Dendritik Hücreler

DMSO :Dimetil Sülfoksit (Dimethyl Sulfoxide) (Çözücü ve hücre geçirgenliği artırıcı)

EU :Avrupa Birliği (European Union)

Egr-1 :Erken Büyüme Yanıtı 1 (Early Growth Response 1) (Hücresel büyüm ve farklılaşmada rol oynayan transkripsiyon faktör)

FBS :Fetal Sığır Serumu (Fetal Bovin Serum) (Hücre Kültürü ortamlarında besin desteği)

GSH :Glutatyon

HDL : Yüksek Yoğunluklu Lipoprotein

HEPES :N-(2-Hidroksietil)piperazin-N'-(2-etan sülfonik asit) (hücre kültür ortamlarında pH dengeleyici tampon)

HMG CoA : 3-hidroksi-3-metilglutaril koenzim A

ICAM-1 : hücreler arası yapışma molekülü 1

IDO : İndolamin 2,3-dioksijenaz

IL-1 :İnterlökin 1 (Bağışıklık ve inflamasyon yanıtında etkili sitokin)

IL-1β :İnterlökin 1 Beta (Bağışık yanıtı regüle eden enflamatuar sitokin)

IL-6 :İnterlökin 6 (Proinflamatuar ve antienflamatuar etkili sitokin)
CXCL1 (IL-8) :İnterlökin 8 (Nötrofillerin kemotaksi regülasyonundan sorumlu sitokin)
IL-10 :İnterlökin 10 (Antienflamatuar sitokin)
IL-12 :İnterlökin 12 (T hücrelerinin aktivasyonundan sorumlu sitokin)
IL-27 :İnterlökin 27 (Proinflamatuar ve immün regülatör sitokin)
mRNA : enflamatuar protein-2 için haberci RNA
IFN :Interferon (Bağışık yanıtın regülasyonundan sorumlu sitokin grubu)
IFN-γ : İnterferon-Gama
iNOS :İndüklenebilir Nitrik Oksit Sentaz (Nitrik oksit üretiminde görevli enzim)
İZO :İzoniazid (Tüberküloz tedavisinde kullanılan temel ilaç)
JNK :c-Jun-n-terminal kinaz
LDL : Düşük Yoğunluklu Lipoprotein
LJ :Löwenstein-Jensen (Tüberküloz için kullanılan katı kültür ortamı)
LİK :Likopen (Kırmızı meyve ve sebzede bulunan güçlü antioksidan)
LİN :Linalool (Terpen)
MDR :Çoklu İlaca Direnç (Multidrug-Resistant)
Mtb :*Mycobacterium tuberculosis*
MGIT :Mikobakteri Büyüme Göstergesi Tüpü (Mycobacteria Growth Indıcator Tube)
MTT :Metil Tiyazolil Tetrazolyum (Hücre canlılığı analizinde kullanılan kimyasal)
NK :Doğal Öldürücü (Natural Killer)
Nrf-2 : Nükleer Faktör 2
NF-κB : Nükleer Kappa B
NO : Nitrik Oksit
OA :Oleik Asit (Omega-9 yağ asidi)
OXPHOS :Oksidatif Fosforilasyonu (
PGE2 :Prostaglandin E2 (Bağışıklık yanıtı, inflamasyon ve diğer fizyolojik süreçlerde rol oynayan lipid mediatör)
PRR :Patern Tanıma reseptörÜ
RA :Rosmarinik Asit (Doğal polifenolik antioksidan
Raw 264.7 :Fare monosit/makrofaj hücre hattı
RİF :Rifampisin (Tüberküloz tedavisinde kullanılan temel ilaç)
RNA :Ribonükleik Asit (Ribonucleic Acid)
RNAse :Ribonükleaz (RNA'yı parçalayan bir enzim)
ROS :Reaktif Oksijen Türleri (Reactive Oxygen Species)
RPMI-1640 :Roswell Park Memorial Institute 1640 (Hücre büyümesinde kullanılan besiyeri)
RS :Rosuvastatin (Kolestrol regüle edici ilaç)
RT-PCR :Ters Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Reverse Transcriptase PCR) / Kantitatif PCR (Quantitative PCR, gen ekspresyonu analizinde

kullanılır)

STAT1	: Sinyal Dönüştürücü ve Transkripsiyon Aktivatörü 1
TB	:Tüberküloz
TDM	:Tüberküloz Dışı Mikobakteriler
THP-1	:İnsan monosit hücre hattı
TPA	: 12-Otetradekanoilphorbol-13-asetat
TNF-α	: Tümör Nekroz Faktör-α
TLR	:Toll-like Reseptör (Toll-like Receptor)
TNF	:Tümör Nekroz Faktör
UV	: Ultraviyole
U937	:İnsan monosit/makrofaj hücre hattı
VCAM-1	:Vasküler hücre yapışma molekülü-1
Vero	:Afrika yeşil maymun böbrek hücre hattı
XDR	:Yaygın ilaca Direnç (Extensively Drug-Resistant)
g	:Gram (kütle birimi)
mA	:Miliamper (elektrik akımı birimi)
mM	:Milimolar (mol konsantrasyon birimi; 10^{-3} mol/L)
mm	:Milimetre (uzunluk birimi; 10^{-3} metre)
ml	:Mililitre (hacim birimi; 10^{-3} litre)
µg/ml	:Mikrogram/mililitre (konsantrasyon birimi)
µm	:Mikrometre (uzunluk birimi; 10^{-6} metre)
µM	:Mikromolar (mol konsantrasyon birimi; 10^{-6} mol/L)
µl	:Mikrolitre (hacim birimi; 10^{-6} litre)

ÖZET

Konak Makrofajlarında Mikobakteriyel Enfeksiyonlara Karşı Doğal ve Sentetik Terapötik Bileşiklerin Antimikobakteriyel Aktivitesinin ve Moleküler Mekanizmalarının Değerlendirilmesi

Mycobacterium tuberculosis, insan ölümlerine yol açan en önemli patojenlerden biridir. Özellikle son yıllarda ilaç dirençli suşların yaygınlaşması, mevcut terapötiklere alternatif yeni ilaç araştırmalarını kaçınılmaz hale getirmiştir. Bu çalışmada, standart anti-tüberkülozik ajanlar ile doğal ve sentetik bileşiklerin etki ve direnç mekanizmalarını aydınlatarak yeni tedavi stratejileri geliştirilmesi hedeflenmiştir. Bu amaçla mikobakterilerin konak hücre enfeksiyon sürecindeki etkilerini anlamak ve değerlendirmek amacıyla standart ilaç olarak izoniazid ve rifampisin kullanılırken, bileşik gruplarında likopen, linalool, rosmarinik asit, rosuvastatin ve oleik asitin etkileri değerlendirilmiştir. Sitotoksisite testleri için Vero hücre hattı, enfeksiyon modeli için Raw 264.7 hücre hattı ve mikobakteriyel enfeksiyon için M. avium suşu kullanılmıştır. Hücre sitotoksisitesi MTT yöntemiyle ölçülmüş, proenflamatuar sitokin (IL-6, CXCL1 (IL-8), IL-1β, TNF-α, IL-12 (P40)), anti-enflamatuar (IL-10, IL-27), enflamatuar süreçlerde rol oynayan enzim genleri (CYP1A1, COX-2, iNOS) ile transkripsiyon faktörü Egr-1 geninin ekspresyon seviyeleri ise RT-PCR ile analiz edilmiştir.

M. avium ile enfekte edilen Raw 264.7 hücrelerinde yapılan gen ekspresyon analizleri hem kontrol grubuyla hem de doğal bileşiklerle tedavi edilen gruplar arasında önemli farklılıklar göstermiştir. Oleik asit tedavisi, IL-1β, IL-6 ve TNF-α gen ekspresyonlarında kontrol grubuna kıyasla belirgin bir azalma sağlamıştır. Kontrol grubunda IL-1β ekspresyonu 2.4 kat artarken, oleik asit grubunda bu artış 1.22 kat ile sınırlı kalmıştır ($p<0.0001$). Benzer şekilde, IL-6 ve TNF-α ekspresyonları kontrol grubunda daha yüksekken, oleik asit tedavisi bu genlerde sırasıyla 0.42 kat ve 1.75 kat artışla daha düşük seviyelerde regülasyon sağlamıştır. IL-12 ekspresyonu ise oleik asit grubunda 25.61 kat artarken, kontrol grubunda bu artış 21.36 kat olarak ölçülmüştür. Proinflamatuar sitokinlerin genel ekspresyonu, doğal bileşiklerle tedavi edilen gruplarda kontrol grubuna kıyasla güçlü şekilde regüle edilmiştir. Örneğin, CYP1A1 gen ekspresyonu kontrol grubunda 2.86 kat artarken, izoniazid grubunda 4.10 kat ve rifampisin grubunda 2.84 kat artış göstermiştir. COX-2 gen ekspresyonu kontrol grubunda 6.12 kat artış gösterirken, izoniazid ve rifampisin tedavi gruplarında bu artışlar sırasıyla 3.78 kat ve 3.85 kat olarak tespit edilmiştir. iNOS gen ekspresyonu kontrol grubunda 12.56 kat artış göstermiş, doğal bileşiklerle tedavi edilen gruplarda ise bu artış daha düşük seviyelerde saptanmıştır. Özellikle likopen, rosmarinik asit, rosuvastatin ve oleik asit ile tedavi edilen gruplarda iNOS ekspresyon artışları sırasıyla 9.92 kat, 7.12 kat, 8.75 kat ve 9.25 kat olarak belirlenmiştir. IL-10 gen ekspresyonu kontrol grubunda azalma eğilimi gösterirken, doğal bileşik tedavi gruplarında anlamlı bir artış sağlamıştır. Bunun yanında, IL-12 ekspresyonu doğal bileşiklerin kullanıldığı gruplarda standart ilaçlara kıyasla daha düşük seviyelerde artış göstermiştir.

Bu çalışma, *M. avium* enfeksiyonunun tedavisinde hem standart ilaçların hem de doğal bileşiklerin enflamatuar yanıt üzerindeki düzenleyici etkilerini ortaya koymuştur. Antibakteriyel ilaçların etkinliğinin, konak hücre immün yanıtının regülasyonu ile doğrudan ilişkili olduğu belirlenmiştir. Özellikle proenflamatuar sitokinlerin regüle edilmesi,

enflamatuar yanıtın kontrol altına alınması ve antienflamatuar genlerin ekspresyonunun artırılması, mikobakterilerin makrofajlar içinde hapsedilmesi veya yok edilmesinde kritik öneme sahiptir. Doğal bileşiklerin (likopen, rosmarinik asit, linalool, rosuvastatin ve oleik asit) proenflamatuar gen ekspresyonunu düzenlediği ve inflamasyon sürecini dengelediği görülmüştür. Bu sonuçlar, doğal bileşiklerin standart tedavilere destekleyici ajanlar olarak eklenmesiyle ilaç direncinin kırılmasında ve çoklu ilaç dirençli tüberküloz vakalarının tedavi başarısında artış sağlanabileceğini göstermektedir. Gelecekte yapılacak klinik çalışmalar, bu yaklaşımların doğrulanması ve geliştirilmesi açısından önemlidir.

Anahtar kelimeler: Raw 264.7, Hücre Kültürü, *M. avium*, Tedavi, İlaç Direnci.

ABSTRACT

Evaluation of the Antimycobacterial Activity and Molecular Mechanisms of Natural and Synthetic Therapeutic Compounds Against Mycobacterial Infections in Host Macrophages

Mycobacterium tuberculosis is one of the most important pathogens that cause human deaths. Especially in recent years, the prevalence of drug-resistant strains has made new drug research as alternatives to existing therapeutics inevitable. In this study, we aimed to develop new treatment strategies by elucidating the mechanisms of action and resistance of standard anti-tuberculosis agents and natural and synthetic compounds. For this purpose, isoniazid and rifampicin were used as standard drugs to understand and evaluate the effects of mycobacteria on the host cell infection process, while the effects of lycopene, linalool, rosmarinic acid, rosuvastatin and oleic acid were evaluated in compound groups. Vero cell line was used for cytotoxicity tests, Raw 264.7 cell line for infection model and *M. avium* strain for mycobacterial infection. Cell cytotoxicity was measured by MTT method and expression levels of pro-inflammatory cytokines (IL-6, CXCL1 (IL-8), IL-1β, TNF-α, IL-12 (P40)), anti-inflammatory (IL-10, IL-27), enzyme genes involved in inflammatory processes (CYP1A1, COX-2, iNOS) and transcription factor Egr-1 gene were analyzed by RT-PCR. While ısoniazid and rifampicin were used as standard drugs, the effects of lycopene, linalool, rosmarinic acid, rosuvastatin, and oleic acid were evaluated in natural compound groups.

Gene expression analyses performed in Raw 264.7 cells infected with *M. avium* showed significant differences between the control group and those treated with natural compounds. Oleic acid treatment caused a significant decrease in IL-1β, IL-6, and TNF-α gene expressions compared to the control group. While IL-1β expression increased 2.4-fold in the control group, this increase was limited to 1.22-fold in the oleic acid group ($p<0.0001$). Similarly, IL-6 and TNF-α expressions were higher in the control group, while oleic acid treatment regulated these genes at lower levels with 0.42-fold and 1.75-fold increases, respectively. IL-12 expression increased 25.61-fold in the oleic acid group, while this increase was 21.36-fold in the control group. The overall expression of proinflammatory cytokines was strongly regulated in the groups treated with natural compounds compared to the control group. For example, CYP1A1 gene expression increased 2.86-fold in the control group, 4.10-fold in the ısoniazid group, and 2.84-fold in the rifampicin group. COX-2 gene expression increased 6.12-fold in the control group, while these increases were determined as 3.78-fold and 3.85-fold in the ısoniazid and rifampicin treatment groups, respectively. iNOS gene expression increased 12.56-fold in the control group, while this increase was lower in the groups treated with natural compounds. In particular, iNOS expression increases were determined as 9.92-fold, 7.12-fold, 8.75-fold, and 9.25-fold in the groups treated with lycopene, rosmarinic acid, rosuvastatin, and oleic acid, respectively. While IL-10 gene expression tended to decrease in the control group, it provided a significant increase in the natural compound treatment groups. In addition, IL-12 expression increased at lower levels in the natural compound groups compared to standard drugs.

This study revealed the regulatory effects of standard drugs and natural compounds on the inflammatory response in treating *M. avium* infection. It was determined that the effectiveness of antibacterial drugs is directly related to the regulation of the host cell's

immüne response. In particular, regulating proinflammatory cytokines, controlling the inflammatory response, and increasing the expression of anti-inflammatory genes are critical in trapping or eliminating mycobacteria within macrophages. It has been observed that natural compounds (lycopene, rosmarinic acid, linalool, rosuvastatin, and oleic acid) regulate proinflammatory gene expression and balance the inflammatory process. These results indicate that adding natural compounds as supportive agents to standard treatments can increase the success of breaking drug resistance and treating multidrug-resistant tuberculosis cases. Future clinical studies are essential for the validation and development of these approaches.

Keywords: Raw 264.7, Cell Culture, *M. avium*, Treatment, Drug Resistance.

1. GİRİŞ

Küresel nüfusun üçte biri *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*) ile enfektedir, ancak bunların yalnızca %5-10'unluk dilimindeki insanlarda aktif enfeksiyon gelişmektedir. Tüberküloz (TB) enfeksiyonu özellikle az gelişmiş veya gelişmekte olan ülkelerde daha sık görülmektedir. Dünya çapında yılda 10 milyondan fazla yeni vakaların teşhisi ile TB büyük bir küresel sağlık sorunu olmaya devam etmektedir. Dünya Sağlık Örgütü'nün 2023 yılında yayınladığı Küresel Tüberküloz Raporu'na göre, COVID-19'dan sonra TB'nin tek bir enfeksiyöz ajandan kaynaklanan ikinci önde gelen ölüm nedeni olduğunu vurgulamaktadır (Dünya Sağlık Örgütü, 2023). Kısmen etkili bir aşının bulunmasına ve makul derecede etkili ancak uzun bir ilaç tedavisine rağmen, bu hastalık her yıl bir (1) milyondan fazla insan ölümüne yol açmaktadır. Doğru ve erişilebilir tanı araçları, daha kısa TB tedavisinin başlatılması ve daha etkili bir aşının tümü, TB'nin küresel yükünü azaltmaya yönelik önemli ilerleme kaydetmek için gereklidir (Hoft ve Abate, 2016).

Çok sayıda virülans faktörüne sahip bu etkenin patojenitesinde en önemli yapı hücre duvarı olup; mevcut antibiyotik rejimlerinin çoğunda bu yapının sentezinde rol oynayan enzimler hedef alınmaktadır (Abuhammad, 2017). Tüberküloz tedavisinde birinci basamak ilaçlar olarak "etambutol, izoniyazid, rifampisin ve pirazinamidden" oluşan antibiyotik kombinasyonları uzun yıllardır kullanılmaktadır (Dünya Sağlık Örgütü, 2018). Bu ilaçlar yarım asırdan daha fazla kullanıldığından dolayı, hedef enzimlerde veya ilaç aktivasyon yollarında mutasyonlar bulunan çoklu ilaca dirençli suşlar (MDR) gelişmiştir. Birinci basamak ilaçlara dirençli kökenlere karşı ikinci basamak ilaç (kinolon, kapreomisin, etionamid ve streptomisin gibi) kombinasyonları ile alternatif tedavi seçenekleri oluşturulmuştur (Dünya Sağlık Örgütü, 2012). Ne yazık ki, ikinci basamak ilaçlara da ek dirençli olan yaygın ilaç dirençli (XDR) suşların da ortaya çıkması tedaviyi daha zor hale getirmektedir (Dünya Sağlık Örgütü, 2012). Bu durum yeni etkili ilaçlar ve hedefler bulma çabalarının yoğunlaşmasına yol açmıştır. Mevcut ilaçların çoğu ve geliştirilmekte olan ilaçlar hücre duvarını hedeflemekte olup ilaç inhibisyonunun ve direncinin biyosentez yolları ve mekanizmalarının anlaşılması yeni ilaç araştırmaları ve geliştirilme çalışmaları için son derece önemlidir (Abuhammad, 2017; Dao ve ark., 2008; Fratti ve ark., 2001; Lopez-Marin, 2012).

Tüberküloz tipik olarak enfekte kişiden aerosol yoluyla yayılan bir akciğer hastalığıdır. Bakteri yeni bir konağın akciğerine girdiğinde; enfeksiyonun bağışıklık sistemi tarafından temizlenmesi, primer enfeksiyonun gelişmesi ve/veya enfeksiyon oluşumunun sonraki dönemlere ertelenmesi olmak üzere üç olasılık söz konusudur. Alveolar makrofajlar *Mtb*'in karşılaştığı ilk hücreler olduğundan, makrofajlarla in vitro çalışma, *Mtb*'in temel biyolojisini, patojenik mekanizmalarını ve makrofajın mikobakterisidal özelliklerini anlamak için vazgeçilmezdir (Lin ve Flynn, 2010).

Enfeksiyonda proenflamatuar ilişkili makrofajlar tarafından üretilen en önemli sitokinler arasında IL-6, IL-1β, IL-8, IL-10, IL-12, IL-27 ve TNF-α gibi pro- ve anti-enflamatuar sitokinler sayılabilir (Choi ve ark., 2019; Jang ve ark., 2021; Mondal ve ark., 2020; Paramita Pal ve ark., 2023). Bunun yanında CYP1A1, iNOS ve COX-2 gibi enflamatuar enzim genleri ve Egr-1 gibi transkripsiyon faktörleri de konak yanıtında önemli immün regülatör genleri olup tedavi bu genlerin ekspresyonlarının arttırılması ve/veya inhibe edilmesi doğrudan hastalığa verilen yanıtla ilişkilidir. Bu yanıt hastalığın ya da patojenin konaktaki progresyonunu etkilemektedir (Chen ve ark., 2025; Pan ve ark., 2022; Pang ve ark., 2023; Z. Wang ve ark., 2024; Wu ve ark., 2021). İdeal olarak mikroorganizma fagozolizozomal füzyonla inaktive edilmekte, parçalanmakta ve antijen sunan hücreler olarak makrofajlar tarafından *Mtb* peptid ve lipidlerin dönüşümü gerçekleşmektedir. Etkileşimlerin sonucunda spesifik bir adaptif bağışıklık tepkisi gelişmektedir. Bu nedenle *Mtb* ve makrofajlar arasındaki primer karşılaşma sonraki bağışıklık tepkisini belirlemektedir. Enfeksiyon sürecinde bağışıklık sistemi bakterinin granülomda tutulmasını ve/veya ortadan kaldırılmasını hedeflemektedir (Ottavi ve ark., 2022).

M.tuberculosis'in üretilmesi için en yaygın olarak tercih edilen hücre hatları insan veya hayvan orijinli monosit ve makrofaj (RAW 364.7, U937 ve THP-1 gibi) hücre hatlarıdır. Konak hücre; yüzey ve hücre içi tanıma reseptörleri aracılığıyla bir dizi *M. tuberculosis* ligandını tanımakta ve proenflamatuar sitokin yanıtını başlatmaktadır (Du ve Low, 2001; Keiser ve Purdy, 2017; Sada-Ovalle ve ark., 2018). TNF ve IFN'nin *Mtb*'e karşı bağışıklıktaki rolleri iyi tanımlanmıştır(Ren ve ark., 2021). Makrofajların *Mtb* ile enfeksiyonu sırasında IL-1β üretimi uyarılır (Stanley ve ark., 2007) .

M. tuberculosis glikolipidlerin makrofajlar ve diğer APC (antijen sunan hücreler)'ler tarafından T hücrelerine ve doğal öldürücü (NK) T hücrelerine spesifik sunumu, adaptif

bağışıklık sistemi tarafından tanınmanın kritik bir bileşenidir. Makrofaj *Mtb* enfeksiyonu bağlamında konak hücrede en çok çalışılan hücre tipi olmasına rağmen, mikroorganizmayı ortadan kaldırmak ve patojene sonraki maruziyetlere karşı bağışık kılmak için birden fazla hücre olaya dahil olmaktadır. Nötrofiller, epitel hücreleri, T hücreleri ve NK hücreleri dahil olmak üzere ilk enfeksiyon sırasında diğer hücre tipleriyle karşılaşmaktadır ((Eum ve ark., 2010; Orme ve Basaraba, 2014).

Çeşitli çalışmalarda in vitro kültür modelleri nötrofillerin mikobakterisid kapasitesi incelenmiş, bazı çalışmalarda opsonize *Mtb*'in yutulmayı takiben nötrofiller tarafından öldürülmediği gösterilmiştir (Corleis ve ark., 2012; DENIS, 1991). Bazı çalışmalarda ise nötrofillerin *Mtb*'i öldürdüğü veya *Mtb* replikasyonunu inhibe ettiği bildirilmiştir (Corleis ve ark., 2012). Literatürdeki çalışmalardan da anlaşılacağı gibi mikobakterilerin konakta infeksiyon oluşturma mekanizması, konak yanıtına gösterilen direnç ve tedavi zorlukları gibi sorunların tamamı moleküler mekanizmanın anlaşılmasından geçmektedir. Bu sebeple bu proje çalışmasında mikobakteriyel suş olarak kullanılacak olan *M. avium* kökeni ile enfekte edilen monosit hücre kültüründe ilaç varlığında/yokluğunda enflamatuar ve antienflamatuar sitokin davranışları incelenerek, böylece ilaç dirençli mikobakterilere karşı yeni ve aktif moleküllerin araştırılmasında ve değerlendirilmesinde bilimsel bir algoritma oluşturulması amaçlanmıştır. Ayrıca bu çalışmada özellikle son yıllarda artan tüberküloz ilaç direnci sebebiyle immün regülasyonda rol oynayabileceği çeşitli çalışmalarda bildirilen bazı fitokimyasalların (likopen, linalool, rosmarinik asit, rosuvastatin ve oleik asit) immün regülasyondaki etkinliklerinin moleküler mekanizmasının izah edilmesi de amaçlanmıştır. Buradaki amaç enfekte konakta patojenin granülomlar oluşturularak hapsedilmesi, granülomlarda yok edilmesi veya granülomlarda çoğalarak akut enfeksiyonun oluşması proseslerinde immün regülasyondaki etkinliklerinin araştırılmasıdır. Bu amaçla *M. avium* standart suşu ile enfekte edilen RAW 264.7 makrofaj hücre hattında Likopen (LİK), Linalool (LİN), Rosmarinik Asit (RA), Rosuvastatin (RS) ve Oleik Asit (OA)'in *M. avium*'un replikasyonu ve ilaç etkinlikleri üzerindeki olası etkinlikleri ile kombine kullanımlarında adaptif ya da sinerjistik etkinliklerinin varlığı da araştırılmıştır.

Biz bu çalışmada mikobakterilerin konak hücreyi enfekte etme sürecinde rol oynayan bazı proenflamatuar [IL-6, CXCL1 (IL-8), IL-1β, TNF-α ve IL-12 (P40)] ve antienflamatuar (IL-10, IL-27) sitokin genleriyle, enflamatuar süreçlerde önemli rol oynayan enzim genleri (CYP1A1,

COX-2 ve iNOS)'nin ile gen ekspresyonlarında bir transkripsiyon faktörü olarak görev yapan Egr-1 geninin ekspresyon seviyelerini belirlemeyi, böylece ilaç etki mekanizmasını izah etmeyi amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 *Mycobacterium tuberculosis* ve Tüberküloz Enfeksiyonu

Tüberküloz hastalığı en az insanlık tarihi kadar eski, tarih boyunca varlığını sürdüren ve dünyada hala önemli bir sağlık sorunu oluşturan ciddi bir enfeksiyon hastalığıdır. Binlerce yıl öncesinden kalan Mısır mumyalarında *Mycobacterium tuberculosis* izlerine rastlandığı bildirilmiştir. Son yıllarda yapılan moleküler genetik çalışmalar *Mtb*'nin milyonlarca yıl önce evrimsel bir kökene sahip olabileceğini göstermiştir (Cristina ve ark., 2005).

Mikobakteriler, konak fizyolojisini etkileyebilecek yağlar ve glikolipidler salgılayarak diğer bakterilerle benzer özellikler gösterebilir. Mikobakteriyel lipidler ve glikanlar, hücre duvarının dayanıklılığını arttırırken, konak savunma mekanizmalarına karşı aşılması zor bir bariyer oluşturur. Bu lipidler arasında en dikkat çekici olanlardan biri mikolik asitlerdir. Mikolik asitler, 60-90 karbon uzunluğundaki zincirlerden oluşan yağ asitleridir ve mikobakterilerin dış zarında bulunurlar. Bu yapılar, arabinogalaktan tabakasına bağlı şekilde veya kapsül içerisinde serbest halde yer alabilir. Hücre duvarının bu yüksek lipid içeriği sayesinde, mikobakteriler "mikomembran" adı verilen özel bir yapı ile karakterize edilir (Ojha ve ark., 2008). Mikobakterilerin hücre duvarı; yavaş üreme hızları, deterjanlara ve yaygın antibiyotiklere karşı direnç, konak bağışıklık sistemine karşı koyma yeteneği ve antijenik özellikler gibi karakteristik özelliklerin temelini oluşturur. Ayrıca, karmaşık lipid tabakası nedeniyle klasik anilin bazlı boyaların hücre içine geçişi zorlaşır. Bu nedenle mikobakterilerin "Gram Boyama" yöntemiyle görünür hale getirilmesi güçtür (Kremer ve Besra, 2004). Hücre duvarı yapıları, bakterilerin aside ve alkole karşı dirençli olmasını sağlar. Bu yüzden mikobakteriler "aside-alkole dirençli" bakteriler olarak sınıflandırılır. Mikobakteriler; çomak şekilli, aerobik ve spor oluşturmayan bakterilerdir. *M. leprae* dışında çoğu mikobakteri türü, yumurta sarısı veya oleik asit gibi yağ asitlerinden zengin besiyerlerinde kolaylıkla üreyebilir. Üreme için gerekli optimum sıcaklık ise türe bağlı olarak 30°C ile 45°C arasında değişiklik gösterebilir (Brown-Elliott ve Wallace, 2015; Heifets ve Desmond, 2004).

Günümüzde 200'den fazla mikobakteri türü tanımlanmıştır ve bunların büyük bir kısmı saprofit olarak yaşamlarını sürdürür. *M. tuberculosis* pulmoner akciğer tüberkülozuna

yol açan *Mtb* kompleksinin bir üyesi olup bu kompleks içinde benzer klinik tablo oluşturan *Mtb* dışında *M. bovis, M.africanum, M. microti, M. pinnipedii, M. caprae* ve *M. canetti* türleri de yer almaktadır. Bu türlerin tamamı patojenik suşlar olarak akciğer tüberkülozuna yol açmakta ve birbirleri ile genetik yakınlık içindedir. Sözgelimi *M. tuberculosis* ve *M. bovis* arasında yalnızca %0.05'ten daha az düşük genetik farklılık olduğu bildirilmiştir. *M. bovis* major olarak sığırlarda tüberküloza yol açsa da insanlar ve diğer memeli türlerde de benzer klinik tablo oluşturabilmektedir (K. A. Cohen ve ark., 2019; Garnier ve ark., 2003). *M. leprae*, ciltte lezyonlarla kendini gösteren kronik granülomatöz bir hastalığa neden olurken, *M. ulcerans* ise kısa sürede ilerleyen ülsere lezyonlarla karakterize nekrotizan cilt ve yumuşak doku enfeksiyonlarına yol açar. *M. avium* ve diğer tüberküloz dışı mikobakteriler (TDM), özellikle bağışıklık sistemi baskılanmış bireylerde hastalığa sebep olabilir. Bu türler, genellikle akut immün yetmezlik sendromu (AIDS) hastalarında enfeksiyon etkeni olarak ortaya çıkar. Diğer birçok TDM'ler ise insanlarda nadiren hastalık oluşturur (Mcnabe ve ark., 2011).

M. tuberculosis'nin Robert Koch tarafından 1882 yılında ilk kez tanımlanmasından bu yana, önlenmesi ve tedavisinde önemli ilerlemeler kaydedilmiştir. Bacillus Calmette-Guérin (BCG) aşısının ortaya çıkması ve streptomisinin tanıtılması, TB enfeksiyonunun önlenmesi ve kemoterapisinde yeni bir dönemi başlatarak TB kontrolünün manzarasını kökten değiştirmiştir (Bloom, 2023; Cambau ve Drancourt, 2014). Bu gelişmeler, mevcut standart 6 aylık tedavi rejiminin temelini oluşturan kombinasyon tedavi stratejilerinin geliştirilmesine yol açmıştır (Nahid ve ark., 2019). Önemli bir halk sağlığı problemi olup dünyada oldukça yaygın enfeksiyonlardan biri olan TB günümüzde dünyanın gündemine yeniden alınmasındaki iki önemli faktörden birincisi *Mtb* suşlarının en etkili (birinci basamak) anti-TB ilaçlarına karşı artan direnç ikincisi ise HIV enfeksiyonu başta olmak üzere immünsupresif konaklarda hastalık tablosunun yaygın olarak oluşmasıdır (Dünya Sağlık Örgütü, 2018). Hastalığın son yıllarda ciddi oranlarda artış göstermesinin sebepleri arasında ise dünyanın artan nüfusu, az gelişmiş ya da yoksul ülkelerde vaka tespit sisteminin zayıflığı ya da hiç olmayışı olarak belirtilmektedir. Ayrıca, tespit edilen vakaların tedavi sürecine düzenli uyum sağlamaması, savaşlar veya kıtlık nedeniyle yüksek endemik ülkelerden göç, fakirlik, evsizlik, kalabalık kamu alanlarında aktif bulaş ve uyuşturucu bağımlılığı gibi çok çeşitli sebepler enfeksiyonun yayılmasında önemli faktörler arasındadır.

Bulaşta toplum için en önemli yayıcılar ise özellikle balgamda aside dirençli basiller taşıyıp basil çıkaran hastalardır (Ahmad, 2011).

M. tuberculosis bulaşında insanların yaklaşık %10'unda klinik tablo ortaya çıkmaktadır. Enfekte bireylerin büyük kısmında immün sistemleri TB basillerinin yayılmasını engelleyerek bakterinin çoğalmasını inhibe eder. Enfekte bireylerin ise sadece yaklaşık %10 kadarında tamamen temizlenme görülür. Primer enfeksiyon meydana gelmeyen konakların yaklaşık %90'ında ise immün yanıt enfeksiyonu kontrol altında tutmaktadır. Kontrol altında tutulan bu basillerin bağışıklık hücrelerinin öldürücü mekanizmalarından (fagozom-lizozom füzyonu, MHC sınıf I ve II molekülleriyle antijen sunumu, nitrik oksit üretimi gibi) kaçmayı başarabilmesi dormant kalması ya da latent enfeksiyon oluşturması ile ilişkilidir**.** İlerleyen dönemde konakta dormant dönemdeki basiller; bir enfeksiyon metabolik hastalık veya ileri yaşlanma gibi immün yanıtın bozulduğu durumlarda reaktive olabilmekte ve aktif tüberküloz hastalığını oluşturabilmektedir (Ahmad, 2011; Dye ve ark., 1999).

Dünya Sağlık Örgütü'nün verilerine göre dünya geneli nüfusunun yaklaşık 1/3'ünün basille enfekte olduğu bu enfekte konakların yaklaşık %5-10 kadarının yaşamları boyunca aktif tüberküloz hastalığına yakalandığı tahmin edilmektedir. Bu durum AIDS sendromu gelişen HIV pozitif hastalarda hastalığı geliştirme oranının %50'lere kadar çıktığı bildirilmiştir (Dünya Sağlık Örgütü, 2019).

TB esas olarak bir akciğer hastalığı olup dissemine hastalık tablosu ciddi tablolar oluşturmaktadır. Enfeksiyon sırasında *Mtb* ile akciğer bağışıklık hücreleri arasında primer etkileşim gerçekleşir. *M. tuberculosis* başlangıçta alveolar makrofajları ve daha sonra ise yeni oluşan interstisyel makrofajları enfekte eder (Fend ve ark., 2007; Smith ve ark., 2004). Bunun yanında *Mtb*; dentritik hücreler (DC), nötrofiller ve solunum epitel hücreleri, fibroblastlar, lenfatik endotel hücreleri, adipositler ve hematopoetik kök hücreler gibi miyeloid olmayan hücreler dahil olmak üzere bir dizi hücreyi de enfekte edebilmektedir. Mikroroganizmanın hücre dışı kalıcılık süresi bilinmese de canlılığını sürdürebilmektedir. *M. tuberculosis*'nin konak hücre ile olan etkileşimi hastalığın progresyonunda oldukça önemlidir (Cardona, 2007; Cardona, 2009).

2.2 *Mycobacterium tuberculosis*-Makrofaj İlişkisi

İnhale edilen *Mycobacterium tuberculosis*, spesifik fagositik ve patern tanıma reseptörleri (PRR) aracılığıyla alveolar makrofajlar (AM) tarafından fagosite edilerek akciğer distal hava yollarına gider (Lin ve Flynn, 2010; Simmons ve ark., 2018). *M. tuberculosis* ile enfekte olmuş AM'ler ve DC'ler, enfeksiyonun erken aşamalarında rol oynayarak adaptif immün yanıtı başlatırlar. Enfekte olan alveolar makrofajlar, alveolar keseden interstisyel boşluğa göç ederek yerleşmenin yanısıra DC'lerle birlikte akciğerden drene olan lenf nodlarına göç eder ve burada T ve B hücrelerini hazırlayarak aktive eder, böylece enfeksiyonun ilerlemesini sınırlamaya yardımcı olabilirler (Shaler ve ark., 2012). Göç eden makrofajlar, ilk aşamada fagositozdan kaçışta başarılı olan *Mtb*'ler hücreler tarafından fagosite edilmesi sonucu immün hafıza oluşabilir (Cohen ve ark., 2022; Cronan, 2022).

Granülom oluşma mekanizmasında ise mikroorganizmanın fagositozdan kaçış sonrası makrofajlar diğer immün sistem hücrelerinin akciğer göçü için bir sinyal akışı oluşturmaktadır. Bu süreçte akciğere ulaşan immün hücreler enfeksiyon bölgesini çevreler ve makrofajlar dahil olmak üzere çoklu hücre tiplerinden oluşan karakteristik tüberküloz granülom oluşumu gerçekleşir (Mcnabe ve ark., 2011). Alveolar makrofaj granülomu birçok farklı şekilde olabilir, ancak genellikle küresel bir yapı halinde organize olmuş makrofajlar ve lenfositlerden oluşur. Klasik kazeöz granülom, makrofaj katmanlarıyla çevrili, merkezi nekrotik bir alandan oluşur ve bu alan daha küçük bir lenfosit şeritleriyle çevrilidir. Lenfositik şerit hem CD4+ hem de CD8+ T hücreleri içerebilir, ancak plazma hücreleri de dahil olmak üzere B hücreleri de belirgindir. Granülomlarda nötrofiller, DC ve fibroblastlar dahil olmak üzere çok sayıda başka hücre tipi de bulunabilir (Fallahi-Sichani ve ark., 2013).

Konakçı merkezli bakış açısına göre granülomun rolü enfeksiyonu kontrol altına almak, basilleri yok etmek ve enfeksiyonun patolojisini sınırlamaktır. Granülomun hastalığa karşı etkili bir bariyer olabilmesi, yani konağın basili tamamen ortadan kaldırmasına ya da latent enfeksiyon olarak kalmasını sağlayacak şekilde bakteriyel replikasyon üzerinde yeterli kontrolü sürdürmesine izin vermesi için yeterli şekilde işlev görmesi önemlidir. Mikobakteri merkezli bakış açısından granülom ise *Mtb* granülom içinde yıllarca varlığını sürdürecek şekilde evrimleşmiştir ve ilk enfeksiyondan onlarca yıl sonra reaktivasyon TB'sine neden olabilir. Dolayısıyla granülom, basil için bir hayatta kalma stratejisidir. Ayrıca granülomun

neden olduğu patoloji, enfeksiyonun yeni bir konağa etkili bir şekilde aktarılması için gereklidir. Dolayısıyla granülom, hem konağın savunma mekanizması hem de TBC enfeksiyonu için kritik rol üstlenmektedir (Mohammad Fallahi-Sichani, 2013).

Alveolar makrofajlar, mikrobiyal eliminasyonu artıran belirli bir PRR alt grubunun yüksek ekspresyonuna sahiptir. Bununla birlikte, proenflamatuar aracılı mikrobiyal inaktivasyonun azaldığı ve inflamasyonun düzenlendiği bir programla alternatif olarak aktive edilmiş hücreler olarak tanımlanır. *M. tuberculosis*'in makrofajlar tarafından tanınması için önemli olan iki PRR; Toll-like reseptörleri **(**TLR) ve mannoz reseptörüdür (MR). TLR'leri patojenlerin yüzeyinde eksprese edilen hücre duvarının herhangi bir komponenti veya patojen nükleik asit gibi molekülleri tanıyarak hücrede birtakım sinyal yolu başlatmaktadır. Bu sinyaller genellikle enflamatuar yanıtı tetikleyerek makrofajları uyarmaktadır. TRL'ler aracılığıyla aktive olan makrofajlar metabolik yolunu değiştirerek glikoliz ile daha hızlı enerji üretim yollarını aktive etmekle görevli iken MR'ler ise bağışıklık tepkisinin dengelenmesinde görev alır (Sada-Ovalle ve ark., 2018; Shi ve ark., 2005).

M. tuberculosis'in patojenitesi konak makrofajları üzerindeki etkisi oldukça komplike bir süreç olup birçok faktör bu süreci modüle etme yeteneğini etkilemektedir. *Mtb* enfeksiyonu sırasında, makrofajların metabolik fenotipi ve tepkisi, enfekte olan bakteri suşuna, makrofajların üzerinde bulunan çeşitli sinyal yollarına ve bağışıklık yanıtının yönlendirilmesine bağlı olarak değişmektedir (Dmitriev ve ark., 2000; Jankute ve ark., 2015; Minnikin ve ark., 2015; Zuber ve ark., 2008). Bir makrofaj mikroorganizma tarafından enfekte edildiğinde, makrofaj cevabını belirleyen farklı transkripsiyonel programlar tetiklenebilmektedir. Maruz kaldıkları uyarana bağlı olarak, makrofajlar klasik olarak aktive edilmiş proenflamatuar M1 fenotipine, ve/veya alternatif olarak aktive edilmiş immün modülatör M2 fenotip makrofajlara veya bu iki aktivasyon durumu arasındaki spektrumda polarize olabilmektedir (Corleis ve ark., 2012; Minnikin ve ark., 2015). M1 makrofajları hızlı fakat daha az verimli bir enerji üretim yolu olan glikoliz yolunu kullanmakta olup hızla enerji üretir. Bu makrofajlar glikolizi tetikleyen İnterlökin-1β (IL), IL-6, IL-8, IL-12 ve Tümör Nekroz Faktör-α (TNF-α) gibi önemli proenflamatuar sitokinlerin üretimine yol açar, reaktif oksijen türlerinin (ROS), nitrik oksit (NO) ve prostaglandinin üretimi için gerekli olan metabolik ara maddelerin birikimini sağlamaktadır (Etna ve ark., 2014; Ottenhoff, 2012). Konak immünitesinde enflamatuar sitokin artışı patojen öldürme mekanizmasının

güçlü çalıştığının göstergesidir. Ayrıca, konakta glutamin gibi bazı protein varlığında glikoliz yolunun tetiklenmesi söz konusu olup daha güçlü enflamatuar yanıt oluşmasına yol açmaktadır (Paramita Pal ve ark., 2023; Ren ve ark., 2021). Makrofajlar M2 fenotipinde immün hücreler tipik olarak non-aktif durumdayken primer enerji kaynağı olarak oksidatif fosforilasyonu (OXPHOS) kullanır (Orme ve Basaraba, 2014; Rieder, 2001). OXPHOS bu durumdaki makrofajların enerji ihtiyacını karşılamaya yetmektedir. Bu durumda oksijen kullanımı ve neticesinde mitokondriyal ATP üretimi ile ilişkili durum söz konusudur. Ayrıca M2 makrofajlar yağ asidi oksidasyonunu kullanmayı sağlamakta ve IL-10 gibi antienflamatuar sitokinler üretmektedir (Fend ve ark., 2007; Vallejo ve ark., 2017). M2 makrofajlar OXPHOS yoluyla mitokondriyal enerji üretimini kullanarak enerji ihtiyaçlarını karşılayabilse de bu durum makrofajların enflamatuar yanıt için gereken hızda enerji üretimi mümkün olamamaktadır (Yang ve ark., 2024).

Makrofajların aktivasyonu sırasında enerji metabolizmasındaki değişiklikler, bağışıklık yanıtının etkinliğini belirleyen kritik bir süreçtir. Makrofajlar**,** enflamatuar uyaranlara ve patojenlere karşı tepki verirken, hücrenin ihtiyaçlarına göre metabolik yollarını yeniden düzenlerler. Bu süreç, makrofajların etkin bir şekilde bağışıklık görevlerini yerine getirebilmeleri için gereklidir. Özellikle, enerji metabolizmasındaki değişiklikler makrofajların patojenlere karşı etkili bir şekilde savaşmasını sağlamak ve iltihaplanma yanıtlarını modüle etmek için kritik rol oynar. Makrofajlar bu krıtik rol ile başa çıkmak için "warburg etkisi" denen bir mekanizma sayesinde glikoliz yoluyla enerji üretmeye başlamaktadır. Glikoliz oksijen gerektirmeyen bir süreç olup, hızlı ATP üretimini sağlar ve bu da makrofajların hızlıca etkili bir şekilde inflamasyon yanıtı oluşturmasını sağlamaktadır (Abdalla ve ark., 2015).

İdeal olarak, bakteriler fagozomizozomal füzyon üzerine öldürülür ve parçalanır ve antijen sunan hücreler olarak makrofajlar *M. tuberculosis* peptitlerini ve lipid antijenlerini sunar ve sonuçta oldukça spesifik bir adaptif bağışıklık tepkisine yol açar. Bu nedenle, *Mtb* ve makrofajlar arasındaki birincil karşılaşma, sonraki bağışıklık tepkisini belirler. Tüberküloz enfeksiyonunda bu bağışıklık tepkisi, bakterinin granülomda tutulmasına ve nihai olarak ortadan kaldırılmasına odaklanır (Scriba ve ark., 2017).

Son yıllarda yapılan çalışmalar *Mtb*'nin bazı ilaca dirençli suşlarının immün yanıtını modüle ettiğini göstermiştir. İlaca dirençli *Mtb* türlerinin artarak ortaya çıkması küresel TB

yoğunluğunu azaltma çabalarını ciddi olarak sınırlamaktadır (Dünya Sağlık Örgütü, 2023). *Mtb*'nin ilaca direnç kazanması, bu bakterinin konakçıda yarattığı patolojik süreci değiştirmekte ve bu da konak immün hücrelerinin yanı sıra mikroorganizmanın metabolik yolaklarını da etkileyebilmektedir (Dmitriev ve ark., 2000; Jankute ve ark., 2015; Minnikin ve ark., 2015; Z. Yang ve ark., 2024; Zuber ve ark., 2008).

2.3 . Anti Tüberküloz İlaçlar

2.3.1. Rifampisin

Anti tüberküloz ilaçların başında gelen rifampisin, lipofilik yapısı sayesinde mikobakteri hücre duvarını kolaylıkla geçebilir. Bu etkiyi, *rpoB* geni tarafından kodlanan DNA bağımlı RNA polimeraz beta alt ünitesine bağlanarak gösterir (E. A. Campbell ve ark., 2001). Dünya genelinde antibiyotik direncine bağlı ölümlerin yaklaşık 1:4, rifampisine dirençli *M. tuberculosis* suşları tarafından oluşturulan tüberküloz nedeniyle meydana gelmektedir. *rpoB* genindeki mutasyonlar, RNA polimeraz beta alt ünitesinin rifampisinin bağlanma afinitesini değiştiren yapısal değişikliklere yol açar. Bu değişiklik sonucunda, düzgün bağlanamayan rifampisin, etkisiz hale gelir (Swain ve ark., 2020). Rifampisin dirençli suşların yaklaşık %90-95'inde *rpoB* geninde mutasyonlar gözlemlenmiştir (Campbell ve ark., 2011; Jagielski ve ark., 2018). Ancak, *M. tuberculosis*'in yaklaşık %5'inde, Rifampisin dirençli suşlarda direnç mekanizması bilinmemektedir. Bu durum, hücre duvarı geçirgenliğinin azaltılması ya da pompalama sistemi (efflux) aktivitesi gibi alternatif direnç mekanizmalarının varlığına işaret edebilir (Louw ve ark., 2009). Ayrıca, bazı fenotiplerin rifampisin duyarlı olmasına rağmen, *rpoB* gen mutasyonlarına sahip olduğu çalışmalar sonucunda bildirilmiştir (Berrada ve ark., 2016; Jamieson ve ark., 2014).

2.3.2. İzoniyazid

İlk kez 1952 yılında tüberküloz tedavisinde kullanılan izoniyazid, diğer mikobakterilere karşı genellikle etkili olmasada, *M. tuberculosis*'in neden olduğu tüberkülozun tedavisinde oldukça etkili ve bakterisidal bir ilaçtır. İzoniyazid yalnızca replikasyon sırasında aktif olur ve bu nedenle oksijene bağımlıdır. Diğer anti tüberküloz ilaçlarına göre daha az toksik olup, teorik olarak tüm vahşi tip *M. tuberculosis* suşlarına karşı etkilidir. *katG* geninin kodladığı katalaz-peroksidaz enzimi, izoniyazidin oksidasyonu ile

mikolik asit sentezinin inhibe olmasını sağlayarak bakterinin hücre dayanıklılığını azaltır (Chopra ve Brennan, 1998; Dutta ve Karakousis, 2017). İzoniyazid direncinin başlıca nedenleri, katG ve inhA genlerinde meydana gelen mutasyonlarıdır (Sreevatsan ve ark., 1997). İzoniyazidin yan etkileri arasında yaşa bağlı hepatit, nadiren periferik nöropat, ateş, döküntü ve artralji gibi hipersensitivite reaksiyonları yer almaktadır (Brown-Elliott ve Wallace, 2015).

2.4 Fitokimyasallar

2.4.1 Likopen

Meyve ve sebzeler iki temel metabolit içerir. Primer metabolitler; bitkinin büyümesi ve gelişmesi ile doğrudan ilişkili olan organik bileşikler iken sekonder metabolitler ise bitkilerin üremesinde, pigmentasyonunda önemli rol oynayan bileşiklerdir. Ayrıca insanlar sekonder metabolitleri koku, boya ve hatta biyolojik ve tıbbi amaçlar gibi çeşitli amaçlar için de kullanmaktadırlar (Roy ve ark., 2017; Verpoorte ve Memelink, 2002)**.**

Özellikle iki binli yıllardan sonra metabolitlerin faydaları üzerinde yapılan çalışmalarda bir artış görülmekte olup bu bileşiklerin temel işlevleri üzerine odaklanılmıştır. Farmakolojik etkinliklere sahip olan sekonder metabolitlerin fenolik bileşikler, terpenler ve steroidler-alkaloidler olmak üzere üç ana bileşik grubunda bulunduğu bildirilmiştir (Bourgaud ve ark., 2001). Terpenoidler ailesine ait olan karotenoidler sekonder metabolitlerin önemli bir grubudur. Bu tetraterpenoidlerin biyosentezi izopentenil difosfat oluşumuyla başlayıp ve ardından çeşitli reaksiyonlar (desatürasyon, izomerizasyon, siklizasyon, oksijen vs.) ve çeşitli karotenoid türlerinin oluşumuna yol açmaktadır (Fraser ve Bramley, 2004; Rodriguez-Amaya, 2016).

Karotenoidler gıda endüstrisinde, kozmetikte ve ilaç endüstrisinde giderek artan bir kullanım alanı bulmaktadırlar. Gıda endüstrisinde, memnuniyeti arttırmak ve tüketicileri cezbetmek amacıyla, karotenoidler gıda maddelerine rengi iyileştirmek ve görsel algıyı arttırmak için eklenmektedir. (Ramesh ve Muthuraman, 2018).

2.4.1.1 Likopenin Kimyasal Yapısı

Günümüze kadar bitki ve organizmalarda 600'den fazla karotenoid karakterize edilmiştir. Bununla birlikte, çoğunlukla bitki kaynaklı, yağda çözünen likopen, lutein, β-karoten, α-karoten ve kriptoksantin dahil olmak üzere sadece 5 ana tip insan plazmasında bulunur (Chidambara Murthy ve ark., 2019). Bileşiklerin kimyasal yapısı renk özelliklerini, antioksidan aktivitelerini ve hastalıklara karşı biyolojik aktivitelerini etkilemektedir (Rao ve Rao, 2007). Karotenoidler, meyve ve sebzelerin renklenmesine katkıda bulunan bu bileşikler arasındadır. Likopen, diğer karotenoidlere benzer şekilde, esas olarak bitkiler tarafından sentezlenen doğal bir pigmenttir. Pembeden kırmızıya kadar değişen bir renk verebilir. Likopenin meyve ve sebzelerin rengine katkısının yanı sıra, fotosentez sırasında ışığı absorbe etme ve sonuç olarak bitkileri ışığa karşı koruma rolü olduğu bilinmektedir (Chidambara Murthy ve ark., 2019).

İnsan plazması likopen izomerlerinin bir karışımını içerir, toplam likopenin %50'si cis formudur. Ayrıca, son yıllarda insan plazmasında apolikopenoitler (likopenin bölünme ürünleri) tespit edilmiştir (Rao ve Rao, 2007). Likopenin ana besin kaynakları meyve ve sebzeler, ağırlıklı olarak taze domates ve ketçap gibi domatesle işlenmiş ürünlerdir. Bununla birlikte, karpuz, greyfurt gibi kırmızı meyveler ve hatta deniz ürünleri de kaynaktır, ancak domates ve ürünleriyle kıyaslandığında seviyesi oldukça düşüktür. Ayrıca kırmızı havuç, acı kavun, kuşburnu ve güz zeytini gibi diğer yeni kaynaklar da likopenin ana kaynakları arasında bildirilmiştir. Sonbahar zeytinlerinin taze meyveleri, domates ve ürünlerine kıyasla 5 ila 20 kat arasında değişen likopen içeriğine sahiptir (Cámara ve ark., 2013; Gerster, 1997)

Likopen içeriği meyve çeşidi, olgunluk derecesi, çevresel koşullar (ışık, sulama, sıcaklık, iklim, dikim yeri), depolama ve işleme koşulları gibi çeşitli faktörlerden etkilenmektedir. Meyve olgunlaşması sırasında toplam klorofil seviyeleri azalarak kaybolurken, likopen seviyeleri artar. Hatta, domates üzerindeki bazı ışıkların (kırmızı, mavi) meyvelerde likopen sentezini teşvik etmektedir. Ayrıca, ışık ve oksijen likopen içeren ürünlerin işlenmesi ve depolanması sırasında önemli etki faktörleri arasındadır (Cámara ve ark., 2013; Fordham ve ark., 2003; Przybylska, 2020).

Likopen insan vücudunda sentezlenmez. Gıdaların alınmasından ve duodenumda salınmasından sonra, likopen, diğer karotenoidlere benzer şekilde, yağ asitleri ve safra

asitleri ile kompleks halinde birleştirilir. Sonuç olarak likopen içeren miseller oluşmuştur (Fordham ve ark., 2003; Sandei, 2018). Bu miseller, hidrofobik çekirdeğin likopen içerdiği hidrofilik yapıdaki kabuklardan oluşur. Bundan sonra, likopen pasif kontrollü difüzyon yoluyla ince bağırsakta emilir ve paketlenir. Ardından, lenfatik sisteme ve kan dolaşımına salgılanır ve son olarak karaciğer ve vücut organlarına iletilir. Likopenin adrenal bezlerde, testislerde ve prostatta yüksek seviyelerde bulunan karotenoidler arasında yer aldığı bilinmektedir (Duquette ve ark., 2014; Sandei, 2018).

2.4.1.2 Farmakolojik Özellikler

Genellikle bitkisel kaynaklı besinler antioksidan maddeler (askorbik asit, α-tokoferol ve karotenoidler gibi) için önemli bir kaynaktır. Karotenoidlerdeki polien omurgasında çift bağların varlığı ile karakterize edilen ışık emme kapasitesi. Ayrıca bitkilerdeki oksidatif stresi azaltmak için önemli bir antioksidan olup bu etkiler, bu bileşikleri tüketen insanlarda ve hayvanlarda da görülür (Arnao ve ark., 2001). Son zamanlarda, likopenin antioksidan aktivitesi ile hastalıkları azaltmadaki katkısı arasındaki ilişki belirgin bir şekilde araştırılmıştır. Likopen takviyesinin hemodiyaliz hastalarında oksidatif stresi azaltmaya yardımcı olabileceğini gösterilmiştir (Arain ve ark., 2017; Stahl ve Sies, 2003).

Likopen kaynakları gıda endüstrisinin yanı sıra, tıpta, kozmetikte ve diğer alanlarda yaygın olarak kullanılmaktadır. Birçok çalışma likopenin kardiyovasküler ve nörolojik hastalıklar, prostat ve cilt kanserleri ve diyabet gibi hastalıklara karşı koruyucu etkileri bildirilmiştir (XIE ve ark., 2019). Kardiyovasküler hastalıklar dünya çapında önemli morbidite ve mortalite nedenlerindendir. Bu hastalıkların etiyolojisinde başta oksidatif stres ve inflamasyon olmak üzere çeşitli faktörler rol oynar. Damarlardaki düşük yoğunluklu lipoproteinlerin oksidasyonu aterosklerotik lezyonlar geliştirebilir. Karotenoidler gibi diyet antioksidanları oksidasyon ve inflamasyona karşı önemli etkiler sergilemektedir bu nedenle kardiyovasküler sağlık risklerinin azaltılmasında kilit rol oynarlar (Gammone ve ark., 2015; Pietro ve ark., 2016).

Domates ve domates bazlı ürünler gibi likopen bakımından zengin ürünlerin tüketimi kanser riskini azaltmakla ilişkilendirilmektedir. Likopen alımının prostat kanserini azalttığına dair net kanıtlar gösterilmiştir ve sık tüketimi önerilmektedir. Yapılan bir çalışmada farklı dozlarda likopenin terapötik etkilerini ve prostat kanserini inhibe etme

kapasitesini incelemişlerdir. Likopen tedavisinin prostat kanserinin ilerlemesini azalttığı ve enflamatuar tepkileri bastırdığı açıkça görülmüştür. Potansiyel terapötik katkısı dozlara ve tedavi süresine bağlıdır. Genel olarak, likopen, kimyasal tedavilerin yerini alabilecek anti-kanser ve antienflamatuar özelliklere sahip ve ayrıca herhangi bir yan etkisi olmayan umut verici terapötik diyet ajanı olarak kabul edilmektedir (Jiang ve ark., 2019; Kelkel ve ark., 2011).

Likopen kullanımının cilt kanseri oluşma riski ile ters bir korelasyonun olduğu da bildirilmiştir. Karotenoidler ciltte ışık filtresi görevi görerek ışığa maruz kalmayı azaltmakta ve oksidatif stresi önlemeye yardımcı olmaktadır. Çalışmalarda ultraviyole (UV) ışınlarının ışığa duyarlılık, fotoyaşlanma, eriteme yol açabileceği ve UV radyasyonuna maruzitin oksijen, hidroksil ve diğer serbest radikallerin oluşumunu indüklediği dolayısıyla da kanser gelişimine yatkınlık oluşturduğu bildirilmektedir. Karotenoidler veya da spesifik olarak likopen UV ile indüklenen bu oksidatif bileşiklerin etkisini söndürülmesinde rol oynamaktadır (Gerster, 1997; Stahl ve Sies, 2003).

Karotenoid bileşiklerinden biri olan likopenin, güçlü antioksidan ve antibakteriyel özellikleri sayesinde kalp-damar hastalıkları, nörolojik bozukluklar, diyabet ve prostat kanseri gibi birçok hastalığın oluşumunun önlenmesinde önemli bir rol oynadığı bildirilmiştir. Domates ve karpuz gibi bazı meyve ve sebzeler, önemli likopen kaynakları olup, lipofilik yapısıyla gıdalardan doğrudan alınabileceği gibi gıda takviyesi olarak da tüketilebilmektedir. Bu nedenle, likopen açısından zengin besinlerin düzenli tüketimi, insan sağlığının korunmasında büyük önem taşımaktadır.(Caseiro ve ark., 2020).

Likopenin modifiye LDL'ye yanıt olarak makrofaj hücre oluşumunu azalttığı ve bu etkinin, hücrelerdeki lipid sentezini baskılayarak ekspresyonu aşağı yönde düzenleyerek gerçekleştiği bildirilmiştir. Ayrıca, likopenin oksisterol kaynaklı proenflamatuar sitokin üretimini hem protein hem de mRNA seviyelerinde engelleyebilme mekanizması, nikotinamid adenin dinükleotid fosfat oksidazın inhibisyonu, ROS üretiminin azalması ve NF-κB aktivasyonunun inhibisyonu gibi bir redoks mekanizmasını içermektedir (Napolitano ve ark., 2007).

Wenli ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada, insan dokularında likopenin (ve izomerik formlarının), diğer antioksidan maddelere kıyasla daha yüksek bir antioksidan

kapasiteye sahip olduğu gösterilmiştir (Cámara ve ark., 2013). Bohm ve arkadaşları likopenin, diğer karotenoidlere kıyasla daha yüksek antioksidan kapasite değerlerine sahip olduğunu rapor etmiştir (Bohm ve ark., 2002).Vivekananthan ve arkadaşları, domates ve domates ürünlerinin yüksek alımının LDL kolesterol seviyelerini azaltarak, LDL oksidasyonuna karşı direnci artırarak ve lipid peroksidasyonunu önleyerek kardiyovasküler hastalıklara karşı koruyucu etkiler gösterdiğini bildirmiştir (Vivekananthan ve ark., 2003). Palozza ve arkadaşları, likopenin insan monosit makrofaj hücre hattında yaptığı çalışmasında kolesterol akışını teşvik ettiğini gözlemlediğini bildirmiştir (Palozza ve ark., 2010).

2.4.2 Linalool

Linalool ($C_{10}H_{18}O$), çeşitli bitki türlerinin uçucu yağlarında bulunan asiklik bir monoterpen tersiyer alkoldür. Linalool, dünya çapında yaygın olarak 200'den fazla tek çenekli ve çift çenekli bitki türünün uçucu yağlarında bulunabilir. Esas olarak Lamiaceae (Lavandula cinsi), Lauraceae (Cinnamomum cinsi) ve Apiaceae'de (Coriandrum cinsi)'da bulunur. Bitki türlerinin bileşiminde linaloolün baskınlığı bitkinin organı, hasat zamanı, iklim, ekstraksiyon yöntemi ve bitki türleri gibi çok çeşitli faktörlere göre değişebilir. Oda sıcaklığında, Linalool renksiz veya hafif sarımsı sıvı aromatik bir bileşiktir. Bu asiklik monoterpen, bergamot yağı veya Fransız lavantasına benzer güçlü bir kokuya sahiptir ve baharatlı bir dokunuşla odunsu ve çiçeksi aromaların bir karışımı olarak tanımlanmaktadır (An ve ark., 2021; Kamatou ve Viljoen, 2008; Van Zyl ve ark., 2006).

2.4.2.1. Linaloolün Kimyasal Yapısı

Linalool, bir hidroksil grubu ile işlevselleştirilmiş küçük molekül ağırlıklı bir moleküldür. Linaloolün kimyasal yapısında bulunan alkol fonksiyonel grubu, bileşiğe polarite kazandırarak onu kimyasal olarak reaktif hale getirir. Çözünürlük açısından, linalool hidrokarbon apolar yapısı nedeniyle suda az çözünür. Buna karşın linalool organik çözücülerde (alkol, kloroform, eter vb.), sabit yağlarda ve propilen glikolde yüksek oranda çözünür. Linalool, yapısında bulunan çift bağlar ve hidroksil grubu nedeniyle kimyasal modifikasyonlara (oksidasyon, glikozilasyon, esterifikasyon ve metilasyon) yatkındır. Linalooldeki en yaygın kimyasal modifikasyon, tipik olarak şaraplarda, çiçek kokularında

ve papaya meyvesinde bulunan furanoid ve piranoid (linalool oksitler) üreten oksidasyondur (Gunaseelan ve ark., 2017; Pereira ve ark., 2018).

Günümüzde linalool; parfüm ve şampuan gibi birçok kozmetik üründe monoterpenin hoş aroması nedeniyle kullanılmaktadır. Ayrıca, linalool gıda katkı maddesi (koku ve aroma maddesi) olarak yaygın olarak tercih edilir (Pereira ve ark., 2018; PereiraZielińska, ve ark., 2018). Linalool alerjik değildir ve cilt üzerinde herhangi bir hassasiyete sebep olmasa da, Linaloolün atmosferde otoksidasyonu lokal ciltte hassasiyet oluşturan hidroperoksitler, furan oksitler, piranoksitler, alkoller ve linalil aldehit gibi Linalool oksitlere dönüşebilmektedir (An ve ark., 2021; Ginting ve ark., 2017; Pereira ve ark., 2018).

2.4.2.1 Farmakolojik Özellikleri

Linaloolün siklooksijenaz-2 (COX-2)'nin ekspresyonunu inhibe ederek antienflamatuar ve analjezik etkilerinin olduğu bildirilmiştir. Linaloolün nükleer kappa B (NF-κB) faktörü yolağının uyarılması yoluyla enflamatuar sitokinlerin tümör nekroz faktörü-α (TNF-α) ve interlökin-6 (IL-6)] üretimini indüklediği bildirilmiştir. Sonraki çalışmalarda linaloolün LPS ile indüklenen TNF-α ve IL-6 üretimini hem in vitro hem de in vivo olarak azalttığı gösterilmiştir. Ayrıca fare makrofajları üzerinde yapılan bir çalışmada da linalool NF-κB yolunun yanı sıra mitojenle aktive olan protein kinaz (MAPK) yolunun aktivasyonunu da bloke ettiği tespit edilmiştir. Bu sebeple linaloolün enflamatuar reaksiyonların dindirilmesinde etkili olabileceği ve enflamatuar hastalıkların tedavisinde etkili olarak kullanılabileceği bildirilmiştir (Ginting ve ark., 2017; Tohidi ve ark., 2017; P. Xu ve ark., 2017b).

Tütün kullanımı kronik obstrüktif akciğer hastalığının (KOAH) nedenlerinden biridir. Sigara dumanındaki kimyasalların toksik karışımı akciğerlerde kalıcı enflamasyona neden olmakta ve TNF-α, IL-6, IL-1β ve IL-8 gibi enflamatuar sitokinler proteinlerin akciğer dokusunda toplanmasına yol açmaktadır. Bu sitokinlerin ve kemokinlerin üretiminin engellenmesi sigara dumanının olumsuz etkilerini ortadan kaldırabilir. Bir çalışmada linaloolün sigara dumanı kaynaklı akciğer enflamasyonunu hafiflettiği bildirilmiştir. Bir monoterpen olan linalool kullanılan farelerde hem enflamatuar hücrelerin infiltrasyonunu hem de TNF-α, IL-6, IL-1β ve IL-8 üretimini inhibe etmiştir. Çalışmalarda linalooloün sitokin üretiminin inhibisyonunun, NF-κB hücresel yolunda uyguladığı inhibitör etki ile

ilişkili olduğu bildirilmektedir. Bir başka çalışmada ise mikroglia hücrelerinde LPS ile indüklenen enflamasyonu sadece NF-κB yolu ile değil, aynı zamanda faktör eritroid 2 ile ilişkili faktör/ hem oksijenaz-1 sinyal yolunun aktivasyonu ile de inhibe edildiği de bildirilmiştir (Kamatou ve Viljoen, 2008).

Linalool, çeşitli enflamatuar ve bağışıklık tepkilerinin kritik bir düzenleyicisi olan nükleer faktör-eritroid 2 ile ilişkili faktör 2'yi (Nrf-2) aktive etmektedir. Aktive olan Nrf-2, akciğer inflamasyonu, nötrofil infiltrasyonu, proenflamatuar sitokin salınımı ve bakteri yükü gelişimine karşı direnç sağlayabilecek antioksidan enzimler üretmektedir. Linaloolün Nrf-2'yi aktive ettiğini ve ilişkili bir antienflamatuar ve antimikrobiyal etkiye sahip patojen aracılı akciğer enflamasyonunda oksidatif stres yolu üzerinden hareket ettiği gösterilmiştir (Xu ve ark., 2017a; Zheng ve ark., 2017).

Linalool bakteriyel pnömoni enfeksiyonları için umut verici bir strateji olabilir. Diyabet ve kardiyovasküler hastalık gibi hastalıkların neden olduğu enflamatuar hastalıkların tedavisinde de linalool; COX-2, NF-κB ve Nrf-2 gibi proteinlerle salgılanmalarını etkileyerek tedavide yeni yaklaşımlar sergileyebilir. Ayrıca linalool, NOS enzimi ile etkileşime girerek NO üretimini inhibe etmektedir. NO, enflamatuar ve immün regülasyonu sağlayarak ödem oluşumu, vazodilatasyon ve enfeksiyon bölgesine bağışıklık hücrelerinin toplanmasına yol açar. Linaloolün NO üzerindeki etkisi, monoterpenin antienflamatuar özellikleriyle ilişkili olup bu özellikler hem antinokosiptif hem de antihiperaljezik etkilerle ilişkilidir. (Baschieri ve ark., 2017; Gunaseelan ve ark., 2017; Hsu ve ark., 2013).

2.4.2.2 Antikanserojen Etkinlikleri

Literatürde fitokimyasalların özellikle de monoterpenlerin, farklı kanser hücrelerinde otofaji ve apoptozu indükleyen farklı hücre içi sinyal yolaklarına müdahale ettiği bildirilmektedir. Linaloolün insan lösemi HL-60 hücre proliferasyonunun apoptosize yol açarak inhibe ettiği bildirilmiştir. Benzer şekilde esensiyel yağ içeriğinde yüksek oranda Linalool bulunan *Lavandula angustofolia* uçucu yağının insan serviks karsinom HeLa hücrelerinin ve akciğer adenokarsinom hücrelerinin hücre canlılığını azalttığı da bildirilmiştir (Liou ve Storz, 2010; Maeda ve ark., 2012).

Bunun yanında önceki çalışmalarda linaloolün prostat kanseri hücrelerinde hücre siklusunu G1 safhasında, myeloid lösemi hücrelerinde G0/G1 fazında hücre döngüsü inhibe ettiği bildirilmiştir. Linaloolün potansiyel anti-kanser özelliklerinin proapoptotik etkileriyle yakından ilişkili olduğu tespit edilmiştir. Bir çalışmada insan melanom hücre hattında linaloolün apoptozu indükleyen kaspaz-3'ü aktive ettiği bildirilmiştir. Başka bir çalışmada ise linaloolün insan glioblastoma hücre hattında hem kaspaz 9 ve 3'ün hem de proapoptotik faktörlerin (Bax ve Bak) ekspresyonunu arttırdığı, apoptozisde intrinsik yolu aktive eden antiapoptotik genlerin (Bcl-2 ve Bcl-xl) ekspresyonunu azalttığı da bildirilmiştir. Linalool sirtuin 3-süperoksit dismutaz 2- reaktif oksijen türleri sinyal yolağının düzenlenmesi yoluyla glioma hücreleri üzerinde inhibitör etki göstermiştir (Iwasaki ve ark., 2016).

ROS üretiminde linaloolün ekprese ederek mitokondriyal oksijen tüketimindeki azalma insan glioblastoma hücre hattında intrinsik apoptoz yolunu tetikleyerek aktivite sergilediği bildirilmiştir. Ayrıca linalool, kanser hücrelerinde anti-kanser ve anti-proliferatif mekanizmaları ve sağlıklı hücrelerde koruyucu mekanizmaları indükleyerek seçici bir biyoaktif etki oluşturmaktadır. Linalool ROS üretimi yoluyla insan kolon kanseri hücrelerinin apoptozu tetiklemektedir. Fareler üzerinde yapılan yapılan bir çalışmada linaloolün oral uygulamasının insan ksenogreftli tümör fare modelinin büyümesini yan etki olmaksızın engellediği de bildirilmiştir (Iwasaki ve ark., 2016).

Linaloolün özellikle kanser hücrelerinde ROS üretimini artırarak yok ediliş mekanizmasını tetikleyebilmektedir. Linaloolün hem normal hem de kanser hücrelerinde antioksidan bir aktiviteye sahip olabildiği ve ROS türlerinin neden olduğu DNA hasarını önleyebildiği de bildirilmiştir. Bir çalışmada monoterpenlerin (linalool, okaliptol ve mirsen), esasen antioksidan aktivitesi nedeniyle ROS'un mutajenik etkisine karşı koruyucu bir etki gösterebildiği bildirilmiştir (Chang ve ark., 2015).

2.4.3 Rosmarinik Asit

Rosmarinik asit (α-o-caffeoyl-3,4- dihidroksifenilaktik asit; RA), Rosmarinus officinalis, Salvia officinalis ve Perilla frutescens gibi Lamiaceae ve Boraginaceae'nin Nepetoideae alt familyası türlerinde yaygın olarak bulunan doğal olarak oluşan hidroksillenmiş bir bileşiktir. RA, fenilalanin amonyak liyaz ve sinnamik asit 4-hidroksilaz içeren sekiz enzim tarafından L-fenilalanin ve L-tirozin amino asitlerinden biyosentezlenir.

RA ayrıca kafeik asit ve 3,4-dihidroksifenillaktik asidin esterleştirilmesiyle kimyasal olarak da üretilebilir. RA ve bir veya iki RA ile diğer aromatik kısımları içeren çok sayıda türevi iyi bilinmektedir ve litospermik asit, yunnaneik asit, salvianolik asit ve melitrik asidi içerir. Son zamanlarda RA ve türevleri, antienflamatuar, anti-oksidan, anti-anjiyojenik, anti-tümör ve anti-mikrobiyal fonksiyonları içeren biyolojik aktiviteleri nedeniyle ilgi çekmektedir. Klinik olarak RA, T hücre reseptörü aracılı sinyalleşmeyi hafifletir, alerjik rinit ve astım gibi alerjik hastalıkları ve 2,4-dinitroflorobenzen kaynaklı atopik dermatit benzeri semptomları hafifletir, nörotoksisiteden korur ve Alzheimer hastalığının gelişimini yavaşlatır. Bu özellikler RA ve türevlerinin biyoteknolojik üretim ve uygulamalarına olan talebi artırmıştır. Bu derleme, klinik etkinliğin altında yatan moleküler mekanizmalarda dahil olmak üzere RA ve türevlerinin işlevini ve uygulamasını tartışmaktadır (Roh ve ark., 2014; Son ve ark., 2014).

Fenolik bileşik RA ve türevleri, kafeik asidin esterleşmesi yoluyla fenilalaninden ve 3,4- dihidroksifenilaktik asit yoluyla tirozinden sentezlenir. Boraginaceae ve Lamiaceae'nin Nepetoideae alt familyası türlerinde yaygın olarak bulunur ve ilk olarak Rosmarinus officinalis'ten saf bir bileşik olarak izole edilmiştir. RA'in çok çeşitli farmakolojik özellikleri bulunmaktadır. Litospermik asit, yunnaneik asit, salviyanolik asit ve melitrik asit gibi bileşiklerle birlikte çeşitli biyolojik etkinliklere sahiptir. Biyolojik etkinlikleri arasında antienflamatuar, antioksidan, antitümör, antiviral ve antimikrobiyal özellikler sayılabilir (Birmingham ve ark., 2015; Tzeng ve ark., 2008).

Boraginaceae familyası ve Lamiaceae ailesinin Nepetoideae alt ailesine ait türlerde yaygın olarak bulunur ve ilk olarak Rosmarinus officinalis'ten saf bir bileşik olarak izole edilmiştir. RA'in çok çeşitli farmakolojik özellikleri bulunmaktadır. Litospermik asit, yunnaneik asit, salviyanolik asit ve melitrik asit gibi bileşiklerle birlikte çeşitli biyolojik etkinliklere sahiptir. Biyolojik etkinlikleri arasında antienflamatuar, anti-oksidan, anti-tümör, antiviral ve antimikrobiyal özellikler sayılabilir. Gıdalarda farmakolojik etkinliklerinden dolayı veya diyet takviyelerine katılmaktadır. Literatürde Alzheimer hastalığı, kardiyovasküler hastalıklar, atopik dermatit benzeri semptomlar ve alerjik inflamasyon gibi tedavisinde faydalı etkileri bildirilmiştir. Bu tip biyolojik etkilerinden dolayı RA'nın yüksek verimlikle üretilebilmesi için biyoteknolojik üretimine yönelik çalışmalar mevcuttur. Günümüzde RA'nın biyolojik etkinlikleriyle alakalı moleküler

mekanizmaların ve yolların belirlenmesine yönelik çalışmalar sınırlı olup bu konuda yapılacak ileri çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır (Ho ve ark., 2006; Martin ve ark., 2002; Nazir ve ark., 2015; Simonson ve ark., 2004; Trabelsi ve ark., 2012).

2.4.3.1 Farmakolojik Özellikleri

2.4.3.1.1 Antienflamatuar Etkinliği

Güçlü antioksidasyon ve antiinflamasyon etkileri, cildi güneş ultraviyole (UV) radyasyonuna maruz kalmanın neden olduğu hasara karşı korur. İnsan keratinosit HaCaT hücrelerinde, 0.18-1.8 mg/L RA konsantrasyonları UVB (295-315 nm) tarafından indüklenen ROS üretimini hafifletebilir, IL-6 salgılanmasını azaltabilir ve apoptozu bloke edebilir (Vostalova ve ark. 2010). Ayrıca, 1- 100 μM RA, interferon-gama (IFN-γ) ile uyarılmış murin kemik iliği kaynaklı dentritik hücrelerde (BMDC'ler) indolamin 2,3-dioksijenaz (IDO) ekspresyonunu ve fonksiyonel aktivitesini IDO'ya bağlı T hücre baskılanması ile ilişkili olarak inhibe etmiştir. RA ayrıca sinyal dönüştürücü ve transkripsiyon aktivatörü 1'in (STAT1) IFN-γ ile indüklenen aktivasyonunu da baskılayabilir (Sotnikova ve ark., 2013). Karrageninin indüklediği pençe ödeminin bir fare modelinde, oral yoldan uygulanan RA'nın derin analjezik aktivitesi gösterilmiştir. Aynı çalışmada, formalin testinde RA'nın önemli antienflamatuar etkileri ve ağrı azaltma kabiliyeti gösterilmiştir (C. Chen ve ark., 2024; Osakabe ve ark., 2004). RA ile tekrarlanan tedaviler (0.25, 0.5, 1.0 ve 1.35 mg) enflamasyonu azaltmıştır. Derinin 12-Otetradekanoilphorbol-13-asetat (TPA) florbol esterine maruz kalmasını içeren bir fare modelinin kullanıldığı çalışmada, nötrofillerin infiltrasyonunun ve miyeloperoksidaz aktivitesinin RA aracılı inhibisyonu gösterilmiş ve hücreler arası yapışma molekülü 1 (ICAM-1), vasküler hücre yapışma molekülü-1 (VCAM-1) ve enflamatuar protein-2 için haberci RNA (mRNA) ekspresyonu azaltılmıştır (Osakabe ve ark., 2004). Yazarlar ayrıca TPA ile indüklenen prostaglandin E2 (PGE2), lökotrien B4 ve COX-2 mRNA ekspresyonunda RA aracılı azalma olduğunu bildirmişlerdir. Günlük oral 50 mg/kg RA uygulaması, streptozosin ile diyabet oluşturulan wistar sıçanlarında IL-6 mRNA seviyesini önemli ölçüde azaltmış ve IL-1β, TNF-α, preproendotelin-1 ve endotelin dönüştürücü enzim-1'in ekspresyonunu inhibe etmiştir (Chen ve ark., 2024; Sotnikova ve ark., 2013).

2.4.3.1.2 Anti-oksidan Ekinliği

Rosmarinik asitin anti-oksidan etkileri temel olarak membran stabilizasyonunu ve oksidatif hasara karşı korumayı indükleyen serbest radikal süpürme ile ilişkilidir. Prunella vulgaris'in su ve etanol ekstrelerindeki RA (2,1±0,3 μM; 30 μg/mL), RAW 264.7 hücrelerinde LPS ile indüklenen PGE2 ve NO üretimini önemli ölçüde baskılamış ve LPS ile uyarılan COX-2 ekspresyonunu inhibe etmiştir (Huang ve ark. 2009). RA 135 mg/kg konsantrasyonda plazma aspartat aminotransferaz seviyesini ve karaciğer ve plazmada TNF-α mRNA ekspresyon seviyesini belirgin şekilde azaltmış ve iNOS mRNA ekspresyonunu ve oksidatif stresi önemli ölçüde inhibe etmiştir (Osakabe ve ark. 2002). RA (1, 5, 10 ve 20 μg/mL) hücre içi ROS üretimini belirgin şekilde azaltmış ve c-Jun-n-terminal kinaz ve ERK aktivasyonunu inhibe ederek mitokondri membran potansiyelinin iyileşmesine yardımcı olmuştur. Ayrıca, RA'nın glutatyon (GSH) ve SOD'nin yukarı regülasyonunu indükleyebildiği bildirilmiştir (Kim ve ark. 2005). İnsan dişeti fibroblastlarında LPS ile indüklenen oksidatif stres ve enflamasyon sırasında RA (1 μg/mL) ROS üretimini, hücre içi GSH tükenmesini ve IL-1β, IL-6, TNF-α ve iNOS'un LPS ile uyarılan yukarı regülasyonunu baskılamıştır (Zdarilova ve ark. 2009).

2.4.4 Rosuvastatin

Statin sınıfından bir ilaç olan Rosuvastatin, 3-hidroksi-3-metilglutaril koenzim A (HMG CoA) redüktaz inhibitörleri olup, total ve düşük yoğunluklu Lipoprotein (LDL) kolesterolünün düşürülmesinde etkili olan ilaçlardır. LDL kolesterol ilişkili ölümlerin özellikle statinlerle, düşürülmesiyle belirgin şekilde azalttığı, kalp hastalıkları, inme ve diğer damar hastalıkları gibi kardiyovasküler hastalık riskini azaltıcı etkinlikleriyle öne çıkmaktadır. Statinler, kolesterol düşürücü etkilerinin yanı sıra, endotel fonksiyonunu iyileştirir, aterosklerotik plakların stabilitesini artırır ve arter duvarlarında enflamatuar ve trombojenik yanıtları inhibe etmektedir (González ve ark., 2022; Kishore ve Mohan, 2017).

Rosuvastatin HMG-CoA redüktaz inhibitörü ola sentetik bir ilaçtır. Diğer HMG-CoA redüktaz inhibitörleri, doğal olarak mevinik asitten türetilmiş (lovastatin, simvastatin, pravastatin) veya sentetik, heptenoik asitten türetilmiş (atorvastatin, fluvastatin) ilaçlardır. Rosuvastatin, yeni nesil bir metan-sülfonamid pirimidin ve N-metansülfonil pirrol-yerleşimli 3, 5-dihidroksi-heptenoat sınıfına aittir. Diğer statinlerle benzer bir farmakofor

yapısına sahip olmakla birlikte, stabil bir polar metan-sülfonamid grubunun eklenmesi, düşük lipofiliklik sağlar ve HMG-CoA redüktaz enzimi ile güçlendirilmiş iyonik etkileşim sunarak enzime bağlanma afinitesini artırır (Zhou ve ark., 2013). Bununla birlikte, rosuvastatinin antienflamatuar ve antimikobakteriyel etkileri de önemli araştırma konuları arasında yer almaktadır. Rosuvastatinin sadece kolesterol düşürücü değil, aynı zamanda immün sistemi regüle edici özelliklere haiz olduğunu bildirilmesi patojenlere karşı konak savunmasında potent etkili olabileceğini göstermektedir (González ve ark., 2022; Singh ve ark., 2014).

2.4.5 Oleik Asit

Oleik asit, monounsaturated (tekli doymamış) bir yağ asidi olup, özellikle bitkisel yağlarda bulunan doğal bir bileşiktir. Oleik asit birçok hayvansal ve bitkisel yağın önemli bir bileşeni olup, özellikle zeytinyağının doğal bileşeninde bolca bulunmaktadır. Zeytinyağı (%55-83), kanola yağı (%60), avokado yağı, badem yağı, ayçiçeği yağı, fıstık yağı ve kuyruk yağı gibi hayvansal yağlarda da bulunur. Oleik asit LDL kolesterolün kontrolünde yüksek yoğunluklu Lipoprotein (HDL) kolesterolün arttırılmasında oldukça önemlidir. Kalp krizi ve stroke gibi kardiyovasküler hastalık riskini azaltıcı etkisi, özellikle damar içindeki inflamasyonu azaltarak ateroskleroz riskini de azaltmaktadır. Bunun yanında immün yanıtın regülasyonunda oldukça önemli etkilerinin olduğu bildirilmiştir (Katariya ve ark., 2021).

Oleokantal özellikle zeytinyağında bulunan ve anti-enflamatuar özellikleriyle bilinen bileşiktir. Oleik asit oleokantal bileşinin temel komponentidir. Oldukça önemli antienflamatuar etkili doğal bir bileşiktir. Oleokantal zeytinyağının karakteristik tadını veren yakıcı veya keskin his veren bileşen olup özellikle soğuk sıkım (işlenmemiş) zeytin yağında bol miktarda bulunur, ibuprofenin antienflamatuar etkinliğine benzer bir etki gösterir (Mourdikoudis ve ark., 2022).

Literatürde oleik asidin antineoplastik etkinliklerinden bahsedilmektedir. Antikanserojen etkinliğinin özellikle kronik inflamasyonun dindirilesiyle etkili olduğu düşünülmektedir. Oleik asitin insülin direncine karşı etkisinden de bahsedilmektedir. Özellikle Tip-2 diyabete karşı metabolik regülasyonu sağlayıcı etkisi bildirilmiştir. Oleik asit insülin direncini önleyecek vücut hücrelerinin glukozu işlemesinin önünü açmakta bu da diyabet ilişkili metabolik sorunların çözümünü kolaylaştırmaktadır. Bunun yanında oleik

asitin kan lipid seviyesini düşürücü etkisinin olduğu da bildirilmiştir. Oleik asitin ciltte oksidatif stresin azaltılmasına yol açtığı böylece anti-aging etkisi de bildirilmiştir. Hücrelerin sıvı kaybını azalttığı için cildi besleyici ve nemlendirici etkisi de bilinmektedir. Güçlü bir antienflamatuar etkinliği çeşitli çalışmalarda gösterilen oleik asitin beyinde inflamasyon azalttığı ve oksidatif stres kaynaklı hasarı önleyerek nöroprotektif etkisinden de bahsedilmektedir. Oleik asit düzenli alımının alzheimer gibi nörodejeneratif hastalıklara karşı koruyuculuğu arttırdığı da bildirilmiştir (Katariya ve ark., 2021; Mourdikoudis ve ark., 2022; Santa-María ve ark., 2023).

Çeşitli çalışmalarda zeytinyağı temel komponentlerinden olan oleik asidin bağışıklık fonksiyonu üzerinde çelişkili bulgulardan bahsedilmektedir. Bir çalışmada sağlıklı gönüllülere verilen zeytinyağı bazlı emülsiyonun makrofaj proliferasyonunu azalttığı, bildirilirken nötrofiller üzerinde herhangi bir etkisinin olmadığı tespit edilmiştir. Soya yağın oleik asitin kullanıldığı sıçanlar üzerinde yapılan araştırmalarda oleik asit açısından zengin zeytinyağı emülsiyonunun, IL-2 reseptör ekspresyonunu, IL-2 üretimini, kemotaksisi, hücre migrasyonunu ve nötrofillerin salgıladığı proenflamatuar sitokinlerin inhibe edilmediği bildirilmiştir. Çalışmalarda oleik asidin immün regülasyon rolünün oleik asit içeriğine, doza ve hayvan türüne göre değişebileceği bildirilmiştir. Sonuç olarak oleik asitin immün regülasyonda önemli bir bileşik olduğunu gösteren çok sayıda bilimsel çalışma bulunmaktadır (Gouzy ve ark., 2021; Katariya ve ark., 2021; Santa-María ve ark., 2023).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalında 25/08/2022-01/10/2024 tarihleri arasında yapıldı. Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurul Kararları kapsamında 08/09/2022 tarih ve 2022/10-13 sayılı karar ile çalışmamızda etik ve bilimsel açıdan sakınca bulunmadığına dair karar verildi. Çalışmamız Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından 22.D.026 nolu proje olarak desteklendi. Çalışmada kullanılan *Mycobacterium avium* (ATCC 15769) suşu Türkiye Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü Mikrobiyoloji Referans Laboratuvar'ından liyofilize suş olarak temin edildi. Çalışmada izoniyazid, rifampisin, likopen, rosmarinik asit, rosuvastatin, oleik asit ve linalool hazır ticari olarak temin edildi. Sitotoksite deneyleri için kullanılan Vero (Afrika yeşil maymun böbrek hücre hattı) hücre hattı Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı kültür koleksiyonundan temin edilmiştir. İn vitro aktivite testleri için kullanılan RAW 264.7 (Fare monosit makrofaj hücre hattı) hücre hattı ise Bursa Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi İmmünoloji Anabilim Dalı kültür koleksiyonundan temin edilmiştir.

3.1 Araç ve Gereçler

- Karbondioksitli İnkübatör (Heal Force HF90, Çin)
- Klas II Güvenlik Kabini (Heal Force, Çin)
- Bidistile Su Cihazı (Elix Essential 10 UV, Almanya)
- İnverted Mikroskop (Soıf, Çin)
- Işık Mikroskop (Smart, Çin)
- Santrifüj (NF 048; Nüve, Türkiye)
- Hassas Terazi (Ohous Corp., NJ USA)
- Benmari (Gesellschaft Für Labortechnik, Almanya)
- Buzdolabı (Indesit TN 5 FNF-İtalya)
- Otoklav (Nuve OT 90L, Almanya)
- 0.22 µm / 25 mm Steril Filtre (Isolab, Almanya)
- Thoma lam (Isolab, Almanya)

- Düz Tabanlı Mikroplaklar (12, 24, 48 ve 96'lık) (TPP, Europe/Switzerland)
- Otomatik Pipetler (Discovery, Transferpette, Almanya)
- Mekanik Hücre Kazıyıcı (25 cm) (Corning, Merck, Almanya)
- Pipet Pompası (Isolab, Almanya)
- 2 ml, 5 ml ve 10 ml Serolojik Steril Pipet (Isolab, Almanya)
- 15 ml, 50 ml'lik Steril Falkon (Isolab, Almanya)
- 2 mL'lik Steril Cryo Tüp (Isolab, Almanya)
- BD BACTEC MGIT 960 (Model: MG 1816, BD, ABD)
- T100 Thermal Cycler (Bio-Rad, ABD)
- Qiagen Rotor-Gene Q (Qiagen GmbH, Almanya)
- Merinton, SMA-1000 UV Spectrophotometer, China
- Isolab Mini Santrifüj (Isolab GmbH, Almanya)
- Isolab Vorteks (Isolab GmbH, Almanya)

3.2 Kimyasal maddeler ve Suşlar

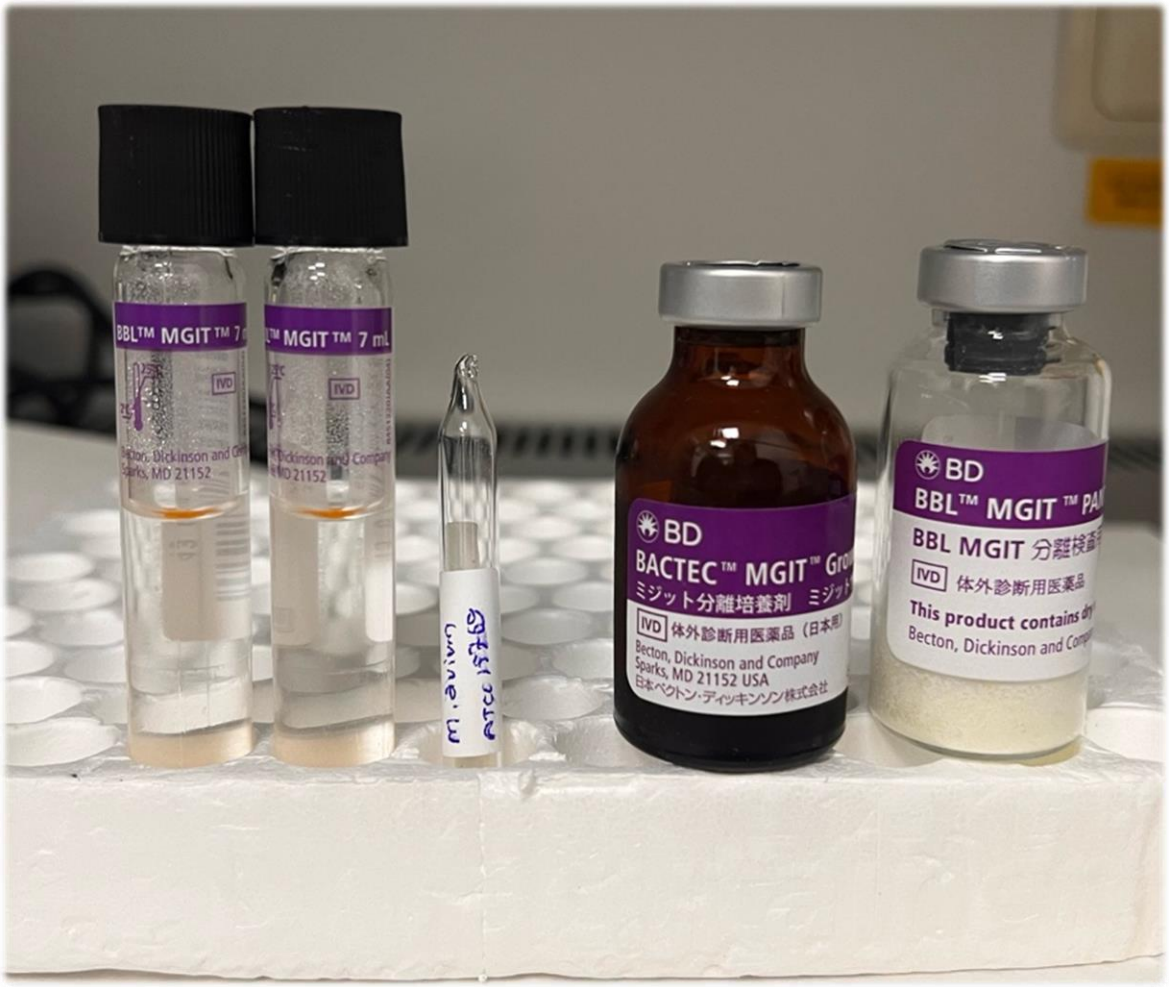
- RPMI-1640 Besiyeri (Sigma, ABD)
- Fetal Bovine Serum (Capricorn Scientific, Güney Amerika)
- Tripsin Enzimi (Biological İndustries, İsrail)
- Dimetil Sülfoksit (Merck Kgaa, Almanya)
- MGIT Sıvı Besiyeri (Becton Dickinson, Amerika)
- *Mycobacterium avium* (ATCC 15769)
- BD BACTEC MGIT 960 (BD, ABD)
- İzoniyazid (INH, Koçak Farma, Türkiye)
- Rifampisin (Rifcap, Koçak Farma, Türkiye)
- Likopen ($C_{40}H_{56}$) (TargetMol, ABD)
- Rosmarinik Asit ($C_{18}H_{16}O_8$) (TargetMol, ABD)
- Rosuvastatin ($C_{44}H_{54}F_2N_6O_{12}S_2Zn$) (TargetMol, ABD)
- Oleik Asit ($C_{18}H_{34}O_2$) (Merck, Almanya)
- Linalool ($C_{10}H_{18}O$) (TargetMol, ABD)
- Fosfat Tuz Solüsyonu (PBS) (Merck, Almanya)
- Dimethyl sulfoxide (DMSO) (Sigma, MI, USA)

- Etil Alkol (Merck, Almanya)
- Tripan Mavisi (Sigma, ABD)
- Buffer (Fermentas, EU)
- Mg (Fermentas, EU)
- dNTP (Fermentas, EU)
- dH_2O (Fermentas, EU)
- Taq polimeraz enzimi (Thermo Scientific Fermentas, EU)
- DNA Ladder (100 bp, Fermentas, EU)
- Etidium Bromid (Sigma, ABD)
- Potasyum dihidrojen fosfat, KH_2PO_4 (Sigma, ABD)
- Proteinaz K (Sigma, ABD)
- Potasyum klorür, KCl (Sigma, ABD)
- Sodyum hidrojen fosfat, Na_2HPO_4 (Sigma, ABD)
- Sodyum klorür, NaCl (Sigma, ABD)
- Sodyum bikarbonat $NaHCO_3$ (Sigma, ABD)
- Titriplex lll (Versen) (Sigma, ABD)
- TAE Elektroforez Tamponu (Tris Asetat Tamponu) 50X
- Trizol (Nucleogene, Almanya)
- cDNA Sentez Kit 5x (Nucleogene, Almanya)
- qPCR SYBR Green Master Mix 2x (Nucleogene, Almanya)
- Enhancer Mix (Nucleogene, Almanya)
- DNase I, RNase-free (1 U/µL, Thermo, ABD)

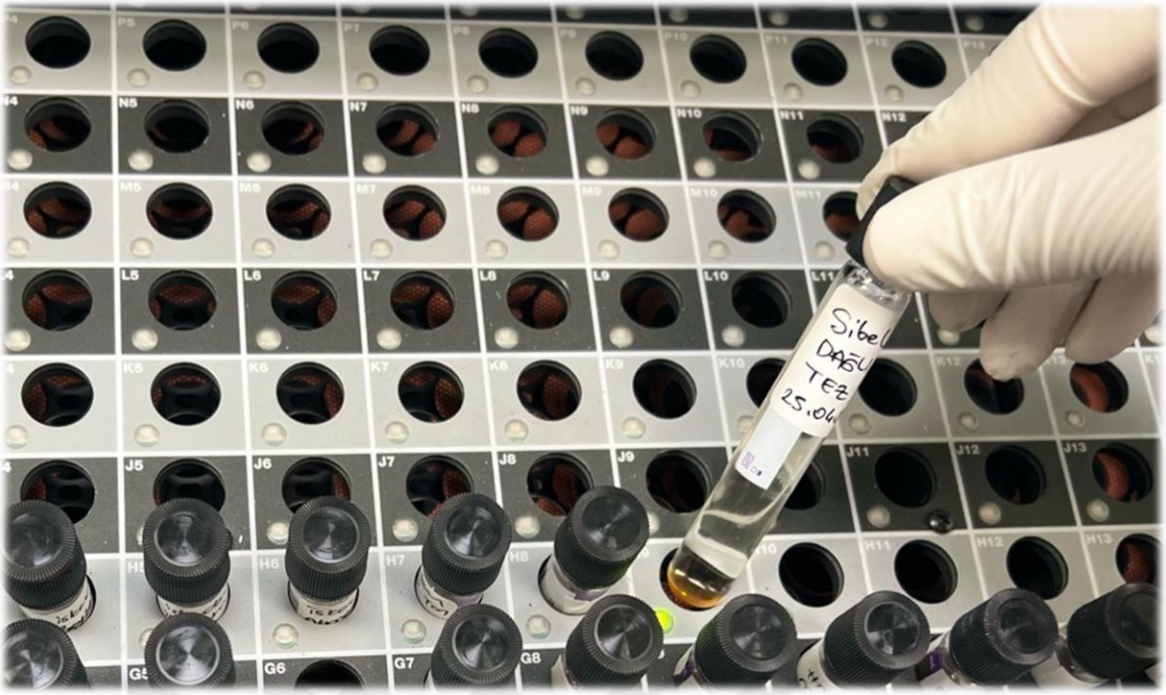
3.3 *Mycobacterium avium* Kültürü

Mycobacterium avium suşu (ATCC 15769) Türkiye Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü Mikrobiyoloji Referans Laboratuvar'ından temin edildi. Liyofilize olarak temin edilen *M. avium* suşu 100 µl PBS içerisinde çözülerek BD MGIT kültür şişelerine inoküle edildi. BD MGIT (Mikobakteri Büyüme Göstergesi Tüpü) sıvı besiyerine antimikrobiyal ajanların liyofilize karışımı olan BD BBL MGIT PANTA (Polimiksin B + Amfoterisin B + Nalidiksik asit + Trimethoprim + Azlosilin) sulandırılarak eklendi. MGIT besiyerinin antimikrobiyal karışımı ile desteklenmesiyle olası kontaminasyon riskinin engellenmesi sağlandı. İki adet

BD MGIT kültür şişesine homojenize edilmesinin ardından, *M. avium* suşundan 50'şer µl olacak şekilde inoküle edilmiştir. Ardından ekim yapılan kültür şişeleri BD BACTEC MGIT 960 (Model: MG 1816, BD, ABD) cihazına inkübasyon için yerleştirildi. İnkübasyonun 72. saatinde cihazdan pozitiflik sinyali alındı. ARB boyama yapılarak basil varlığı verifiye edildi. Daha sonra çoğaltılan bakteriler saklama besiyeri içerisine alınarak kültür koleksiyonuna dahil edildi.



Şekil 3.1. *Mycobacterium avium (ATCC 15769)* liyofilize suşu, BD MGIT kültür tüpleri, BD BBL MGIT PANTA antimikrobiyal ajanlar.



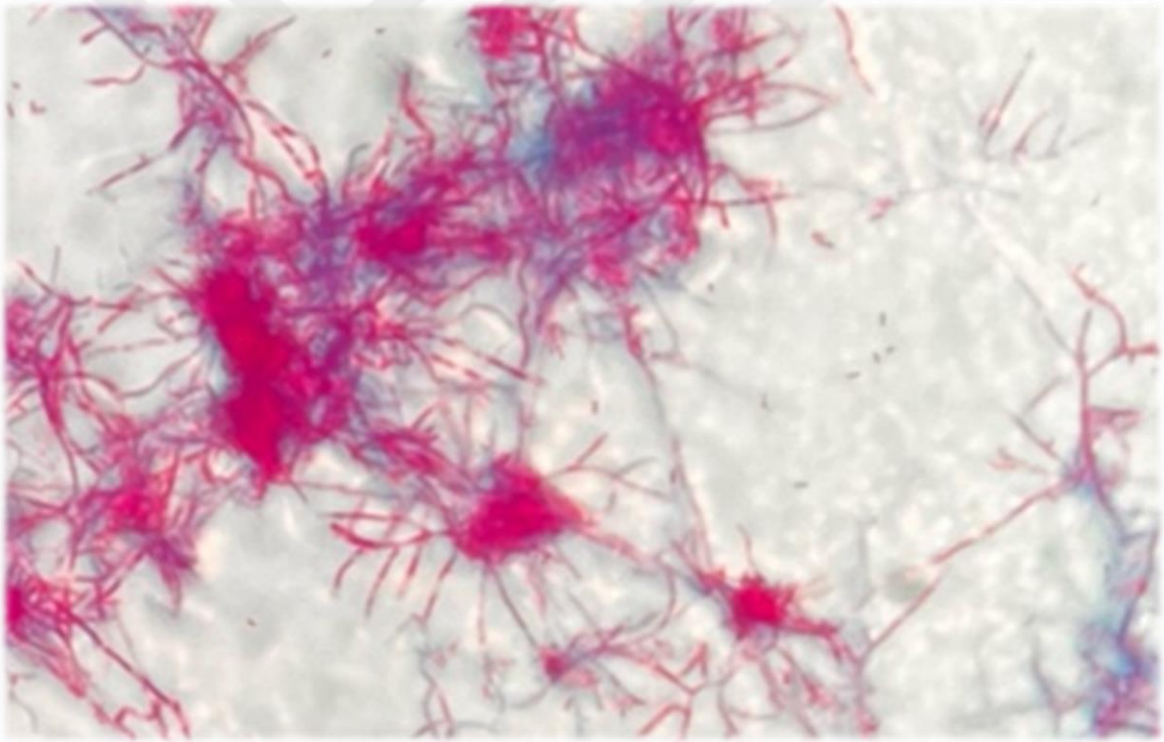
Şekil 3.2. *Mycobacterium avium* (ATCC 15769) suşunun BD MGIT kültür tüplerine ekimini takiben BD BACTEC MGIT 960 cihazına inkübasyon için yerleştirilmesi.



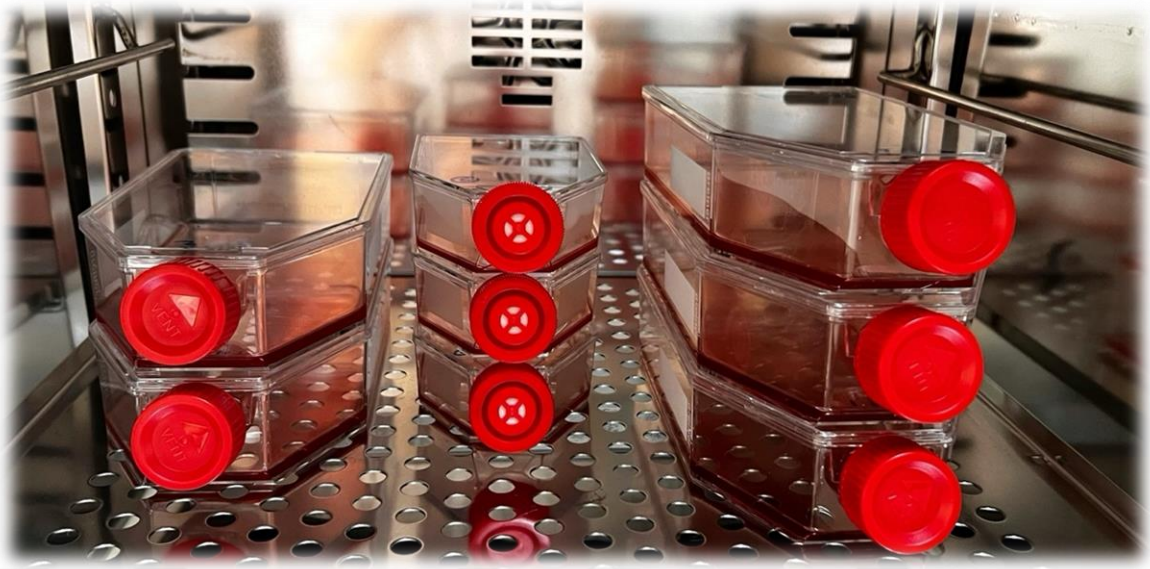
Şekil 3.3. İnkübasyonun 72. saatinde üreme tespit edilen kültür örnekleri.



Şekil 3.4. Pozitiflik sinyali alınan örneklerin ARB yöntemiyle boyanması.



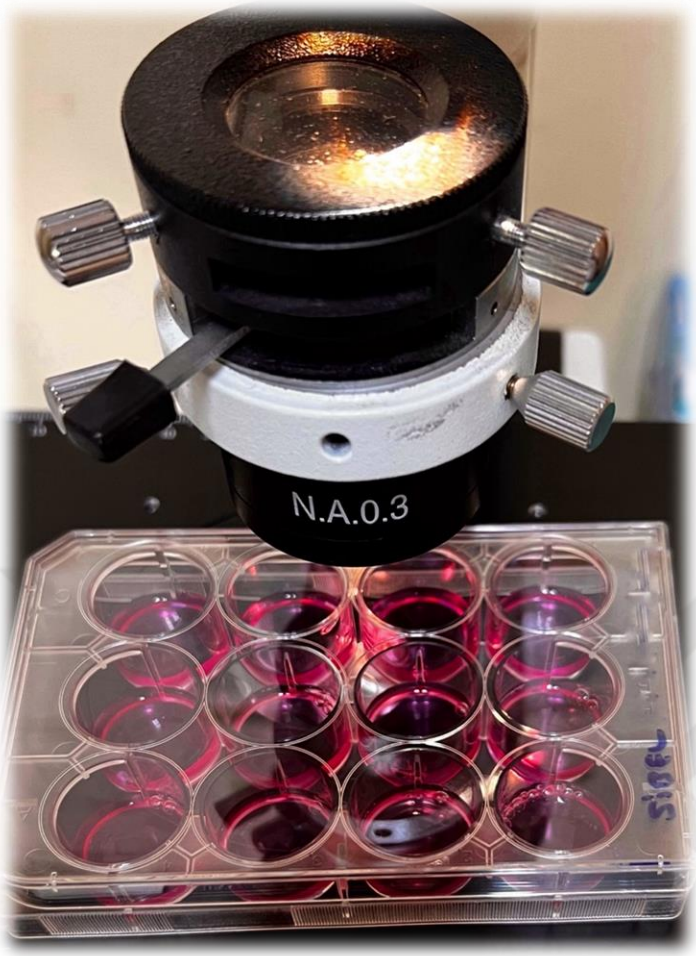
Şekil 3.5. *Mycobacterium avium* (ATCC 15769) suşu, x100 büyütmede ışık mikroskobu görünümü.



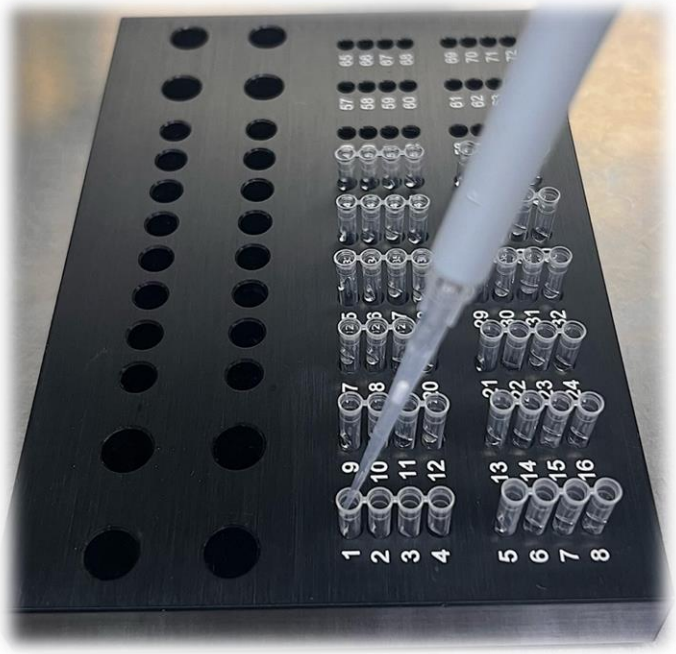
Şekil 3.6. Vero ve Raw 264.7 hücre hatlarının 37 ^{0} C'de %5 CO_2'li etüvde inkübasyonu.



Şekil 3.7. Raw 264.7 hücreleri ile oluşturulan çalışma gruplarına *M. avium* eklenmesi.



Şekil 3.8. Raw 264.7 hücrelerinin *M. avium* ile inkübasyon sonrası invert mikroskop altında incelenmesi.



Şekil 3.9. RT-PCR gen ekspresyon çalışmaları.

3.3.1 ARB Boyama

- BD MGIT kültür tüplerinden alınarak hazırlanan preparat kurutulur ve alev kullanılarak fiziksel fiksasyon ile tespit edilir.
- Preparatlara karbol fuksin boyası dökülür ve alttan ısıtılarak boyamanın etkili olması sağlanır. Bu aşama yaklaşık 5 dakikada gerçekleştirilir ve kaynatılmamasına dikkat edilir.
- Boyama işlemi sonunda preparat akan su ile yıkanır.
- Preparat, asit-alkol çözeltisi (%95 alkol + %5 HCl) ile dekolore edilir
- Dekolorizasyon işlemi sonrası preparat akan su ile tekrar yıkanır.
- Son olarak, kontrast boyama için metilen mavisi uygulanır ve 30 sn boyama işlemi tamamlanır.
- Preparat yıkanarak kurutulur ve ışık mikroskobunda immersiyon objektifi ile incelenir.

3.4 Solüsyon ve Bileşiklerinin Hazırlanması

3.4.1 RPMI-1640 Besiyeri

Besiyeri ticari olarak toz (powder) olarak temin edilmiştir. Laboratuvarda 2 g sodyum bikarbonat ($NaHCO_3$) 1 lt besiyeri için hazır paket halindeki toz besiyerine eklendi ve 1 lt distile su ile erlenmayer içinde karıştırıldı. Homojenize olması için erlenmayerin ağzı kapatılıp karıştırıcıda 30 dakika kadar karıştırıldı. Homojen hale gelen karışımın filtrasyon yöntemiyle sterilizasyonu gerçekleştirildi.

3.4.2 Tripsin Solüsyonunun Hazırlanması

Bidistile su ile son hacim 1 litre olacak şekilde ayarlanmak üzere 8 g NaCl, 0.2 g KCl, 2.37 g Na_2HPO_4 12 H_2O, 0.2 g KH_2PO_4, 1 g titriplex lll (Versen) ve 1.25 g tripsin tartılarak erlenmayer içinde karıştırıldı. Erlenmayerin ağzı kapatılarak karıştırıcıda 30 dakika karıştırılarak homojenize edildi. Homojen hale gelen karışımın filtrasyon yöntemiyle sterilizasyonu gerçekleştirildi.

3.4.3 PBS hazırlanması

Bidistile su ile son hacim 1 litre olacak şekilde 8 g NaCl, 0.2 g KCl, 2.37 g Na_2HPO_4 12 H_2O ve 0.2 g KH_2PO_4 tartılarak erlenmayer içinde çözüldü. Erlenmayerin ağzı kapatılarak karıştırıcıda 30 dakika karıştırılarak homojenize edildi ve 121 °C 15 psi basınç altında 15 dakika tutularak otoklav ile sterilizasyonu gerçekleştirildi.

3.5 Standart İlaçlar

3.5.1 İzoniyazid

Ticari olarak temin edilen (INH, Farma, Türkiye) izoniyazidin 300 mg oranında tablet formunun çözülmesi için solvent olarak steril 10 ml Fosfat Tuz Solüsyonu (PBS) kullanıldı. İzoniyazidin stok solüsyonu 30 mg/ml olacak şekilde hazırlandı.

3.5.2 Rifampisin

Ticari olarak temin edilen (Rifcap, Koçak Farma, Türkiye) rifampisinin 300 mg oranında tablet formunu çözülmesi için solvent olarak steril 10 ml PBS kullanıldı. Rifampisinin stok solüsyonu 30 mg/ml olacak şekilde hazırlandı.

3.5.3 Likopen

Ticari olarak temin edilen ($C_{40}H_{56}$) (Moleküler ağırlığı 536.87 g/mol) (TargetMol, ABD) likopenin çözülmesi için solvent olarak steril 10 ml PBS kullanıldı. Likopen stok solüsyonu konsantrasyonu 18.6 mM olacak şekilde hazırlandı.

3.5.4 Rosmarinik Asit

Ticari olarak temin edilen ($C_{18}H_{16}O_8$) (Moleküler ağırlığı 360.31 g/mol) (TargetMol, ABD) rozmarinik asitin çözülmesi için solvent olarak steril 10 ml PBS kullanıldı. Rosmarinik asit stok solüsyonu konsantrasyonu 13.9 mM olacak şekilde hazırlandı.

3.5.5 Rosuvastatin

Ticari olarak temin edilen ($C_{44}H_{54}F_2N_6O_{12}S_2Zn$) (Moleküler ağırlığı 1026.47 g/mol) (TargetMol, ABD) rosuvastatinin çözülmesi için solvent olarak steril 10 ml PBS kullanıldı. Rosuvastatinin stok solüsyonu konsantrasyonu 9.75 mM olacak şekilde hazırlandı.

3.5.6 Oleik Asit

Ticari olarak temin edilen ($C_{18}H_{34}O_2$) (Moleküler ağırlığı 282.46 g/mol, Yoğunluğu 0.895 g/ml) (Merck, Almanya) oleik asitin çözülmesi için solvent olarak steril 10 ml PBS kullanıldı. Oleik asitin stok solüsyonu konsantrasyonu 349 mM olacak şekilde hazırlandı.

3.5.7 Linalool

Ticari olarak temin edilen ($C_{10}H_{18}O$) (Moleküler ağırlığı 154.25 g/mol) (TargetMol, ABD) linaloolun çözülmesi için solvent olarak steril 10 ml PBS kullanıldı. Linaloolun stok solüsyonu konsantrasyonu 648 mM olacak şekilde hazırlandı.

3.6 Hücre Kültürü Çalışmaları

Çalışmada in vitro analizleri gerçekleştirmek amacı ile Vero (Afrika yeşil maymun hücre hattı) hücre hattı ve RAW 264.7 (Fare monosit makrofaj hücre hattı) hücre hattı kullanıldı. Kültür çalışmalarında hücre kültürü üretme besiyeri olarak içerisinde 10 mM HEPES, %10 oranında fetal dana serumu (FBS), 4 mM glutamin ve 100 IU/ml penisilin/streptomisin içeren RPMI-1640 hücre üretme besiyeri kullanıldı. Hücre kültürü çalışmaları 25 cm^2 ve 75 cm^2 hücre kültür flaskları kullanılarak yapıldı. Hücre hatlarının kültivasyonunda inkübasyon protokolü 37 ^{0}C'de %5 CO_2'li etüvde gerçekleştirildi.

Hücre kültürlerinin idame ettirilmesinde hücrelerin inkübasyonu kültür kabı yüzeyini kaplayıncaya kadar devam ettirildi. Hücrelerin çoğaltılması sırasında besiyerlerinin pH'ında asitlik tespit edildiğinde kültür besiyeri değiştirildi. Kültür kabı yüzeyini kaplayan hücreler kültür kabı yüzeyini steril mekanik hücre kazıyı (Corning, Merck, Almanya) ile hassas bir şekilde kaldırılarak 50 ml'lik santrifüj tüplerine toplandı. Tüpler soğutmalı santrifüjde 1500 rpm'de 5 dakika santrifüj edilerek toplandı. Hücre canlılığı ve sayısı hemositometre ile tripan mavisi boyama yöntemi ile belirlendi.

3.6.1 Sitotoksite Testleri

Sitotoksite çalışmalarında hücre hattı olarak Vero (Afrika yeşil maymun hücre hattı) hücre hattı kullanıldı. Öncelikle bileşiklerin toksik olmayan konsantrasyonlarının belirlenmesi, Vero hücre hattında gerçekleştirildi. Kültür çalışmalarında Vero hücre hattı için üretme besiyeri olarak içerisinde 10 mM HEPES, %10 oranında fetal dana serumu (FBS), 4 mM glutamin ve 100 IU/ml penisilin/streptomisin içeren RPMI-1640 hücre üretme besiyeri kullanıldı. Hücre kültürü çalışmaları 25 cm^2, 75 cm^2 ve 175 cm^2 hücre kültür flaskları kullanılarak yapıldı. Hücre hatlarının kültivasyonunda inkübasyon protokolü 37 ^0C'de %5 CO_2'li etüvde gerçekleştirildi.

Hücre kültürlerinin idame ettirilmesinde hücrelerin inkübasyonu kültür kabı yüzeyini kaplayıncaya kadar devam ettirildi. Hücrelerin çoğaltılması sırasında besiyerlerinin pH'ında asitlik tespit edildiğinde kültür besiyeri değiştirildi. Kültür kabının yüzeyinin %80-90'ını kaplayan hücreler için kabın yüzeyinde alan kalmaması ve besiyeri ortamı verimsiz olmasından dolayı kültür kabı yüzeyinden %0.25'lik Versen-Tripsin solüsyonu ile kaldırılarak 50 ml'lik santrifüj tüplerine alındı. Tüpler soğutmalı santrifüjde 1500 rpm'de 15 dakika santrifüj edilerek toplandı. Hücre canlılığı ve sayısı hemositometre ile tripan mavisi boyama yöntemi ile belirlendi.

Aktivite deneyleri 12, 24, 48 96 kuyucuklu düz tabanlı mikroplaklarda yapıldı. Kuyucukların içerisinde %10 oranında fetal dana serumu bulunan RPMI 1640 besiyeri ile ml'sinde $1x10^6$ hücre olacak şekilde hücre inoküle edildi.

3.6.2 Non-Toksik Konsantrasyonların Belirlenmesi

Non-toksik konsantrasyon deneyleri için steril 96 kuyucuklu düz tabanlı mikroplaklar kullanıldı. Kuyucukların içerisinde %10 oranında fetal dana serumu bulunan RPMI 1640 besiyeri ile ml'sinde $1x10^6$ hücre olacak şekilde 100 µl hücre içeren besiyeri inoküle edildi.

3.6.3 DMSO'nun Non-Toksik Konsantrasyonunun Belirlenmesi

Doksan altı kuyucuklu düz tabanlı steril mikroplak kuyucuklarına %10 oranında fetal dana serumu bulunan RPMI 1640 besiyeri ile ml'sinde $1x10^6$ hücre olacak şekilde 100 µl hücre içeren besiyeri inoküle edildi.

3.6.4 Anti-tüberküloz ilaçların Non-Toksik Konsantrasyonunun Belirlenmesi

3.6.4.1 İzoniyazid

Ticari olarak temin edilen (INH, Koçak Farma, Türkiye) 300 mg izoniyazid tabletin steril 10 ml PBS solventi içerisinde çözülerek 30 mg/ml oranında stok solüsyonu hazırlandı. 96 kuyucuklu düz tabanlı steril mikroplak kuyucukları kullanıldı. İzoniyazid stok solüsyonundan ilk kuyucuğa 1:1 oranında olacak 100'er µl %10 oranında fetal dana serumlu bulunan RPMI 1640 besiyeri inoküle edildi. Diğer tüm kuyucuklara ise yalnızca 100'er µl %10 oranında fetal dana serumlu RPMI 1640 besiyeri inoküle edildi. İlk kuyucuktan başlayarak tüm kuyucuklara seri olarak 100'er µl mikrodilüsyon gerçekleştirildi. Son kuyucukta kalan 100 µl sıvı dışarı atıldı. Ardından %10 oranında fetal dana serumu bulunan RPMI 1640 besiyeri ile ml'sinde $1x10^6$ hücre olacak şekilde 100 µl Vero hücreleri içeren besiyeri inoküle edildi. Son konsantrasyonda kuyucuk hacimleri 200 µl oldu. Sırası ile kuyucuklara son konsantrasyonları 50, 25, 12.5, 6.25, 3.13, 1.56, 0.78 ve 0.39 mg (veya %) olacak şekilde izoniyazid ilave edilerek %5 CO_2'li inkübatörde 37 ºC'de 48 saat süre ile inkübasyona bırakıldı. İzoniyazid tabletini çözmek için kullanılan PBS negatif kontrol olarak kullanıldı.

Deneyler üç tekrarlı olarak gerçekleştirildi ve izoniyazidin Vero hücre hattında invert mikroskop altında morfolojik değerlendirme yapılarak non-toksik konsantrasyonu belirlendi. Rifampisin için de sitotoksisite testleri benzer şekilde gerçekleştirilmiştir.

3.6.4.2 Non-Toksik Konsantrasyonunun Belirlenmesi

Çalışmada izoniyazid, rifampisin, likopen, rosmarinik asit, rosuvastatin, oleik asit ve linalool doğal ve sentetik biyolojik aktif bileşiklerin Vero hücre kültürlerinde sitotoksik dozlar MTT yöntemiyle belirlendi.

3.6.5 MTT(3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) Yöntemi

Bu yöntemde kültive edilen canlı hücreler kolorimetrik olarak tespit edilebilmektedir. Burada temel prensip sağlam hücrelerdeki mitokondriyanın 3-(4,5-dimetil tiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromid (MTT) boyasının tetrazolium halkasını parçalayabilmesi ilkesine dayanmaktadır ve hücre canlılığının tayini için sıkça kullanılan bir yöntemdir. MTT, hücre içerisine giren ve mitokondriye bağlı bir reaksiyon ile renkli, suda çözünmeyen formazana dönüşen bir maddedir. Hücrelerin MTT'yi indirgeme özelliği hücre canlılığının göstergesi olarak kabul edilir ve MTT analizi sonucunda ortaya çıkan boya yoğunluğu canlı hücre sayısı ile pozitif korelasyon göstermektedir.

Negatif ve pozitif kontroller de MTT yönteminde birlikte çalışılarak kıyaslandı. Hücre kültürlerine bileşikler ve kombinasyonları eklendikten sonra 96 saat 37 ºC'de %5 CO_2'li etüvde inkübasyona bırakıldı. Sonra her kuyucuğa 10 µl MTT eklendi ve pleytler 4 saat için aynı şartlar altında inkübe edilerek absorbans ölçümleri spektrofotometrede 570 nm dalga boyunda yapıldı. Proliferasyon fitokimyasallarla muamele edilen kuyucuklardaki hücrelerin kontrol grubu hücrelerine oranı olarak ifade edildi.

Çizelge 3.1. Sitotoksite çalışmaları deney grupları ve tekrar sayıları.

Deney Grupları	**Tekrar Sayısı**
Grup 1 (İzoniyazid; **İZO**)	3
Grup 2 (Rifampisin; **RİF**)	3
Grup 3 (Likopen; **LİK**)	3
Grup 4 (Rosmarinik Asit; **RA**)	3
Grup 5 (Rosuvastatin; **RS**)	3
Grup 6 (Oleik Asit; **OA**)	3
Grup 7 (Linalool; **LİN**)	3

3.6.6 Tripan Mavisi ile Hücre Canlılığının Belirlenmesi

Hücre canlılığı tripan mavisi boyama yöntemi ile tespit edildi. Bu yöntemin temel prensibi membran bütünlüğü bozulmuş olan ölü hücrelerin tripan mavisi ile boyanması ve boyama sonunda canlı hücrelerin boyasız, ölü hücrelerin ise maviye boyanmış olarak görülmesidir. Tripan mavisinin %1'lik çözeltisi PBS içinde hazırlandı. Versen-Tripsin solüsyonu (%0.25'lik konsantrasyon) ile toplanan hücreler 1:1 oranında tripan mavisi ve hücre süspansiyonu olacak şekilde boyandı. Oda sıcaklığında 15 dakika inkübe edilen karışım mikroskopta incelenerek canlılık tespiti yapıldı. Hemositometre ile hücre sayımı gerçekleştirildi.

3.6.7 RAW 264.7 Hücrelerinin *M. avium* ile Enfekte Edilmesi ve Deney Grupları

RAW 264.7 hücrelerinin kültivasyonu için 10 mM HEPES, %10 oranında FBS, 4 mM glutamin ve 100 IU/ml penisilin/streptomisin içeren RPMI-1640 hücre üretme besiyeri kullanıldı. Hücre kültürü çalışmaları 25 cm^2 ve 75 cm^2 hücre kültür flaskları kullanılarak yapıldı. Hücre hatlarının kültivasyonunda inkübasyon protokolü 37 ^{0}C'de %5 CO_2'li inkübatörde gerçekleştirildi.

Deney grubundaki ilaç ve bileşiklerin (izoniyazid, rifampisin, likopen, rosmarinik asit, rosuvastatin, oleik asit ve linalool) *M. avium* ve RAW 264.7 monosit makrofaj hücre hattı ile muamele edilmiş farklı kombinasyonlarının etkinlikleri, pozitif ve negatif grupları ile birlikte gen ekspresyon çalışmaları gerçekleştirildi. IL-6, CXCL1 (IL-8), IL-1β, TNF-α, IL-12a (P40), IL-27, CYP1A1, COX-2, iNOS, Egr-1, IL-10 ve β-actin genleri ekspresyon seviyeleri üzerindeki etkinlikleri Çizelge 3.2.'deki tedavi grupları oluşturularak değerlendirildi.

Deneyler 12 kuyucuklu düz tabanlı pleytlerde gerçekleştirildi. Hücre inkübasyon şartları yukarıda belirtildiği gibi uygulandı. Hücre yoğunluğu $1x10^5$ hücre/ml olacak şekilde belirlendi. *M. avium* ile enfekte edilen RAW 264.7 hücreleri kontrol grubu olarak seçildi. Tedavi gruplarında bileşikler ve/veya farklı kombinasyonları üzerindeki etkinlikleri test edildi.

Çizelge 3.2. *M. avium* ile enfekte edilmiş RAW 264.7 hücrelerinde ekspresyon çalışması deney grupları.

Deney Grupları	**Tekrar Sayısı**
Grup 1 (RAW 264.7 Kontrol)	3
Grup 2 (RAW 264.7+*M. avium*)	3
Grup 3 (RAW 264.7+İZO)	3
Grup 4 (RAW 264.7+*M. avium*+İZO)	3
Grup 5 (RAW 264.7+RİF)	3
Grup 6 (RAW 264.7+*M. avium*+RİF)	3
Grup 7 (RAW 264.7+LİK)	3
Grup 8 (RAW 264.7+*M. avium*+LİK)	3
Grup 9 (RAW 264.7+RA)	3
Grup 10 (RAW 264.7+*M. avium*+RA)	3
Grup 11 (RAW 264.7+ RS)	3
Grup 12 (RAW 264.7+*M. avium*+RS)	3
Grup 13 (RAW 264.7+OA)	3
Grup 14 (RAW 264.7+*M. avium*+OA)	3
Grup 15 (RAW 264.7+LİN)	3
Grup 16 (RAW 264.7+*M. avium*+LİN)	3

3.7 Gen Ekpsresyon Çalışmaları

M. avium suşu ile enfekte edilen ve bu enfekte hücreler bileşiklerin farklı kombinasyonlarıyla muamele edildikten sonra toplandı (toplama işlemi fiziksek olarak bir kazıyıcı yardımıyla gerçekleştirildi, bu aşamada enzim solüsyonu kullanılmaktan imtina edildi. Kuyucuklara %10 oranında FBS içeren RPMI 1640 besiyeri içinde hazırlanmış $1x10^6$ hücre/ml yoğunluğunda hücre eklendi. Negatif ve pozitif kontrol grupları hariç diğer gruplara *M. avium* suşundan 500 µl ilave edildi.

Ardından standart ilaçlar izoniyazid [(238.1 µg/ml) ve rifampisin (238.1 µg/ml)], ve fitokimyasallar [(likopen (0.2 mM), rosmarinik asit (0.09 mM), rosuvastatin (0.02 mM), oleik asit (0.2 mM) ve linalool (0.8 mM)] olacak şekilde hesaplanarak eklendi. Plaklar inkübasyon için 48 saat süre ile 37 °C ve %5 CO_2'li inkübasyona bırakıldı.

İnkübasyon sonunda hücreler plaklardan steril mekanik hücre kazıyı ile nazikçe kaldırılarak 2 ml'lik ependorf tüplerde toplandı.

3.7.1 RNA İzolasyonu

- Hücre süspansiyonu içeren ependorflar 16.000 g'de 10 dk santrifüj edildi. Süpernatant kısmı dikkatlice döküldü.

- Pellet üzerine 1 ml Triazol solüsyonu ve 4 µL Enhancer eklendikten sonra 15 kez pipetaj yapılarak hücrelerin solüsyon ile karışması sağlandı. Laminar flow kabin içerisinde 10 dk inkübasyona bırakıldı.

- 10 dk inkübasyon sonrasında her örneğe 250 µL kloroform eklenir, 20 kez kuvvetlice ters-düz edilerek 10 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı.

- İnkübasyon sonunda örnekler 12000 rpm de 15 dakika +4 °C'de santrifüj edilerek süpernatant (üstte kalan berrak faz) aspire edilip ependorf tüplere alındı.

- Üzerine 1:1 oranında izopropanol alkol eklendi, elle 20 kez kuvvetlice ters-düz edildikten sonra yeniden 10 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı.

- İnkübasyon sonunda yeniden 12000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek tüpün dibindeki RNA pelleti -20°C den alınarak %70'lik 1 ml etanol içinde çözüldü.

- Ardından 7500 rpm'de 5 dakika santrifüj edildikten sonra alkol dökülerek yeniden %70'lik etanol eklendi. İkinci tekrardan sonra tüplere 1 ml -20°C den alınmış %99'luk etanol eklenerek 7500 rpm'de 5 dakika santrifüj edilip, süpernatant atılarak son yıkama işlemi gerçekleştirildi.

- RNA içeriği steril kabin içinde kurutuldu. Bu işlemin sonunda tüpün dibindeki RNA peletleri 15 µl RNAse-free bidistile su ile çözüldü.

- Elde edilen RNA'nın spektrofotometre cihazı ile (Merinton, SMA-1000 UV Spectrophotometer, China) 550 nm dalga boyunda saflığı ve konsantrasyonu tespit edildikten sonra %1'lik agaroz jelde 90 volt 500 mA'de 30 dakika süre ile yürütülerek görüntüleme cihazı ile RNA bantlarının varlığı tespit edilerek izolasyon işleminin verifikasyonu gerçekleştirildi.

3.7.2 Komplementer DNA (cDNA) Sentezi

Konsantrasyonu tespit edilen RNA örneklerinin RNAase-free su kullanılarak 500 ng/ml olacak şekilde konsantrasyonu ayarlandı. cDNA eldesi ticari firmanın (Nucleogene, Almanya) test protokolüne uygun olarak gerçekleştirildi. cDNA eldesi 25 °C'de 5 dakika, 50 °C'de 30 dakika ve 85 °C'de 5 dakika inkübe edilerek gerçekleştirildi. Sentezlenen cDNA örnekleri RT-PCR analizleri yapılıncaya kadar -20°C'de muhafaza edildi.

3.7.3 İnflamatuar Sitokin Genlerinin Ekspresyon Seviyelerinin qPCR ile Belirlenmesi

Gen ekspresyonu çalışmaları sırasında β-actin housekeeping gen olarak seçildi. Çalışmada IL-6, CXCL1 (IL-8), IL-1β, TNF-α, IL-12a (P40), IL-27, CYP1A1, COX-2, iNOS, Egr-1 ve IL-10 genlerinin ekspresyon düzeyleri tespit edildi. Ekspresyon çalışmalarında her grup için 5 µl cDNA örneği kullanıldı. RT-PCR analizlerinde SYBR Green Master Mix (Nucleogene, Almanya) kullanılarak gerçekleştirildi.

Reaksiyon protokolü Qiagen Rotor-Gene Q (Qiagen GmbH, Almanya) cihazı kullanılarak; 95 °C'de 2 dakika, 95 °C'de 15 saniye, 60 °C'de 60 saniye olarak 40 siklus olacak şekilde uygulandı. Her örnekten dublike olarak çalışıldı. Sonuçlar $2^{-\Delta\Delta Ct}$ metodu ile analiz edildi. Çalışmada kullanılan primerlerin sekansları Çizelge 3.3.'de verilmiştir.

Çizelge 3.3. Çalışmada kullanılan oligonükleotit dizileri.

Primerler	Sekanslar	Referanslar
β-actin	5'-CACTGTCGAGTCGCGTCC -3' 5'-TCATCCATGGCGAACTGGTG -3'	(Fragoulis ve ark., 2021)
IL-6	5'- TAGTCCTTCCTACCCCAATTTCC -3' 5'-TTGGTCCTTAGCCACTCCTTC -3'	(Wang ve ark., 2024)
CXCL1 (IL-8)	5'- CTGGGATTCACCTCAAGAACATC -3' 5'- CAGGGTCAAGGCAAGCCTC -3'	(Chen ve ark., 2025)
IL-1β	5′- GCACTACAGGCTCCGAGATGAA -3′ 5′- GTCGTTGCTTGGTTCTCCTTGT -3′	(Paramita Pal ve ark., 2023)
TNF-α	5′- ACCCTCACACTCAGATCATCTTC -3′ 5′- TGGTGGTTTGCTACGACGT -3′	(Ren ve ark., 2021)
IL-12a (P40)	5′- CAGCACTTCAGAATCACAACCA -3′ 5′- TCATTTTCACTCTGTAAGGGTCTG -3′	(Wu ve ark., 2021)
CYP1A1	5′-ATGAGTTTGGGGAGGTTACTGGT-3′ 5′-ACTTCTTATTCAAGTCCTTGAAGGCA-3'	(Özgöçmen ve Azırak, 2023)

IL-27	5′- CTCTGCTTCCTCGCTACCAC -3′ 5′- GGGGCAGCTTCTTTTCTTCT -3′	(Bruni ve ark., 2018)
COX-2	5′- AGAAGGAAATGGCTGCAGAA -3′ 5′- GCTCGGCTTCCAGTATTGAG -3'	(Lee ve ark., 2023)
iNOS	5′- ACATCGACCCGTCCACAGTAT -3′ 5′- CAGAGGGGTAGGCTTGTCTC -3'	(Wang ve ark., 2024)
Egr-1	5′- CCGCTTTTCTCGCTCGGATG -3′ 5′- GCGGATGTGGGTGGTAAGGT -3'	(Pang ve Lin, 2023)
IL-10	5′- CAGGGATCTTAGCTAACGGAAA -3′ 5′- GCTCAGTGAATAAATAGAATGGGAAC -3'	(Pan ve ark., 2022)

3.7.4 İstatistik Analizler

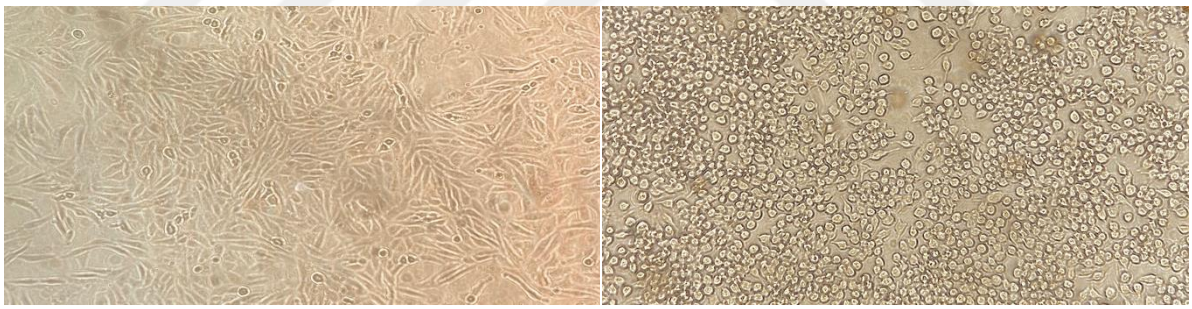
İstatistiksel analiz için GraphPad Prism yazılımı (sürüm 10) kullanıldı. En az üç denemenin ortalaması ve standart sapması hesaplandı. Her grup ve gruplararası karşılaştırmalar tek yönlü ANOVA testleri kullanılarak yapıldı. İki alt grubun olduğu deneyler, two-tailed t-testleri ile analiz edildi. Üç veya daha fazla tek değişkenli alt grubun olduğu deneyler ise tek yönlü ANOVA ile analiz edildi. İki grup arasında post hoc analiz Tukey'nin çoklu karşılaştırma testleri kullanılarak yapıldı.

4. BULGULAR

Çalışmada öncelikle deneylerde standart ilaçlar (izoniyazid ve rifampisin) ve fitokimyasalların (likopen, rosmarinik asit, rosuvastatin, oleik asit ve linalool) hücreler üzerinde toksik konsantrasyonları etki oluşturmayan dozları; hem morfolojik olarak visuel değerlendirmeyle hem de hücre sayısı ve MTT yöntemiyle hücre canlılıkları hesaplanarak gerçekleştirildi. Deneylerde non-toksik konsantrasyonlar aşağıda verilmiştir.

İzoniyazid: 234 µg/ml
Rifampisin: 59 µg/ml
Likopen: 63 µg/ml, 0.12 mM
Rosmarinik Asit: 16 µg/ml, 0.04 mM
Rosuvastatin: 8 µg/ml, 7.6 mM
Oleik Asit: 0.6 µg/ml, 0.002 mM
Linalool: 57 µg/ml, 0.4 mM

4.1 Aktivite Çalışmaları

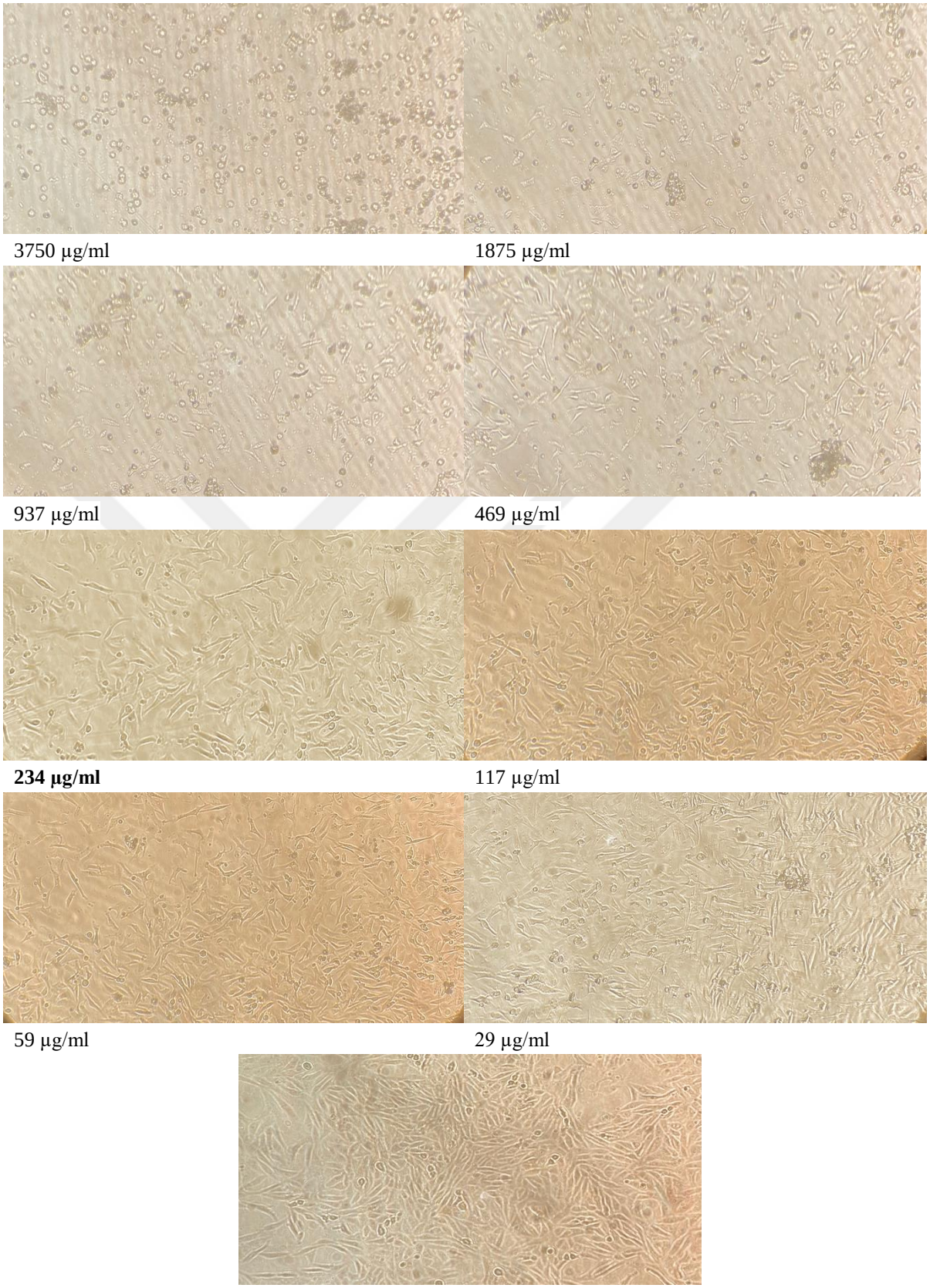


A **B**

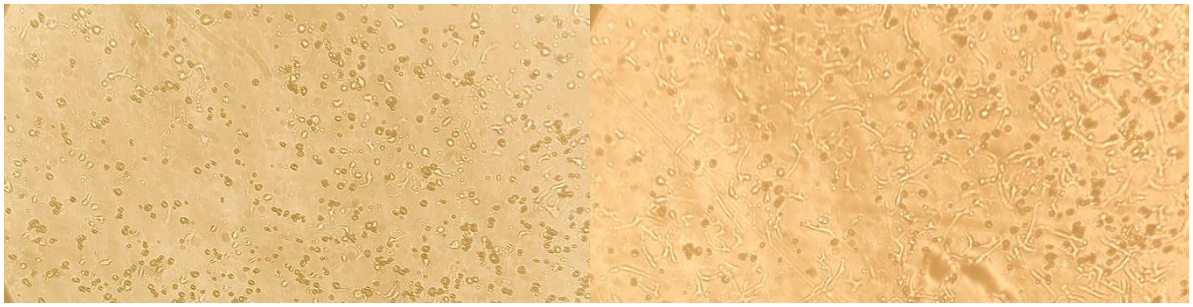
Şekil 4.1. Hücrelerin 96. saat inkübasyonundaki hücre morfolojileri, A: Vero, B: RAW 264.7 (10×).

Şekil 4.1'de RAW 264.7 ve Vero kontrol grubu hücrelerinin 96. saat sonundaki hücre morfolojileri verilmiştir. Hücrelerde herhangi bir sitotoksisite tespit edilmemiştir. Hücreler tipik morfolojide monolayer tarzda kültür kabı yüzeyini kaplamış olup, herhangi bir sitopatolojik değişim tespit edilmemiştir.

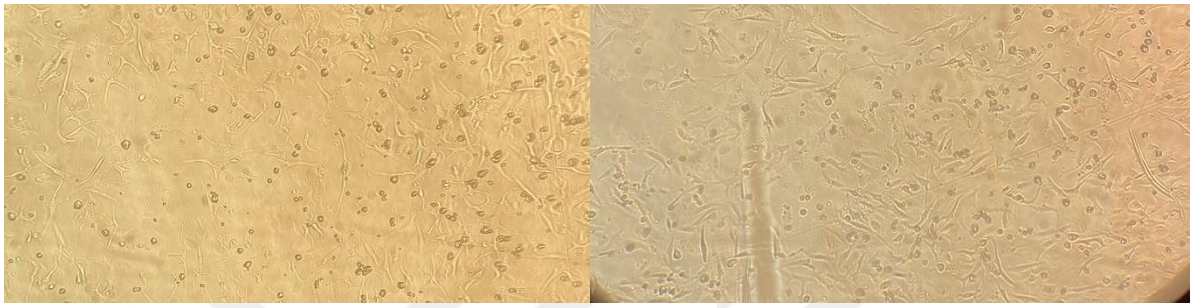
Deneylerde aktivite çalışmaları standart ilaç ve bileşiklerin Vero hücreleri üzerinde toksisite oluşturmayan dozlarında gerçekleştirilmiştir. İnkübasyonun 96. saatinde sitotoksisite testlerinde hücre görüntüleri; Şekil 4-2, 4-3,4-4, 4-5, 4-6, 4-7 ve 4-8.'dedir.



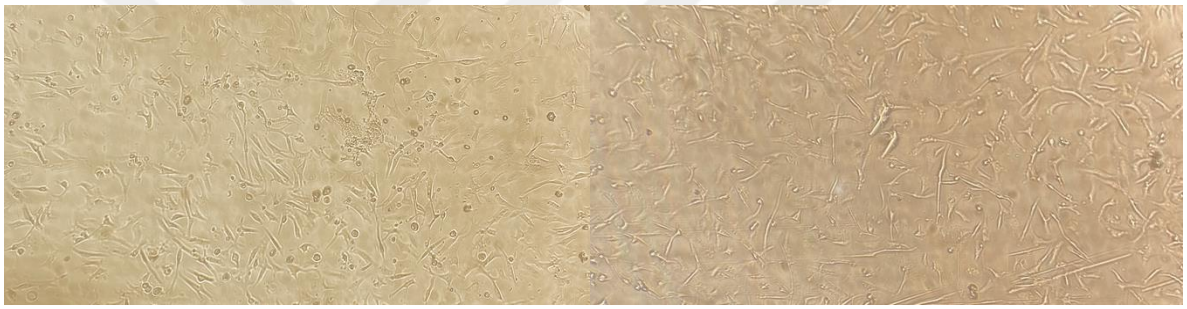
Şekil 4.2. Vero hücre hattında izoniyazidin **<234 µg/ml** konsantrasyonda hücrelerde toksik etki tespit edilmezken, **>234 µg/ml** konsantrasyonda İzoniyazid toksik etki oluşturmuştur. Hücrelerde agregasyon, hücre yuvarlaklaşması, nükleer büyüme gibi sitopatolojik değişimler görülmektedir.



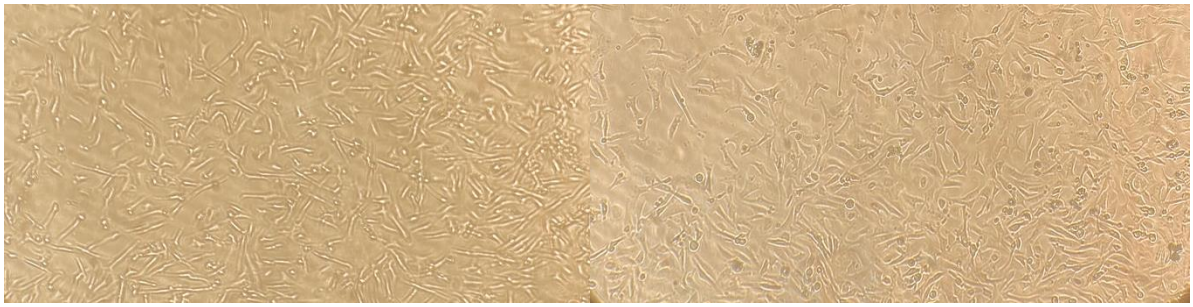
3750 µg/ml 1875 µg/ml



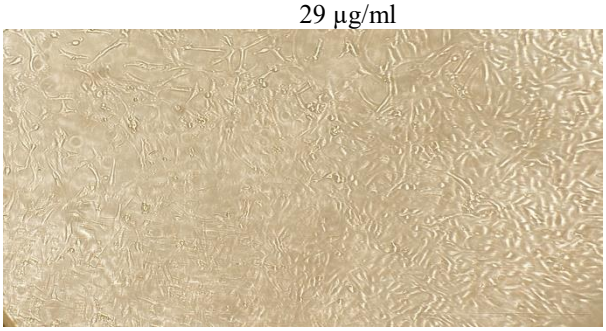
937 µg/ml 469 µg/ml



234 µg/ml 117 µg/ml

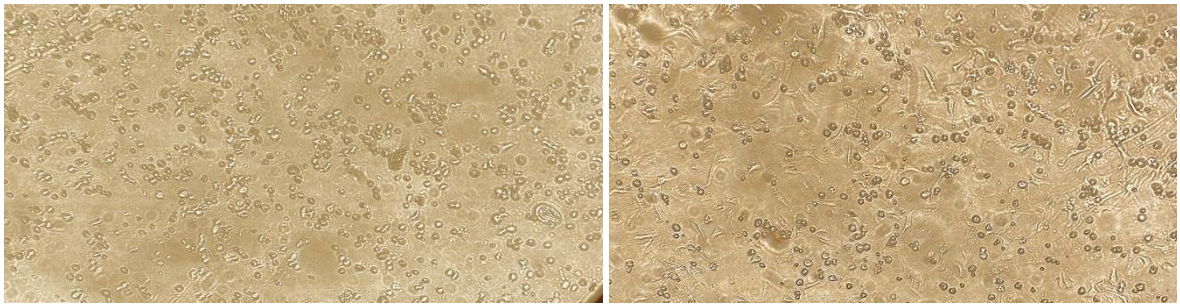


59 µg/ml 29 µg/ml



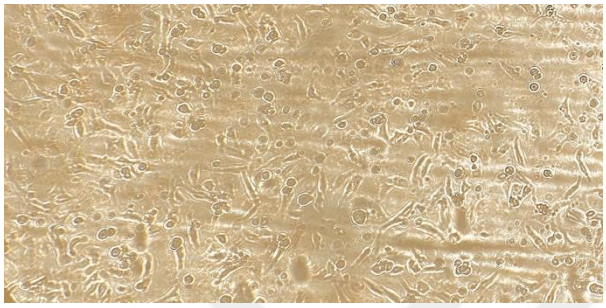
Vero Kontrol

Şekil 4.3. Vero hücre hattında rifampisinin **<59 µg/ml** konsantrasyonda hücrelerde toksik etki tespit edilmezken, **>59 µg/ml** konsantrasyonda toksik etki oluşturmuştur. Yüksek konsantrasyonlarda hücrelerde genel bir atipik görünüm ile izoniyazid testlerine benzer şekilde hücrelerde agregasyon, hücre yuvarlaklaşması, nükleer büyüme gibi sitopatolojik değişimler saptanmıştır.

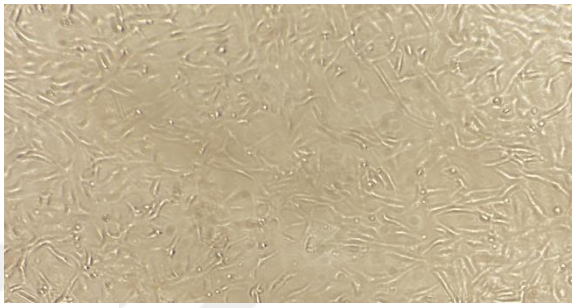


500 µg/ml

250 µg/ml



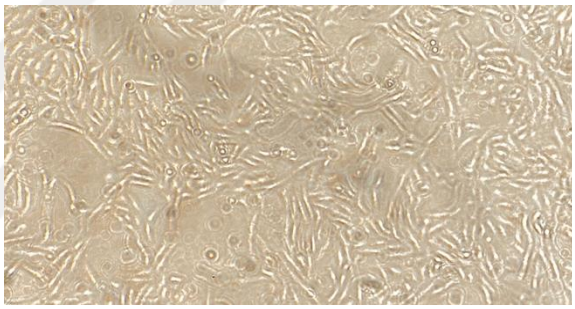
125 µg/ml



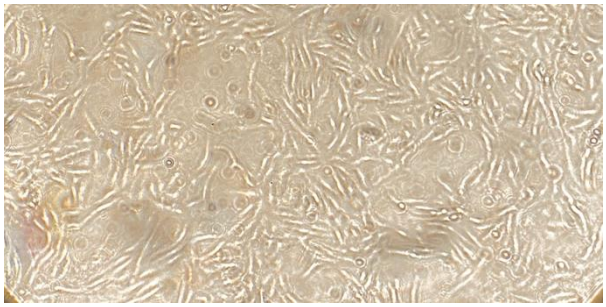
63 µg/ml



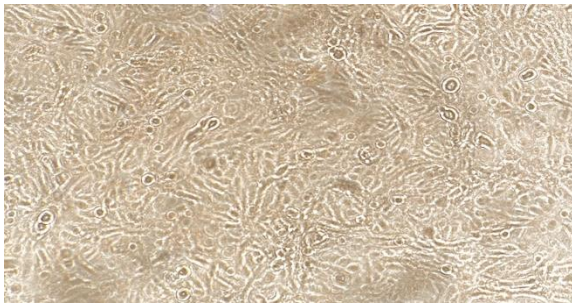
31 µg/ml



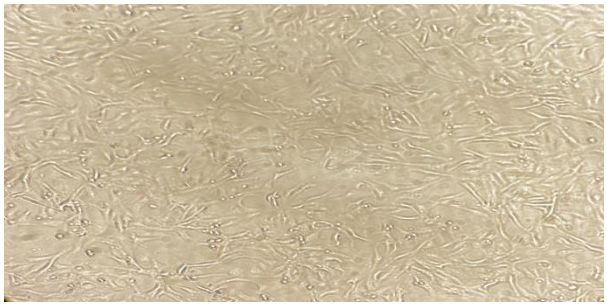
16 µg/ml



8 µg/ml

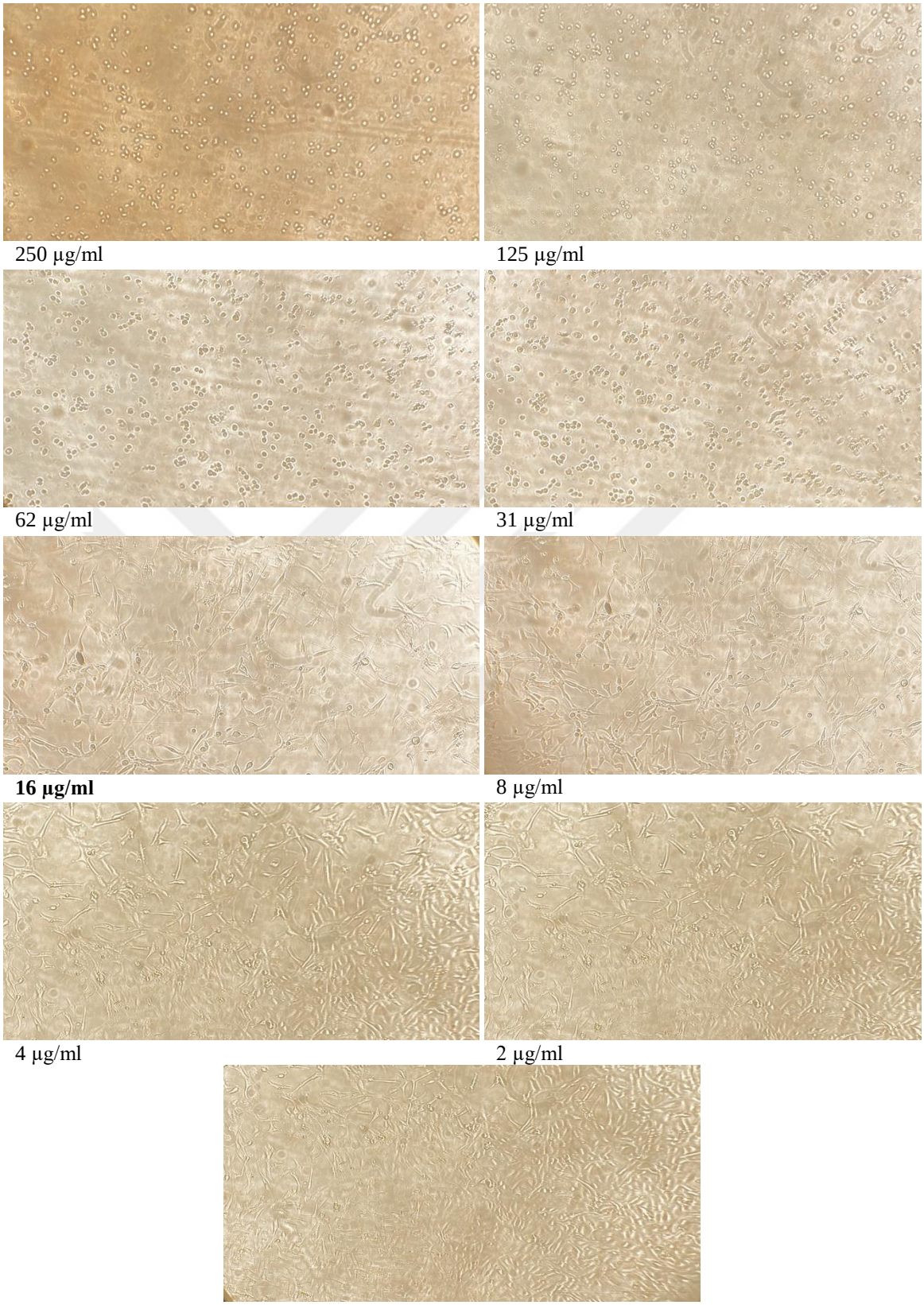


4 µg/ml



Vero Kontrol

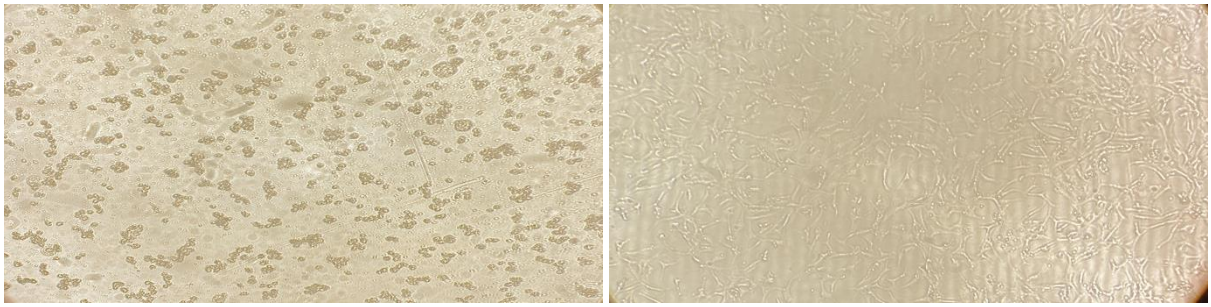
Şekil 4.4. Vero hücre hattında likopenin **<63 µg/ml (0.12 mM)** konsantrasyonda hücrelerde toksik etki tespit edilmezken, **>63 µg/ml** konsantrasyonda toksik etki oluşturmuştur. Hücrelerde agregasyon, hücre yuvarlaklaşması, nükleer büyüme gibi sitopatolojik değişimler saptanmıştır.



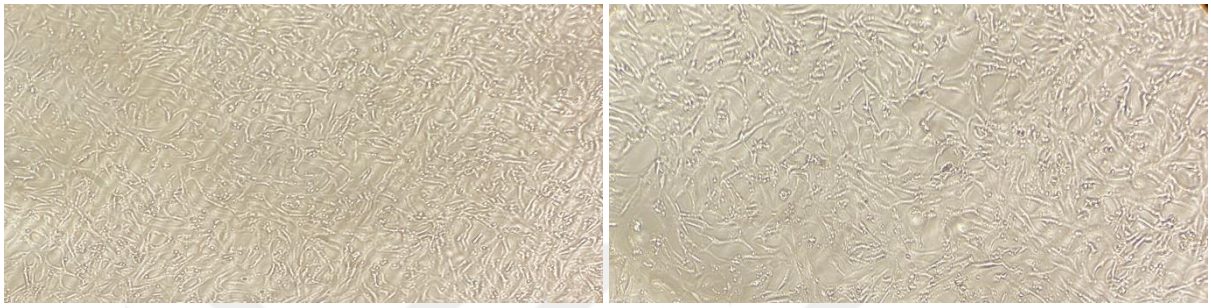
Şekil 4.5. Vero hücre hattında rosmarinik asitin **<16 µg/ml (0.04)** konsantrasyonda hücrelerde toksik etki tespit edilmezken, **>16 µg/ml** konsantrasyonda toksik etki oluşturmuştur. Hücrelerde agregasyon, hücre yuvarlaklaşması, nükleer büyüme gibi sitopatolojik değişimler saptanmıştır.



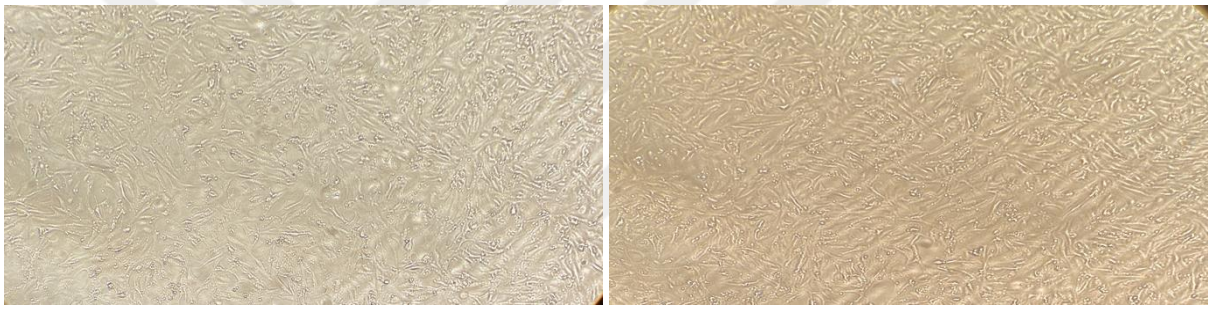
Şekil 4.6. Vero hücre hattında rosuvastatinin **<8 µg/ml (7,6 mM)** konsantrasyonda hücrelerde toksik etki tespit edilmezken, **>8 µg/ml** konsantrasyonda rosuvastatin toksik etki oluşturmuştur. Hücrelerde agregasyon, hücre yuvarlaklaşması, nükleer büyüme gibi sitopatolojik değişimler görülmektedir.



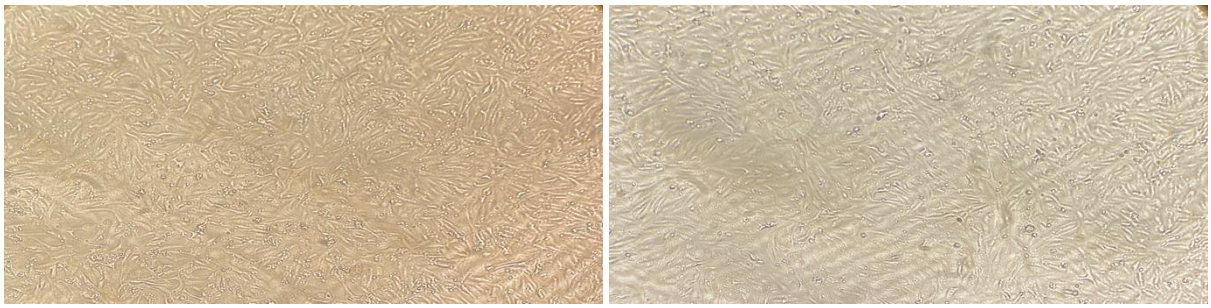
2.5 µg/ml 1.3 µg/ml



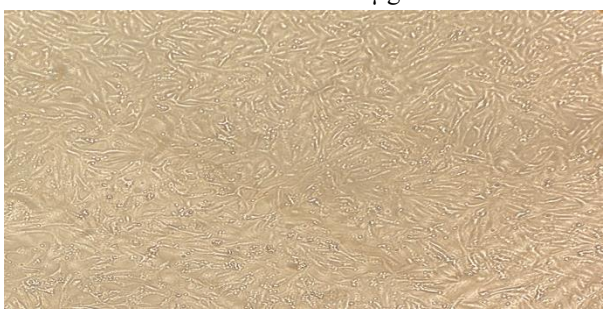
0.6 µg/ml 0.3 µg/ml



0.2 µg/ml 0.08 µg/ml



0.04 µg/ml 0.02 µg/ml



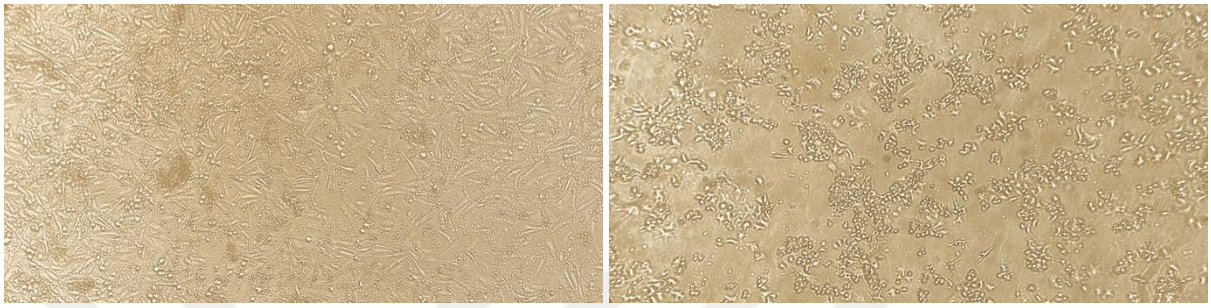
Vero Kontrol

Şekil 4.7. Vero hücre hattında oleik asitin **<0.6 µg/ml (0.002 mM)** konsantrasyonda hücrelerde toksik etki tespit edilmezken, **>0.6 µg/ml** konsantrasyonda oleik asit toksik etki oluşturmuştur. Hücrelerde agregasyon, hücre yuvarlaklaşması, nükleer büyüme gibi sitopatolojik değişimler görülmektedir.



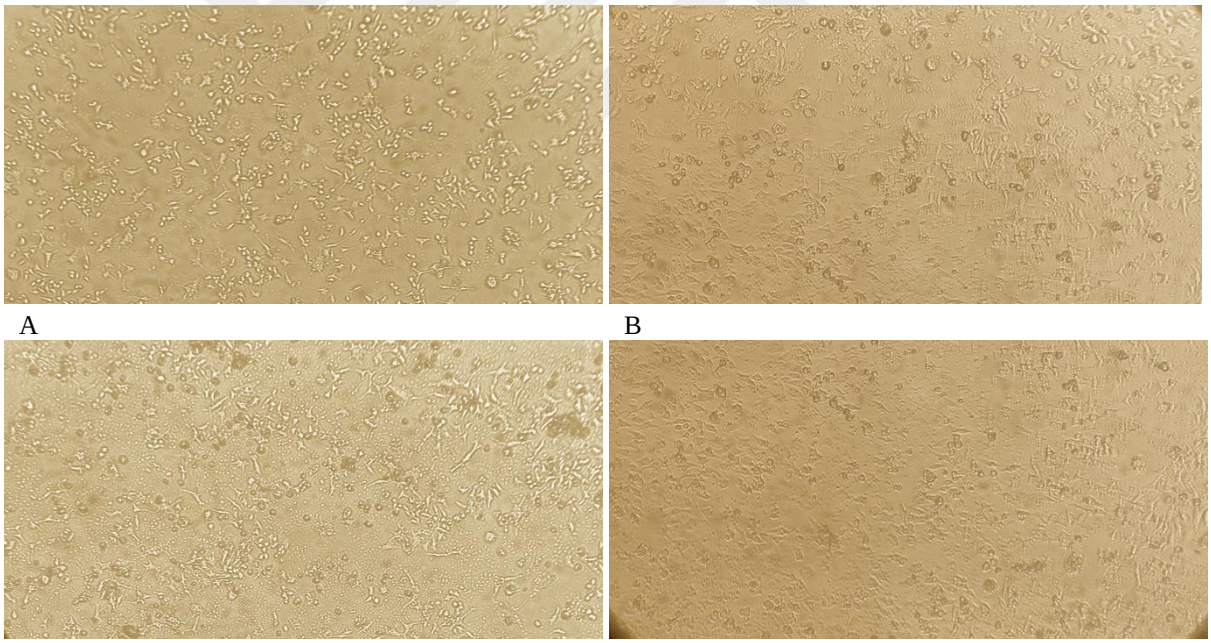
Şekil 4.8. Vero hücre hattında linaloolün **<57 µg/ml (0.4 mM)** konsantrasyonda hücrelerde toksik etki tespit edilmezken, **>57 µg/ml** konsantrasyonda linalool toksik etki oluşturmuştur. Hücrelerde agregasyon, hücre yuvarlaklaşması, nükleer büyüme gibi sitopatolojik değişimler görülmektedir.

Vero hücrelerinde izoniyazid ve rifampisin sırasıyla non-toksik konsantrasyonları; **234 ve 59 mM**, likopen, rosmarinik asit, rozuvastatin, oleik asit ve linaloolün sırasıyla non-toksik konsantrasyonları ise; **63, 16, 8, 0.6 ve 57** µg/ml olarak tespit edilmiştir. Bu konsantrasyonların üzerinde hücrelerde belirgin sitopatolojik değişimlerin varlığı tespit edilmiştir.



A B

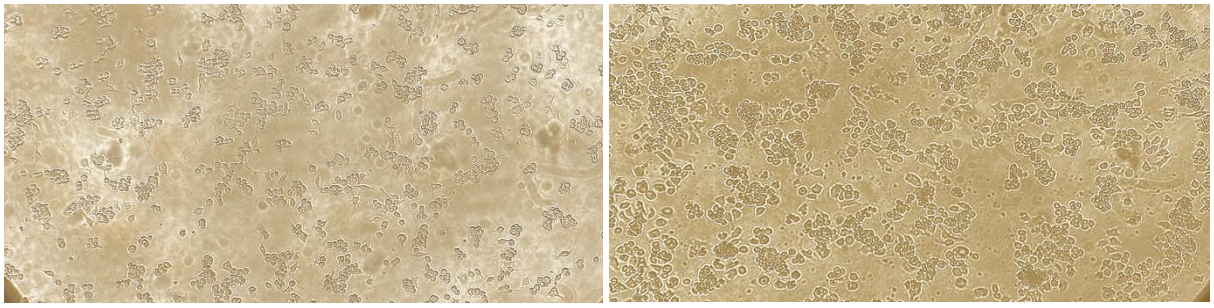
Şekil 4.9. *M. avium* ile enfekte edilmiş Vero ve RAW 264.7 hücrelerin 96 saat inkübasyon sonundaki hücre morfolojileri, A: Vero+*M. avium*, B: RAW+*M. avium*, (10×).



A B C D

Şekil 4.10. *M. avium* ile enfekte edilen RAW 264.7 hücrelerinde A:İZO **(234 µg/ml)** B:İZO+*M. avium* ve C:RİF **(59 µg/ml),** D:RİF+*M. avium* hücre morfolojileri üzerinde meydana getirdiği sitopatolojik değişiklikler.

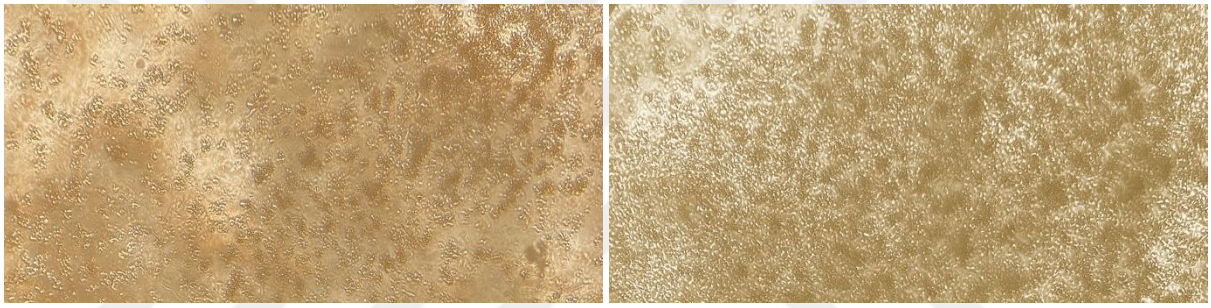
İzoniyazid (234 µg/ml) ve rifampisin (59 µg/ml) RAW 264.7 hücreleri üzerinde inkübasyonun 48. saatinde herhangi bir toksisite oluşturmadığı morfolojik olarak yapılan incelemelerde tespit edilmiştir (Şekil 4-10).



A B

Şekil 4.11. *M. avium* ile enfekte edilen RAW 264.7 hücrelerinde A:LİK, B:LİK+*M. avium* **(63 µg/ml)** hücre morfolojileri üzerinde meydana getirdiği sitopatolojik değişiklikler.

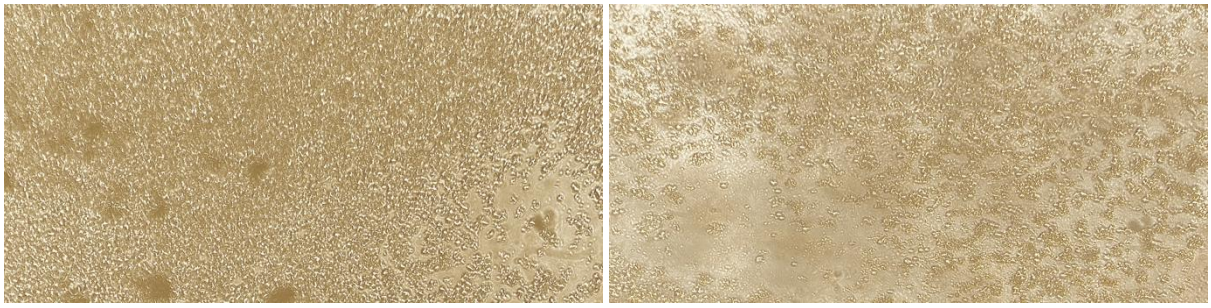
Likopen (63 µg/ml) Şekil 4-11'de görüldüğü üzere RAW 264.7 hücreleri üzerinde inkübasyonun 48. saatinde herhangi bir toksik etki meydana gelmediği morfolojik olarak yapılan incelemelerde tespit edilmiştir.



A B

Şekil 4.12. *M. avium* ile enfekte edilen RAW 264.7 hücrelerinde A:RA, B:RA+*M. avium* **(16 µg/ml)** hücre morfolojileri üzerinde meydana getirdiği sitopatolojik değişiklikler.

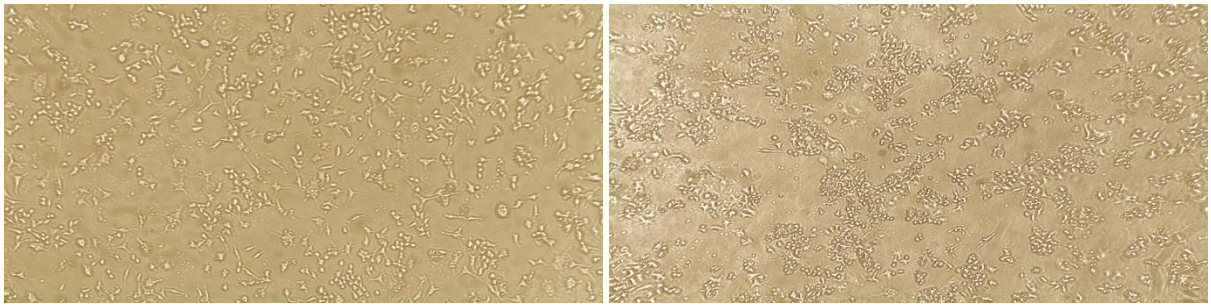
Rosmarinik asit (16 µg/ml) Şekil 4-12'de görüldüğü üzere RAW 264.7 hücreleri üzerinde inkübasyonun 48. saatinde herhangi bir toksik etki meydana gelmediği morfolojik olarak yapılan incelemelerde tespit edilmiştir.



A B

Şekil 4.13. *M. avium* ile enfekte edilen RAW 264.7 hücrelerinde A:RS, B:RS+*M. avium* **(8 µg/ml)** hücre morfolojileri üzerinde meydana getirdiği sitopatolojik değişiklikler.

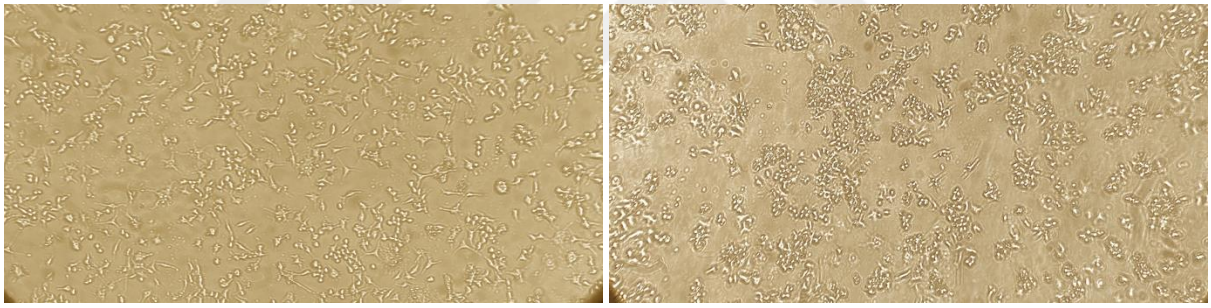
Rosuvastatin (8 µg/ml) Şekil 4-13'de görüldüğü üzere RAW 264.7 hücreleri üzerinde inkübasyonun 48. saatinde herhangi bir toksik etki meydana gelmediği morfolojik olarak yapılan incelemelerde tespit edilmiştir.



A B

Şekil 4.14. *M. avium* ile enfekte edilen RAW 264.7 hücrelerinde A:OA, B:OA+*M. avium* **(0.6 µg/ml)** hücre morfolojileri üzerinde meydana getirdiği sitopatolojik değişiklikler.

Oleik asit (8 µg/ml) Şekil 4.14'da görüldüğü üzere RAW 264.7 hücreleri üzerinde inkübasyonun 48. saatinde herhangi bir toksik etki meydana gelmediği morfolojik olarak yapılan incelemelerde tespit edilmiştir.

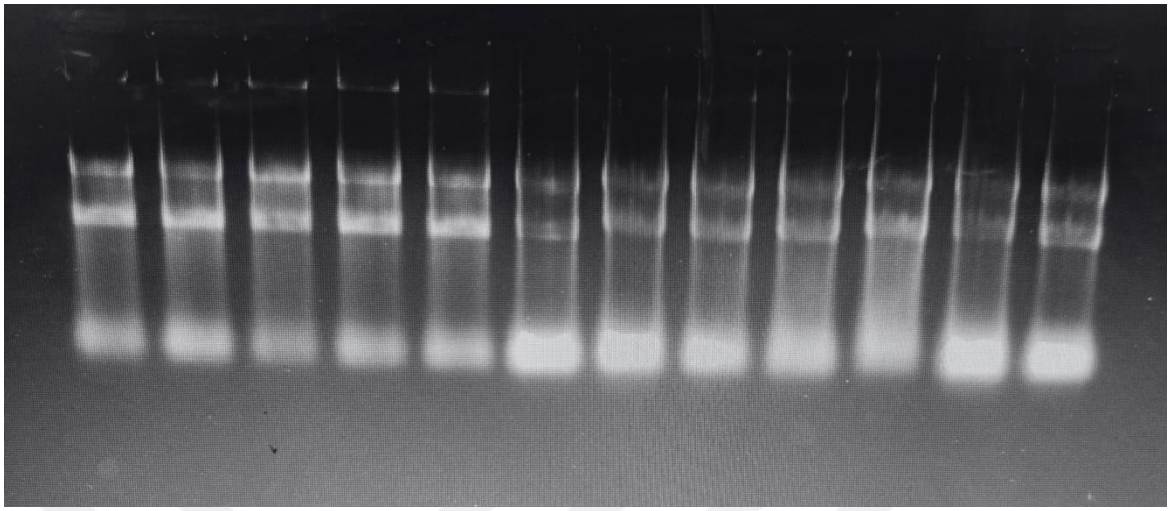


A B

Şekil 4.15. *M. avium* ile enfekte edilen RAW 264.7 hücrelerinde A:LİN, B:LİN+*M. avium* **(57 µg/ml)** hücre morfolojileri üzerinde meydana getirdiği sitopatolojik değişiklikler.

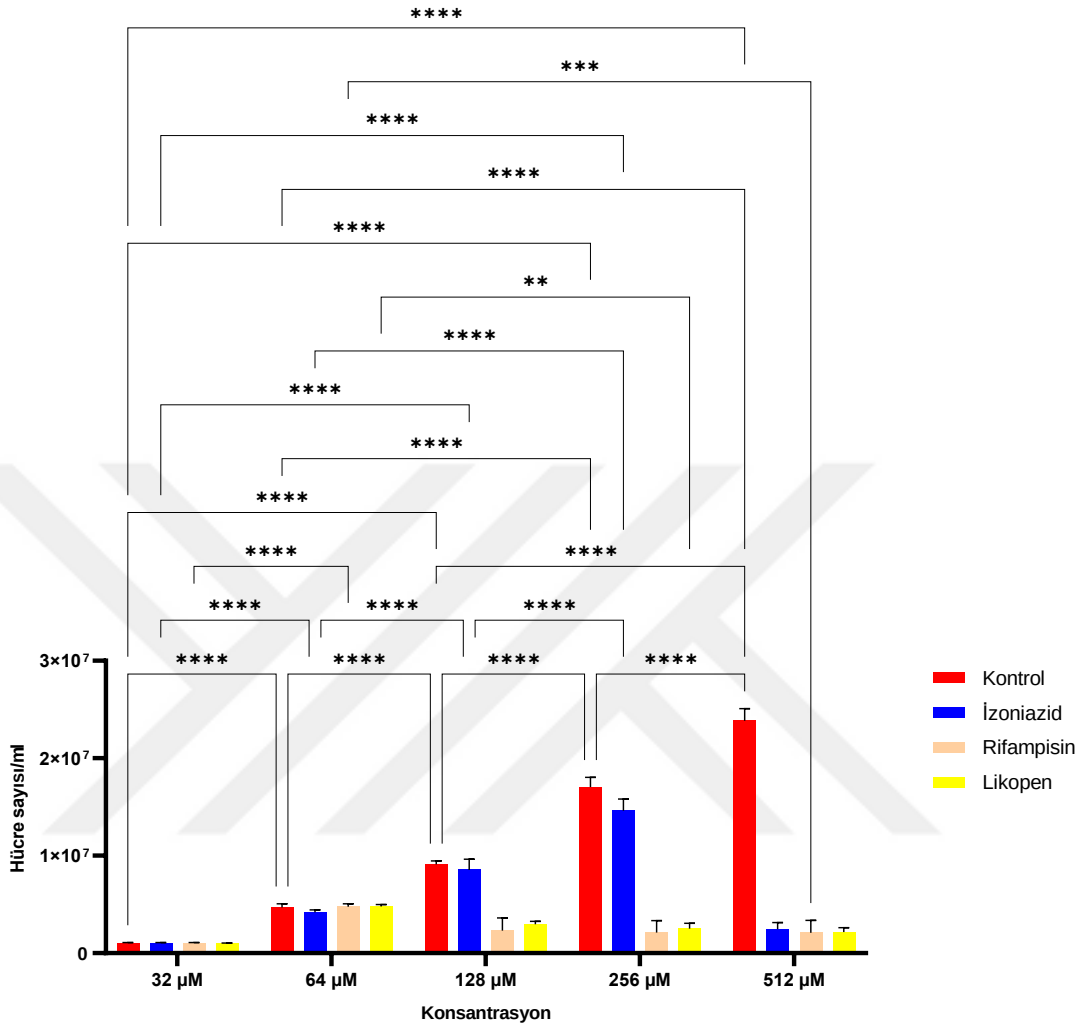
Linalool (57 µg/ml) Şekil 4.15'de görüldüğü üzere RAW 264.7 hücreleri üzerinde inkübasyonun 48. saatinde herhangi bir toksik etki meydana gelmediği morfolojik olarak yapılan incelemelerde tespit edilmiştir.

4.2 Gen Ekspresyon Analizi Sonuçları



Şekil 4.16. RNA izolasyonu sonrası RAW 264.7 hücrelerinden elde edilen total RNA'nın agaroz jel görüntüsü.

4.3 Analiz Sonuçları

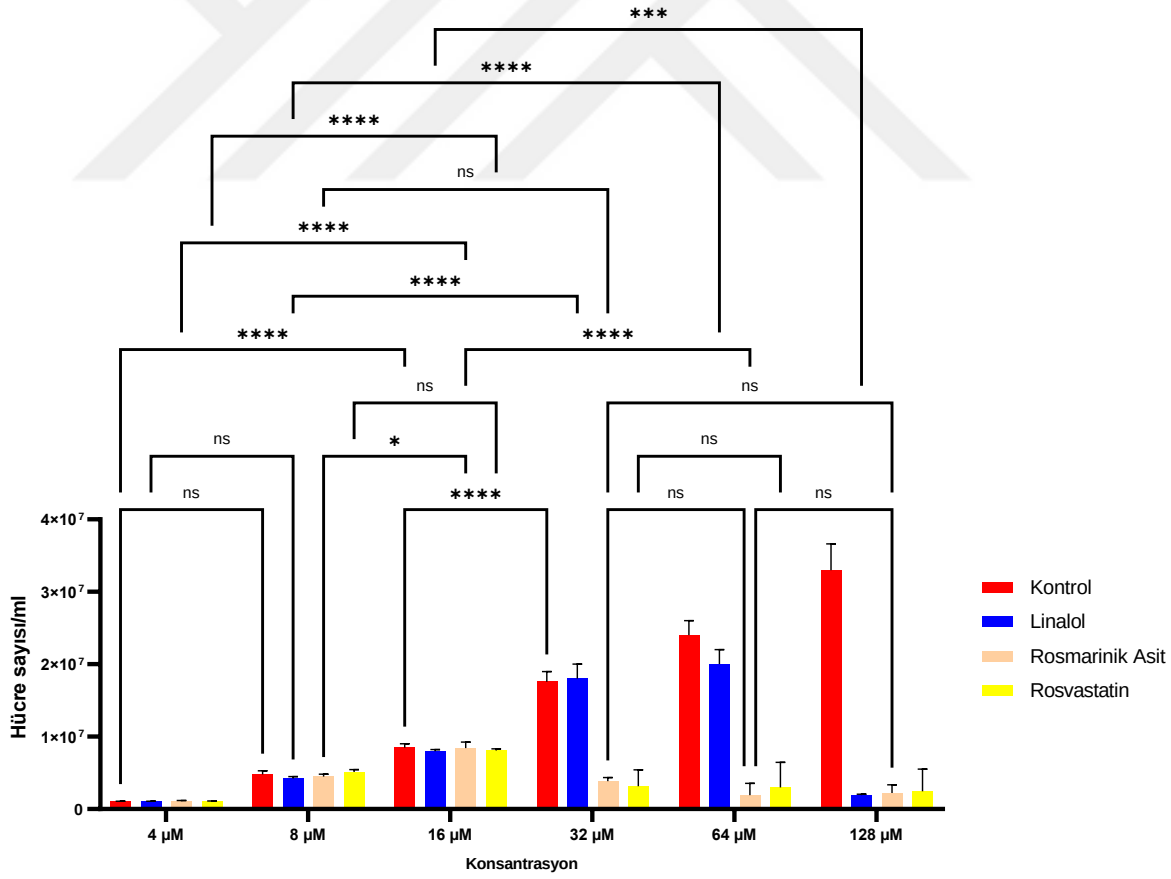


Şekil 4.17. İzoniazid, rifampisin ve likopenin Vero hücrelerindeki sitotoksisite değerlendirmesi.

	Kontrol		**İzoniazid**		**Rifampisin**		**Likopen**	
	Özet	**P Değeri**	**Özet**	**P Değeri**	**Özet**	**P Değeri**	**Özet**	**P Değeri**
32 µM & 64 µM	****	<0,0001	****	<0,0001	****	<0,0001	****	<0,0001
32 µM & 128 µM	****	<0,0001	****	<0,0001	ns	0,2654	*	0,0258
32 µM & 256 µM	****	<0,0001	****	<0,0001	ns	0,4393	ns	0,1423
32 µM & 512 µM	****	<0,0001	ns	0,1666	ns	0,4552	ns	0,3636
64 µM & 128 µM	****	<0,0001	****	<0,0001	**	0,0028	*	0,0437

64 µM & 256 µM	****	<0,0001	****	<0,0001	**	0,0010	**	0,0062
64 µM & 512 µM	****	<0,0001	ns	0,0636	***	0,0010	**	0,0013
128 µM & 256 µM	****	<0,0001	****	<0,0001	ns	0,9973	ns	0,9436
128 µM & 512 µM	****	<0,0001	****	<0,0001	ns	0,9963	ns	0,7030
256 µM & 512 µM	****	<0,0001	****	<0,0001	ns	>0,9999	ns	0,9832

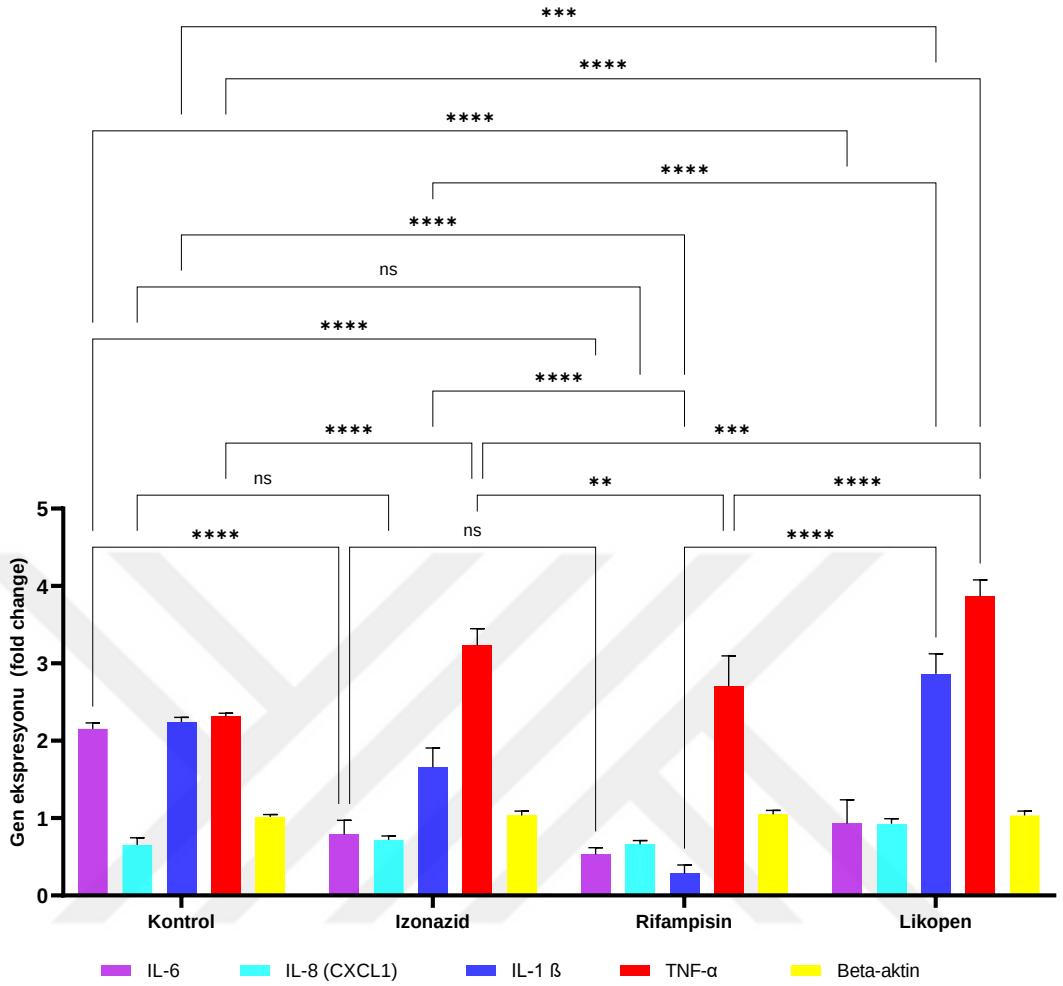
Şekil 4.17'de görüldüğü gibi rifampisin ve likopenin 128 µM, izoniazidin ise 512 µM düzeyinde hücreler üzerinde toksisite oluşturduğu, bu konsantrasyonlarda hücre canlılığının anlamlı derecede azaldığı, hücrelerin atipik morfolojiye geçtikleri ve hücrelerde sitopatolojik değişimlerin varlığı tespit edilmiştir (Şekil 4-17).



Şekil 4.18. Linalool, rosmarinik asit ve rosuvastatinin Vero hücrelerindeki sitotoksisite değerlendirmesi.

	Kontrol		Linalool		Rosmarinik Asit		Rosuvastatin	
	Özet	P Değeri	Özet	P Değeri	Özet	P Değeri	Özet	P Değeri
4 µM & 8 µM	ns	0,0565	ns	0,1516	ns	0,1060	*	0,0315
4 µM & 16 µM	****	<0,0001	****	<0,0001	****	<0,0001	****	<0,0001
4 µM & 32 µM	****	<0,0001	****	<0,0001	ns	0,2667	ns	0,5726
4 µM & 64 µM	****	<0,0001	****	<0,0001	ns	0,9840	ns	0,6584
4 µM & 128 µM	****	<0,0001	ns	0,9810	ns	0,9491	ns	0,8833
8 µM & 16 µM	ns	0,0602	ns	0,0565	*	0,0384	ns	0,2109
8 µM & 32 µM	****	<0,0001	****	<0,0001	ns	0,9971	ns	0,6633
8 µM & 64 µM	****	<0,0001	****	<0,0001	ns	0,3736	ns	0,5776
8 µM & 128 µM	****	<0,0001	ns	0,4901	ns	0,4982	ns	0,3243
16 µM & 32 µM	****	<0,0001	****	<0,0001	*	0,0110	**	0,0050
16 µM & 64 µM	****	<0,0001	****	<0,0001	****	<0,0001	**	0,0033
16 µM & 128 µM	****	<0,0001	***	0,0003	***	0,0002	***	0,0009
32 µM & 64 µM	***	0,0001	ns	0,6306	ns	0,6633	ns	>0,9999
32 µM & 128 µM	****	<0,0001	****	<0,0001	ns	0,7854	ns	0,9933
64 µM & 128 µM	****	<0,0001	****	<0,0001	ns	>0,9999	ns	0,9982

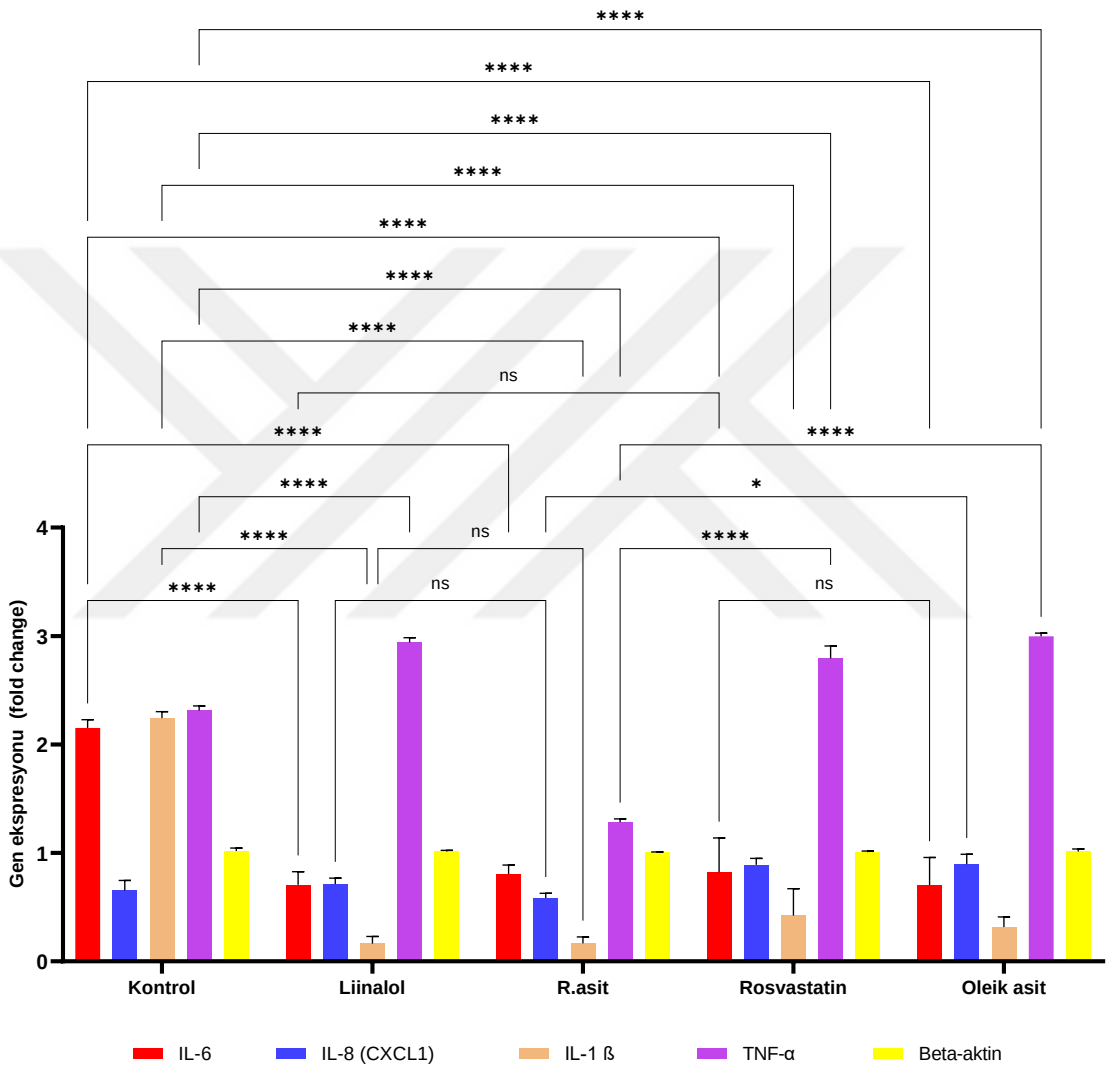
Çalışmada; rosmarinik asit 32 µM, rosuvastatin 16 µM ve linaloolün ise 128 µM düzeyinde hücreler üzerinde toksisite oluşturduğu, bu konsantrasyonlarda hücre canlılığının anlamlı derecede azaldığı, hücrelerin atipik morfolojiye geçtikleri ve hücrelerde sitopatolojik değişimlerin varlığı tespit edilmiştir. Sitotoksisite testlerinde linaloolün hücre toksisitesi en düşük bileşen olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4-18).



Şekil 4.19. Raw 264.7 hücre kültüründe IL-6, IL-8 (CXCL1), IL-1β ve TNF-α gen ekspresyonlarının Beta-aktin ile karşılaştırmalı analizi.

	IL-6		**IL-8 (CXCL1)**		**IL-1β**		**TNF-α**		**Beta-aktin**	
	Özet	P Değeri	Özet	P Değeri	Özet	P Değeri	Özet	P Değeri	Özet	P Değeri
Kontrol & Izonazid	****	<0,0001	ns	0,9618	***	0,0006	****	<0,0001	ns	0,9993
Kontrol & Rifampisin	****	<0,0001	ns	0,9999	****	<0,0001	*	0,0340	ns	0,9949
Kontrol & Likopen	****	<0,0001	ns	0,2080	***	0,0003	****	<0,0001	ns	0,9993
Izonazid & Rifampisin	ns	0,2567	ns	0,9759	****	<0,0001	**	0,0022	ns	0,9993
Izonazid & Likopen	ns	0,7244	ns	0,4433	****	<0,0001	***	0,0002	ns	>0,9999
Rifampisin & Likopen	*	0,0284	ns	0,2364	****	<0,0001	****	<0,0001	ns	0,9993

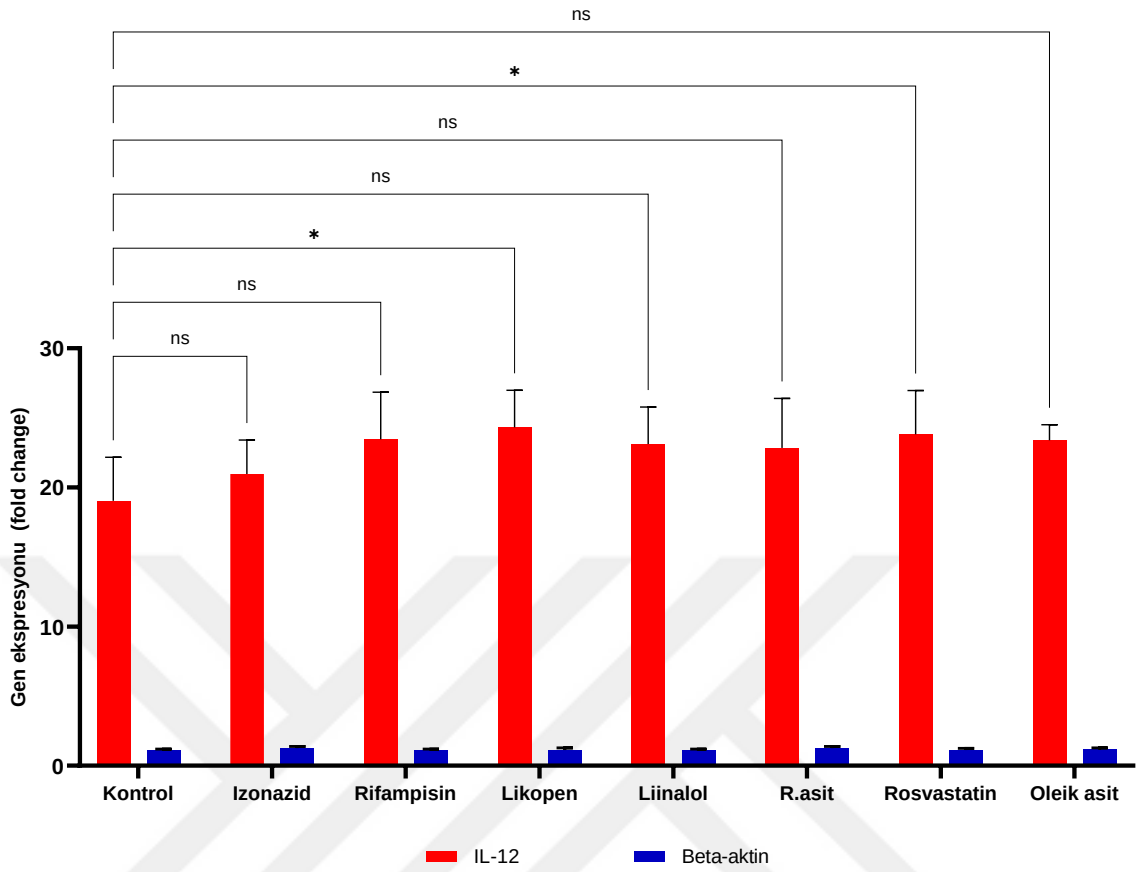
Kontrol grubuyla kıyaslandığında IL-1β, IL-6 standart ilaç gruplarında (izoniazid ve rifampisin) anlamlı derecede azalırken, likopen grubunda IL-1β'nın anlamlı düzeyde arttığı tespit edilmiştir. Bunun yanında izoniazid, rifampisin ve likopen gruplarında TNF-α seviyesinin kontrol grubuyla kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı oranda arttığı saptanmıştır (Şekil 4-19).



Şekil 4.20. Raw 264.7 hücre kültüründe proenflamatuar sitokin gen (IL-6, IL-8 (CXCL1), IL-1β ve TNF-α) ekspresyonlarının linalool, rosmarinik asit, rosuvastatin ve oleik asit ile modülasyonu**.**

	IL-6		IL-8 (CXCL1)		IL-1β		TNF-α	
	Özet	P Değeri	Özet	P Değeri	Özet	P Değeri	Özet	P Değeri
Kontrol & Linalool	****	<0,0001	ns	0,9654	****	<0,0001	****	<0,0001
Kontrol & Rozmerik Asit	****	<0,0001	ns	0,9405	****	<0,0001	****	<0,0001
Kontrol & Rosuvastatin	****	<0,0001	ns	0,0910	****	<0,0001	****	<0,0001
Kontrol & Oleik Asit	****	<0,0001	ns	0,0773	****	<0,0001	****	<0,0001
Linalool & Rosmarinik asit	ns	0,8122	ns	0,6220	ns	>0,9999	****	<0,0001
Linalool & Rosuvastatin	ns	0,7114	ns	0,3199	ns	0,0503	ns	0,4852
Linalool & Oleik Asit	ns	>0,9999	ns	0,2841	ns	0,4630	ns	0,9774
Rosmarinik asit & Rosuvastatin	ns	0,9998	*	0,0134	ns	0,0550	****	<0,0001
Rosmarinik asit & Oleik Asit	ns	0,7934	*	0,0109	ns	0,4852	****	<0,0001
Rosuvastatin & Oleik Asit	ns	0,6895	ns	>0,9999	ns	0,7738	ns	0,1926

Deneylerde IL-6 ve IL-1β ekspresyon seviyeleri kontrol grubuyla kıyaslandığında linalool, rosmarinik asit, rosuvastatin ve oleik asit gruplarında anlamlı derecede azalırken, TNF-α gen ekspresyonu seviyelerinde anlamlı derecede artışların olduğu saptanmıştır. Fakat, IL-8 gen ekspresyonunun tüm bileşik gruplarında kontrol grubuyla kıyaslandığında anlamlı değişimlerin olmadığı tespit edilmiştir (Şekil 4.20).

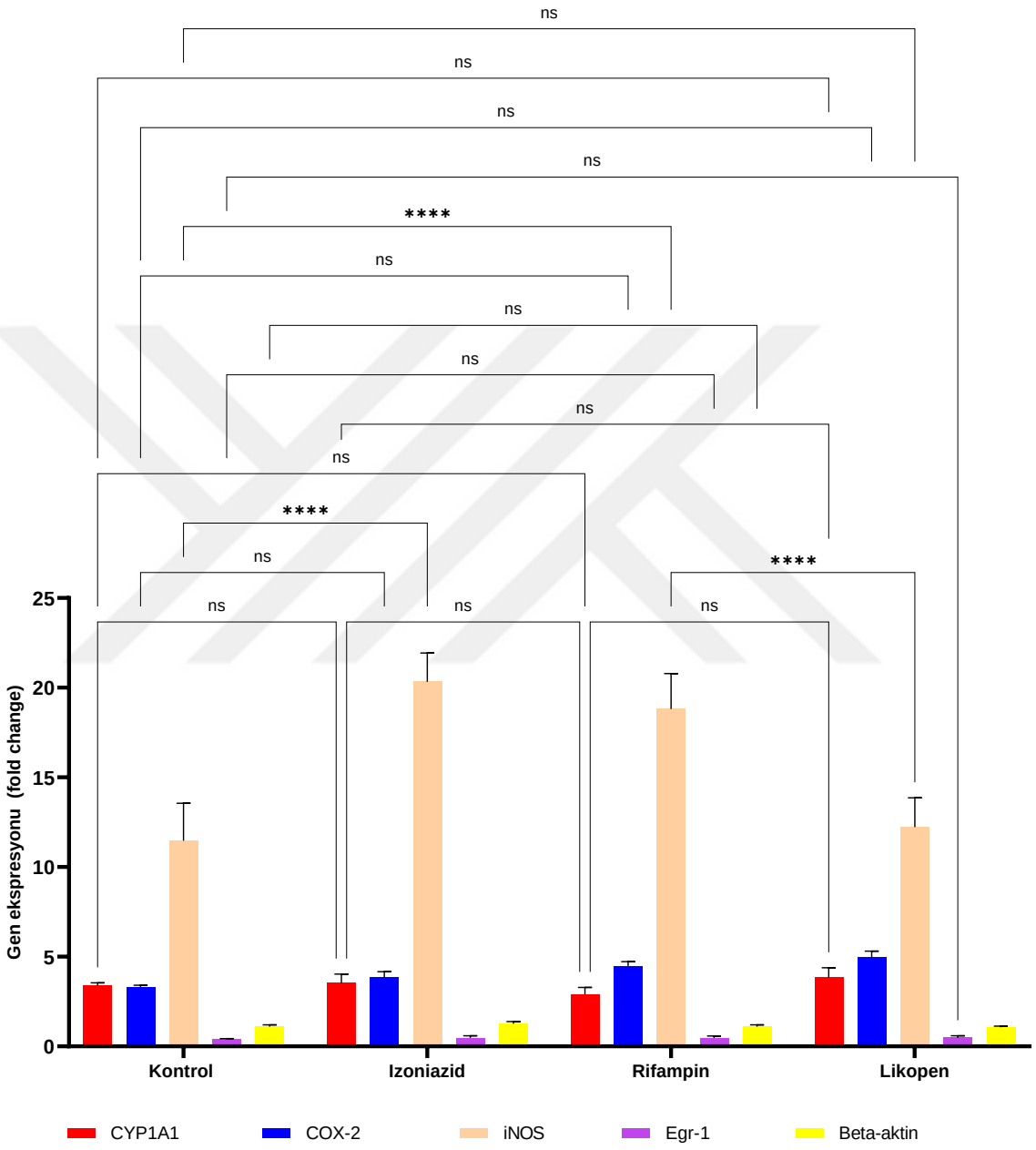


Şekil 4.21. Raw 264.7 hücre kültüründe IL-12 geni ekspresyon seviyelerinin Beta-aktin geni ile karşılaştırmalı analizi.

	IL-12	
	Özet	P Değeri
Kontrol & Izonazid	ns	0,7521
Kontrol & Rifampisin	ns	0,0606
Kontrol & Likopen	*	0,0179
Kontrol & Linalool	ns	0,0955
Kontrol & Rosmarinik asit	ns	0,1354
Kontrol & Rosuvastatin	*	0,0371
Kontrol & Oleik asit	ns	0,0672

Kontrol grubu dahil olmak üzere tüm ilaç (izoniazid ve rifampisin) ve bileşik (likopen, linalool, rosmarinik asit, rosuvastatin ve oleik asit) gruplarında Beta-aktin geni ile kıyaslandığında IL-12 ekspresyon seviyelerinde anlamlı artışların olduğu saptanmıştır.

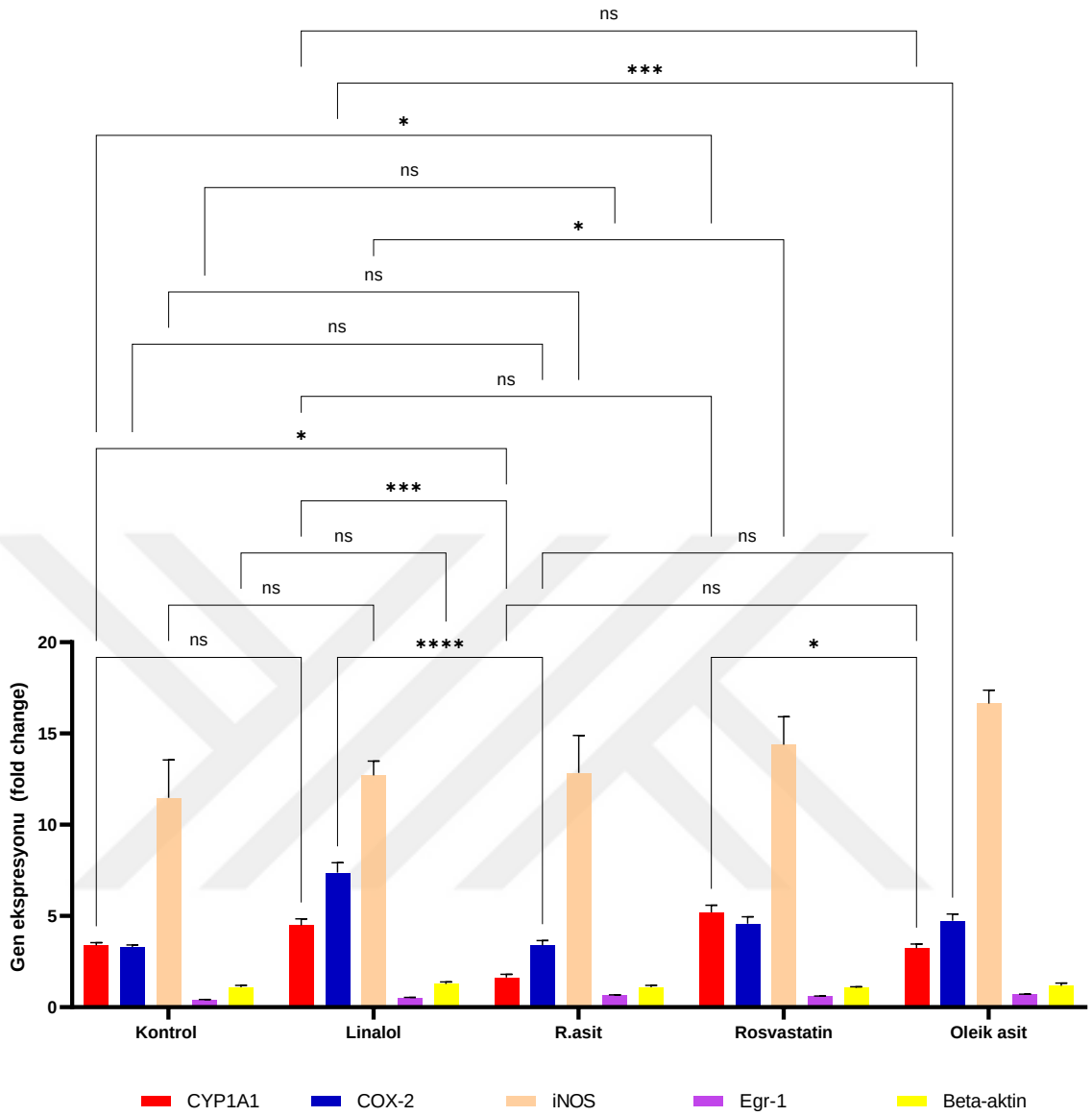
Kontrol grubuyla kıyaslandığında tüm gruplarda IL-12 ekspresyon düzeyi bir artış gösterse de likopen ve rosuvastatin dışındaki tüm gruplardan bu artışların istatiksel olarak anlamlı olmadığı tespit edilmiştir (Şekil 4.21).



Şekil 4.22. Raw 264.7 hücre hattında izoniazid, rifampisin ve likopenin CYP1A1, COX-2, iNOS ve Egr-1 gen ekspresyon oranlarına etkisinin Beta-aktin geniyle karşılaştırmalı analizi.

	CYP1A1		COX-2		iNOS		TNF-α		Beta-aktin	
	Özet	P Değeri	Özet	P Değeri	Özet	P Değeri	Özet	P Değeri	Özet	P Değeri
Kontrol & Izoniazid	ns	0,9969	ns	0,8494	****	<0,0001	ns	0,9996	ns	0,9952
Kontrol & Rifampin	ns	0,9000	ns	0,3391	****	<0,0001	ns	0,9997	ns	>0,9999
Kontrol & Likopen	ns	0,9140	ns	0,1020	ns	0,7055	ns	0,9996	ns	>0,9999
Izoniazid & Rifampin	ns	0,8071	ns	0,8120	ns	0,1513	ns	>0,9999	ns	0,9952
Izoniazid & Likopen	ns	0,9697	ns	0,4191	****	<0,0001	ns	>0,9999	ns	0,9917
Rifampin & Likopen	ns	0,5414	ns	0,9106	****	<0,0001	ns	>0,9999	ns	>0,9999

Kontrol grubuyla kıyaslandığında izoniazid, rifampisin ve likopen ile muamele edilen gruplarda CYP1A1, COX-2 ve Egr-1 gen ekspresyonlarında anlamlı farklılıklar tespit edilmemiştir. Halbuki, iNOS ekspresyonunda izoniazid ve rifampisin gruplarından istatiksel olarak anlamlı düzeyde artışlar görülürken, likopen grubunda bu gen ekspresyonunun kontrol grubuna benzer şekilde regüle edildiği tespit edilmiştir (Şekil 4-22).

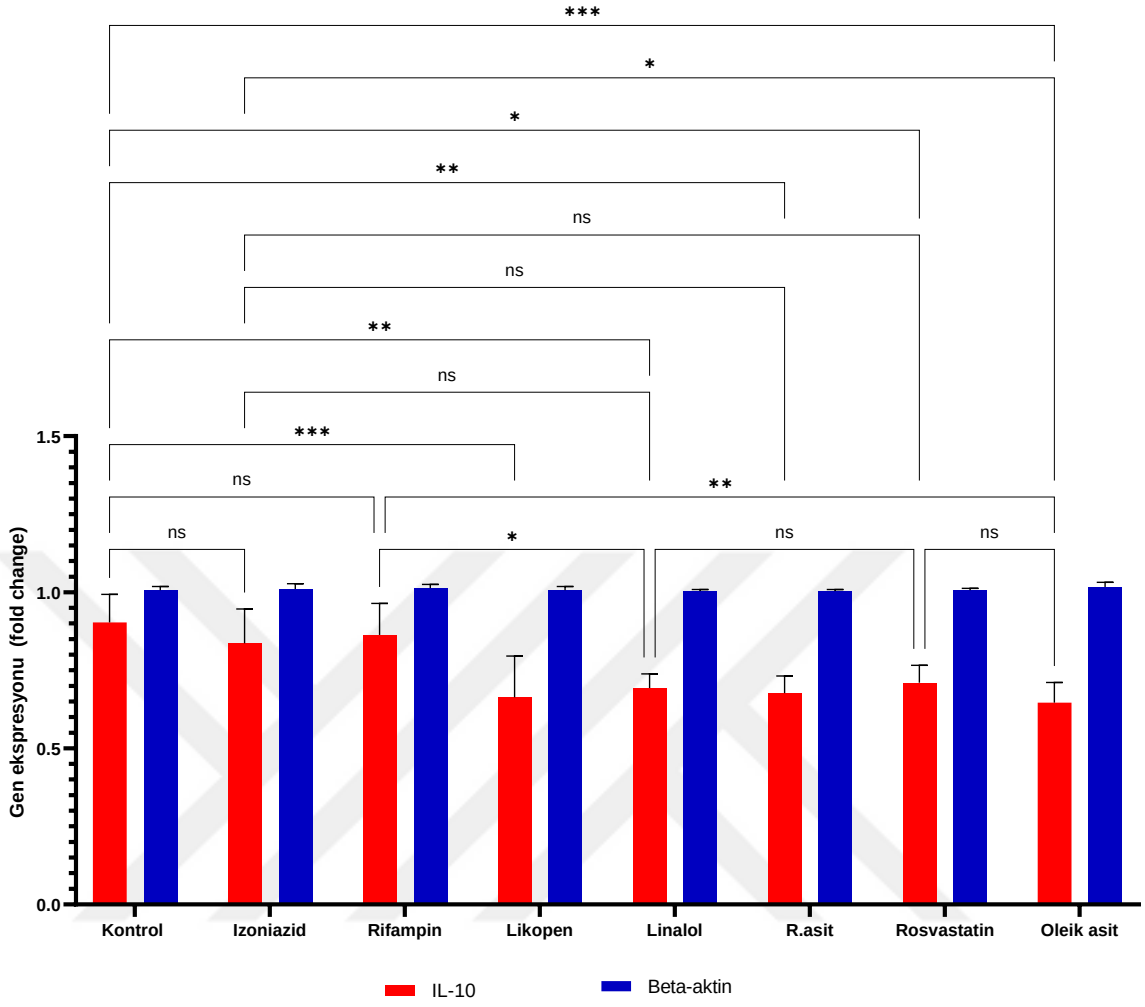


Şekil 4.23. Raw 264.7 hücre hattında linalool, rosmarinik asit, rosuvastatin ve oleik asitin CYP1A1, COX-2, iNOS ve Egr-1 gen ekspresyon oranlarına etkisinin Beta-aktin geni ile karşılaştırmalı analizi.

	CYP1A1		**COX-2**		**iNOS**		**Egr-1**	
	Özet	P Değeri	Özet	P Değeri	Özet	P Değeri	Özet	P Değeri
Kontrol & Linalool	ns	0,3489	****	<0,0001	ns	0,2424	ns	0,9998
Kontrol & Rosmarinik asit	*	0,0363	ns	0,9999	ns	0,1532	ns	0,9931
Kontrol & Rosuvastatin	*	0,0268	ns	0,2123	****	<0,0001	ns	0,9976

Kontrol & Oleik asit	ns	0,9992	ns	0,1171	****	<0,0001	ns	0,9874
Linalool & Rosmarinik asit	***	0,0001	****	<0,0001	ns	0,9992	ns	0,9992
Linalool & Rosuvastatin	ns	0,7446	***	0,0002	*	0,0480	ns	>0,9999
Linalool & Oleik asit	ns	0,2329	***	0,0005	****	<0,0001	ns	0,9978
Rosmarinik asit & Rosuvastatin	****	<0,0001	ns	0,2806	ns	0,0849	ns	>0,9999
Rosmarinik asit & Oleik asit	ns	0,0655	ns	0,1621	****	<0,0001	ns	>0,9999
Rosuvastatin & Oleik asit	*	0,0139	ns	0,9982	**	0,0034	ns	0,9998

Şekil 4.23'e benzer olarak kontrol grubuyla kıyaslandığında rosmarinik asit, rosuvastatin ve oleik asit ile muamele edilen gruplarda COX-2 gen ekspresyonunda anlamlı farklılıklar tespit edilmemiştir. CYP1A1 gen ekspresyonunda oleik asit grubundan anlamlı olarak değişmezken, rosmarinik asit grubundan anlamlı derecede azalış, rosuvastatin grubunda ise anlamlı derecede artış olduğu tespit edilmiştir. Linalool ve rosmarinik asit grubunda iNOS ekspresyonundan anlamlı farklar tespit edilmezken, rosuvastatin ve oleik asit grubunda anlamlı düzeyde artışların olduğu bulunmuştur (Şekil 4.23).

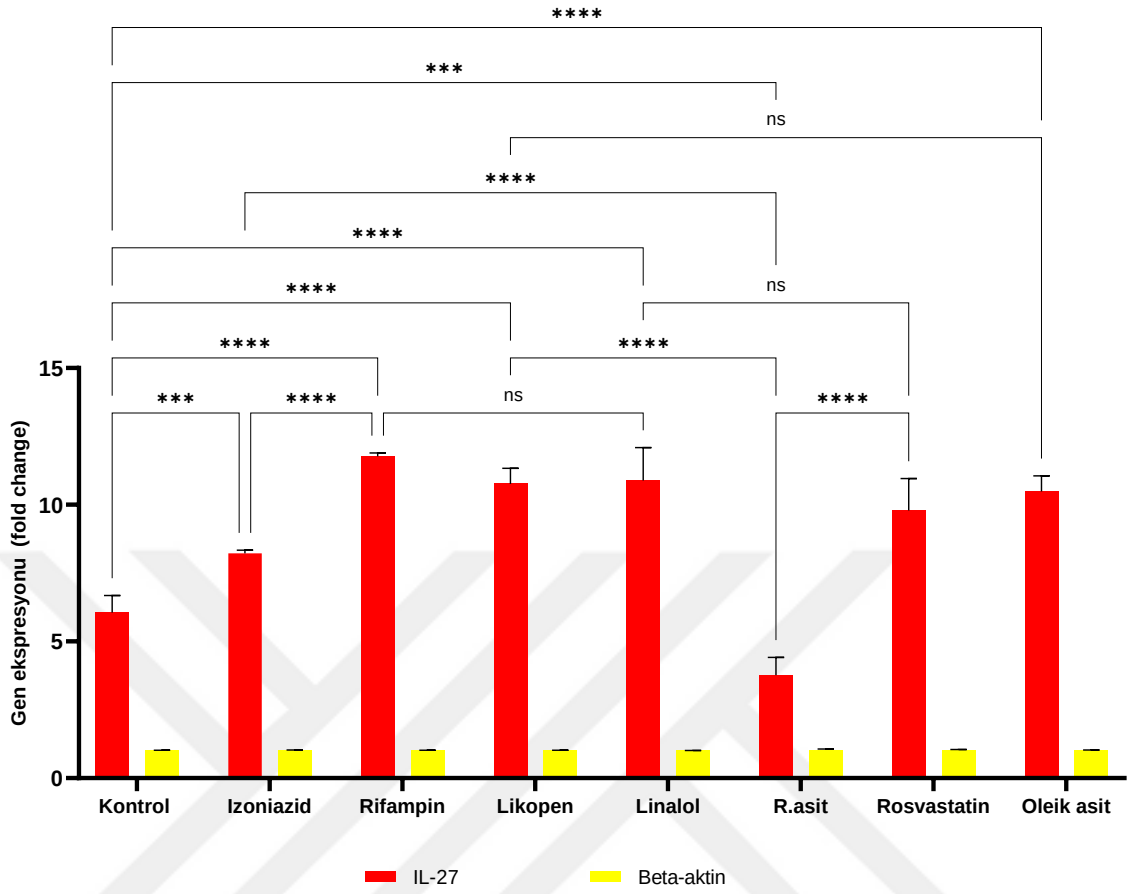


Şekil 4.24. Raw 264.7 hücre kültüründe izoniazid, rifampisin, likopen, linalool, rosmarinik asit, rosuvastatin ve oleik asitin IL-10 gen ekspresyon seviyeleri üzerindeki etkisinin Beta-aktin geni referansı ile karşılaştırmalı analizi.

	IL-10	
	Özet	P Değeri
Kontrol & Izoniazid	ns	0,8838
Kontrol & Rifampin	ns	0,9923
Kontrol & Likopen	***	0,0009
Kontrol & Linalool	**	0,0048
Kontrol & Rosmarinik asit	**	0,0020
Kontrol & Rosuvastatin	*	0,0116
Kontrol & Oleik asit	***	0,0004
Izoniazid & Rifampin	ns	0,9994
Izoniazid & Likopen	*	0,0313
Izoniazid & Linalool	ns	0,1199

Izoniazid & Rosmarinik asit	ns	0,0584
Izoniazid & Rosuvastatin	ns	0,2271
Izoniazid & Oleik asit	*	0,0137
Rifampin & Likopen	**	0,0082
Rifampin & Linalool	*	0,0367
Rifampin & Rosmarinik asit	*	0,0162
Rifampin & Rosuvastatin	ns	0,0785
Rifampin & Oleik asit	**	0,0034
Likopen & Linalool	ns	0,9987
Likopen & Rosmarinik asit	ns	>0,9999
Likopen & Rosuvastatin	ns	0,9812
Likopen & Oleik asit	ns	>0,9999
Linalool & Rosmarinik asit	ns	>0,9999
Linalool & Rosuvastatin	ns	>0,9999
Linalool & Oleik asit	ns	0,9812
Rosmarinik asit & Rosuvastatin	ns	0,9975
Rosmarinik asit & Oleik asit	ns	0,9987
Rosuvastatin & Oleik asit	ns	0,9082

Kontrol grubu dahil olmak üzere tüm ilaç (izoniazid ve rifampisin) ve bileşik (likopen, linalool, rosmarinik asit, rosuvastatin ve oleik asit) gruplarında Beta-aktin geni ile kıyaslandığında IL-10 ekspresyon seviyelerinde azalışların olduğu saptanmıştır. Kontrol grubuyla kıyaslandığında izoniazid ve rifampisin grupları dışında tüm bileşik gruplarında IL-10 ekspresyonunun anlamlı derecede azaldığı saptanmış, bu azalışların en anlamlı olduğu grupların ise likopen ve oleik asit grupları olmuştur (Şekil 4.24).

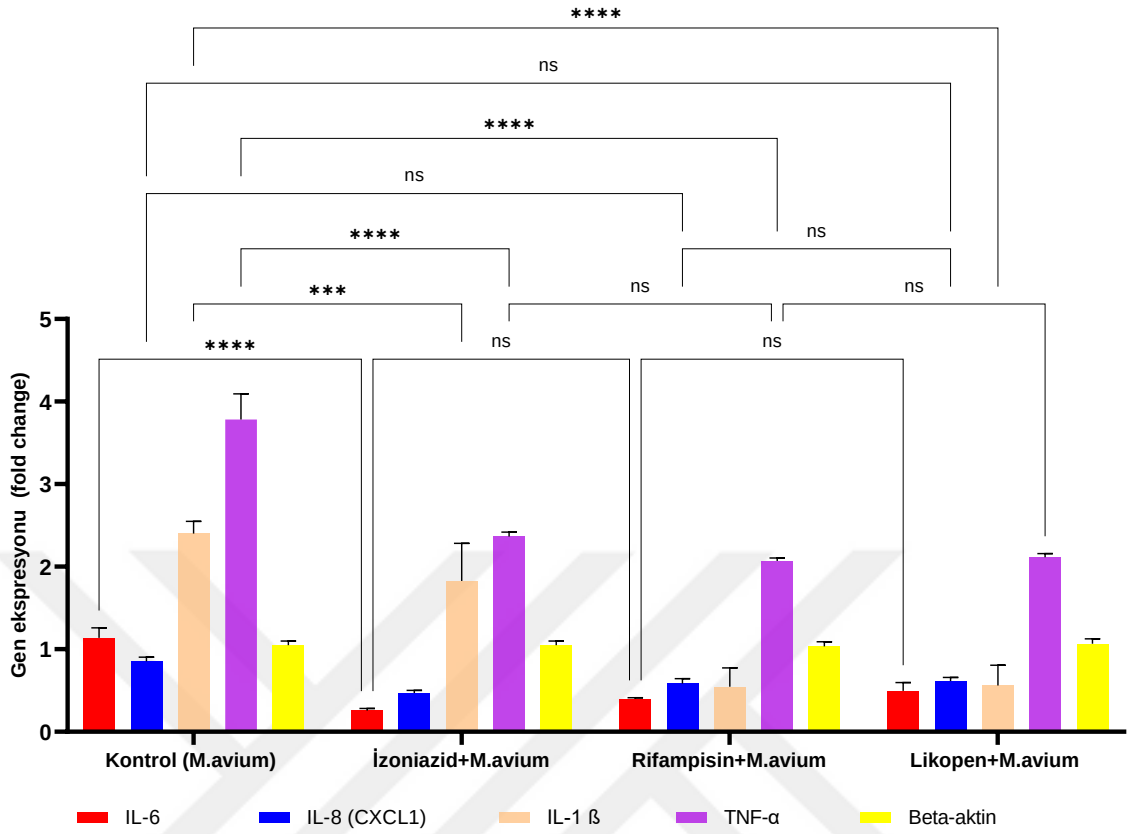


Şekil 4.25. Raw 264.7 hücre kültüründe izoniazid, rifampisin, likopen, linalool, rosmarinik asit, rosuvastatin ve oleik asitin IL-12 gen ekspresyon seviyeleri üzerindeki etkisinin Beta-aktin geni referansı ile karşılaştırmalı analizi.

	IL-27	
	Özet	P Değeri
Kontrol & Izoniazid	***	0,0003
Kontrol & Rifampin	****	<0,0001
Kontrol & Likopen	****	<0,0001
Kontrol & Linalool	****	<0,0001
Kontrol & Rosmarinik asit	***	0,0001
Kontrol & Rosuvastatin	****	<0,0001
Kontrol & Oleik asit	****	<0,0001
Izoniazid & Rifampin	****	<0,0001
Izoniazid & Likopen	****	<0,0001
Izoniazid & Linalool	****	<0,0001
Izoniazid & Rosmarinik asit	****	<0,0001
Izoniazid & Rosuvastatin	*	0,0156
Izoniazid & Oleik asit	***	0,0002

Rifampin & Likopen	ns	0,2871
Rifampin & Linalool	ns	0,4510
Rifampin & Rosmarinik asit	****	<0,0001
Rifampin & Rosuvastatin	**	0,0012
Rifampin & Oleik asit	ns	0,0802
Likopen & Linalool	ns	>0,9999
Likopen & Rosmarinik asit	****	<0,0001
Likopen & Rosuvastatin	ns	0,3263
Likopen & Oleik asit	ns	0,9976
Linalool & Rosmarinik asit	****	<0,0001
Linalool & Rosuvastatin	ns	0,1943
Linalool & Oleik asit	ns	0,9776
Rosmarinik asit & Rosuvastatin	****	<0,0001
Rosmarinik asit & Oleik asit	****	<0,0001
Rosuvastatin & Oleik asit	ns	0,7226

Kontrol grubuyla kıyaslandığında IL-27 gen ekspresyonun rosmarinik asit grubu dışındaki tüm ilaç ve bileşik gruplarında istatistiksel olarak anlamlı derecede arttığı tespit edilirken, rosmarinik asit grubunda anlamlı derecede azalış saptanmıştır (Şekil 4.25).

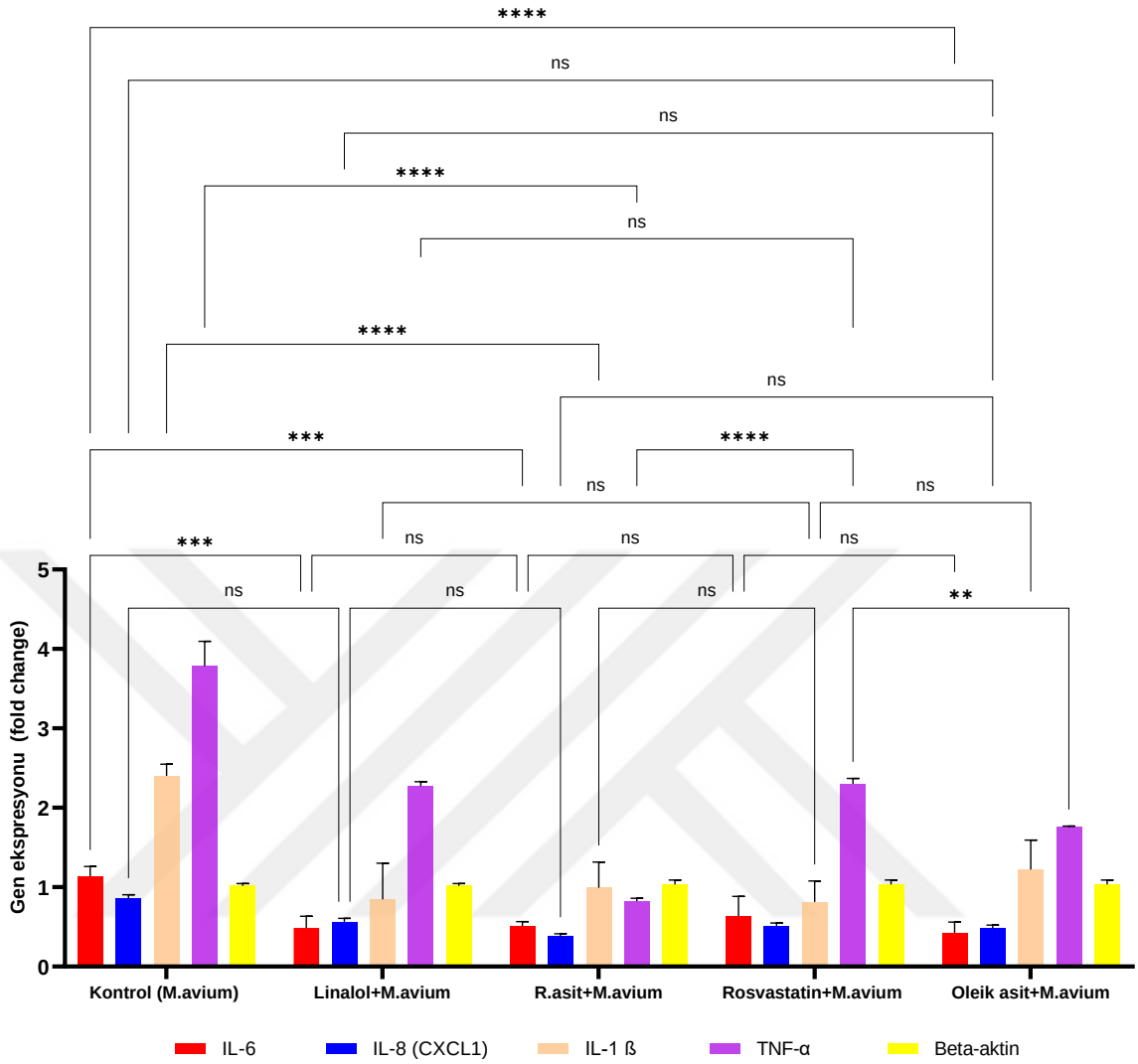


Şekil 4.26. Raw 264.7 hücrelerinde *M. avium* enfeksiyonu sonrası proenflamatuar sitokin genlerinin (IL-6, IL-8, IL-1β ve TNF-α) ekspresyonunun izoniazid, rifampisin, linalool, rosmarinik asit, rosuvastatin ve oleik asit ile modüle edilmesi.

	IL-6		**IL-8 (CXCL1)**		**IL-1β**		**TNF-α**		**Beta-aktin**	
	Özet	P Değeri	Özet	P Değeri	Özet	P Değeri	Özet	P Değeri	Özet	P Değeri
Kontrol (*M. avium*) & İzoniazid+ *M. avium*	****	<0,0001	*	0,0232	***	0,0003	****	<0,0001	ns	>0,9999
Kontrol (*M. avium*) & Rifampisin+ *M. avium*	****	<0,0001	ns	0,1671	****	<0,0001	****	<0,0001	ns	0,9992
Kontrol (*M. avium*) & Likopen+*M. avium*	****	<0,0001	ns	0,2543	****	<0,0001	****	<0,0001	ns	0,9992
İzoniazid+ *M. avium* & Rifampisin+ *M. avium*	ns	0,6948	ns	0,8120	****	<0,0001	ns	0,1106	ns	0,9992

İzoniazid+ *M. avium* & Likopen+ *M. avium*	ns	0,2543	ns	0,6791	****	<0,0001	ns	0,2123	ns	0,9992
Rifampisin+ *M. avium* & Likopen+*M. avium*	ns	0,8622	ns	0,9954	ns	0,9996	ns	0,9864	ns	0,9937

M. avium ile enfekte edilen ve tedavi verilmeyen kontrol grubunda Beta-aktin geni ile kıyaslandığında IL-6 ve IL-8 gen ekspresyonları arasında anlamlı değişimler yokken, IL-1β ve TNF-α ekspresyonlarında anlamlı artışlar tespit edildi. İzoniazid tedavi grubunda IL-6 ve IL-8 ekspresyonları anlamlı derece azalırken, IL-1β ve TNF-α ekspresyonlarındaki artış anlamlıydı. Rifampisin tedavi grubunda ise izoniazid tedavi grubundan farklı olarak sadece IL-1β ekspresyonunda azalış meydana gelmiştir. Likopen tedavi grubunda ise rifampisin tedavi grubuna benzer şekilde IL-6, IL-8 ve IL-1β ekspresyonlarında Beta-aktin geni ile kıyaslandığında anlamlı derecede azalışlar, TNF-α ekspresyonunda ise anlamlı derecede artışların olduğu saptanmıştır (Şekil 4.26).

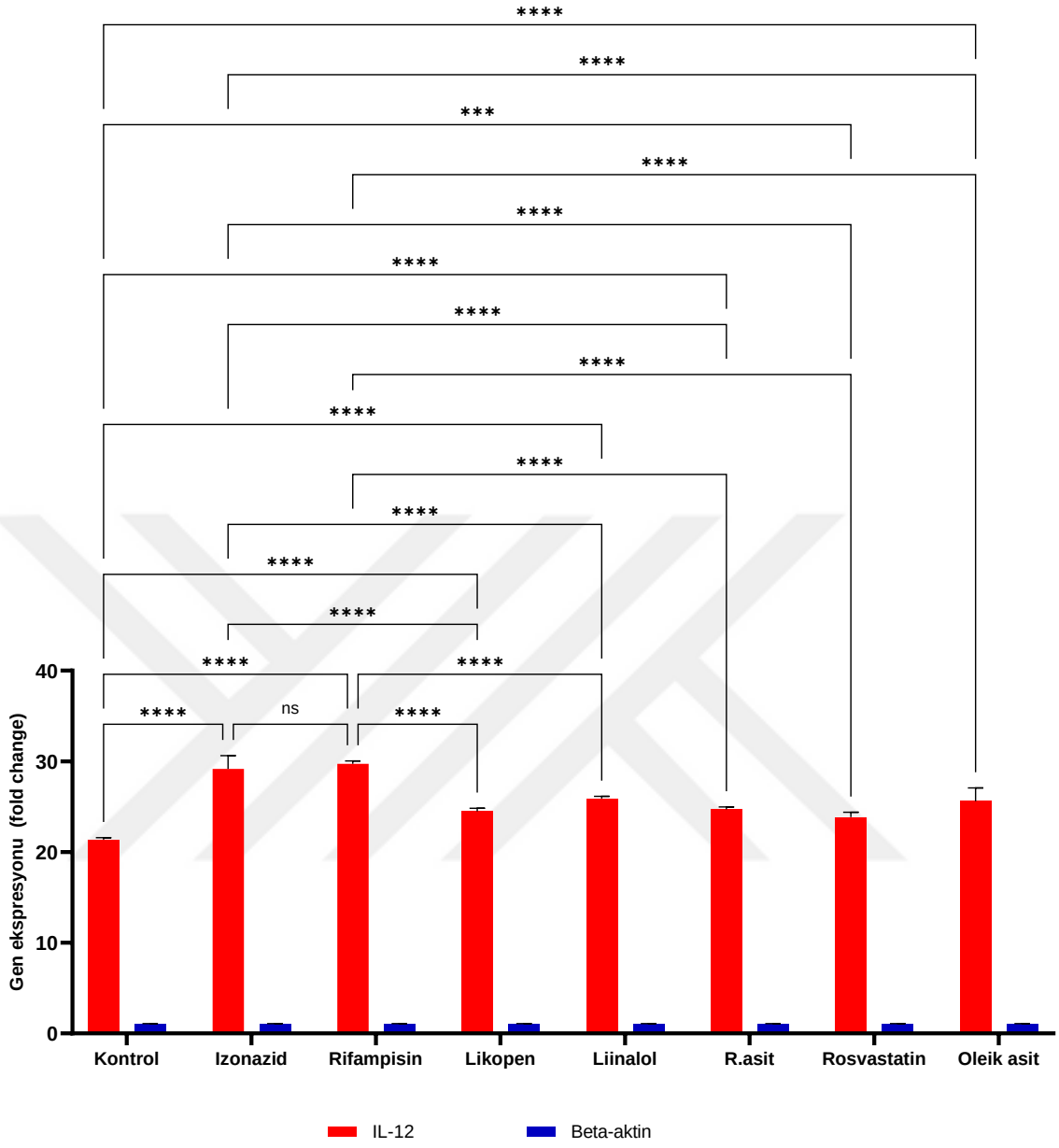


Şekil 4.27. Raw 264.7 hücrelerinde *M. avium* enfeksiyonu sonrası proenflamatuar sitokin genlerinin (IL-6, IL-8, IL-1β ve TNF-α) ekspresyonunun linalool, rosmarinik asit, rosuvastatin ve oleik asit ile modüle edilmesi.

	IL-6		**IL-8 (CXCL1)**		**IL-1β**		**TNF-α**	
	Özet	P Değeri	Özet	P Değeri	Özet	P Değeri	Özet	P Değeri
Kontrol (*M. avium*) & Linalool+*M. avium*	***	0,0004	ns	0,2805	****	<0,0001	****	<0,0001
Kontrol (*M. avium*) & Rosmarinik asit+*M. avium*	***	0,0007	*	0,0152	****	<0,0001	****	<0,0001
Kontrol (*M. avium*) & Rosuvastatin+*M. avium*	**	0,0097	ns	0,1477	****	<0,0001	****	<0,0001
Kontrol (*M. avium*) & Oleik asit+*M. avium*	****	<0,0001	ns	0,1001	****	<0,0001	****	<0,0001

Linalool+*M. avium* & Rosmarinik asit+*M. avium*	ns	0,9998	ns	0,6997	ns	0,8486	****	<0,0001
Linalool+*M. avium* & Rosuvastatin+*M. avium*	ns	0,8379	ns	0,9969	ns	0,9994	ns	0,9997
Linalool+*M. avium* & Oleik asit+*M. avium*	ns	0,9905	ns	0,9839	ns	0,0859	**	0,0065
Rosmarinik asit+*M. avium* &Rosuvastatin+*M. avium*	ns	0,9051	ns	0,8786	ns	0,7270	****	<0,0001
Rosmarinik asit+*M. avium* &Oleik asit+*M. avium*	ns	0,9710	ns	0,9410	ns	0,5125	****	<0,0001
Rosuvastatin+*M. avium* &Oleik asit+*M. avium*	ns	0,5705	ns	0,9997	ns	0,0501	**	0,0038

Linalool, rosmarinik asit, rosuvastatin ve oleik asit tedavi gruplarında IL-6 ve IL-8 ekspresyonları Beta-aktin ile kıyaslandığında anlamlı derece azalırken, IL-1β düzeylerinde anlamlı bir değişim olmamış, TNF-α ekspresyonlarında ise anlamlı oranda artışların olduğu tespit edilmiştir. Kontrol grubu ekspresyon oranlarıyla kıyaslandığında ise, IL-1β ve TNF-α ekspresyonunun linalool, rosmarinik asit, rosuvastatin ve oleik asit tedavi gruplarında anlamlı derecede azalarak ekspresyonların regüle edildiği saptanmıştır (Şekil 4-27).

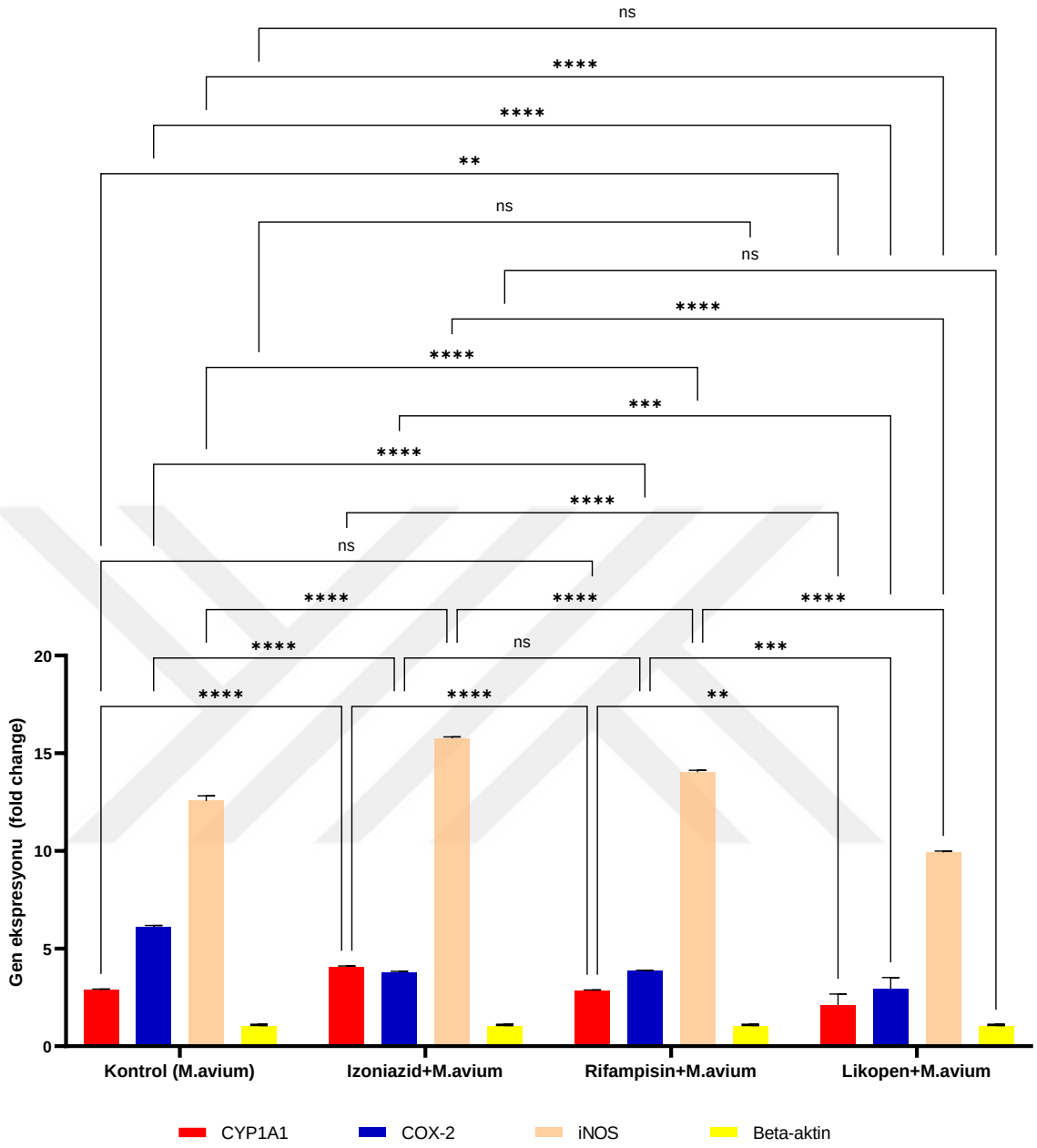


Şekil 4.28. Raw 264.7 hücrelerinde *M. avium* enfeksiyonu sonrası IL-12 geni ekspresyonunun izoniazid, rifampisin, linalool, rosmarinik asit, rosuvastatin ve oleik asit ile modüle edilmesi.

	IL-12	
	Özet	P Değeri
Kontrol & Izoniazid	****	<0,0001
Kontrol & Rifampin	****	<0,0001
Kontrol & Likopen	****	<0,0001
Kontrol & Linalool	****	<0,0001
Kontrol & Rosmarinik asit	****	<0,0001

Kontrol & Rosuvastatin	***	0,0001
Kontrol & Oleik asit	****	<0,0001
Izoniazid & Rifampin	ns	0,9156
Izoniazid & Likopen	****	<0,0001
Izoniazid & Linalool	****	<0,0001
Izoniazid & Rosmarinik asit	****	<0,0001
Izoniazid & Rosuvastatin	****	<0,0001
Izoniazid & Oleik asit	****	<0,0001
Rifampin & Likopen	****	<0,0001
Rifampin & Linalool	****	<0,0001
Rifampin & Rosmarinik asit	****	<0,0001
Rifampin & Rosuvastatin	****	<0,0001
Rifampin & Oleik asit	****	<0,0001
Likopen & Linalool	ns	0,0673
Likopen & Rosmarinik asit	ns	0,9997
Likopen & Rosuvastatin	ns	0,8661
Likopen & Oleik asit	ns	0,2520
Linalool & Rosmarinik asit	ns	0,1808
Linalool & Rosuvastatin	**	0,0021
Linalool & Oleik asit	ns	0,9976
Rosmarinik asit & Rosuvastatin	ns	0,5996
Rosmarinik asit & Oleik asit	ns	0,5114
Rosuvastatin & Oleik asit	*	0,0121

IL-12 gen ekspresyon düzeyleri Beta-aktin geni ile kıyaslandığında tüm ilaç ve bileşik gruplarından anlamlı düzeyde artışlar göstermiştir. Kontrol grubu ile kıyaslandığında ise IL-12 ekspresyonları izoniazid ve rifampisin tedavi gruplarında anlamlı derecede yüksek bulunurken, likopeni linalool, rosmarinik asit, rosuvastatin ve oleik asit gruplarında anlamlı değişimler tesit edilmemiştir. Bu gruplarda IL-12 gen ekspresyonlarının kontrol grubuna benzer oranlarda bulunması bir regülasyon olarak değerlendirilebilir (Şekil 4-28).

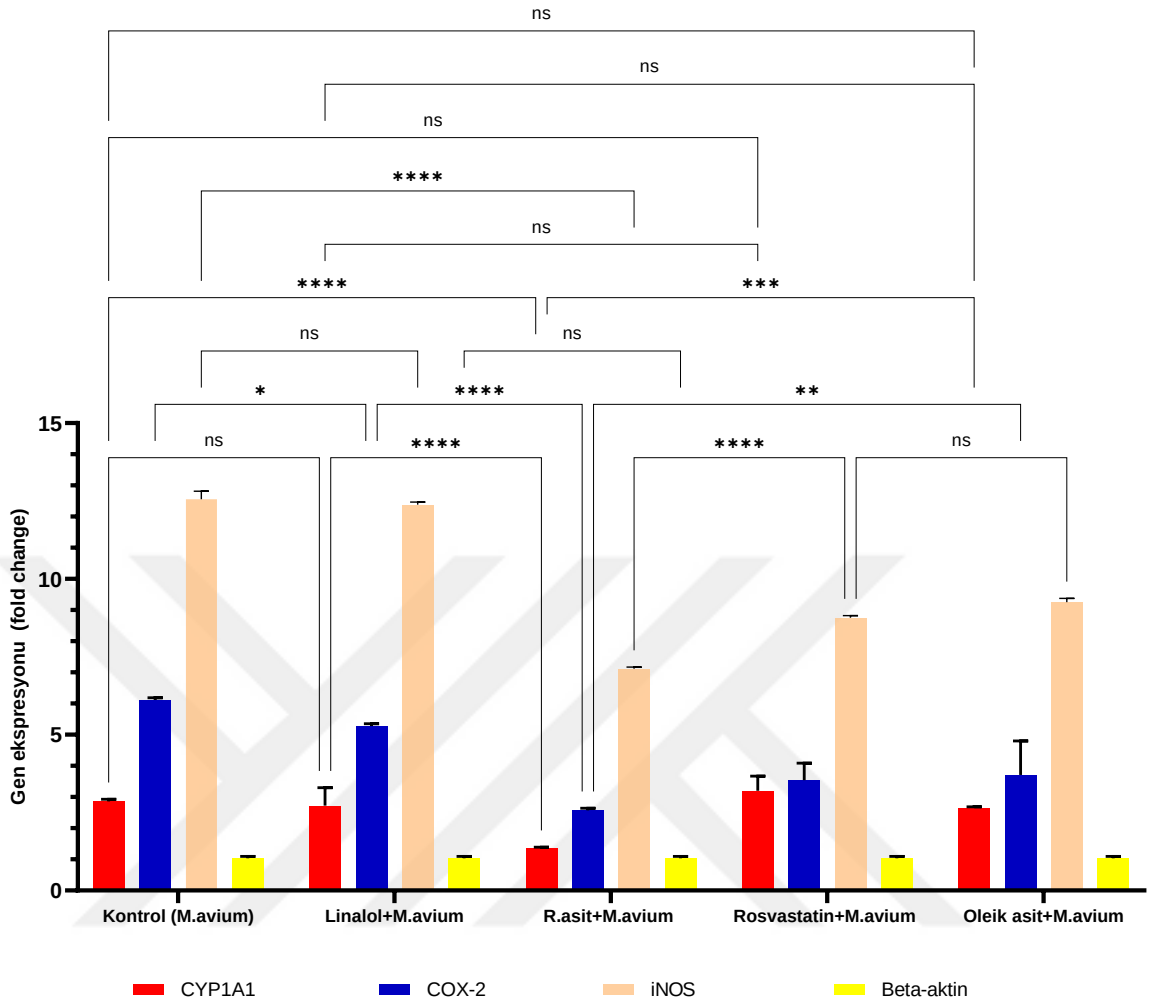


Şekil 4.29. Raw 264.7 hücrelerinde *M. avium* enfeksiyonu sonrası izoniazid, rifampisin ve likopenin CYP1A1, COX-2, iNOS ve Egr-1 gen ekspresyon oranlarına etkisinin Beta-aktin geniyle karşılaştırmalı analizi.

	CYP1A1		**COX-2**		**iNOS**	
	Özet	P Değeri	Özet	P Değeri	Özet	P Değeri
Kontrol (*M. avium*) & Izoniazid+*M. avium*	****	<0,0001	****	<0,0001	****	<0,0001
Kontrol (*M. avium*) & Rifampisin+*M. avium*	ns	0,9995	****	<0,0001	****	<0,0001
Kontrol (*M. avium*) & Likopen+*M. avium*	**	0,0011	****	<0,0001	****	<0,0001

Izoniazid+*M. avium* & Rifampisin+*M. avium*	****	<0,0001	ns	0,9801	****	<0,0001
Izoniazid+*M. avium* & Likopen+*M. avium*	****	<0,0001	***	0,0003	****	<0,0001
Rifampisin+*M. avium* & Likopen+*M. avium*	**	0,0014	***	0,0001	****	<0,0001

Tedavi verilmeyen *M. avium* ile enfekte hücrelerde CYP1A1, COX-2 ve iNOS gen ekspresyonları Beta-aktin geni ile kıyaslandığında anlamlı düzeyde artmıştır. Benzer şekilde bu üç gen ekspresyon oranları izoniazid, rifampisin ve likopen tedavi gruplarında da tespit edilmiştir. Ancak, izoniazid ve rifampisin tedavi gruplarında CYP1A1 ve COX-2 gen ekspresyonları artışları likopen grubundan anlamlı oranda daha yüksek bulunmuştur. Standart ilaç tedavi gruplarında kontrol grubuyla kıyaslandığında iNOS düzeyleri anlamlı derecede yüksek bulunurken, likopen tedavi grubunda ilaç tedavi gruplarına göre daha düşük düzeyde tespit edilmiştir. Likopenin izoniazid ve rifampisine göre daha düzenleyici fonksiyon gösterdiği söylenebilir (Şekil 4.29).

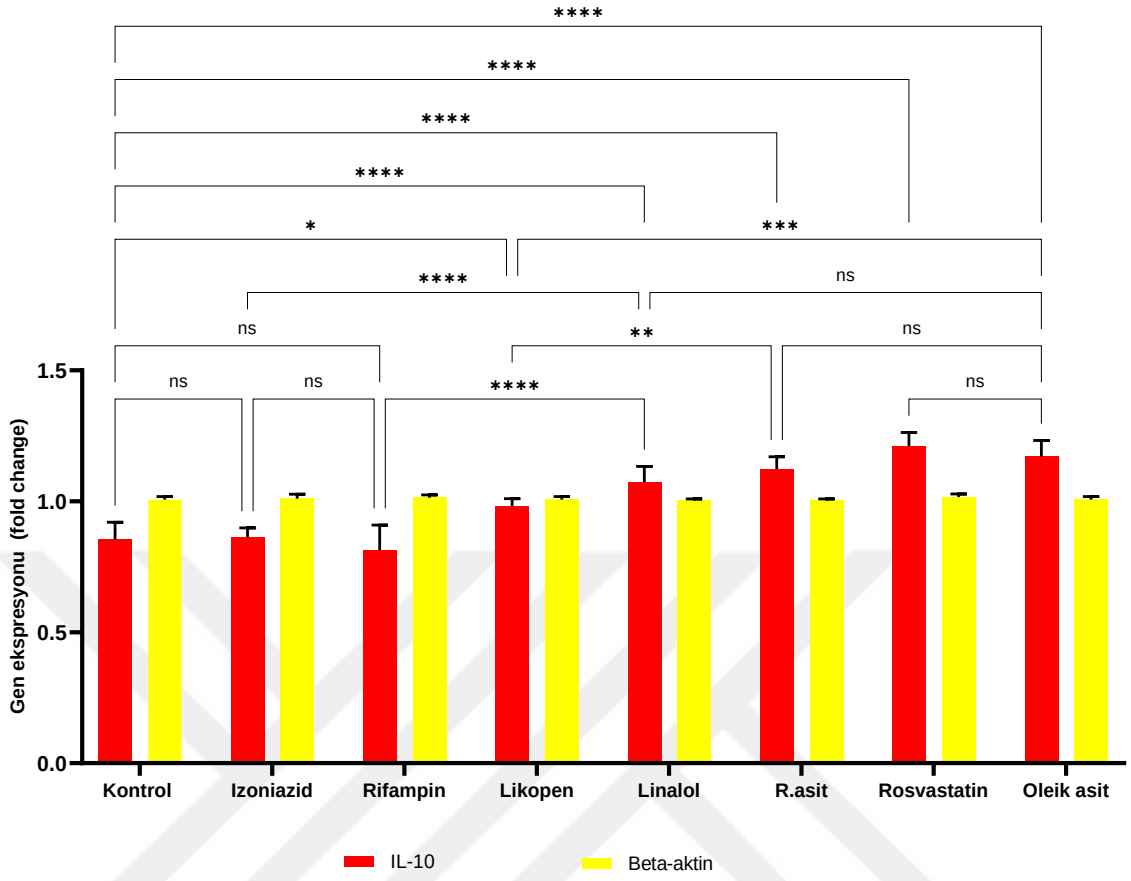


Şekil 4.30. Raw 264.7 hücrelerinde *M. avium* enfeksiyonu sonrası linalool, rosmarinik asit, rosuvastatin ve oleik asitin CYP1A1, COX-2, iNOS ve Egr-1 gen ekspresyon oranlarına etkisinin Beta-aktin geniyle karşılaştırmalı analizi.

	CYP1A1		**COX-2**		**iNOS**	
	Özet	P Değeri	Özet	P Değeri	Özet	P Değeri
Kontrol (*M. avium*) & Linalool+*M. avium*	ns	0,9860	*	0,0255	ns	0,9664
Kontrol (*M. avium*) & Rosmarinik asit+*M. avium*	****	<0,0001	****	<0,0001	****	<0,0001
Kontrol (*M. avium*) & Rosuvastatin+*M. avium*	ns	0,7196	****	<0,0001	****	<0,0001
Kontrol (*M. avium*) & Oleik asit+*M. avium*	ns	0,9305	****	<0,0001	****	<0,0001
Linalool+*M. avium* & Rosmarinik asit+*M. avium*	****	<0,0001	****	<0,0001	****	<0,0001

Linalool+*M. avium* & Rosuvastatin+*M. avium*	ns	0,4080	****	<0,0001	****	<0,0001
Linalool+*M. avium* & Oleik asit+*M. avium*	ns	0,9985	****	<0,0001	****	<0,0001
Rosmarinik asit+*M. avium* & Rosuvastatin+*M. avium*	****	<0,0001	**	0,0070	****	<0,0001
Rosmarinik asit+*M. avium* & Oleik asit+*M. avium*	***	0,0002	**	0,0011	****	<0,0001
Rosuvastatin+*M. avium* & Oleik asit+*M. avium*	ns	0,2617	ns	0,9687	ns	0,3530

M. avium ile enfekte tedavi verilmeyen grup ile linalool, rosmarinik asit, rosuvastatin ve oleik asit tedavi gruplarında CYP1A1, COX-2 ve iNOS gen ekspresyonları Beta-aktin geni ile kıyaslandığında anlamlı derecede artışlar gösterirken, rosmarinik asit tedavi grubunda CYP1A1 gen ekspresyonunda anlamlı değişiklik tespit edilmemiştir. Kontrol grubuyla kıyaslandığında ise COX-2 gen ekspresyonu, linalool grubundan anlamlı oranda değişmezken; rosmarinik asit, rosuvastatin ve oleik asit grubunda anlamlı düzeyde azalışlar göstermiştir. Benzer şekilde linalool grubunda iNOS gen ekspresyonu kontrol grubuna benzer bir ekspresyon oranı gösterirken, rosmarinik asit, rosuvastatin ve oleik asit tedavi gruplarında anlamlı düzeyde azalışlara yol açmıştır. Bu değerler rosmarinik asit, rosuvastatin ve oleik asitin gen ekspresyonları üzerindeki regülatör etkisi olarak değerlendirilebilir (Şekil 4-30).

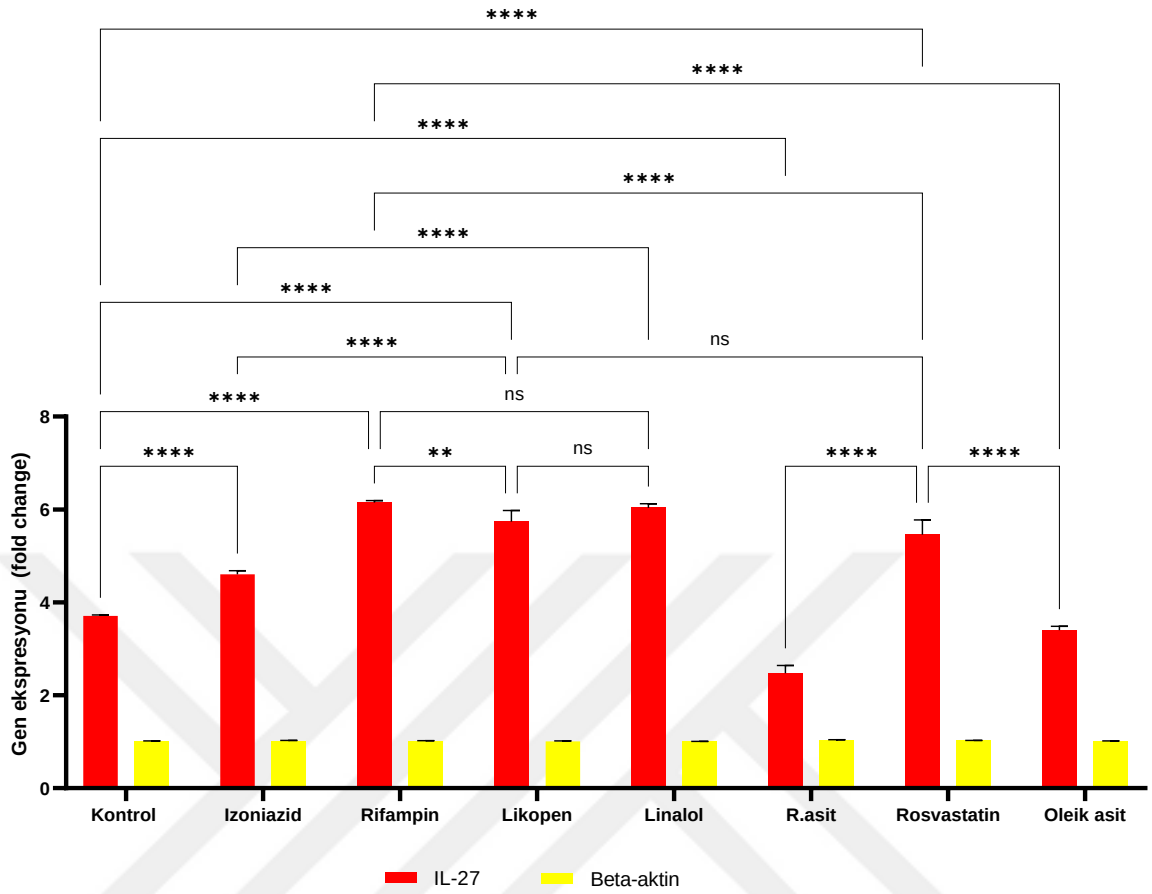


Şekil 4.31. Raw 264.7 hücrelerinde *M. avium* enfeksiyonu sonrası izoniazid, rifampisin, likopen, linalool, rosmarinik asit, rosuvastatin ve oleik asitin IL-10 gen ekspresyon seviyeleri üzerindeki etkisinin Beta-aktin geni referansı ile karşılaştırmalı analizi.

	IL-10	
	Özet	P Değeri
Kontrol & Izoniazid	ns	>0,9999
Kontrol & Rifampin	ns	0,9419
Kontrol & Likopen	*	0,0199
Kontrol & Linalool	****	<0,0001
Kontrol & Rosmarinik asit	****	<0,0001
Kontrol & Rosuvastatin	****	<0,0001
Kontrol & Oleik asit	****	<0,0001
Izoniazid & Rifampin	ns	0,8373
Izoniazid & Likopen	*	0,0401

Izoniazid & Linalool	****	<0,0001
Izoniazid & Rosmarinik asit	****	<0,0001
Izoniazid & Rosuvastatin	****	<0,0001
Izoniazid & Oleik asit	****	<0,0001
Rifampin & Likopen	***	0,0009
Rifampin & Linalool	****	<0,0001
Rifampin & Rosmarinik asit	****	<0,0001
Rifampin & Rosuvastatin	****	<0,0001
Rifampin & Oleik asit	****	<0,0001
Likopen & Linalool	ns	0,1700
Likopen & Rosmarinik asit	**	0,0058
Likopen & Rosuvastatin	****	<0,0001
Likopen & Oleik asit	***	0,0001
Linalool & Rosmarinik asit	ns	0,8373
Linalool & Rosuvastatin	**	0,0096
Linalool & Oleik asit	ns	0,1410
Rosmarinik asit & Rosuvastatin	ns	0,2416
Rosmarinik asit & Oleik asit	ns	0,8792
Rosuvastatin & Oleik asit	ns	0,9419

M. avium ile enfekte ve tedavi verilmeyen grup ile izoniazid ve rifampisin tedavi gruplarında IL-10 gen ekspresyonlarında Beta-aktin geni ile kıyaslandığında anlamlı bir değişiklik olmazken, tüm bileşik gruplarında (likopen, linalool, rosmarinik asit, rosuvastatin ve oleik asit) IL-10 gen ekspresyonu anlamlı derecede artış göstermiştir (Şekil 4.31).



Şekil 4.32. Raw 264.7 hücrelerinde *M. avium* enfeksiyonu sonrası izoniazid, rifampisin, likopen, linalool, rosmarinik asit, rosuvastatin ve oleik asitin IL-27 gen ekspresyon seviyeleri üzerindeki etkisinin Beta-aktin geni referansı ile karşılaştırmalı analizi.

	IL-27	
	Özet	P Değeri
Kontrol & Izoniazid	****	<0,0001
Kontrol & Rifampin	****	<0,0001
Kontrol & Likopen	****	<0,0001
Kontrol & Linalool	****	<0,0001
Kontrol & Rosmarinik asit	****	<0,0001
Kontrol & Rosuvastatin	****	<0,0001
Kontrol & Oleik asit	ns	0,0494
Izoniazid & Rifampin	****	<0,0001
Izoniazid & Likopen	****	<0,0001

Izoniazid & Linalool	****	<0,0001
Izoniazid & Rosmarinik asit	****	<0,0001
Izoniazid & Rosuvastatin	****	<0,0001
Izoniazid & Oleik asit	****	<0,0001
Rifampin & Likopen	**	0,0026
Rifampin & Linalool	ns	0,9223
Rifampin & Rosmarinik asit	****	<0,0001
Rifampin & Rosuvastatin	****	<0,0001
Rifampin & Oleik asit	****	<0,0001
Likopen & Linalool	ns	0,0582
Likopen & Rosmarinik asit	****	<0,0001
Likopen & Rosuvastatin	ns	0,0801
Likopen & Oleik asit	****	<0,0001
Linalool & Rosmarinik asit	****	<0,0001
Linalool & Rosuvastatin	****	<0,0001
Linalool & Oleik asit	****	<0,0001
Rosmarinik asit & Rosuvastatin	****	<0,0001
Rosmarinik asit & Oleik asit	****	<0,0001
Rosuvastatin & Oleik asit	****	<0,0001

IL-27 gen ekspresyon oranları *M. avium* ile tedavi gruplarının tümünde Beta-aktin geni ile kıyaslandığından anlamlı derecede artmıştır. Bu artış; izoniazid, rifampisin, likopen, linalool ve rosuvastatin tedavi gruplarında anlamlı oranda iken, oleik asit tedavi grubunda anlamlı bulunmamıştır. Rosmarinik asit tedavi grubunda IL-27 gen ekspresyon düzeyi kontrol grubundan anlamlı düzeyde azalış göstermiştir (Şekil 4.32).

5. TARTIŞMA

Tüberküloz antibiyotiklerin keşfiyle tedavi edilebilir bir hastalık haline gelse de tedavisi en zor enfeksiyonlardan biri olmaya devam etmektedir. Mevcut tüberküloz tedavi rejimlerinin çoğunda hastalar için oldukça toksik olan dört ilacın uzun süreli (altı-dokuz ay) günlük kullanımları söz konusudur. Tedavideki temel amaç *Mycobacterium tuberculosis*'i tamamen ortadan kaldırmak ve ilaç dirençli mutantların ortaya çıkmasına engel olmaktır. Fakat, aksine uzun süreli tedaviler hasta uyumunun zayıflatmış ve ilaç direncinin artmasına yol açmıştır. *Mtb* 'in derin ilaç direncinin altında yatan moleküler mekanizmaların anlaşılması tedavi alternatiflerinin geliştirilmesinde veya mevcut ilaçlara direncin mekanizmasının çözülmesinde yardımcı olacaktır. Böylece tedavi sorunu hat safhalara ulaşan bu patojene karşı yeni tedavi seçenekleri sunulabilecektir (Hoft ve Abate, 2016; Lin ve Flynn, 2010; Russell ve ark., 2010).

Günümüzde ülkemizde ve tüm dünyada tüberkülozda artan ilaç direnci, özellikle de çoklu ilaç direnci tedavide ciddi zorluklara yol açmaktadır. İlaç direncinin ve ilgili yolakların in vitro tüberküloz kültüründe araştırılacak olması mevcut tedavi protokollerinin revize edilmesi, geliştirilmesi ve/veya yeni formülasyonların oluşturulmasının önünü açacaktır ki bu, çalışmanın özgünlüğünü oluşturmaktadır.

Tüberküloz ciddi bir enfeksiyon hastalığı olup; hastalığın patogenezinde farklı proenflamatuar ve antienflamatuar genlerin ekspresyon düzeyleri kritik rol oynamaktadır. IL-6 proenflamatuar bir sitokin olup enflamasyonun ve akut faz yanıtının başlatılmasında önemli rol oynar. *M. tuberculosis* enfeksiyonu sırasında IL-6'nın aşırı üretimi bağışıklık sistemini daha güçlü bir şekilde aktive etse de aşırı inflamasyona ve akciğerde doku hasarlarına yol açabilmektedir. IL-6 immün yanıtın regülasyonunda önemi bir sitokin olup *Mtb* patogenezini ve bağışıklık sisteminin cevabını modüle etme açısından kritik bir role sahiptir. Bu sitokin makrofajlar ve DC'ler gibi immün hücreler tarafından *Mtb* enfeksiyonu sırasında salınmaya başlamaktadır. Bu durum T hücreleri ilişkili immün cevabın güçlendirilmesi için oldukça önemlidir (Madhvi ve ark., 2022).

IL-6 aynı zamanda Th1 hücrelerinin IFN-γ üretimini teşvik etmekte, bu da makrofajların *Mtb* basilini yok etme yeteneğini artırmaktadır. Aşırı IL-6 üretiminin ise

immün sistem hücre infiltrasyonu ve granülom oluşumunu tetiklediğini bilinmektedir. IL-6'nın tüberküloz tedavisindeki rolü tam olarak bilinmese de bazı araştırmalar IL-6 düzeylerinin tedaviye yanıtında önemli olduğu bildirilmiştir (Paramita Pal ve ark., 2023; Scriba ve ark., 2017).

M. tuberculosis enfeksiyonu sırasında IL-6 seviyeleri yükselmektedir. Tedavi başladıktan sonra ilacın etkinliğinden dolayı IL-6 seviyesinde azalma olasıdır. Ancak IL-6 düzeylerinin çok yüksek olması durumunda, IL-6 immün sistem üzerinde baskı oluşturabilmektedir. IL-6 seviyesi tüberküloz hastalarının klinik açıdan takibinde önemli bir biyomarkerdır. Tedavi sırasında IL-6 seviyelerinin izlenmesi hastalığın prognozu hakkında bilgi verir. Aşırı üretimi ya da uzun süreli yüksek seviyelerde seyretmesi immün yanıtın yüksek olması anlamına gelir ki bu durum konakta kronik inflamasyon göstergesidir (Paramita Pal ve ark., 2023; Ren ve ark., 2021; Wang ve ark., 2024)

IL-6'nın ekspresyonun baskılanması ise kanser ve bazı otoimmün hastalıkların gelişimiyle yakın ilişki olduğu bildirilmiştir. Bu hastalıkların tedavisinde IL-6 geni inhibitörlerinden yararlanılmaktadır. *Mtb* tedavisinde de bu sitokinin suprese edilmesi tedavinin progresyonu açsısından önemlidir. Ancak bu konuda ileri çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır. Yani *Mtb* tedavisi sırasında immün modülasyon sağlanması açsısından IL-6'nın salınımının azaltılması önemli olacaktır (Pal ve ark., 2024; Paramita Pal ve ark., 2023).

IL-6, *M. tuberculosis* enfeksiyonuna karşı immün yanıtının düzenlenmesinde önemli bir sitokindir. Aşırı üretimi, inflamasyonun şiddetlendirirken immün yanıtını destekleme ve *Mtb* karşı mücadelede olumlu bir etkisi mevcuttur. Ancak bu sitokinin uzun süreli yüksek düzeyde ekspresyon durumunda kronik inflamasyon ve tedaviye karşı direnç gelişimi de söz konusu olabilmektedir. IL-6 inhibitörü kullanımı olası tedavi seçenekleri arasında önemlidir (Ren ve ark., 2021). Bu çalışmada IL-6 sitokin geni ekspresyonunun tüm bileşik gruplarında (likopen, linalool, rosmarinik asit, rosuvastatin ve oleik asit tedavi grupları) anlamlı düzeyde inhibe edildiği saptanmıştır.

Proenflamatuar sitokinlerden bir diğeri IL-8 (CXCL1)'dir. *M. tuberculosis* enfeksiyonunda nötrofil ve makrofajlar gibi immün hücrelerin enfeksiyon bölgesine yönlendirilmesinde önemli bir role sahiptir. Bu sitokin hastalığın prognozu üzerinde etkilidir. IL-8 immün sistem hücrelerinden özellikle nötrofillerin enfeksiyon odağına göçünü

tetiklemektedir. *M. tuberculosis* enfeksiyonunda ise enfeksiyon odağına makrofajlar ve granülositler gibi immün hücrelerin göçünü arttırmaktadır (Hu ve ark., 2023; Madhvi ve ark., 2022).

M. tuberculosis ile enfekte konakta IL-8'in aşırı salgılanması inflamasyonu arttırmakta ve granülom oluşumunu da tetiklemektedir. Enfekte bireylerde granülom oluşumu bakterilerin invaze olamadıklarını lokalize olarak hapsedildikleri anlamına gelmektedir. Granülomlar *Mtb*'in etrafında bağışıklık hücrelerinin bir araya geldiği yapılar olup, bakterilerin lokalize edilmesini ve çoğalmalarının inhibisyonunu sağlar. IL-8 bu hücresel yapıların oluşumunu ve stabilitesini teşvik etmektedir. Mikobakteri enfeksiyonlarında aşırı IL-8 üretimi yüksek düzeyde nötrofil infiltrasyonu ve granülom oluşumuna yol açmaktadır. Bu durum inflamasyonun şiddetli hale gelmesine ve konakta doku hasarına sebep olmaktadır (Madhvi ve ark., 2022).

Literatürde IL-8 düzeyinin aktif TB hastalarında yüksek seyrettiği bu sitokin düzeyinin bakteriyel yük ile korelasyon halinde olduğu bildirilmiştir. Bu sitokinin yüksek düzeyde seyretmesi akut inflamasyon ve daha ciddi hastalık tablosu anlamına da gelebilmektedir. Özellikle akut tüberküloz enfeksiyonu olan hastalarda yüksek IL-8 düzeyleri hastalığın daha şiddetli seyretmesine ve dissemine hal almasına yol açabilmektedir. Dolayısıyla konakta aşırı IL-8 ekspresyonunun milier tüberküloz ilişkili olabileceği söylenebilir (Chen ve ark., 2025; Pan ve ark., 2022).

Günümüzde IL-8'in direkt olarak azaltılmasını içeren bir tedavi modeli olmasa da bu konuda araştırmalar devam etmektedir. IL-8 sentezinin bağışıklık sistemi hücrelerinin modülasyonunda etkin rol oynaması sebebiyle hastalarda bu sitokinin regülasyonunun inflamasyon ilişkili olarak prognozu etkilemesi noktasından hareketle IL-8 sentezinin kontrol etme önemli olacaktır (Hu ve ark., 2023).

Standart anti-mikobakteriyel tedavi sırasında IL-8'in varlığının tayini hastalığın progresyonuyla doğrudan ilişkilidir. Yüksek düzeyde seyretmesi enfeksiyonun kontrol edilemediğinin göstergesi olarak değerlendirilebilirken, azalması tedavi başarısı olarak yorumlanabilmektedir. Kısaca belirtmek gerekirse IL-8 seviyesinin belirlenmesi tedavi sırasında hastanın durumunun iyileşeceği veya kötüye gidişin olabileceğinin göstergesi olacaktır. IL-8 seviyesinin azaltılması son yıllarda hedeflenen tüberküloz başarına katkı

verecektir (Chen ve ark., 2025). Çalışmamızda likopen, linalool, rosmarinik asit, rosuvastatin ve oleik asit tedavi gruplarının tümünde IL-8 ekspresyon seviyelerinin kontrol grubuyla kıyaslandığında anlamlı düzeyde inhibe edildiği tespit edilmiştir.

IL-8'in yüksek düzeyse sentezi nötrofil filtrasyonu yanında diğer immün hücrelerinin artışını da tetiklediğinden uzun erimli varlığı inflamasyon varlığının göstergesidir. Tüberküloz hastalığı sırasında IL-8 inhibitörlerinin kullanılması yüksek düzey inflamasyon yanıtını dindirecek ve tüberkülozun seyrini iyiye yönlendirecektir. Yeni nesil tüberküloz tedavi seçenekleri arasında IL-8 inhibitörlerinin kullanılması üzerinde çalışılmaktadır. *M. tuberculosis* enfeksiyonunda IL-8 seviyesi tedavi duyarlılığı için bir biyomarker olarak kullanılmakta tedavi takibinde azalan seviye duyarlılığı ifade etmektedir (Chen ve ark., 2025; Pan ve ark., 2022).

IL-1β immün yanıt ve inflamasyon süreçlerinde enflamasyonu başlatması ve bağışıklık hücrelerini enfeksiyon bölgesine yönlendirmesi nedeniyle bağışıklık yanıtında kritik role sahip olan proenflamatuar bir sitokindir. Vücutta temel olarak makrofajlar ve dentritik hücreler tarafından oluşturulur. *Mtb* enfeksiyonuna karşı immün yanıtta önemli rol oynar. IL-1β salınımı tüberküloz patogenezini, bağışıklık yanıtını ve tedavi stratejilerini etkileyebilen önemli bir sitokindir. Tüberkülozda enfeksiyona karşı konak direncini desteklerken bağışıklık patolojisini önlemek amacıyla IL-1 tepkilerinin dikkatle düzenlenmesi hayati önem taşır. *Mtb*'nin fare modelinde yapılan çalışmalarda hem IL-1'in eksikliğinin hem de aşırı üretimin hastalık şiddetini ve ölüm oranını artırdığını göstermiştir. İnsanlarda IL-1β genindeki bazı polimorfizmlerin TB'ye karşı artan duyarlılıkla ilişkili olduğu bildirilmiştir. *Mtb* ile enfekte konaklar IL-1 yanıtının regülasyonu için çeşitli mekanizmalar geliştirmektedirler. TB tedavisine IL-1 regülasyonun yapılmasına yönelik çalışmalar potansiyel tedavi yaklaşımlarından kabul edilmektedir (Silvério ve ark., 2021).

M. tuberculosis enfeksiyonunda IL-1β TLR'ler tarafından aktive edilen immün hücreler tarafından sentezlenir. Sentezlenmesi immün sistem hücrelerinin çalışmasını tetiklediği gibi IL-6 ve TNF-α aktivasyonu için de hayati derecede önemlidir. Bu sitokinler mikroorganizmanın granülomlar içinde toplanmasını sağlamaktadır. Granülom varlığı enfeksiyonun sınırlandırılması için hayati derecede önemlidir. Bu noktada IL-1β, granülomların bütünlüğünü koruyarak koruyucu bağışıklık ile aşırı inflamasyon arasında

dengeyi sağlayan sitokin olarak görev yapmaktadır. Bu sitokinin azlığı ve fazlalığı durumu da konak açısından büyük risk anlamına gelmektedir. Eğer IL-1β seviyesi yüksek ise dokularda enflamatuar hasara yol açabilmektedir. Tüberküloz hastalığında görülen akciğerdeki doku hasarının başlıca sorumlusu bu sitokindir. IL-1β'nın kronik durumda yüksek seviyede kalması akciğer dokusunda kavitelerin oluşmasıyla direkt ilişkilidir. Yetersizliği durumunda ise immün sistemin düşük düzeyde çalışması söz konusu olacak bu durumda da *Mtb*'in immün hücreler tarafından yok edilmesi akamete uğrayabilecek ve basilin temizlenmesi engellenerek enfeksiyon varlığı devam edecektir (Yang ve ark., 2025).

IL-1β'nın tüberküloz hastalığında konağı koruyucu veya yüksek seviyelerde sentezlenmesi zararlı etkiler oluşturabildiğinden enfeksiyon sırasında bu sitokinin regüle edilmesi büyük önem taşımaktadır. IL-1β'nın regülasyonu immün regülasyonu anlamına gelmektedir. Bu sebeple IL-1β sinyal yolunun hedeflenmesi tüberküloz tedavisinde önemli bir strateji olarak değerlendirilmektedir. Tüberküloz tedavisinde IL-1β salınımının tetiklenerek immün sistem hücrelerini aktive etmek, aynı zamanda aşırı salınımının önüne geçerek de akciğer doku hasarının oluşmaması ana hedeflerdendir. Günümüzde tüberküloz tedavisi sırasında IL-1β'nın modülasyonunu hedefleyen tedavi çalışmaları yoğun olarak sürdürülmektedir. Tüberküloz tedavisi sırasında IL-1β aracılı inflamasyonun azaltılması için kortikosteroid kullanımı özellikle ağır akciğer hasarı, menenjit ve perikardit gibi enfeksiyonların varlığı durumunda önerilmekteyse de bu ilaçların immün yanıtı etkilediği unutulmamalıdır. Bu sebeple tüberküloz tedavisinde IL-1β'nın regüle salınımı hedeflenmektedir (Masola ve ark., 2019). Bizim çalışmamızda tedavi verilmeyen *M. avium* ile enfekte kontrol grubunda IL-1β ekspresyonu 2.4 kat artarken, likopen, linalool, rosmarinik asit, rosuvastatin ve oleik asit tedavi gruplarında sırasıyla 0.56, 0.85, 0.99, 0.81 ve 1.22 kat artış tespit edilmiş olup tüm bileşik gruplarında IL-1β ekspresyonun anlamlı derecede regüle edildiği saptanmıştır. IL-1β'nin çeşitli sitokin inhibitörleri veya adjuvanlar yoluyla modülasyonu, tüberküloz tedavi ve yönetimini iyileştirmek için çok değerli yaklaşımlar olabilir. Özellikle ilaç dirençli vakaların tedavisinde ve/veya ağır seyirli enfeksiyonların tedavisinde faydalı olabilme potansiyeli bulunmaktadır (Gorska-Ciebiada ve ark., 2016; Paramita Pal ve ark., 2023).

TNF-α konağın patojenlerle karşılaştığında enfeksiyon durumunda immün yanıtta önemli bir rol oynayan bir proenflamatuar sitokindir. TNF-α, enfeksiyonla mücadelede kritik

bir rol oynarken, aşırı üretimi veya düzensiz regülasyonu, doku hasarına ve hastalığın progresyonunun kötüye gitmesine yol açmaktadır. Tüberküloz tedavisinde etkili stratejiler geliştirilmesi için TNF-α'nın sentezi ya da regülasyonu kritik düzeyde önemlidir. Bu sitokin esas olarak makrofajlar**,** DC'ler ve diğer immün sistem hücreleri tarafından enfeksiyon durumunda üretilmektedir. TNF-α *M. tuberculosis* enfeksiyonunda makrofajları aktive ederek intraselüler yerleşim gösteren bakterilerin inaktivasyonunda yayılmasının kontrol edilmesinde önemli rol oynar**.** Ayrıca TNF-α salınımı diğer immün sistem hücrelerini enfeksiyon odağına çekmektedir. Ayrıca, TNF-α, IL-1β ve IL-6 gibi diğer enflamatuar sitokinlerin üretimini arttırarak *M.tuberculosis*'le mücadeleyi güçlendirmektedir (Horiuchi ve ark., 2010; Romanowska-Próchnicka ve ark., 2021).

TNF-α'nın aşırı düzeyde üretimi inflamasyona bağlı konak hasarı ve akciğer dokusunda kavitasyona yol açan hasar oluştururken bu sitokinin inhibe edilmesi ise latent tüberkülozun reaktifleşmesine veya aktif tüberkülozun ağır seyretmesine yol açabilmektedir. Bazı çalışmalarda TNF-α inhibitörlerinin akciğer hasarını azaltabileceğini ve klinik iyileşmeyi sağlayabilse de baskılaması ve latent tüberkülozun reaktifleşmesine yol açabilmektedir (Romanowska-Próchnicka ve ark., 2021). Deneylerde TNF-α ekspresyon düzeylerinin kontrol grubuyla kıyaslandığında anlamlı oranda inhibe edildiği görülmektedir.

IL-12 (P40); IL-12'nin bir alt birimi olup immün sistem üzerinde etkili olan proenflamatuar sitokindir ve bağışıklık yanıtlarının düzenlenmesinde kilit rol oynar. Bu sitokin özellikle de *Mtb* enfeksiyonu ile ilişkili olarak araştırılmış, özellikle T hücreleri ile NK hücrelerinin aktivasyonunda önemli rol oynamaktadır. IL-12 immün yanıtı özellikle Th1 hücre yanıtlarını başlatma kapasitesine sahip sitokindir. Bu yanıt, *M. tuberculosis* gibi hücre içi patojenlere karşı etkili bir savunma sağlamaktadır. Bu sitokin T hücrelerini ve NK hücrelerini aktive eder, bu hücreler ise daha sonra IFN-γ üretimi gerçekleştirmektedir. IFN-γ ise makrofajları aktive ederek *M. tuberculosis* ile mücadelede önemlidir. *M. tuberculosis* enfeksiyonu sırasında IL-12 üretimi genellikle enfeksiyonun erken evrelerinde başlamakta olup bu sitokin enfeksiyonun kontrolü açısından önemlidir. Daha önce de belirtildiği gibi granülom formasyonunun oluşması *M. tuberculosis* enfeksiyonunun kontrol altına alınmasında çok önemli olup IL-12 bu oluşumu desteklemektedir (Mondal ve ark., 2020).

IL-12'nin yeterli düzeyde üretimi enfeksiyonun kontrolü açısından önemlidir, yetersiz üretimi durumunda mikroorganizmanın granülom yapılarından kaçmasına veya immün sistem hücrelerinden saklanmasına neden olabilir, bu da enfeksiyonun kronikleşmesine ve aktif tüberkülozun gelişmesine yol açabilmektedir. Bunun yanında bu sitokinin yetersizliği Th1 hücre cevabını zayıflatarak konağın patojene karşı savunmasını etkisiz hale getirmektedir. Tüberküloz hastalarında IL-12 yeterli üretimi ya da dışarıdan konağa verilmesi önemli tüberküloz tedavi stratejileri arasında düşünülmektedir. IL-12 bağışıklık yanıtını destekleyerek enfeksiyonun kontrol edilmesine yardımcı olabilmektedir. IL-12 terapisi**,** özellikle latent tüberküloz gibi daha dirençli ve şiddetli enfeksiyonlar için önerilen terapötik yol olabilir. Çünkü IL-12 üretiminin immün yanıtı güçlendirme gibi önemli bir yeteneği bulunmaktadır (Floss ve ark., 2020; Larosa ve ark., 2019).

Bir önemli husus da diğer proenflamatuar sitokinler gibi IL-12'nin aşırı üretimi de inflamasyonla ilişkili olup aşırı ekspresyon durumunda akciğer dokusu tahribatına ve hastalığın şiddetlenmesine yol açabilmektedir. Bu durumda aşırı üretim söz konusu olduğunda IL-12 inhibitörlerinin kullanımına gerek duyulabilir. IL-12'nin aşırı inhibisyonu durumunda ise immün hücrelerin enfeksiyona karşı koymada etkinliği zayıflayacak bu durumda yaygın *Mtb* enfeksiyonu gelişecektir. Tüberkülozla mücadelede IL-12'nin modülasyonu önem arz etmektedir (Glassman ve ark., 2021). IL-12 gen ekspresyonunun primer enfeksiyonda artışların görülmesi enfeksiyona karşı güçlü cevabı gösterirken, kontrolsüz ekspresyonun da konağa zarar verebilmesi aşikardır. Bu sebeple bu sitokinin kontrollü salınımı, enfeksiyonun. Başlangıcında yüksek oranda sentezlenmesini takiben durağanlaşması veya azalması önem arz etmektedir. Çalışmamızda standart ilaç tedavi gruplarında IL-12 ekspresyon düzeyleri yüksek olarak seyrederken, likopen, linalool, rosmarinik asit, rosuvastatin ve oleik asit tedavi gruplarında regüle edilerek ekspresyonların inhibe edildiği tespit edilmiştir.

IL-27, IL-12 ailesinden olup bağışıklık sisteminde önemli bir sitokindir. Enfeksiyonlara karşı bağışıklık yanıtlarını düzenlemede önemli bir rol oynar, özellikle Th1 hücre aracılı bağışıklığı teşvik eder, IFN-γ üretimi üzerinde etkilidir. IL-27 temel olarak makrofajlarla DC'ler tarafından sentezlenmektedir. Fakat diğer immün sistem hücreleri tarafından da düşük düzeyde sentezlenmektedir (Abdalla ve ark., 2015) .

IL-27 konağın *M. tuberculosis* gibi hücre içi patojenlerle mücadelesi için vazgeçilmez olan Th1 hücre cevabını yönlendirmek açısından çok önemlidir. IL-27 üretimi ile aktive olan Th-1 hücreleri IFN-γ üretimi teşvik etmektedir. IFN-γ makrofajlar ile diğer immün hücreleri tetikleyerek enfeksiyonun temizlenmesini aktive eden bir sitokindir. Bunun yanında IL-27 naif CD4+ T hücrelerinin Th1 hücrelerine farklılaşmasını uyarmakta ve bu hücrelerin IFN-γ üretme yeteneklerini artırmaktadır (Ting ve ark., 2023). IFN-γ üretimiyle makrofajlar *M. tuberculosis* ve diğer hücre içi patojenleri yok etmek için aktive olmaktadır. Dolayısıyla IL-27 sentezi granüloma oluşumu teşvik etmekte enfeksiyonun kontrol altına alınmasına yardımcı olmaktadır. IL-27 özellikle enfeksiyon bölgesinde T hücreleri ve makrofajların çekilmesi ve aktive ederek granülomların stabilizasyonunu sağlamaktadır. IL-27 regülatör T hücrelerinin etkili olarak çalışmasını düzenleyerek immün regülasyona katkı vermektedir. Treg hücreleri doku immün yanıtı kontrol ederek doku hasarının önlenmesine yardım etmektedir (Harker ve ark., 2023).

Günümüzde tüberküloz tedavisinde IL-27 sitokini üzerinde durulan hedeflerden biridir. Hem immün regülasyonu sağlamada hem de yetersiz immün yanıt oluşturan konaklarda immün yanıtın artmasını sağlamaktadır. IFN-γ üretimini ve granüloma oluşumunu tetiklemektedir. IL-27 üretiminin klasik anti-tüberküloz tedavi etkinliğini arttırabilecektir (Ting ve ark., 2023).

IL-27 üretiminin regülasyonu özellikle ilaç dirençli *M. tuberculosis* vakalarında ilaç dirençli veya kronik hastalarda tamamlayıcı bir tedavi olarak düşünülebilir klinik sonuçları da iyileştirebilir. Tedavide IL-27'nin üretimiyle inflamasyon tetikleneceğinden tamamlayıcı tedavi olarak IL-27 inhibitörlerinin kullanılması faydalı olabilecektir (Ma ve ark., 2023). IL-12'de olduğu gibi IL-27 ekspresyonunun tedavi sırasında regülasyonu doğrudan tedavi başarısını etkileyecektir. Çalışmamızda IL-27 gen ekspresyonunu en yüksek düzeyde inhibe ederek regülatif etki gösteren bileşik Rosmarinik asit olmuştur. Kontrol grubunda bu genin ekspresyon oranı 6.06 kat iken, Rosmarinik asit tedavi grubunda 3.77 kat olmuştur.

CYP1A1 (Sitokrom P450 1A1) çeşitli endojen ve ekzojen bileşiklerin metabolizmasında rol oynayan sitokrom P450 enzim ailesinin bir üyesi olup bu enzimler, detoksifikasyon sürecinde önemli bir rol oynar. CYP1A1 endojen ve ekzojen maddelerin metabolizmasında önemli bir enzimdir. Bu enzimin *Mtb* enfeksiyonundaki doğrudan rolü

tam olarak bilinmese de oksidatif stresin, bağışıklık tepkilerinin ve muhtemelen ilaç metabolizmasının modülasyonu yoluyla enfeksiyonun patogenezini etkileme söz konusu olabilir (Sánchez-Siles ve ark., 2020) .

CYP1A1 çevresel toksinler ve ilaçların metabolizmasında rol oynar. CYP1A1'in enzimatik aktivitesi sırasında ROS üretmektedir. ROS, makrofajların *M. tuberculosis* aktivitesini güçlendirirken aşırı ROS üretimi doku hasarına neden olabilmekte ve sonuçta hastalığın progresyonunu kötüleştirmekte ve şiddetlendirebilmektedir. Dolayısıyla ilk başta artan enzim aktivitesi, daha sonraları regüle olmasıyla iyileşmeye katkı verebilecektir (Kapelyukh ve ark., 2019).

CYP1A1, anti-TB ilaçlarını metabolize edebilirliği üzerinde etkili olabilir, potansiyel olarak bu ilaçların etkinliğini ve toksisitesini etkileyebilmektedir. Kombine ilaç tedavilerinde CYP1A1'in üretimin tetiklenmesi veya inhibisyonu tedavi sonuçlarıyla direkt ilişkili olan anti-TB ilaçlarının plazma konsantrasyonlarının değişmesine sebep olabilmekte olup bu da tedavi sürecine tesir etmektedir. Bu enzim aynı zamanda ilaç dirençli TB vakalarında ilaçların inhibitör konsantrasyonları üzerinde etkili olabildiklerinden direnci etkileyebilmektedir (Ye ve ark., 2019).

Tüberküloz tedavisi sırasında çeşitli inhibitörler veya indükleyiciler vasıtasıyla CYP1A1'in regüle olması konak immünitesini güçlendirebilir veya ilaç metabolizmasını optimize etmek için yeni bir terapötik strateji olabilir (Coelho ve ark., 2022). Çalışmamızda CYPA1 geni ekspresyonu regülasyonu sağlayan en etkili bileşikler likopen ve rosmarinik asit olmuştur. Kontrol tedavi grubunda bu gen ekspresyonu 2.86 kat artarken, likopen ve rosmarinik asit tedavi gruplarında sırasıyla 2.1 ve 1.35 olmuştur.

COX-2 (Siklooksijenaz-2) enflamasyon ve immün yanıtta önemli rol oynayan lipid bileşikleri olan prostaglandinlerin sentezinde önemli bir enzimdir. *M. tuberculosis* enfeksiyonu sırasında COX-2 genellikle konak immün yanıtı sonucu up-regüle edilmektedir. COX-2 tarafından üretilen prostaglandinler, özellikle PGE2 enflamasyonu düzenlemede, TB'ye karşı koruyucu ve patolojik reaksiyonlar arasındaki dengeyi sağlamada oldukça önemlidir. PGE2 üretimi aşırı hücre ölümünü sınırlamaktadır. *M. tuberculosis* enfeksiyonunu sırasında hastalığın sınırlaması için apoptozu tetiklemektedir. Ayrıca, granülomların bütünlüğünü korumasına yardım etmekte ve böylece enfeksiyonun

sınırlandırılmasında rol oynamaktadır (Przybyła ve ark., 2021; Tudor ve ark., 2020; X. Wang ve ark., 2023). COX-2 regülasyonu çalışmamızda tüm tedavi gruplarında saptanmıştır.

iNOS, L-argininden nitrik oksit (NO) üretmekten sorumlu bir enzimdir. Patojenlere karşı mücadele önemli olup reaktif bir nitrojen türü olan NO üreterek immün yanıtta kritik görevler üstlenmektedir. iNOS ekspresyonu IFN-γ, TNF-α gibi olarak proenflamatuar sitokinlerin salınımı tetiklemektedir. Lipopolisakkaritler gibi mikrobiyal komponentler sentezini tetiklemektedir. NO, makrofajların içerisinde mikobakteri inaktivasyonu yapmakta ya da çoğalmasını inhibe eden önemli moleküldür. Bunun yanında bakteriyel invazyonu durduracak granülom oluşumuna katkı vermektedir. Konakta NO üretimi mikrobiyal temizliği tetiklerken aşırı ekspresyonu doku hasarı oluşturabilmektedir (Guo ve ark., 2023; Shah ve ark., 2023; Vanini ve ark., 2015).

iNOS eksiliğinde farelerde tüberküloza yatkınlık geliştiği bildirilmiştir. Latent tüberküloz enfeksiyonunda iNOS aktivasyonunun basilin reaktif duruma geçmesini engellediği, iNOS sentezi regülasyonunun bozulması durumunda ise tüberküloz gelişimi riskinin arttığı bildirilmiştir (Shah ve ark., 2023; Vanini ve ark., 2015). Çalışmamızda iNOS ekspresyon oranları standart ilaç gruplarında yüksek seyrederken, tüm bileşik gruplarında kontrol grubundan daha düşük düzeylerde bulunmuştur. iNOS gen ekspresyonunun regüle edilmesi doku hasarının azaltılması bakımından önemli olarak değerlendirilmiştir.

Egr-1 geni hücre çoğalmasında, apoptozda ve immün yanıtta rol oynayan genlerin regülasyonunda önemli bir rol oynayan bir zinc-finger transkripsiyon faktörüdür. Stres, enfeksiyon ve inflamasyona yanıt olarak hızla indüklenmektedir. Enfeksiyonlar sırasında Egr-1 geni Toll benzeri reseptörler, sitokinler veya mikrobiyal ürünler tarafından aktive edilen çeşitli sinyal yolları tarafından eksprese edilmektedir (Bhattacharyya ve ark., 2013).

Egr-1 mikobakteriyel enfeksiyonlar sorasında TNF-α ve IL-1β gibi enflamatuar sitokinlerin ekspresyonunu ve makrofaj aktivasyonunu regüle etmektedir. Ayrıca antibakteriyel aktiviteyi de destekleyici etkisi bildirilmiştir. Egr-1'in mikobakteri enfeksiyonu sırasında apoptozis mekanizmasını tetikleyerek antibakteriyel etkinlik sergilediği bildirilmiştir. Apoptozis mekanizmasındaki bozukluk mikroorganizmanın makrofajlar içinde canlı kalmasına yol açacaktır. Bu gen ayrıca makrofaj aktivasyonu ve

inflamasyonu düzenleyerek granülom oluşumunda da rol oynamaktadır (Li ve ark., 2020; A. Shah ve ark., 2018).

Buna karşın Egr-1'in aşırı eksprese olması aşırı inflamasyona, doku hasarına ve tüberküloz hastalığının alevlenmesine de yol açabilmektedir. Bu sebeple Egr-1 geninin regüle edilmesi tedavisi başarısını arttıracaktır. Tüberküloz hastalarında bu genin ekspresyonunu değerlendirmek ya da kantite etmek hastalığın progresyonu ya da tedavi yanıtını değerlendirmede faydalı olabilecektir (Khachigian, 2023; Li ve ark., 2020). Çalışmamızda transkripsiyon faktörü Egr-1 geni ekspresyonunun tüm tedavi gruplarında benzer oranlarda eksprese edildiği tespit edilmiştir.

IL-10 birçok immün sitem hücresi tarafından üretilen antienflamatuar sitokindir. Bu sitokin üretimini gerçekleştiren başlıca hücreler arasında; makrofajlar, DC'ler ve düzenleyici T regülatör hücreleri başlıca hücrelerdir. IL-10 geni aşırı inflamasyonu önleyerek immün sistem dengesini sağlamaktadır. Başlıca TNF-α, IL-12 ve IFN-γ gibi proenflamatuar sitokinler ile makrofaj aktivasyonunu azaltmaktadır. Ayrıca APC'ler tarafından antijen sunumunu engelleyerek T hücre aktivasyonunu inhibe etmektedir (Wei ve ark., 2020) .

IL-10 üretimi makrofajlarda fagolizozom füzyonu, ROS ve NO üretimini azaltarak antimikrobiyal prosesleri sınırlandırır. Tüberküloz enfeksiyonu sırasında aşırı oluşan enflamatuar sitokin salınımı azaltarak doku hasarı gelişimi azaltıcı etkiye sahiptir. IL-10'nun aşırı ekspresyonu aktif tüberküloz enfeksiyonu sırasında bakteriyel temizlenmeyi bozabilmektedir. Dolayısıyla latent fazdaki bakterinin aktivasyonuna ve aktif enfeksiyon gelişimine yol açabilmektedir. IL-10 üretiminin azaltılması *Mtb*'e karşı immün yanıtı tetikleyecektir. Makrofajların etkinliğini arttıracaktır. Tedavide IL-10 inhibitörlerinin kullanımı bakteri klirensini yükseltecektir. Fakat bu antienflamatuar sitokinin susturulması proenflamatuar sitokinlerin salınımı arttıracak ve doku hasarı gelişimi riskini de arttırabilecektir. Bu bakımdan IL-10 üretimin mikobakteriyel enfeksiyonlar sırasında regüle edilmesi mutlak gereklilik arz etmektedir (Ouyang ve O'Garra, 2019; Porro ve ark., 2020).

*M. tuberculosis'*e karşı bağışıklık tepkisinin temel moleküler belirteçleri sitokinler (IL-1β, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-17, IL-22b, IFNɣ, TNFa ve TGFß), matris metalloproteinazlar ve bu genlerin inhibitörlerinin TB enfeksiyonunun farklı evrelerini

karakterize etmek, tedavisinin etkinliğini değerlendirmek ve farmakoterapi hedefleri olarak biyobelirteç olarak kullanılabileceği bildirilmiştir (Diatlova ve ark., 2023).

Tüberkülozlu hastalarda IL-8'in kan ve bronkoalveolar lavaj örneklerinde enflamatuar süreçlere ilişkin rolünün araştırıldığı bir çalışmada IL-8'in tüberküloz basiline doğrudan bağlanabildiği, IL-8'in *Mtb* molekülleriyle ilişkisinin lökositlerin (nötrofiller ve makrofajlar) bu basilleri fagosite etme ve öldürme yeteneğinin artmasına yol açtığı, TB hastalarının kanında bulunan önemli miktarda IL-8'in eritrositlerle ilişkili olduğu bildirilmiştir. Ayrıca IL-8'in T lenfositlerini (CD3+, CD4+ ve CD8+) sürece dahil eden temel kemokin olduğu bildirilmiştir. Edilen veriler IL-8'in *Mtb* molekülleriyle ilişkisinin TB hastalarında doğal bağışıklık yanıtı tetikleyebileceği bildirilmiştir (Krupa ve ark., 2015).

A549 akciğer epitel hücrelerinde *Mtb* suşlarının enflamatuar süreçlerde gen ekspresyonlarının araştırıldığı bir çalışmada farklı fenotiplere (duyarlı, INH R, Rif R, MDR ve XDR) sahip *Mtb* izolatlarında tüm genom dizi analizleri yapılmış inflamasyon ve apoptozda rol oynayan genler RT-PCR kullanılarak değerlendirilmiştir. Tüm duyarlı ve dirençli suşların IL-8, proenflamatuar sitokin olan TNF- α ve IFN- γ ekspresyonunu anlamlı düzeyde up-regüle edildiği, IL-10 ekspresyonunun ise enfeksiyondan 24 ve 48 saat sonra anlamlı düzeyde inhibe edildiği tespit edilmiştir. Bu çalışmada apoptozis ve inflamasyonla ilişkili gen ekspresyonu farklılıklarının direnç durumundan ziyade genotiplere alakalı olabileceği bildirilmiştir. Çünkü çoğu genin ekspresyonunun dirençli suşlarda, duyarlı suşlara kıyasla daha düşük olduğu bildirilmiştir (Abdolhamidi ve ark., 2024).

THP-1 insan monosit makrofaj hücrelerinde *Mtb*'nın C vitamini ile inkübasyonu sonrası hücre apoptozis sonuçlarının analiz edildiği bir çalışmada IL-1β ve IL-6 ekspresyon oranlarının *Mtb* grubunda kontrol grubuna kıyasla anlamlı derecede daha yüksek olduğu ve C vitamini tedavisinin bu genlerin ekspresyon seviyelerinden anlamlı derecede azalmalara yol açtığı saptanmıştır. Çalışmada C vitamini muamelesinin THP-1 hücrelerinin canlılığında doz-ilişkili bir artışın olduğu, IL-8, IL-6, IL-1β, ve TNF-α genlerinin ekspresyon düzeylerinin olmak üzere enflamasyonun anlamlı düzeyde inhibe edildiği bildirilmiştir (Song ve ark., 2022).

Tüberküloz fare modelinde fenolik bir bileşik olarak bitki metaboliti kullanarak akut akciğer hasarının analiz edilmesinin amaçlandığı bir çalışmada makrofaj poliferasyonuna

bağlı olarak fenolik bileşiğin proenflamatuar sitokinlerin (TNF-α, IL-1β ve IL-6) gen ekspresyonlarını anlamı derecede arttırdığı bildirilmiştir. Sürekli M1 polarizasyonunun IL-6, TNF-α, IL-1β, iNOS ve COX-2 gibi enflamatuar faktörlerin tetiklenebileceği ve bunun sonucunda NF-κB'nin M1 tipi makrofajlara bağımlı polarizasyonun indüklenerek kontrolsüz inflamasyona ve doku ve organ hasarına yol açabileceği bildirilmiştir. Proenflamatuar gen ekspresyonlarının regülasyonununda fenoliklerin etkili olabileceği bildirilmiştir (Wang ve ark., 2024).

Bir çalışmada aktif tüberküloz hastaları ile latent TB enfeksiyonlu hastalarda proenflamatuar genlerin ekspresyonları kıyaslanmış aktif hastalarda IFN-γ, TNF-α, IL-6, IL-5, IL-10 ve CXCL-1 ekspresyonlarının anlamlı derecede daha yüksek olduğu bildirilmiştir (Zhang ve ark., 2024).

Yeni doğal molekül polonilignanın IL-1β başta olmak üzere TNF-α ve IL-6 sitokinleri inhibe etme potansiyelinin araştırıldığı in vitro RAW 264.7 hücreleri üzerinde yapılan çalışmada polonilignan bileşiklerle muamele edilen hücrelerde proenflamatuar sitokinlerin (IL-1β, TNF-α ve IL-6) anlamlı olarak inhibe edildiği bildirilmiştir (Pal ve ark., 2024).

Mezenkimal kök hücrelerinin avirülan *Mtb* H37Ra suşu ile THP-1 hücreleri üzerinde oluşturulan enfeksiyonda makrofajlar üzerindeki immünomodülatör etkilerini araştırıldığı bir çalışmada makrofajlarda hücre içi ROS salınımı araştırılmıştır. Çalışmada gen ekspresyon çalışmaları RT-PCR ile, apoptoz Annexin V/PI testi ile piroptoz belirteçleri Western blotlama ile ölçülmüştür. *Mtb* ile enfekte THP-1 makrofajlarında, mezenkimal kök hücrelerle birlikte kültive edilen gruplarda ROS salınımı, özellikle IL-1β olmak üzere IL-6, TNF-α sitokin ekspresyonu ve apoptozun tetiklendiği bildirilmiştir. Mezenkimal kök hücrelerinin immün reseptörlerini ve özellikle IL-1β olmak üzere IL-6, TNF-α enflamatuar sinyal yollarını aktive ederek makrofajların *Mtb*'ye karşı immün yanıtı arttırabildiği düşünülmektedir (Yang ve ark., 2025).

Mtb ile enfekte monosit türevi dentritik hücrelerde sitokin ekspresyonunun epigenetik modülasyonu anlamayı amaçlayan bir çalışmada dentritik hücreler MDR ve XDR gibi aktif *Mtb* suşları enfekte edilerek, IL-6, IL-12, IFN-γ, IL-1β, TNF-α ve IL-10 yolaklarındaki pro/anti-inflamatuar gen ifade düzeyleri RT-PCR kullanılarak

değerlendirilmiş, tüm gruplardaki proenflamatuar genlerin up-regüle olduğu, TNF-α ekspresyonun en yüksek oranda gerçekleştiği bildirilmiştir. Çalışmada *Mtb* enfeksiyonunda monosit türevi dentritik hücrelerdeki DNA metilasyon değişikliklerine neden olduğu TNF-α'nın hipo-metilasyonu bu genin yukarı regülasyonunu indükleyebildiği, bu korelasyonda XDR *Mtb* suşu ne kadar dirençli ise TNF-α genindeki metilasyon durumunun o kadar düşük olduğu bildirilmiştir (Ma ve ark., 2024).

Aktif tüberküloz hastalarında makrofajlarda granulin ve TNFR2'nin makrofaj polarizasyonundaki mekanizmasının araştırmak amacıyla yapılan bir çalışmada TNFR2'nin makrofaj polarizasyonundaki işlevini doğrulamak için IL-4 ile indüklenmiş RAW hücrelerinde TNFR2, TNF-α, iNOS ve IL-6 ekspresyonları RT-PCR yöntemiyle analiz edilmiştir. Sağlıklı gönüllülere kıyasla aktif tüberküloz hastalarında makrofajlarda TNFR2 ve granülin ekspresyonunun arttığı ve M2 tipinin baskın olduğunu bulunmuştur. Granülin yıkımının M1 polarizasyon belirteçleri olan TNF-α, iNOS ve IL-6'nın yüksek ekspresyon seviyelerinin takip ettiği bildirilmiştir (Zhang ve ark., 2024).

Likopenin etkinliği hususunda yapılan bir çalışmada rifampisin kaynaklı beyin dokusu hasarında linaloolun iyileştirici rolünü araştırmak amacı ile in-vivo model fare modeli oluşturulmuş ve kombine etkinlikleri değerlendirilmiştir. Çalışmada linaloolun rifampisin toksik etkisini inhibe ettiği, CYP1A1 ve CYP1A2 mRNA gen ekspresyonunda anlamlı düzeyde azalışlara yol açtığı bildirilmiştir (Özgöçmen ve Azırak, 2023).

Mtb higBA'nın bakteriyel stres yanıtı ve hücre içi enfeksiyon ve immünite üzerindeki etkisini araştırmak amacı ile yapılan bir çalışmada *Mtb* H37Rv genomundan çoğaltılan hedef gen vektöre klonlanarak *Mycobacterium smegmatis*'e (Ms) aktarılmıştır. IL-10, IL-12 (p40), IFN- γ, TNF- α ve iNOS dahil olmak üzere sitokinlerin transkripsiyonel seviyelerini ölçmek için RT-PCR analizleri gerçekleştirilmiştir. Çalışmada higBA'nın makrofajlarda bakteriyel sağkalımı arttırdığını ve sitokinlerin transkripsiyonel seviyesini yukarı regüle olduğu gösterilmiştir (Wang ve ark., 2022).

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

6.1 SONUÇLAR

Enflamatuar süreçler, bağışıklık sisteminin enfeksiyonlara karşı verdiği temel yanıtlardan biridir; ancak bu süreçlerin kontrolsüz aktivasyonu, ciddi doku hasarlarına ve kronik hastalıklara yol açabilmektedir. *Mycobacterium avium* gibi patojenler, inflamatuar yanıtı tetikleyerek enfekte konak hücrelerde proenflamatuar ve antienflamatuar gen ekspresyon dengesini bozmaktadır. Bu durum, yalnızca enfeksiyonun ilerlemesini kolaylaştırmakla kalmaz, aynı zamanda tedavi süreçlerini de karmaşık hale getirir. Bu bağlamda, standart tedavi ilaçlarının yanı sıra doğal bileşiklerin inflamatuar gen ekspresyonu üzerindeki düzenleyici etkilerinin araştırılması, yeni ve etkili tedavi stratejilerinin geliştirilmesine katkı sağlayabilir. Çalışmamızda, *M. avium* ile enfekte edilen ve edilmeyen Raw 264.7 hücrelerinde, standart ilaçlar (izoniazid ve rifampisin) ile doğal bileşiklerin (likopen, linalool, rosmarinik asit, rosuvastatin ve oleik asit) enflamatuar süreçler üzerindeki düzenleyici etkileri detaylı olarak incelenmiştir. Çalışma kapsamında elde edilen veriler aşağıda maddeler halinde verilmiştir:

1. *M. avium* ile enfekte edilmeyen Raw hücrelerinde proenflamatuar sitokinlerden IL-6, IL-1β ve TNF-α ekspresyonlarının Beta-aktin geni ile kıyaslandığında anlamlı olarak arttığı tespit edilirken, IL-8 ekspresyonunun anlamlı değişiklik saptanmamıştır. izoniazid IL-1β ve TNF-α, rifampisinin ise TNF -alfa ekspresyonlarını anlamlı düzeyde tetiklemiştir. Bileşiklerden likopenin hem IL-1β hem de TNF-α ekspresyonlarını anlamlı düzeyde tetiklediği tespit edilirken, linalool, rosuvastatin ve oleik asit gruplarında sadece TNF-α ekspresyonları tetiklenirken, IL-6, IL-8 ve IL-1β ekspresyonları Beta-aktin geni ile kıyaslandığında anlamlı oranda değişmemiştir. Rosmarinik asit grubunda ise Raw hücrelerinde IL-6, IL-8, TNF-α ve IL-1β ekspresyonlarında anlamlı değişimler tespit edilmemiştir.

2. IL-12 ekspresyon düzeyleri izoniazid, rifampisin, likopen, linalool, rosmarinik asit, rosuvastatin ve oleik asit gruplarında Beta-aktin geni ile kıyaslandığında kontrol grubunda 19 kat, diğer yedi bileşik grubunda ise 20.97- 24.31 kat arasında artış göstermiştir.

3. Proenflamatuar enzim genlerinden CYPA1, COX-2 ve iNOS'un ekspresyon düzeyleri sırasıyla 3.38, 3.30 ve 11.47 kat artmıştır. İzoniazid ve rifampisin gruplarında iNOS ekspresyonları sırasıyla 20.32 ve 18.81 kat artmış olup kontrol grubuyla kıyaslandığında anlamlı artışlar gözlenmiştir. iNOS geni ekspresyon oranları likopen, linalool, rosmarinik asit, rosuvastatin ve oleik asit gruplarında ise sırasıyla 12.22, 12.70, 12.84, 14.29 ve 16.64 kat artışlar saptanmıştır. Bu artışlar standart ilaçlarla kıyaslandığında anlamlı oranda düşük bulunmuş olup, bileşiklerin gen ekspresyonu üzerinde regülatif etkinlikleri olduğunu göstermektedir.

4. IL-10 ekspresyon düzeylerinde kontrol grubu, ilaç grupları ve diğer beş bileşik gruplarında Beta-aktin ile kıyaslandığında azalışlar tespit edilmiştir. Bu azalışlar izoniazid ve rifampisin gruplarında anlamlı bulunmazken, likopen, linalool, rosmarinik asit, rosuvastatin ve oleik asit gruplarında anlamlı düzeyde bulunmuştur.

5. IL-27 ekspresyon oranları Beta-aktin ile kıyaslandığında kontrol dahil tüm gruplarda anlamlı düzeyde artmıştır. Kontrol grubu ile kıyaslandığında izoniazid, rifampisin, likopen, linalool, rosuvastatin ve oleik asit gruplarında anlamlı oranda artarken, rosmarinik asit grubunda ise anlamlı oranda azalış tespit edilmiştir.

6. *M. avium* ile enfekte makrofaj hücrelerinde Beta-aktin geni ile kıyaslandığında proenflamatuar sitokinlerden IL-1β 2.4 ve TNF-α ekspresyonu 3.78 kat artmıştır. IL-6 ve IL-8 gen ekspresyonlarının Beta-aktin ile kıyaslandığında anlamlı değişimler tespit edilmemiştir. IL-1β ekspresyonu İzoniazid tedavi grubunda 1.83 kat artarken, Rifampisin tedavi grubunda 0.55 kat artmıştır. likopen, linalool, rosmarinik asit, rosuvastatin ve oleik asit tedavi gruplarında ise IL-1β ekspresyonu sırasıyla 0.56, 0.85, 0.99, 0.81 ve 1.22 kat artmıştır. Bu grupta kontrol grubuyla kıyaslandığında TNF-α ekspresyon düzeylerindeki artış hem ilaç tedavi gruplarında hem de bileşik gruplarında anlamlı düzeyde regüle edilmiştir. Kontrol grubunda TNF-α ekspresyon düzeyi 3.78 kat artarken, izoniazid ve rifampisin tedavi gruplarında sırasıyla 2.37 ve 2.1 kat artışmıştır. Likopen, linalool, rosmarinik asit, rosuvastatin ve oleik asit tedavi gruplarında ise artış oranları sırasıyla; 2.11, 2.27, 0.82, 2.3 ve 1.75 olarak bulunmuştur. TNF-α ekspresyonu en yüksek düzeyde rosmarinik asit tedavi grubunda tespit edilmiştir.

7. IL-27 ekspresyon düzeyleri *M. avium* ile enfekte edilen ve tedavi verilmeyen grupta Beta-aktin geni ile kıyaslandığında 21.36 kat artarken; izoniazid ve rifampisin tedavi gruplarında sırasıyla 29.16 ve 29.72 kat artmıştır. IL-27 ekspresyonunun standart ilaçlarla kıyaslandığında likopen (24.86 kat), linalool (25.90 kat), rosmarinik asit (24.70 kat), rosuvastatin (23.86 kat) ve oleik asit (25.61 kat) gruplarında nispeten daha düşük artış oranlarıyla eksprese edildiği saptanmıştır.

8. *M. avium* ile enfekte edilen ve tedavi verilmeyen kontrol grubunda CYPA1, COX-2 ve iNOS gen ekspresyonları sırasıyla; 2.86, 6.12 ve 12.56 kat artmıştır. İlaç tedavi gruplarında CYPA1 ve COX-2 genleri artış oranları kontrol grubuna yakın oranlarda bulunurken, iNOS ekspresyonları izoniazid (15.76 kat) ve rifampisin (14.03 kat) tedavi gruplarında daha yüksek bulunmuştur. Likopen (9.92 kat), rosmarinik asit (7.12 kat), rosuvastatin (8.75 kat) ve oleik asit (9.25 kat) tedavi gruplarında standart ilaç tedavi gruplarından anlamlı derecede düşük bulunmuştur.

9. IL-10 ekspresyon düzeyi kontrol grubu, izoniazid ve rifampisin gruplarında beta-aktin geni ile kıyaslandığında azalmayla seyretmekteyken, linalool, rosmarinik asit, rosuvastatin ve oleik asit tedavi gruplarında anlamlı olmasa da artışlar göstermiştir.

10. IL-27 ekspresyonu Beta-aktin geni ile kıyaslandığında tüm tedavi grupları ve kontrol grubunda anlamlı oranlarda artışlar göstermiştir. Kontrol grubunda IL-27 ekspresyonu 3.70 kat artarken, rosmarinik asit ve oleik asit tedavi gruplarında sırasıyla 2.48 ve 3.40 kat artış göstermiştir.

Bu çalışmada, *M. avium* ile enfekte edilen ve edilmeyen Raw 264.7 hücrelerinde proenflamatuar ve antienflamatuar sitokinler ile enzim genlerinin ekspresyon düzeyleri karşılaştırılmış ve bu süreçte standart ilaçlar (izoniazid ve rifampisin) ile doğal bileşiklerin (likopen, linalool, rosmarinik asit, rosuvastatin ve oleik asit) düzenleyici etkileri analiz edilmiştir. Elde edilen bulgular aşağıdaki gibi özetlenebilir:

1. Proenflamatuar sitokinlerden IL-6 ve IL-8 gen ekspresyonlarında genel olarak anlamlı değişimler gözlenmemiştir; ancak TNF-α ve IL-1β gen ekspresyonlarının *M. avium* enfeksiyonu ile tetiklendiği ve standart ilaçlar ile doğal bileşiklerin bu genlerde farklı düzeylerde regülasyon sağladığı belirlenmiştir.

2. IL-12 ve IL-27 gen ekspresyonlarının enfekte hücrelerde anlamlı şekilde arttığı, özellikle IL-27'nin standart ilaç gruplarında ve doğal bileşik gruplarında düzenleyici etkiler gösterdiği tespit edilmiştir.
3. Proenflamatuar enzim genlerinden iNOS'un hem standart ilaç gruplarında hem de doğal bileşik gruplarında artış gösterdiği; ancak doğal bileşiklerin, standart ilaçlara kıyasla bu artışları daha düşük düzeyde regüle ettiği belirlenmiştir. Bu durum, doğal bileşiklerin inflamasyon süreçleri üzerinde daha ılımlı ve dengeleyici bir etki sağladığını düşündürmektedir.
4. IL-10 ekspresyon seviyelerinin standart ilaç tedavisi ve kontrol grubunda azaldığı, doğal bileşik gruplarında ise IL-10'un ekspresyon seviyelerinin az da olsa arttığı gözlenmiştir. Bu durum, doğal bileşiklerin antienflamatuar yanıtları destekleyebileceğini göstermektedir.
5. Rosmarinik asit, diğer doğal bileşiklerden farklı olarak TNF-α ekspresyonunu güçlü şekilde artırırken, IL-10 ve IL-27 genlerinde düzenleyici etkiler sağlamıştır.

6.2 ÖNERİLER

- **Doğal Bileşiklerin Potansiyeli:**

Doğal bileşiklerin (likopen, linalool, rosmarinik asit, rosuvastatin ve oleik asit) enflamatuar süreçlerde gösterdiği regülatif etkileri, ilaç geliştirme çalışmalarında destekleyici ajanlar olarak kullanılabileceklerini göstermektedir. Bu bileşiklerin, özellikle inflamasyon süreçlerini düzenlemede standart tedavilere ek olarak kullanılması değerlendirilebilir.

- **Standart İlaçlarla Kombinasyon:**

İzoniazid ve rifampisin gibi standart ilaçların yan etkilerini azaltmak veya etkinliğini artırmak amacıyla doğal bileşiklerle kombinasyon tedavisi önerilebilir. Kombinasyonların enflamatuar yanıtları nasıl etkilediği ileri çalışmalarla daha detaylı şekilde araştırılmalıdır.

- **IL-27 Üzerine Çalışmalar:**

IL-27'nin özellikle hem standart ilaçlar hem de doğal bileşikler tarafından düzenlenmesi, bu sitokinin inflamasyon süreçlerindeki rolünün daha fazla araştırılmasını

gerektirmektedir. IL-27'nin enflamatuar ve antienflamatuar dengenin sağlanmasındaki etkisi, terapötik potansiyeller sunabilir.

- **iNOS Regülasyonu:**

iNOS gen ekspresyonunun doğal bileşikler tarafından daha düşük düzeylerde artırılması, enflamatuar hasarı azaltma potansiyeline işaret etmektedir. Bu nedenle, iNOS'un düzenlenmesine yönelik daha spesifik doğal bileşiklerin taranması ve geliştirilmesi önemlidir.

Elde edilen bulguların in vitro koşullarda elde edilmiş olması, klinik çalışmalarla desteklenmesi gerektiğini göstermektedir. Özellikle doğal bileşiklerin güvenilirliği, etkinliği ve toksisite profilleri klinik deneylerle detaylandırılmalıdır.

IL-10 ekspresyonunu artıran ve TNF-α gibi proenflamatuar sitokinleri dengeleyen doğal bileşikler, kronik inflamasyonun tedavisinde yeni yaklaşımlar sunabilir. Bu tür bileşiklerin mekanizmaları moleküler düzeyde daha fazla incelenmelidir.

Rosmarinik asitin TNF-α ekspresyonunu artırırken diğer sitokinler üzerindeki etkilerinin farklılık göstermesi, bu bileşiğin hem enflamatuar hem de antienflamatuar süreçlerde rol oynayabileceğini göstermektedir. Bu mekanizmaların detaylı analizini önermekteyiz.

Elde edilen sonuçlar hem standart ilaçlar hem de doğal bileşiklerin enflamatuar yanıtları nasıl etkilediğine dair önemli bilgiler sunmakta ve enflamatuar hastalıkların tedavisinde alternatif yaklaşımlar geliştirilmesine ışık tutmaktadır. Bu bulguların, daha kapsamlı deneyler ve klinik çalışmalarla desteklenmelidir.

7. KAYNAKLAR

1. Abdalla, A. E., Li, Q., Xie, L., & Xie, J. (2015). Biology of il-27 and its role in the host immunity against mycobacterium tuberculosis. In *International Journal of Biological Sciences* (Vol. 11, Issue 2). https://doi.org/10.7150/ijbs.10464
2. Abdolhamidi, R., Haghighat, S., Moshiri, A., Fateh, A., & Siadat, S. D. (2024). Significance of genotypes and resistance status of Mycobacterium tuberculosis strains in gene expression of apoptosis cell death and inflammatory pathways in A549 lung epithelial cell line. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, *27*(7), 825–831. https://doi.org/10.22038/IJBMS.2024.75195.16303
3. Abuhammad, A. (2017). Cholesterol metabolism: a potential therapeutic target in Mycobacteria. In *British Journal of Pharmacology* (Vol. 174, Issue 14). https://doi.org/10.1111/bph.13694
4. Ahmad, S. (2011). Pathogenesis, immunology, and diagnosis of latent mycobacterium tuberculosis infection. In *Clinical and Developmental Immunology* (Vol. 2011). https://doi.org/10.1155/2011/814943
5. An, Q., Ren, J. N., Li, X., Fan, G., Qu, S. S., Song, Y., Li, Y., & Pan, S. Y. (2021). Recent updates on bioactive properties of linalool. In *Food and Function* (Vol. 12, Issue 21). https://doi.org/10.1039/d1fo02120f
6. Arain, M. A., Mei, Z., Hassan, F. U., Saeed, M., Alagawany, M., Shar, A. H., & Rajput, I. R. (2017). Lycopene: A natural antioxidant for prevention of heat-induced oxidative stress in poultry. In *World's Poultry Science Journal* (Vol. 74, Issue 1). https://doi.org/10.1017/S0043933917001040
7. Arnao, M. B., Cano, A., & Acosta, M. (2001). The hydrophilic and lipophilic contribution to total antioxidant activity. *Food Chemistry*, *73*(2). https://doi.org/10.1016/S0308-8146(00)00324-1
8. Baschieri, A., Ajvazi, M. D., Tonfack, J. L. F., Valgimigli, L., & Amorati, R. (2017). Explaining the antioxidant activity of some common non-phenolic components of essential oils. *Food Chemistry*, *232*. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.04.036
9. Berrada, Z. L., Lin, S. Y. G., Rodwell, T. C., Nguyen, D., Schecter, G. F., Pham, L., Janda, J. M., Elmaraachli, W., Catanzaro, A., & Desmond, E. (2016). Rifabutin and rifampin resistance levels and associated rpoB mutations in clinical isolates of Mycobacterium tuberculosis complex. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, *85*(2). https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2016.01.019
10. Bhattacharyya, S., Fang, F., Tourtellotte, W., & Varga, J. (2013). Egr-1: New conductor for the tissue repair orchestra directs harmony (regeneration) or cacophony (fibrosis). In *Journal of Pathology* (Vol. 229, Issue 2). https://doi.org/10.1002/path.4131
11. Birmingham, B. K., Bujac, S. R., Elsby, R., Azumaya, C. T., Zalikowski, J., Chen, Y., Kim, K., & Ambrose, H. J. (2015). Rosuvastatin pharmacokinetics and pharmacogenetics in Caucasian and Asian subjects residing in the United States. *European Journal of Clinical Pharmacology*, *71*(3). https://doi.org/10.1007/s00228-014-1800-0
12. Bloom, B. R. (2023). A half-century of research on tuberculosis: Successes and challenges. *The Journal of Experimental Medicine*, *220*(9). https://doi.org/10.1084/jem.20230859
13. Bohm, V., Puspitasari-Nienaber, N. L., Ferruzzi, M. G., & Schwartz, S. J. (2002). Trolox equivalent antioxidant capacity of different geometrical isomers of α-carotene, β-carotene, lycopene, and zeaxanthin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *50*(1). https://doi.org/10.1021/jf010888q
14. Bourgaud, F., Gravot, A., Milesi, S., & Gontier, E. (2001). Production of plant secondary metabolites: A historical perspective. In *Plant Science* (Vol. 161, Issue 5). https://doi.org/10.1016/S0168-9452(01)00490-3
15. Brown-Elliott, B. A., & Wallace, R. J. (2015). Mycobacterium : Clinical and Laboratory Characteristics of Rapidly Growing Mycobacteria . In *Manual of Clinical Microbiology* . https://doi.org/10.1128/9781555817381.ch32
16. Bruni, D., Dignam, A., Dunne, S., Wall-Coughlan, D., McCrudden, A., O'Connell, K., Lyons, C., McGuigan, C., Tubridy, N., & Butler, M. P. (2018). IRAK1 Limits TLR3/4- and IFNAR-Driven IL-27 Production through a STAT1-Dependent Mechanism. *The Journal of Immunology*, *201*(7). https://doi.org/10.4049/jimmunol.1701373
17. Cámara, M., De Cortes Sánchez-Mata, M., Fernández-Ruiz, V., Cámara, R. M., Manzoor, S., & Caceres, J. O. (2013). Lycopene: A review of chemical and biological activity related to beneficial health effects. In *Studies in Natural Products Chemistry* (Vol. 40). https://doi.org/10.1016/B978-0-444-59603-1.00011-4
18. Cambau, E., & Drancourt, M. (2014). Steps towards the discovery of Mycobacterium tuberculosis by Robert Koch, 1882. In *Clinical Microbiology and Infection* (Vol. 20, Issue 3).

https://doi.org/10.1111/1469-0691.12555
19. Campbell, E. A., Korzheva, N., Mustaev, A., Murakami, K., Nair, S., Goldfarb, A., & Darst, S. A. (2001). Structural mechanism for rifampicin inhibition of bacterial RNA polymerase. *Cell*, *104*(6). https://doi.org/10.1016/S0092-8674(01)00286-0
20. Campbell, P. J., Morlock, G. P., Sikes, R. D., Dalton, T. L., Metchock, B., Starks, A. M., Hooks, D. P., Cowan, L. S., Plikaytis, B. B., & Posey, J. E. (2011). Molecular detection of mutations associated with first- and second-line drug resistance compared with conventional drug susceptibility testing of Mycobacterium tuberculosis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *55*(5). https://doi.org/10.1128/AAC.01550-10
21. Cardona, P. J. (2007). New insights on the nature of latent tuberculosis infection and its treatment. In *Inflammation and Allergy - Drug Targets* (Vol. 6, Issue 1). https://doi.org/10.2174/187152807780077282
22. Cardona, P. J. (2009). A dynamic reinfection hypothesis of latent tuberculosis infection. In *Infection* (Vol. 37, Issue 2). https://doi.org/10.1007/s15010-008-8087-y
23. Caseiro, M., Ascenso, A., Costa, A., Creagh-Flynn, J., Johnson, M., & Simões, S. (2020). Lycopene in human health. In *LWT* (Vol. 127). https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109323
24. Chang, M. Y., Shieh, D. E., Chen, C. C., Yeh, C. S., & Dong, H. P. (2015). Linalool induces cell cycle arrest and apoptosis in leukemia cells and cervical cancer cells through CDKIs. *International Journal of Molecular Sciences*, *16*(12). https://doi.org/10.3390/ijms161226089
25. Chen, C., Ma, J., Ren, L., Sun, B., Shi, Y., Chen, L., Wang, D., Wei, J., Sun, Y., & Cao, X. (2024). Rosmarinic Acid Activates the Nrf2/ARE Signaling Pathway via the miR-25-3p/SIRT6 Axis to Inhibit Vascular Remodeling. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *72*(8). https://doi.org/10.1021/acs.jafc.3c02916
26. Chen, K., Ye, Q., Zhang, Y., Qi, Z., Huang, Y., Lu, W., Wang, X., Wang, Y., Cao, L., Qiu, S., Xu, Y., Huang, J., & Xie, J. (2025). CXCL1-CXCR2 signaling mediates the activation of microglia in the nucleus tractus solitarii to promote pancreatic cancer-induced pain. *Brain, Behavior, and Immunity*, *123*, 1026–1041. https://doi.org/10.1016/J.BBI.2024.11.016
27. Chidambara Murthy, K. N., Shivapriya, M., Monika, P., & Tejashree, B. (2019). Challenges in Optimal Utilization of Bioactive Molecules Clinically. In *Reference Series in Phytochemistry*. https://doi.org/10.1007/978-3-319-78030-6_49
28. Choi, Y. H., Lim, E. J., Kim, S. W., Moon, Y. W., Park, K. S., & An, H. J. (2019). IL-27 enhances IL-15/IL-18-mediated activation of human natural killer cells. *Journal for ImmunoTherapy of Cancer*, *7*(1). https://doi.org/10.1186/s40425-019-0652-7
29. Chopra, I., & Brennan, P. (1998). Molecular action of anti-mycobacterial agents. In *Tubercle and Lung Disease* (Vol. 78, Issue 2). https://doi.org/10.1016/S0962-8479(98)80001-4
30. Coelho, N. R., Pimpão, A. B., Correia, M. J., Rodrigues, T. C., Monteiro, E. C., Morello, J., & Pereira, S. A. (2022). Pharmacological blockage of the AHR-CYP1A1 axis: a call for in vivo evidence. In *Journal of Molecular Medicine* (Vol. 100, Issue 2). https://doi.org/10.1007/s00109-021-02163-2
31. Cohen, K. A., Manson, A. L., Desjardins, C. A., Abeel, T., & Earl, A. M. (2019). Deciphering drug resistance in Mycobacterium tuberculosis using whole-genome sequencing: Progress, promise, and challenges. In *Genome Medicine* (Vol. 11, Issue 1). https://doi.org/10.1186/s13073-019-0660-8
32. Cohen, S. B., Gern, B. H., & Urdahl, K. B. (2022). The Tuberculous Granuloma and Preexisting Immunity. In *Annual Review of Immunology* (Vol. 40). https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-093019-125148
33. Commins, S., Steinke, J. W., & Borish, L. (2008). The extended IL-10 superfamily: IL-10, IL-19, IL-20, IL-22, IL-24, IL-26, IL-28, and IL-29. In *Journal of Allergy and Clinical Immunology* (Vol. 121, Issue 5). https://doi.org/10.1016/j.jaci.2008.02.026
34. Corleis, B., Korbel, D., Wilson, R., Bylund, J., Chee, R., & Schaible, U. E. (2012). Escape of Mycobacterium tuberculosis from oxidative killing by neutrophils. *Cellular Microbiology*, *14*(7). https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2012.01783.x
35. Cronan, M. R. (2022). In the Thick of It: Formation of the Tuberculous Granuloma and Its Effects on Host and Therapeutic Responses. In *Frontiers in Immunology* (Vol. 13). https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.820134
36. Dao, D. N., Sweeney, K., Hsu, T., Gurcha, S. S., Nascimento, I. P., Roshevsky, D., Besra, G. S., Chan, J., Porcelli, S. A., & Jacobs, W. R. (2008). Mycolic acid modification by the mmaA4 gene of M. tuberculosis modulates IL-12 production. *PLoS Pathogens*, *4*(6). https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000081
37. DENIS, M. (1991). Killing of Mycobacterium tuberculosis within human monocytes: activation by cytokines and calcitriol. *Clinical & Experimental Immunology*, *84*(2). https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.1991.tb08149.x

38. Diatlova, A., Linkova, N., Lavrova, A., Zinchenko, Y., Medvedev, D., Krasichkov, A., Polyakova, V., & Yablonskiy, P. (2023). Molecular Markers of Early Immune Response in Tuberculosis: Prospects of Application in Predictive Medicine. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 24, Issue 17). https://doi.org/10.3390/ijms241713261
39. Dmitriev, B. A., Ehlers, S., Rietschel, E. T., & Brennan, P. J. (2000). Molecular mechanics of the mycobacterial cell wall: From horizontal layers to vertical scaffolds. *International Journal of Medical Microbiology*, *290*(3), 251–258. https://doi.org/10.1016/S1438-4221(00)80122-8
40. Du, X., & Low, M. G. (2001). Down-regulation of glycosylphosphatidylinositol-specific phospholipase D induced by lipopolysaccharide and oxidative stress in the murine monocyte-macrophage cell line RAW 264.7. *Infection and Immunity*, *69*(5). https://doi.org/10.1128/IAI.69.5.3214-3223.2001
41. Dünya Sağlık Örgütü. (2012). *Global tuberculosis report 2012. Geneva: World Health Organization; 2012. https://www.who.int/publications/i/item/9789241564502*.
42. Dünya Sağlık Örgütü. (2018). *Global tuberculosis report 2018. Geneva: World Health Organization; 2018. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO. https://www.who.int/tb/publications/global_report/en/*. Global Tuberculosis Report 2018. Geneva: World Health Organization; 2018. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO. Https://Www.Who.Int/Tb/Publications/Global_report/En/.
43. Dünya Sağlık Örgütü. (2019). *Global tuberculosis report 2019. Geneva: World Health Organization; 2019. https://www.who.int/tb/publications/global_report/en/*. Global Tuberculosis Report 2019. Geneva: World Health Organization; 2019. Https://Www.Who.Int/Tb/Publications/Global_report/En/.
44. Dünya Sağlık Örgütü. (2023). *https://www.who.int/teams/global-tuberculosis-programme/tb-reports/global-tuberculosis-report-2023*.
45. Duquette, S. C., Fischer, C. D., Feener, T. D., Muench, G. P., Morck, D. W., Barreda, D. R., Nickerson, J. G., & Buret, A. G. (2014). Anti-inflammatory effects of retinoids and carotenoid derivatives on caspase-3–dependent apoptosis and efferocytosis of bovine neutrophils. *American Journal of Veterinary Research*, *75*(12). https://doi.org/10.2460/ajvr.75.12.1064
46. Dutta, N. K., & Karakousis, P. C. (2017). Mechanisms of Action and Resistance of the Antimycobacterial Agents. In *Antimicrobial Drug Resistance*. https://doi.org/10.1007/978-3-319-46718-4_25
47. Dye, C., Scheele, S., Dolin, P., Pathania, V., & Raviglione, M. C. (1999). Global burden of tuberculosis: Estimated incidence, prevalence, and mortality by country. *Journal of the American Medical Association*, *282*(7). https://doi.org/10.1001/jama.282.7.677
48. Etna, M. P., Giacomini, E., Severa, M., & Coccia, E. M. (2014). Pro-and anti-inflammatory cytokines in tuberculosis: A two-edged sword in TB pathogenesis. In *Seminars in Immunology* (Vol. 26, Issue 6). https://doi.org/10.1016/j.smim.2014.09.011
49. Eum, S. Y., Kong, J. H., Hong, M. S., Lee, Y. J., Kim, J. H., Hwang, S. H., Cho, S. N., Via, L. E., & Barry, C. E. (2010). Neutrophils are the predominant infected phagocytic cells in the airways of patients with active pulmonary TB. *Chest*, *137*(1). https://doi.org/10.1378/chest.09-0903
50. Fallahi-Sichani, M., Marino, S., Flynn, J. L., Linderman, J. J., & Kirschner, D. E. (2013). A Systems Biology Approach for Understanding Granuloma Formation and Function in Tuberculosis. In *Systems Biology of Tuberculosis* (pp. 127–155). Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-4966-9_7
51. Fend, F., Langer, R., Hann von Weyhern, C. W., Schulz, S., & Miethke, T. (2007). Molecular diagnosis of mycobacterial infections. *Verhandlungen Der Deutschen Gesellschaft Für Pathologie*, *91*. https://doi.org/10.1128/9781555817657.ch6
52. Floss, D. M., Moll, J. M., & Scheller, J. (2020). IL-12 and IL-23-Close Relatives with Structural Homologies but Distinct Immunological Functions. In *Cells* (Vol. 9, Issue 10). https://doi.org/10.3390/cells9102184
53. Fordham, I. M., Zimmerman, R. H., Black, B. L., Clevidence, B. M., & Wiley, E. R. (2003). Autumn olive: A potential alternative crop. *Acta Horticulturae*, *626*. https://doi.org/10.17660/actahortic.2003.626.59
54. Fragoulis, A., Biller, K., Fragoulis, S., Lex, D., Uhlig, S., & Reiss, L. K. (2021). Reference gene selection for gene expression analyses in mouse models of acute lung injury. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(15). https://doi.org/10.3390/ijms22157853
55. Fraser, P. D., & Bramley, P. M. (2004). The biosynthesis and nutritional uses of carotenoids. In *Progress in Lipid Research* (Vol. 43, Issue 3). https://doi.org/10.1016/j.plipres.2003.10.002
56. Fratti, R. A., Backer, J. M., Gruenberg, J., Corvera, S., & Deretic, V. (2001). Role of phosphatidylinositol 3-kinase and Rab5 effectors in phagosomal biogenesis and mycobacterial phagosome maturation arrest. *Journal of Cell Biology*, *154*(3). https://doi.org/10.1083/jcb.200106049
57. Gammone, M. A., Riccioni, G., & D'Orazio, N. (2015). Carotenoids: Potential allies of cardiovascular

health? *Food and Nutrition Research*, *59*. https://doi.org/10.3402/fnr.v59.26762
58. Garnier, T., Eiglmeier, K., Camus, J. C., Medina, N., Mansoor, H., Pryor, M., Duthoy, S., Grondin, S., Lacroix, C., Monsempe, C., Simon, S., Harris, B., Atkin, R., Doggett, J., Mayes, R., Keating, L., Wheeler, P. R., Parkhill, J., Barrell, B. G., … Hewinson, R. G. (2003). The complete genome sequence of Mycobacterium bovis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *100*(13). https://doi.org/10.1073/pnas.1130426100
59. Gerster, H. (1997). The potential role of lycopene for human health. In *Journal of the American College of Nutrition* (Vol. 16, Issue 2). https://doi.org/10.1080/07315724.1997.10718661
60. Ginting, B., Mustanir, M., Helwati, H., Desiyana, L. S., Eralisa, E., & Mujahid, R. (2017). ANTIOXIDANT ACTIVITY OF N-HEXANE EXTRACT OF NUTMEG PLANTS FROM SOUTH ACEH PROVINCE. *Jurnal Natural*, *17*(1). https://doi.org/10.24815/jn.v17i1.6969
61. Glassman, C. R., Mathiharan, Y. K., Jude, K. M., Su, L., Panova, O., Lupardus, P. J., Spangler, J. B., Ely, L. K., Thomas, C., Skiniotis, G., & Garcia, K. C. (2021). Structural basis for IL-12 and IL-23 receptor sharing reveals a gateway for shaping actions on T versus NK cells. *Cell*, *184*(4). https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.01.018
62. González, R., Peña, M. A., Torres, N. S., & Torrado, G. (2022). Design, development, and characterization of amorphous rosuvastatin calcium tablets. *PLoS ONE*, *17*(3 March). https://doi.org/10.1371/journal.pone.0265263
63. Gorska-Ciebiada, M., Saryusz-Wolska, M., Borkowska, A., Ciebiada, M., & Loba, J. (2016). Adiponectin, leptin and IL-1 β in elderly diabetic patients with mild cognitive impairment. *Metabolic Brain Disease*, *31*(2). https://doi.org/10.1007/s11011-015-9739-0
64. Gouzy, A., Healy, C., Black, K. A., Rhee, K. Y., & Ehrt, S. (2021). Growth of Mycobacterium tuberculosis at acidic pH depends on lipid assimilation and is accompanied by reduced GAPDH activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *118*(32). https://doi.org/10.1073/pnas.2024571118
65. Gunaseelan, S., Balupillai, A., Govindasamy, K., Ramasamy, K., Muthusamy, G., Shanmugam, M., Thangaiyan, R., Robert, B. M., Nagarajan, R. P., Ponniresan, V. K., & Rathinaraj, P. (2017). Linalool prevents oxidative stress activated protein kinases in single UVB-exposed human skin cells. *PLoS ONE*, *12*(5). https://doi.org/10.1371/journal.pone.0176699
66. Guo, Y., Wen, J., He, A., Qu, C., Peng, Y., Luo, S., & Wang, X. (2023). iNOS contributes to heart failure with preserved ejection fraction through mitochondrial dysfunction and Akt S-nitrosylation. *Journal of Advanced Research*, *43*. https://doi.org/10.1016/j.jare.2022.03.003
67. Harker, J. A., Greene, T. T., Barnett, B. E., Bao, P., Dolgoter, A., & Zuniga, E. I. (2023). IL-6 and IL-27 play both distinct and redundant roles in regulating CD4 T-cell responses during chronic viral infection. *Frontiers in Immunology*, *14*. https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1221562
68. Heifets, L., & Desmond, E. (2004). Clinical Mycobacteriology (Tuberculosis) Laboratory: Services and Methods. In *Tuberculosis and the Tubercle Bacillus*. https://doi.org/10.1128/9781555817657.ch4
69. Ho, R. H., Tirona, R. G., Leake, B. F., Glaeser, H., Lee, W., Lemke, C. J., Wang, Y., & Kim, R. B. (2006). Drug and Bile Acid Transporters in Rosuvastatin Hepatic Uptake: Function, Expression, and Pharmacogenetics. *Gastroenterology*, *130*(6). https://doi.org/10.1053/j.gastro.2006.02.034
70. Hoft, D., & Abate, G. (2016). Immunotherapy for tuberculosis: future prospects. *ImmunoTargets and Therapy*. https://doi.org/10.2147/itt.s81892
71. Horiuchi, T., Mitoma, H., Harashima, S. I., Tsukamoto, H., & Shimoda, T. (2010). Transmembrane TNF-α: Structure, function and interaction with anti-TNF agents. In *Rheumatology* (Vol. 49, Issue 7). https://doi.org/10.1093/rheumatology/keq031
72. Hsu, C. C., Lai, W. L., Chuang, K. C., Lee, M. H., & Tsai, Y. C. (2013). The inhibitory activity of linalool against the filamentous growth and biofilm formation in Candida albicans. *Medical Mycology*, *51*(5). https://doi.org/10.3109/13693786.2012.743051
73. Hu, C., Qiu, Y., Guo, J., Cao, Y., Li, D., & Du, Y. (2023). An Oxygen Supply Strategy for Sonodynamic Therapy in Tuberculous Granuloma Lesions Using a Catalase-Loaded Nanoplatform. *International Journal of Nanomedicine*, *18*. https://doi.org/10.2147/IJN.S430019
74. Iwasaki, K., Zheng, Y. W., Murata, S., Ito, H., Nakayama, K., Kurokawa, T., Sano, N., Nowatari, T., Villareal, M. O., Nagano, Y. N., Isoda, H., Matsui, H., & Ohkohchi, N. (2016). Anticancer effect of linalool via cancer-specific hydroxyl radical generation in human colon cancer. *World Journal of Gastroenterology*, *22*(44). https://doi.org/10.3748/wjg.v22.i44.9765
75. Jagielski, T., Bakuła, Z., Brzostek, A., Minias, A., Law Stachowiak, R., Kalita, J., Napiorkowska, A., Augustynowicz-Kopeć, E., Zaczek, A., Vasiliauskiene, E., Bielecki, J., & Dziadek, J. (2018). Characterization of mutations conferring resistance to rifampin in mycobacterium tuberculosis clinical

strains. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *62*(10). https://doi.org/10.1128/AAC.01093-18
76. Jamieson, F. B., Guthrie, J. L., Neemuchwala, A., Lastovetska, O., Melano, R. G., & Mehaffy, C. (2014). Profiling of rpoB mutations and MICs for rifampin and rifabutin in mycobacterium tuberculosis. *Journal of Clinical Microbiology*, *52*(6). https://doi.org/10.1128/JCM.00691-14
77. Jang, D. I., Lee, A. H., Shin, H. Y., Song, H. R., Park, J. H., Kang, T. B., Lee, S. R., & Yang, S. H. (2021). The role of tumor necrosis factor alpha (Tnf-α) in autoimmune disease and current tnf-α inhibitors in therapeutics. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 22, Issue 5). https://doi.org/10.3390/ijms22052719
78. Jankute, M., Cox, J. A. G., Harrison, J., & Besra, G. S. (2015). Assembly of the Mycobacterial Cell Wall. In *Annual Review of Microbiology* (Vol. 69, Issue 1). https://doi.org/10.1146/annurev-micro-091014-104121
79. Jiang, L. N., Liu, Y. Bin, & Li, B. H. (2019). Lycopene exerts anti-inflammatory effect to inhibit prostate cancer progression. *Asian Journal of Andrology*, *21*(1). https://doi.org/10.4103/aja.aja_70_18
80. Kamatou, G. P. P., & Viljoen, A. M. (2008). Linalool - A review of a biologically active compound of commercial importance. In *Natural Product Communications* (Vol. 3, Issue 7). https://doi.org/10.1177/1934578x0800300727
81. Kapelyukh, Y., Henderson, C. J., Scheer, N., Rode, A., & Wolf, C. R. (2019). Defining the contribution of CYP1A1 and CYP1A2 to drug metabolism using humanized CYP1A1/1A2 and Cyp1a1/Cyp1a2 knockout mice. *Drug Metabolism and Disposition*, *47*(8). https://doi.org/10.1124/dmd.119.087718
82. Katariya, A., Gajera, V., Lambole, V., Shah, D., & Joshi, H. (2021). Review On: Role of Oleic Acid in Various Disease. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*. https://doi.org/10.47583/ijpsrr.2021.v67i02.031
83. Keiser, T. L., & Purdy, G. E. (2017). Killing Mycobacterium tuberculosis In Vitro : What Model Systems Can Teach Us . *Microbiology Spectrum*, *5*(3). https://doi.org/10.1128/microbiolspec.tbtb2-0028-2016
84. Kelkel, M., Schumacher, M., Dicato, M., & Diederich, M. (2011). Antioxidant and anti-proliferative properties of lycopene. *Free Radical Research*, *45*(8). https://doi.org/10.3109/10715762.2011.564168
85. Khachigian, L. M. (2023). The MEK-ERK-Egr-1 axis and its regulation in cardiovascular disease. In *Vascular Pharmacology* (Vol. 153). https://doi.org/10.1016/j.vph.2023.107232
86. Kishore, C. R. P., & Mohan, G. V. K. (2017). Structural identification and estimation of Rosuvastatin calcium related impurities in Rosuvastatin calcium tablet dosage form. *Analytical Chemistry Research*, *12*. https://doi.org/10.1016/j.ancr.2016.11.002
87. Kremer, L., & Besra, G. S. (2004). A Waxy Tale, by Mycobacterium tuberculosis . In *Tuberculosis and the Tubercle Bacillus*. https://doi.org/10.1128/9781555817657.ch19
88. Krupa, A., Fol, M., Dziadek, B. R., Kepka, E., Wojciechowska, D., Brzostek, A., Torzewska, A., Dziadek, J., Baughman, R. P., Griffith, D., & Kurdowska, A. K. (2015). Binding of CXCL8/IL-8 to Mycobacterium tuberculosis Modulates the Innate Immune Response. *Mediators of Inflammation*, *2015*. https://doi.org/10.1155/2015/124762
89. Larosa, M., Zen, M., Gatto, M., Jesus, D., Zanatta, E., Iaccarino, L., Inês, L., & Doria, A. (2019). IL-12 and IL-23/Th17 axis in systemic lupus erythematosus. In *Experimental Biology and Medicine* (Vol. 244, Issue 1). https://doi.org/10.1177/1535370218824547
90. Lee, S.-M., Kim, Y.-H., & Min, J. (2023). Anti-inflammatory effects of yeast-derived vacuoles on LPS-induced murine macrophage activation. *Microbiology Spectrum*, *11*(5). https://doi.org/10.1128/spectrum.01466-23
91. Li, T. tong, Liu, M. ru, & Pei, D. sheng. (2020). Friend or foe, the role of EGR-1 in cancer. In *Medical Oncology* (Vol. 37, Issue 1). https://doi.org/10.1007/s12032-019-1333-6
92. Lin, P. L., & Flynn, J. L. (2010). Understanding Latent Tuberculosis: A Moving Target. *The Journal of Immunology*, *185*(1). https://doi.org/10.4049/jimmunol.0903856
93. Liou, G. Y., & Storz, P. (2010). Reactive oxygen species in cancer. In *Free Radical Research* (Vol. 44, Issue 5). https://doi.org/10.3109/10715761003667554
94. Lopez-Marin, L. M. (2012). Nonprotein structures from mycobacteria: Emerging actors for tuberculosis control. In *Clinical and Developmental Immunology* (Vol. 2012). https://doi.org/10.1155/2012/917860
95. Louw, G. E., Warren, R. M., Gey Van Pittius, N. C., McEvoy, C. R. E., Van Helden, P. D., & Victor, T. C. (2009). A balancing act: Efflux/influx in mycobacterial drug resistance. In *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* (Vol. 53, Issue 8). https://doi.org/10.1128/AAC.01577-08
96. M Cristina, G., Brisse, S., Brosch, R., Fabre, M., Omaïs, B., Marmiesse, M., Supply, P., & Vincent, V. (2005). Ancient origin and gene mosaicism of the progenitor of Mycobacterium tuberculosis. *PLoS Pathogens*, *1*(1). https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0010005
97. Ma, X., Gao, Y., Ren, Z., Dong, H., Zhang, X., & Niu, N. (2024). Study on the role and molecular

mechanism of METTL3-mediated miR-29a-3p in the inflammatory response of spinal tuberculosis. *Tuberculosis*, *148*, 102546. https://doi.org/10.1016/j.tube.2024.102546
98. Ma, Y., Ma, M., Ye, S., Liu, Y., Zhao, X., & Wang, Y. (2023). Association of IL-17 and IL-27 polymorphisms with susceptibility to recurrent pregnancy loss and pre-eclampsia: A systematic review and meta-analysis. *Immunity, Inflammation and Disease*, *11*(10). https://doi.org/10.1002/iid3.1057
99. Madhvi, A., Mishra, H., Chegou, N. N., Mkhonza, M. N., Ndou, S., Tromp, G., & Baker, B. (2022). Comparison of Cytokines Expression from Human Monocyte-Derived Macrophages Infected with Different Species of Mycobacteria. *Journal of Interferon and Cytokine Research*, *42*(4). https://doi.org/10.1089/jir.2021.0216
100. Maeda, H., Yamazaki, M., & Katagata, Y. (2012). Kuromoji (Lindera umbellata) essential oil-induced apoptosis and differentiation in human leukemia HL-60 cells. *Experimental and Therapeutic Medicine*, *3*(1). https://doi.org/10.3892/etm.2011.357
101. Martin, P. D., Dane, A. L., Nwose, O. M., Schneck, D. W., & Warwick, M. J. (2002). No effect of age or gender on the pharmacokinetics of rosuvastatin: A new HMG-CoA reductase inhibitor. *Journal of Clinical Pharmacology*, *42*(10). https://doi.org/10.1177/009127002401382722
102. Masola, V., Carraro, A., Granata, S., Signorini, L., Bellin, G., Violi, P., Lupo, A., Tedeschi, U., Onisto, M., Gambaro, G., & Zaza, G. (2019). In vitro effects of interleukin (IL)-1 beta inhibition on the epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) of renal tubular and hepatic stellate cells. *Journal of Translational Medicine*, *17*(1). https://doi.org/10.1186/s12967-019-1770-1
103. Mcnabe, M., Tennant, R., Danelishvili, L., Young, L., & Bermudez, L. E. (2011). Mycobacterium avium ssp. hominissuis biofilm is composed of distinct phenotypes and influenced by the presence of antimicrobials. *Clinical Microbiology and Infection*, *17*(5). https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2010.03307.x
104. Minnikin, D. E., Lee, O. Y. C., Wu, H. H. T., Besra, G. S., Bhatt, A., Nataraj, V., Rothschild, B. M., Spigelman, M., & Donoghue, H. D. (2015). Ancient mycobacterial lipids: Key reference biomarkers in charting the evolution of tuberculosis. *Tuberculosis*, *95*(S1). https://doi.org/10.1016/j.tube.2015.02.009
105. Mohammad Fallahi-Sichani, S. M. J. L. F. J. J. L. and D. E. K. (2013). A Systems Biology Approach for Understanding Granuloma Formation and Function in Tuberculosis. In *Systems Biology of Tuberculosis*.
106. Mondal, S., Kundu, M., Jana, M., Roy, A., Rangasamy, S. B., Modi, K. K., Wallace, J., Albalawi, Y. A., Balabanov, R., & Pahan, K. (2020). IL-12 p40 monomer is different from other IL-12 family members to selectively inhibit IL-12Rβ1 internalization and suppress EAE. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *117*(35). https://doi.org/10.1073/pnas.2000653117
107. Mourdikoudis, S., Menelaou, M., Fiuza-Maneiro, N., Zheng, G., Wei, S., Pérez-Juste, J., Polavarapu, L., & Sofer, Z. (2022). Oleic acid/oleylamine ligand pair: a versatile combination in the synthesis of colloidal nanoparticles. In *Nanoscale Horizons* (Vol. 7, Issue 9). https://doi.org/10.1039/d2nh00111j
108. Nahid, P., Mase, S. R., Migliori, G. B., Sotgiu, G., Bothamley, G. H., Brozek, J. L., Cattamanchi, A., Peter Cegielski, J., Chen, L., Daley, C. L., Dalton, T. L., Duarte, R., Fregonese, F., Robert Horsburgh, C., Khan, F. A., Kheir, F., Lan, Z., Lardizabal, A., Lauzardo, M., … Ann Raftery, R. N. (2019). Treatment of drug-resistant tuberculosis an official ATS/CDC/ERS/IDSA clinical practice guideline. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, *200*(10). https://doi.org/10.1164/rccm.201909-1874ST
109. Napolitano, M., De Pascale, C., Wheeler-Jones, C., Botham, K. M., & Bravo, E. (2007). Effects of lycopene on the induction of foam cell formation by modified LDL. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*, *293*(6). https://doi.org/10.1152/ajpendo.00315.2007
110. Nazir, S., Iqbal, Z., Shah, Y., Ahmad, L., & Khan, A. (2015). Pharmacokinetic study of rosuvastatin in males and females. *European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, *40*(3). https://doi.org/10.1007/s13318-014-0211-z
111. Ojha, A. K., Baughn, A. D., Sambandan, D., Hsu, T., Trivelli, X., Guerardel, Y., Alahari, A., Kremer, L., Jacobs, W. R., & Hatfull, G. F. (2008). Growth of Mycobacterium tuberculosis biofilms containing free mycolic acids and harbouring drug-tolerant bacteria. *Molecular Microbiology*, *69*(1). https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2008.06274.x
112. Orme, I. M., & Basaraba, R. J. (2014). The formation of the granuloma in tuberculosis infection. In *Seminars in Immunology* (Vol. 26, Issue 6). https://doi.org/10.1016/j.smim.2014.09.009
113. Osakabe, N., Takano, H., Sanbongi, C., Yasuda, A., Yanagisawa, R., Inoue, K. I., & Yoshikawa, T. (2004). Anti-inflammatory and anti-allergic effect of rosmarinic acid (RA); Inhibition of seasonal allergic rhinoconjunctivitis (SAR) and its mechanism. *BioFactors*, *21*(1–4). https://doi.org/10.1002/biof.552210125
114. Ottavi, S., Scarry, S. M., Mosior, J., Ling, Y., Roberts, J., Singh, A., Zhang, D., Goullieux, L., Roubert, C., Bacqué, E., Lagiakos, H. R., Vendome, J., Moraca, F., Li, K., Perkowski, A. J., Ramesh, R., Bowler,

M. M., Tracy, W., Feher, V. A., … Aubé, J. (2022). In Vitro and in Vivo Inhibition of the Mycobacterium tuberculosis Phosphopantetheinyl Transferase PptT by Amidinoureas. *Journal of Medicinal Chemistry*, *65*(3). https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.1c01565

115. Ottenhoff, T. H. M. (2012). The knowns and unknowns of the immunopathogenesis of tuberculosis. In *International Journal of Tuberculosis and Lung Disease* (Vol. 16, Issue 11). https://doi.org/10.5588/ijtld.12.0479
116. Ouyang, W., & O'Garra, A. (2019). IL-10 Family Cytokines IL-10 and IL-22: from Basic Science to Clinical Translation. In *Immunity* (Vol. 50, Issue 4). https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.03.020
117. Özgöçmen, M., & Azırak, S. (2023). RİFAMPİSİN KAYNAKLI BEYİN DOKUSU HASARINDA LİNALOOL'UN İYİLEŞTİRİCİ RÖLÜ. *SDÜ Tıp Fakültesi Dergisi*, *30*(3), 362–370. https://doi.org/10.17343/sdutfd.1282668
118. Pal, P. P., Lakshmi Soukya, P. S., Gupta, S., Araya, H., Fujimoto, Y., & Begum, A. S. (2024). Computational analysis followed by in vitro studies to explore cytokines (<scp>TNF</scp> -α, <scp>IL</scp> -6 and <scp>IL</scp> -1β) inhibition potential of the new natural molecule polonilignan. *Chemical Biology & Drug Design*, *103*(3). https://doi.org/10.1111/cbdd.14486
119. Palozza, P., Parrone, N., Simone, R. E., & Catalano, A. (2010). Lycopene in atherosclerosis prevention: An integrated scheme of the potential mechanisms of action from cell culture studies. In *Archives of Biochemistry and Biophysics* (Vol. 504, Issue 1). https://doi.org/10.1016/j.abb.2010.06.031
120. Pan, P. K., Wu, T. M., Tsai, H. Y., Cho, I. C., Tseng, H. W., Lin, T. Du, Nan, F. H., & Wu, Y. S. (2022). Acid external and internal environment exchange the Oreochromis niloticus tissue immune gene expression compared to the mouse macrophage polarization model. *Frontiers in Immunology*, *13*. https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.1012078
121. Pang, Z., & Lin, T. J. (2023). Mice with double knockout of Egr-1 and RCAN1 exhibit reduced inflammation during Pseudomonas aeruginosa lung infection. *Immunobiology*, *228*(3). https://doi.org/10.1016/j.imbio.2023.152377
122. Paramita Pal, P., Sajeli Begum, A., Ameer Basha, S., Araya, H., & Fujimoto, Y. (2023). New natural pro-inflammatory cytokines (TNF-α, IL-6 and IL-1β) and iNOS inhibitors identified from Penicillium polonicum through in vitro and in vivo studies. *International Immunopharmacology*, *117*, 109940. https://doi.org/10.1016/J.INTIMP.2023.109940
123. Pereira, I., Severino, P., Santos, A. C., Silva, A. M., & Souto, E. B. (2018). Linalool bioactive properties and potential applicability in drug delivery systems. In *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* (Vol. 171). https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2018.08.001
124. Pereira, I., Zielińska, A., Ferreira, N. R., Silva, A. M., & Souto, E. B. (2018). Optimization of linalool-loaded solid lipid nanoparticles using experimental factorial design and long-term stability studies with a new centrifugal sedimentation method. *International Journal of Pharmaceutics*, *549*(1–2). https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2018.07.068
125. Pietro, D., Tomo, D. Di, & Pandolfi, P. (2016). Carotenoids in Cardiovascular Disease Prevention. In *JSM Atheroscler* (Vol. 1, Issue 1).
126. Porro, C., Cianciulli, A., & Panaro, M. A. (2020). The regulatory role of IL-10 in neurodegenerative diseases. In *Biomolecules* (Vol. 10, Issue 7). https://doi.org/10.3390/biom10071017
127. Przybyła, G. W., Szychowski, K. A., & Gmiński, J. (2021). Paracetamol – An old drug with new mechanisms of action. In *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* (Vol. 48, Issue 1). https://doi.org/10.1111/1440-1681.13392
128. Przybylska, S. (2020). Lycopene – a bioactive carotenoid offering multiple health benefits: a review. In *International Journal of Food Science and Technology* (Vol. 55, Issue 1). https://doi.org/10.1111/ijfs.14260
129. Quintans-Júnior, L. J., Barreto, R. S. S., Menezes, P. P., Almeida, J. R. G. S., Viana, A. F. S. C., Oliveira, R. C. M., Oliveira, A. P., Gelain, D. P., de Lucca Júnior, W., & Araújo, A. A. S. (2013). β-Cyclodextrin-complexed (-)-linalool produces antinociceptive effect superior to that of (-)-linalool in experimental pain protocols. *Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology*, *113*(3). https://doi.org/10.1111/bcpt.12087
130. Rao, A. V., & Rao, L. G. (2007). Carotenoids and human health. In *Pharmacological Research* (Vol. 55, Issue 3). https://doi.org/10.1016/j.phrs.2007.01.012
131. Ren, Q., Tao, S., Guo, F., Wang, B., Yang, L., Ma, L., & Fu, P. (2021). Natural flavonol fisetin attenuated hyperuricemic nephropathy via inhibiting IL-6/JAK2/STAT3 and TGF-β/SMAD3 signaling. *Phytomedicine*, *87*. https://doi.org/10.1016/j.phymed.2021.153552
132. Rieder, H. L. (2001). Risk of travel-associated tuberculosis. In *Clinical Infectious Diseases* (Vol. 33, Issue 8). https://doi.org/10.1086/323127
133. Rodenak-Kladniew, B., Islan, G. A., de Bravo, M. G., Durán, N., & Castro, G. R. (2017). Design,

characterization and in vitro evaluation of linalool-loaded solid lipid nanoparticles as potent tool in cancer therapy. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, *154*. https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2017.03.021
134. Rodriguez-Amaya, D. B. (2016). Natural food pigments and colorants. In *Current Opinion in Food Science* (Vol. 7). https://doi.org/10.1016/j.cofs.2015.08.004
135. Roh, H., Son, H., Lee, D., Chang, H., Yun, C., & Park, K. (2014). Pharmacokinetic interaction between rosuvastatin and olmesartan: A randomized, open-label, 3-period, multiple-dose crossover study in healthy Korean male subjects. *Clinical Therapeutics*, *36*(8). https://doi.org/10.1016/j.clinthera.2014.06.022
136. Romanowska-Próchnicka, K., Felis-Giemza, A., Olesińska, M., Wojdasiewicz, P., Paradowska-Gorycka, A., & Szukiewicz, D. (2021). The role of tnf-α and anti-tnf-α agents during preconception, pregnancy, and breastfeeding. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 22, Issue 6). https://doi.org/10.3390/ijms22062922
137. Roy, C., Singh, R. S., Yadav, A., Kumar, S., & Kumari, M. (2017). Secondary metabolites: Evolutionary perspective, in vitro production, and technological advances. In *Plant Secondary Metabolites: Volume II: Stimulation, Extraction, and Utilization*. https://doi.org/10.1201/9781315366319-2
138. Russell, D. G., Barry, C. E., & Flynn, J. L. (2010). Tuberculosis: What we don't know can, and does, hurt us. In *Science* (Vol. 328, Issue 5980). https://doi.org/10.1126/science.1184784
139. Sada-Ovalle, I., Chávez-Galán, L., Vasquez, L., Aldriguetti, S., Rosas-Perez, I., Ramiréz-Venegas, A., Perez-Padilla, R., & Torre-Bouscoulet, L. (2018). Macrophage exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons from wood smoke reduces the ability to control growth of mycobacterium tuberculosis. *Frontiers in Medicine*, *5*(NOV). https://doi.org/10.3389/fmed.2018.00309
140. Sánchez-Siles, M., Pelegrín-Hernández, J. P., Hellin-Meseguer, D., Guerrero-Sánchez, Y., Corno-Caparrós, A., Cabezas-Herrera, J., Pastor-Quirante, F., Fernández-Ruiz, J. A., Aliaga-Sánchez, A., Lucero-Berdugo, M., & Camacho-Alonso, F. (2020). Genotype of null polymorphisms in genes GSTM1, GSTT1, CYP1A1, and CYP1A1*2A (RS4646903 T>C)/CYP1A1*2C (RS1048943 A>G) in patients with larynx cancer in Southeast Spain. *Cancers*, *12*(9). https://doi.org/10.3390/cancers12092478
141. Sandei, L. (2018). Lycopene and Tomatoes. In *Lycopene and Tomatoes in Human Nutrition and Health*. https://doi.org/10.1201/9781351110877-9
142. Santa-María, C., López-Enríquez, S., Montserrat-de la Paz, S., Geniz, I., Reyes-Quiroz, M. E., Moreno, M., Palomares, F., Sobrino, F., & Alba, G. (2023). Update on Anti-Inflammatory Molecular Mechanisms Induced by Oleic Acid. In *Nutrients* (Vol. 15, Issue 1). https://doi.org/10.3390/nu15010224
143. Scriba, T. J., Coussens, A. K., & Fletcher, H. A. (2017). Human ImmScriba, T. J., Coussens, A. K., & Fletcher, H. A. (2017). Human Immunology of Tuberculosis. https://doi.org/10.1128/microbiolspec.TBTB2-0016-2016unology of Tuberculosis. *Microbiol Spectr*, *5*(1).
144. Shah, A., Jain, R., & Brockmann, A. (2018). Egr-1: A candidate transcription factor involved in molecular processes underlying time-memory. *Frontiers in Psychology*, *9*(JUN). https://doi.org/10.3389/fpsyg.2018.00865
145. Shah, S. A., Reagan, C. E., Bresticker, J. E., Wolpe, A. G., Good, M. E., Macal, E. H., Billcheck, H. O., Bradley, L. A., French, B. A., Isakson, B. E., Wolf, M. J., & Epstein, F. H. (2023). Obesity-Induced Coronary Microvascular Disease Is Prevented by iNOS Deletion and Reversed by iNOS Inhibition. *JACC: Basic to Translational Science*, *8*(5). https://doi.org/10.1016/j.jacbts.2022.11.005
146. Shaler, C. R., Horvath, C., Lai, R., & Xing, Z. (2012). Understanding delayed T-cell priming, lung recruitment, and airway luminal T-cell responses in host defense against pulmonary tuberculosis. In *Clinical and Developmental Immunology* (Vol. 2012). https://doi.org/10.1155/2012/628293
147. Shi, S., Blumenthal, A., Hickey, C. M., Gandotra, S., Levy, D., & Ehrt, S. (2005). Expression of Many Immunologically Important Genes in *Mycobacterium tuberculosis* -Infected Macrophages Is Independent of Both TLR2 and TLR4 but Dependent on IFN-αβ Receptor and STAT1. *The Journal of Immunology*, *175*(5), 3318–3328. https://doi.org/10.4049/jimmunol.175.5.3318
148. Silvério, D., Gonçalves, R., Appelberg, R., & Saraiva, M. (2021). Advances on the Role and Applications of Interleukin-1 in Tuberculosis. *MBio*, *12*(6). https://doi.org/10.1128/mBio.03134-21
149. Simmons, J. D., Stein, C. M., Seshadri, C., Campo, M., Alter, G., Fortune, S., Schurr, E., Wallis, R. S., Churchyard, G., Mayanja-Kizza, H., Boom, W. H., & Hawn, T. R. (2018). Immunological mechanisms of human resistance to persistent Mycobacterium tuberculosis infection. In *Nature Reviews Immunology* (Vol. 18, Issue 9). https://doi.org/10.1038/s41577-018-0025-3
150. Simonson, S. G., Raza, A., Martin, P. D., Mitchell, P. D., Jarcho, J. A., Brown, C. D. A., Windass, A. S., & Schneck, D. W. (2004). Rosuvastatin pharmacokinetics in heart transplant recipients administered an antirejection regimen including cyclosporine. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, *76*(2).

https://doi.org/10.1016/j.clpt.2004.03.010
151. Singh, J., Walia, M., & Harikumar, S. L. (2014). FORMULATION AND EVALUATION OF FAST DISSOLVING TABLETS OF ROSUVASTATIN: RESEARCH ARTICLE. *Journal of Drug Delivery and Therapeutics*, *4*(5). https://doi.org/10.22270/jddt.v4i5.947
152. Smith, I., Bishai, W. R., & Nagaraja, V. (2004). Control of Mycobacterial Transcription. In *Tuberculosis and the Tubercle Bacillus*. https://doi.org/10.1128/9781555817657.ch15
153. Son, M., Kim, Y., Lee, D., Roh, H., Son, H., Guk, J., Jang, S. B., Nam, S. Y., & Park, K. (2014). Pharmacokinetic interaction between rosuvastatin and telmisartan in healthy Korean male volunteers: A randomized, open-label, two-period, crossover, multiple-dose study. *Clinical Therapeutics*, *36*(8). https://doi.org/10.1016/j.clinthera.2014.06.007
154. Song, F., Wu, Y., Lin, X., Xue, D., & Wang, Y. (2022). Vitamin C inhibits apoptosis in THP-1 cells in response to incubation with Mycobacterium tuberculosis. *Experimental and Therapeutic Medicine*, *24*(6), 717. https://doi.org/10.3892/etm.2022.11653
155. Sotnikova, R., Okruhlicova, L., Vlkovicova, J., Navarova, J., Gajdacova, B., Pivackova, L., Fialova, S., & Krenek, P. (2013). Rosmarinic acid administration attenuates diabetes-induced vascular dysfunction of the rat aorta. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, *65*(5). https://doi.org/10.1111/jphp.12037
156. Sreevatsan, S., Pan, X., Zhang, Y., Deretic, V., & Musser, J. M. (1997). Analysis of the oxyR-ahpC region in isoniazid-resistant and - susceptible Mycobacterium tuberculosis complex organisms recovered from diseased humans and animals in diverse localities. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *41*(3). https://doi.org/10.1128/aac.41.3.600
157. Stahl, W., & Sies, H. (2003). Antioxidant activity of carotenoids. In *Molecular Aspects of Medicine* (Vol. 24, Issue 6). https://doi.org/10.1016/S0098-2997(03)00030-X
158. Stanley, E. C., Mole, R. J., Smith, R. J., Glenn, S. M., Barer, M. R., McGowan, M., & Rees, C. E. D. (2007). Development of a new, combined rapid method using phage and PCR for detection and identification of viable Mycobacterium paratuberculosis bacteria within 48 hours. *Applied and Environmental Microbiology*, *73*(6). https://doi.org/10.1128/AEM.01722-06
159. Swain, S. S., Sharma, D., Hussain, T., & Pati, S. (2020). Molecular mechanisms of underlying genetic factors and associated mutations for drug resistance in Mycobacterium tuberculosis. In *Emerging Microbes and Infections* (Vol. 9, Issue 1). https://doi.org/10.1080/22221751.2020.1785334
160. Ting, L., Feng, Y., Zhou, Y., Tong, Z., & Dong, Z. (2023). IL-27 induces autophagy through regulation of the DNMT1/lncRNA MEG3/ERK/p38 axis to reduce pulmonary fibrosis. *Respiratory Research*, *24*(1). https://doi.org/10.1186/s12931-023-02373-x
161. Tohidi, B., Rahimmalek, M., & Arzani, A. (2017). Essential oil composition, total phenolic, flavonoid contents, and antioxidant activity of Thymus species collected from different regions of Iran. *Food Chemistry*, *220*. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.09.203
162. Trabelsi, F., Bartůněk, A., Vlavonou, R., Navrátilová, L., Dubé, C., Tanguay, M., & Hauser, T. (2012). Single-dose, 2-way crossover, bioequivalence study of two rosuvastatin formulations in normal healthy subjects under fasting conditions. *International Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics*, *50*(10). https://doi.org/10.5414/CP201687
163. Tudor, D. V., Bâldea, I., Lupu, M., Kacso, T., Kutasi, E., Hopârtean, A., Stretea, R., & Filip, A. G. (2020). COX-2 as a potential biomarker and therapeutic target in melanoma. In *Cancer Biology and Medicine* (Vol. 17, Issue 1). https://doi.org/10.20892/j.issn.2095-3941.2019.0339
164. Tzeng, T. Bin, Schneck, D. W., Birmingham, B. K., Mitchell, P. D., Zhang, H., Martin, P. D., & Kung, L. P. (2008). Population pharmacokinetics of rosuvastatin: Implications of renal impairment, race and dyslipidaemia. *Current Medical Research and Opinion*, *24*(9). https://doi.org/10.1185/03007990802312807
165. Vallejo, M. J., Salazar, L., & Grijalva, M. (2017). Oxidative stress modulation and ROS-mediated toxicity in cancer: A review on in vitro models for plant-derived compounds. In *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* (Vol. 2017). https://doi.org/10.1155/2017/4586068
166. Van Zyl, R. L., Seatlholo, S. T., Van Vuuren, S. F., & Viljoen, A. M. (2006). The biological activities of 20 nature identical essential oil constituents. *Journal of Essential Oil Research*, *18*(SPEC. ISS.). https://doi.org/10.1080/10412905.2006.12067134
167. Vanini, F., Kashfi, K., & Nath, N. (2015). The dual role of iNOS in cancer. In *Redox Biology* (Vol. 6). https://doi.org/10.1016/j.redox.2015.08.009
168. Verpoorte, R., & Memelink, J. (2002). Engineering secondary metabolite production in plants. In *Current Opinion in Biotechnology* (Vol. 13, Issue 2). https://doi.org/10.1016/S0958-1669(02)00308-7
169. Vivekananthan, D. P., Penn, M. S., Sapp, S. K., Hsu, A., & Topol, E. J. (2003). Use of antioxidant vitamins for the prevention of cardiovascular disease: Meta-analysis of randomised trials. *Lancet*, *361*(9374).

https://doi.org/10.1016/S0140-6736(03)13637-9
170. Wang, W.-T., Zhang, Y.-Y., Li, Z.-R., Li, J.-M., Deng, H.-S., Li, Y.-Y., Yang, H.-Y., Lau, C. C., Yao, Y.-J., Pan, H.-D., Liu, L., Xie, Y., & Zhou, H. (2024). Syringic acid attenuates acute lung injury by modulating macrophage polarization in LPS-induced mice. *Phytomedicine*, *129*, 155591. https://doi.org/10.1016/j.phymed.2024.155591
171. Wang, X., Chen, J., & Zheng, J. (2023). The roles of COX-2 in protozoan infection. In *Frontiers in Immunology* (Vol. 14). https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.955616
172. Wang, X. Y., Luo, T., Chen, Z. H., Liao, W., Wang, Y., & Bao, L. (2022). Effect of Mycobacterium tuberculosishigBA on Bacterial Stress Response and Intracellular Infection and Immunity. *Sichuan Da Xue Xue Bao. Yi Xue Ban = Journal of Sichuan University. Medical Science Edition*, *53*(5). https://doi.org/10.12182/20220960209
173. Wang, Z., Tao, H., Chu, M., Yu, L., Yang, P., Wang, Q., Lu, J., Yang, H., Wang, Z., Zhang, H., & Geng, D. (2024). Byakangelicol suppresses TiPs-stimulated osteoclastogenesis and bone destruction via COX-2/NF-κB signaling pathway. *Regenerative Biomaterials*, *11*. https://doi.org/10.1093/rb/rbad092
174. Wei, H. X., Wang, B., & Li, B. (2020). IL-10 and IL-22 in Mucosal Immunity: Driving Protection and Pathology. In *Frontiers in Immunology* (Vol. 11). https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01315
175. Wu, J., Xie, S., Li, H., Zhang, Y., Yue, J., Yan, C., Liu, K., Liu, Y., Xu, R., & Zheng, G. (2021). Antitumor effect of IL-12 gene-modified bone marrow mesenchymal stem cells combined with Fuzheng Yiliu decoction in an in vivo glioma nude mouse model. *Journal of Translational Medicine*, *19*(1). https://doi.org/10.1186/s12967-021-02809-2
176. XIE, B. xing, WEI, J. jing, ZHANG, Y. ting, SONG, S. wei, SU, W., SUN, G. wen, HAO, Y. wei, & LIU, H. cheng. (2019). Supplemental blue and red light promote lycopene synthesis in tomato fruits. *Journal of Integrative Agriculture*, *18*(3). https://doi.org/10.1016/S2095-3119(18)62062-3
177. Xu, P., Wang, K., Lu, C., Dong, L., Gao, L., Yan, M., Aibai, S., Yang, Y., & Liu, X. (2017a). Protective effects of linalool against amyloid beta-induced cognitive deficits and damages in mice. *Life Sciences*, *174*. https://doi.org/10.1016/j.lfs.2017.02.010
178. Xu, P., Wang, K., Lu, C., Dong, L., Gao, L., Yan, M., Aibai, S., Yang, Y., & Liu, X. (2017b). The Protective Effect of Lavender Essential Oil and Its Main Component Linalool against the Cognitive Deficits Induced by D-Galactose and Aluminum Trichloride in Mice. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, *2017*. https://doi.org/10.1155/2017/7426538
179. Yang, Q., Zhou, Y., Farooq, W., Liu, Q., Duan, J., Xing, L., Wu, C., & Dong, L. (2025). The immunomodulatory effects of Mesenchymal stem cells on THP-1-derived macrophages against Mycobacterium tuberculosis H37Ra infection. *Tuberculosis*, *150*, 102593. https://doi.org/10.1016/j.tube.2024.102593
180. Yang, Z., Wang, J., Pi, J., Hu, D., Xu, J., Zhao, Y., & Wang, Y. (2024). Identification and Validation of Genes Related to Macrophage Polarization and Cell Death Modes Under Mycobacterium tuberculosis Infection. *Journal of Inflammation Research*, *Volume 17*, 1397–1411. https://doi.org/10.2147/JIR.S448372
181. Ye, W., Chen, R., Chen, X., Huang, B., Lin, R., Xie, X., Chen, J., Jiang, J., Deng, Y., & Wen, J. (2019). AhR regulates the expression of human cytochrome P450 1A1 (CYP1A1) by recruiting Sp1. *FEBS Journal*, *286*(21). https://doi.org/10.1111/febs.14956
182. Zhang, B., Xiang, L., Chen, J., Zhang, J., Dong, R., Mo, G., & Wu, F. (2024). GRN Activates TNFR2 to Promote Macrophage M2 Polarization Aggravating Mycobacterium Tuberculosis Infection. *Frontiers in Bioscience-Landmark*, *29*(9). https://doi.org/10.31083/j.fbl2909332
183. Zhang, L., Yang, Z., Wu, F., Ge, Q., Zhang, Y., Li, D., Gao, M., & Liu, X. (2024). Multiple cytokine analysis based on QuantiFERON-TB gold plus in different tuberculosis infection status: an exploratory study. *BMC Infectious Diseases*, *24*(1), 28. https://doi.org/10.1186/s12879-023-08943-0
184. Zheng, X. H., Liu, C. P., Hao, Z. G., Wang, Y. F., & Li, X. L. (2017). Protective effect and mechanistic evaluation of linalool against acute myocardial ischemia and reperfusion injury in rats. *RSC Advances*, *7*(55). https://doi.org/10.1039/c7ra00743d
185. Zhou, C., Gao, W., Lu, G., Ding, J., Wu, X., Huang, X., Chen, J., Liu, M., Jiang, J., & Wu, H. (2013). Preparation, characterization and in vitro release of microparticles based on dextran-rosuvastatin conjugate. *Carbohydrate Polymers*, *96*(1). https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.03.094
186. Zuber, B., Chami, M., Houssin, C., Dubochet, J., Griffiths, G., & Daffé, M. (2008). Direct visualization of the outer membrane of mycobacteria and corynebacteria in their native state. *Journal of Bacteriology*, *190*(16). https://doi.org/10.1128/JB.01919-07