

# Myrtus communis L. Esansiyel Yağının IL-1 $\beta$ ile Uyarılmış İnsan Bronşiyal Epitel Hücre Hattında Antiinflamatuvar Etkilerinin Araştırılması: Deneysel Çalışma

## Investigation of Anti-Inflammatory Effects of Myrtus Communis L. Essential Oil on IL-1 $\beta$ Induced Human Bronchial Epithelial Cell Line: Experimental Study

<sup>id</sup> Gülşay GÜLBOL DURAN<sup>a,b</sup>, <sup>id</sup> Menderes Yusuf TERZİ<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup>Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji ABD, Hatay, TÜRKİYE

<sup>b</sup>Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Biyokimya ve Genetik ABD, Hatay, TÜRKİYE

**ÖZET Amaç:** İnflamasyon, bağışıklık sisteminin enfeksiyona, yaralanmaya veya tahrişe ilk biyolojik tepkisi olmakla birlikte kontrol edilemediğinde otoinflamatuvar ve nörodegeneratif hastalıklara veya kansere neden olabilir. *Myrtus communis* L. (MC) Akdeniz bölgesinde yetişen, çokça farmakolojik aktivitesi olan aromatik bir bitkidir. Bu çalışmada, halk arasında sıklıkla kullanılan MC esansiyel yağının antiinflamatuvar etkisini araştırmayı amaçladık. **Gereç ve Yöntemler:** Sağlıklı insan bronşiyal epitel hücre hattı (BEAS-2B) ile hücre kültürü çalışmaları yapıldı. Hücreler; kontrol, interleukin-1 beta (IL-1 $\beta$ ) ile inflamatuvar hâle getirilen BEAS-2B hücreleri ve MC uygulanan inflamatuvar BEAS-2B hücreleri olmak üzere 3 farklı gruba ayrıldı. MC'nin sitotoksik olmayan konsantrasyonları MTT testi ile belirlendi. IL-6, IL-10, uyarılabilir sitrik oksit sentaz [inducible nitric oxide synthase (iNOS)], tümör nekrozis faktör alfa (TNF- $\alpha$ ), siklooksijenaz-2 [cyclooxygenase-2 (COX-2)] ve nükleer faktör kapp B (NF $\kappa$ B) genlerinin ekspresyon düzeyleri revers transkriptaz-kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu ile saptandı. IL-6, IL-10, iNOS ve TNF- $\alpha$  protein düzeyleri ELISA ile ölçüldü. **Bulgular:** IL-1 $\beta$  ile uyarılmış inflamatuvar hücrelerde artan IL-6, IL-10 ve NF $\kappa$ B mRNA düzeyleri, MC yağı uygulama sonrası anlamlı derecede azalarak bazal seviyelere dönmüştür. IL-6 ve IL-10 protein düzeyleri gen ekspresyon verileriyle uyumlu olarak inflamatuvar hâle getirilen grupta artmış olarak saptandı. MC uygulaması inflamatuvar hücrelerdeki artan protein düzeylerini kontrol gurubundaki bazal seviyeye döndürdü. **Sonuç:** Çalışmamızda, MC esansiyel yağının BEAS-2B hücrelerinde proinflamatuvar sitokinlerin ekspresyonunu inhibe ederek, antiinflamatuvar etkiye sahip olduğunu gösterdik. MC esansiyel yağının güçlü bir antiinflamatuvar etkiye sahip potansiyel bir terapötik ajan olarak değerlendirilmesi için farklı konsantrasyonlarla daha fazla araştırma yapılmalıdır.

**ABSTRACT Objective:** Inflammation is the primary biological response of immune system against infection, injury, and irritation, but when it is not curbed, it can lead to autoimmune and neurodegenerative diseases or cancer. *Myrtus communis* L. (MC) is an aromatic plant raised in the region of Mediterranean Sea and bearing several pharmacological activities. We aimed in this study to investigate anti-inflammatory effects of MC essential oil that is often utilized by the local population. **Material and Methods:** Cell culture experiments were conducted with healthy bronchial epithelial lung cell line (BEAS-2B). The cells were grouped in three as follows; non-treated control, interleukin-1 beta (IL-1 $\beta$ ) induced inflammatory cells, and MC-treated inflammatory cells. Non-cytotoxic concentrations of MC were determined with MTT assay. The gene expression levels of IL-6, IL-10, inducible nitric oxide synthase (iNOS), tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ), cyclooxygenase-2 (COX-2), and nuclear factor kapp b (NF $\kappa$ B) were analyzed with reverse transcriptase-quantitative polymerase chain reaction. The protein levels of IL-6, IL-10, iNOS, and TNF- $\alpha$  were detected with ELISA. **Results:** The elevated mRNA levels of IL-6, IL-10, and NF $\kappa$ B in IL-1 $\beta$ -induced inflammatory cells significantly reduced back to the basal levels after MC treatment. In line with the mRNA levels, the protein levels of IL-6 and IL-10 significantly increased in inflammatory cells. MC treatment reversed this increase in protein levels to the baseline as in the control group. **Conclusion:** We demonstrated in our study the anti-inflammatory effects of MC essential oil on BEAS-2B cells by inhibiting the expression of pro-inflammatory cytokines. To be able suggest MC essential oil as a potential therapeutic agent with a strong anti-inflammatory action, further studies testing several concentrations are warranted.

**Anahtar Kelimeler:** *Myrtus communis* L.; antiinflamatuvar; BEAS-2B; RT-qPCR; ELISA

**Keywords:** *Myrtus communis* L.; anti-inflammatory; BEAS-2B; RT-qPCR; ELISA

**Correspondence:** Gülşay GÜLBOL DURAN

Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji ABD, Hatay, TÜRKİYE/TURKEY

**E-mail:** gulayduran@gmail.com



Peer review under responsibility of Türkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences.

**Received:** 25 Jan 2021

**Received in revised form:** 19 Aug 2021

**Accepted:** 01 Sep 2021

**Available online:** 07 Sep 2021

2146-9040 / Copyright © 2021 by Türkiye Klinikleri. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

İnflamasyon, vücudun enfeksiyona karşı doğuştan gelen ve uyarlanabilir bağışıklık sistemlerini içeren doğal bir biyolojik tepkisidir. Doku hasarı, patojen istilası ve tahriş edici maddeler gibi uyarılara karşı ortaya çıkar.<sup>1-3</sup> İnflamasyon çoklu bir süreç olup, hem doğal hem uyarlanabilir immün hücrelerince modüle edilmektedir. Bu sürece dâhil olan hücreler, proinflatuar sitokinlerin ve diğer inflammatuar mediyatörlerin üretiminden ve modüle edilmesinden sorumludurlar. İnflamasyonda proinflatuar ve antiinflatuar sitokinlerin kombine etkileri görülmektedir. İnterlökin-6 (IL-6) ve tümör nekrozis faktör alfa (TNF- $\alpha$ ) gibi proinflatuar sitokinler bağışıklık yanıtını meydana getirirken, IL-10 gibi antiinflatuar sitokinler bağışıklık yanıtını ve diğer bazı sitokinlerin sentezini baskılayabilirler. IL-6 akut faz inflammatuar yanıtı aracılık eder ancak kronik inflamasyonda yüksek kalmaya devam eder.<sup>4,6</sup> TNF- $\alpha$  sitokin üretimini teşvik ederek inflamasyonu artırır. Nükleer faktör kapp B (NF $\kappa$ B), inflamasyon gelişimi ve ilerlemesinde rol oynayan genlerin ekspresyonunu indükleyen bir transkripsiyon faktörüdür. NF $\kappa$ B inflamasyon sürecinde düzinelere hedefi düzenleyerek inflamasyona katkıda bulunur. Bu nedenle NF $\kappa$ B ekspresyonundaki değişimler inflamasyon biyobelirteci olarak kabul edilmektedir.<sup>4,7</sup> IL-1 $\beta$ , uyarılabilir sitrik oksit sentaz [inducible nitric oxide synthase (iNOS)] ve siklooksijenaz-2 [cyclooxygenase-2 (COX-2)] gibi inflammatuar şelalede yer alan mediyatörlerin gen ekspresyonlarını upregüle eder.<sup>6</sup>

İnflamasyonun kontrol edilmeden devam etmesine izin verildiğinde, süreç otoimmün veya otoinflammatuar bozukluklar, nörodejeneratif hastalık veya kanser ile sonuçlanabilir.<sup>1,2</sup> İnflatuar mediyatörlerin aşırı üretiminin, özellikle IL-1 $\beta$ , IL-6 ve TNF- $\alpha$  gibi proinflatuar sitokinlerin aşırı üretiminin inhibisyonu, çeşitli inflammatuar hastalıkları önleyebilir.<sup>8</sup> Mevcut antisitokin tedavileri, romatoid artrit, inflammatuar bağırsak hastalığı, psöriyazis, multipl skleroz gibi otoimmün hastalıkların tedavisinde bir yer bulmuştur; spesifik proinflatuar sitokinlerin nötralizasyonu bu amaçla geliştirilmiş stratejilerden biridir.<sup>1</sup>

Antik çağlardan beri, iltihaplı durumlar ve bunlarla ilgili rahatsızlıklar bitkiler veya bitkilerden türetilmiş formülasyonlarla tedavi edilmiştir. Ayrıca antioksidan bakımından zengin çok sayıda doğal

ürün, inflamasyona karşı koruyucu etkiler sergiler. Çeşitli bitki özlerinin ve izole edilmiş bileşiklerin antiinflatuar aktiviteleri hâlihazırda bilimsel olarak kanıtlanmıştır.<sup>9-11</sup> *Myrtus communis* L. (MC) Myrtaceae familyasına ait Hatay ilinde "Hambeles" olarak bilinen bir bitkidir. Yaprak dökmeyen bu bitki Murt ve Mersin adıyla da bilinir. Türkiye, Yunanistan, Fas, Cezayir ve Tunus'ta yaygın olarak görülmektedir.<sup>12-14</sup> Bitki ve yapraklarının bildirilen antiinflatuar, antifungal, antibakteriyel ve antioksidan etkilerinin yanı sıra hemoroid tedavisinde de etkileri bildirilmiştir.<sup>14-18</sup> Geleneksel tıpta yaprakları ve meyvesi uzun yıllardır kullanılmaktadır. Bitkiden elde edilen esansiyel yağın bileşimi coğrafi bölgelere göre farklılıklar göstermektedir. Ana bileşen grupları arasında gallik asit türevleri, flavonoller, flavonol türevleri ve hidroksibenzoik asitler bulunur. Renkli meyvelerde antosiyaninler de mevcuttur.<sup>13,19</sup>

Patofizyolojisinde inflamasyon olan hastalıkların tedavisinde yan etkilerin minimum olacağı doğal bileşikler son derece önem kazanmaktadır. Bu çalışmada, çok sayıda etkisi bildirilmiş olan MC esansiyel yağının sağlıklı insan bronşiyal epitel hücre hattı olan BEAS-2B üzerindeki antiinflatuar etkileri araştırılmıştır.

## GEREÇ VE YÖNTEMLER

### HÜCRE KÜLTÜRÜ

Bu çalışma için Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulundan onay belgesi alınmıştır (Tarih: 31.10.2019-Karar no: 14). Çalışmanın bütünü Helsinki Deklarasyonu Prensipleri'ne uygun şekilde gerçekleştirilmiştir. Çalışmamızda Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Tıbbi Biyoloji Ana Bilim Dalı hücre kültürü laboratuvarından temin edilen BEAS-2B hücre hattı, in vitro çalışmalarda yaygın olarak kullanılan insan bronşiyal epitel hücre hattıdır. Deneylerde kullanılacak olan BEAS-2B hücre dizileri 175 cm<sup>2</sup>lik kültür kaplarında (flask) %10 FBS (Gibco, Carlsbad, CA, ABD) ve %1 penisilin/streptomisin (Gibco, Carlsbad, CA, ABD) ihtiva eden Dulbecco Modifiye Edilmiş besiyeri içerisinde (Dulbecco's Modified Eagle Medium, DMEM, Gibco, Birleşik Krallık) büyütüldü. İnkübasyon koşulları %95 nem, %5 CO<sub>2</sub> ve 37 °C olan etüde

inkübe edildi. Besiyeri haftada 2 kez değiştirilerek, hücreler kültür kabının %70-80'nini kaplayan yoğunluğa ulaştıklarında deneylerde kullanıldı.

### MC ESANSİYEL YAĞININ KONSANTRASYONLARININ BELİRLENMESİ

Çalışmamızda kullandığımız MC esansiyel yağı Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Ziraat Fakültesinden temin edildi. MC esansiyel yağının içeriği, daha önce yapmış olduğumuz çalışmada "Gas Chromatography/Mass spectrometry" yöntemi ile belirlendi.<sup>20</sup> MC esansiyel yağı 1000-500-250-125-62,5-31,25-15,625 mg/mL konsantrasyonları en yüksek konsantrasyonun %1 oranında DMSO (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, ABD) içerdiği, serumsuz DMEM besiyeri içinde çözündürülerek, seri dölüsyon hazırlandı. Hücreler yukarıda belirtilen konsantrasyonlara maruz bırakılarak uygun konsantrasyonun tespiti için 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide (MTT) testi uygulandı.

### HÜCRE CANLILIĞI

MTT testi için 96 kuyucuklu plâtelere %10 FBS ve %1 penisilin/streptomisin içeren DMEM besiyeri 1x10<sup>5</sup> hücre/mL olacak şekilde hücre ekimi yapıldı ve %95 nem, %5 CO<sub>2</sub> ve 37°C ısıda inkübe edildi. Hücrelerin kültür kaplarının yüzeyini %70-80 oranında kaplaması beklendi. Akabinde hücrelerin üzerindeki %10 FBS içeren besiyeri uzaklaştırılarak yerine serumsuz besiyeri eklendi ve 24 saat süreyle bu koşullarda inkübe edildi. Hazır hâle getirilen hücrelere MC esansiyel yağının farklı konsantrasyonları için MTT testi uygulandı.

MC esansiyel yağının nonsitotoksik konsantrasyonlarını belirlemek üzere, hazır hâle getirilmiş hücreler 1000-500-250-125-62,5-31,25-15,625 mg/mL MC esansiyel yağına 24 saat maruz bırakıldı. MTT deneyi için 1 mg/mL MTT (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, ABD) solüsyonu hazırlandı. Doksan altı kuyucuklu plâtedeki mevcut solüsyon uzaklaştırıldı ve her bir kuyuya 100 mL MTT solüsyonu eklendi. Dört saat 37°C'de inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresi sonunda plate içindeki MTT solüsyonu uzaklaştırıldı. Her bir kuyuya 100 mL DMSO eklendi ve 5 dk oda sıcaklığında bekletildi. Renkteki değişim spektrofotometrede 590 nm'de ve 670 nm referans dalga boyuna karşı okutuldu.

### GEN EKSPRESYONU

RNA izolasyonu için hücreler 6 kuyucuklu plâtelere %10 FBS ve %1 penisilin/streptomisin içeren DMEM besiyerinde 1x10<sup>5</sup> hücre/mL olacak şekilde ekildi ve %95 nem, %5 CO<sub>2</sub> ve 37°C sağlayan inkübatör koşullarında inkübe edildi. Hücreler plate yüzeyini %70-80 oranında kapladıktan sonra, mevcut besiyeri uzaklaştırılarak serumsuz besiyeri eklendi ve 24 saat süreyle inkübasyona bırakıldı. Yirmi dört saat sonunda hücreler;

i) Kontrol grubu (herhangi bir maddenin eklenmediği sağlıklı hücre grubu),

ii) İnkübasyonun tetiklendiği grup (10 ng/ml IL-1β ile 4 saat inkübe edilen grup),

iii) MC esansiyel yağı uygulanan grup (IL-1β+MC esansiyel yağı verilen grup) olmak üzere 3 farklı gruba ayrılarak aynı koşullarda inkübe edildi. İnkübasyonun tetiklenmesi amacıyla IL-1β kullanıldı. Yapılan ön çalışmalarda IL-1β'nin farklı konsantrasyonları (1, 5 ve 10 ng/mL) denendi. Proinflatuar bir belirteç olan NFκB ekspresyon seviyeleri değerlendirilerek IL-1β'nin 10 ng/mL konsantrasyonu ile 4 saatlik inkübasyonu tercih edildi.

Yirmi dört saatlik inkübasyon süresinin sonunda hücreler tripsin ilave edilerek kaldırıldı ve 3000 rpm'de 5 dk santrifüj edildi. Üst faz toplanarak ELISA çalışmaları için çalışma gününe kadar -80°C'de muhafaza edildi. Hücre pelleti RNA izolasyon kiti (Thermo Scientific GeneJET RNA Purification Kit, Waltham, MA, ABD) kullanılarak, üretici firmanın protokolü doğrultusunda total RNA izolasyonu yapıldı.

Total RNA'lardan cDNA sentez kiti (High Capacity cDNA, Reverse Transcription Kit, applied biosystems by Thermo Fisher Scientific, Litvanya) kullanılarak cDNA sentezi gerçekleştirildi. Elde edilen cDNA'lar gen ekspresyon analizleri için çalışma gününe kadar -80°C'de muhafaza edildi.

IL-6, IL-10, iNOS, TNF-α, COX-2, NFκB genleri ve "housekeeping" geni olarak β-aktin genlerinin transkripsiyon düzeyleri revers transkriptaz-kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu (RT-qPCR) yöntemiyle (Qiagen, Rotor-Gene Q, Almanya) belirlendi.

Hedef genlere ait primerler hazır kit olarak satın alındı (Tablo 1) (#330001, Qiagen, Almanya). Rölatif mRNA düzeylerinin hesaplanması için  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  yöntemi kullanıldı. Normalizasyon için  $\beta$ -aktin “housekeeping gen” olarak kullanıldı. Sonuçlar “fold change (kat değişimi)” olarak verildi.

## ELISA

Hücre kültürü deneyleri sırasında elde edilen üst fazdan IL-6 (Human Interleukin 6 ELISA Kit, BT Lab, Çin), IL-10 (Human Interleukin 10 ELISA Kit, BT Lab, Çin), TNF- $\alpha$  (Human Tumor Necrosis Factor Alpha ELISA Kit, BT Lab, Çin) ve iNOS (Human Nitric Oxide Synthase, Inducible ELISA Kit, Bt Lab, Çin) düzeyleri ELISA kiti ile üretici firmanın protokolü doğrultusunda ölçüldü.

## İSTATİSTİKSEL ANALİZ

ELISA ve MTT analiz sonuçları GraphPad Prism Version 6.01 (GraphPad Software Inc., ABD) programı uygulanarak hesaplandı. Gruplar içindeki verilerin normal dağılıma uygunluğu Shapiro-Wilk testi ile belirlendi. Gruplar arasında farklılığın var olup olmadığı Kruskal-Wallis testi ile değerlendirildi. Gruplar arasındaki anlamlılığın hangileri arasında olduğunun tespitinde Dunn’s Multiple Comparison testi kullanıldı. Gen ekspresyon analizlerinde gruplar arası anlamlılık Student t-testi ile analiz edildi. Her çalışma grubu kontrol grubu ile karşılaştırıldı ve  $p < 0,05$ ’ten küçük olan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Sonuçlar ortalama  $\pm$  standart sapma olarak verildi.

## BULGULAR

### HÜCRE CANLILIĞI VE MC ESANSİYEL YAĞ KONSANTRASYONUNUN BELİRLENMESİ

MC yağının BEAS-2B hücrelerine 24 saatlik inkübasyonun sonunda 15,625, 31,25, 62,5 ve 125  $\mu\text{g}/\text{mL}$  konsantrasyonlarda kontrol grubu ile karşılaştırıldığında hücre canlılığı açısından anlamlı bir fark görülmezken (sırasıyla  $p=0,9999$ ;  $0,9999$ ;  $0,7204$ ;  $0,1732$ ), 250-500-1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  konsantrasyonlarının hücre canlılığını anlamlı derecede azalttığı bulundu (sırasıyla  $p=0,0083$ ;  $0,0001$ ;  $0,0001$ ) (Şekil 1). Sیتotoksik etki göstermeyen ve kontrol grubuna en yakın hücre canlılığına sahip (%99,22) konsantrasyon olan 15,625  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , çalışmaların devamında kullanıldı. Böylelikle 3 farklı gruba (1. grup: kontrol, 2. grup: inflamatuvar hücre) ayırdığımız çalışmamızda, MC uygulanan grup olan 3. gruptaki hücreler için 10  $\text{ng}/\text{mL}$  IL-1 $\beta$  ile 4 saatlik uyarımdan sonra, 15,625  $\mu\text{g}/\text{mL}$  MC esansiyel yağ konsantrasyonu tercih edildi.

### GEN EKSPRESYONU

BEAS-2B hücrelerinde 24. saatte kontrol grubu ile inflamatuvar hücre grubunun gen ekspresyon düzeylerini karşılaştırıldığında; proinflamatuvar belirteçlerden olan IL-6’nın ekspresyon düzeyinin kontrol grubuna göre 4,89 kat ( $p=0,00032$ ), NF $\kappa$ B’nin ise 3,32 kat ( $p=0,00001$ ) arttığı saptanmıştır. Antiinflamatuvar bir belirteç olan IL-10, inflamasyonun tetiklendiği grupta kontrol grubuna göre 2,57 kat ( $p=0,03070$ ) artmıştır. iNOS, COX-

**TABLO 1:** Primer dizileri ve qPCR döngü koşulları.

Gen sembolü	Primer kodu*	Amplikon boyutu (bp)	Bağlanma sıcaklığı (°C)	Döngü sayısı	Referans dizisi
IL-6	PPH00560C	98 bp	60	40x	NM_000600
TNF- $\alpha$	PPH00341F	110 bp	60	40x	NM_000594
IL-10	PPH00572C	63 bp	60	40x	NM_000572
COX-2	PPH01136F	63 bp	60	40x	NM_000963
iNOS	PPH00173F	71 bp	60	40x	NM_000625
NF $\kappa$ B	PPH00204F	81 bp	60	40x	NM_001165412
$\beta$ -Actin	PPH00073G	174 bp	60	40x	NM_0011101

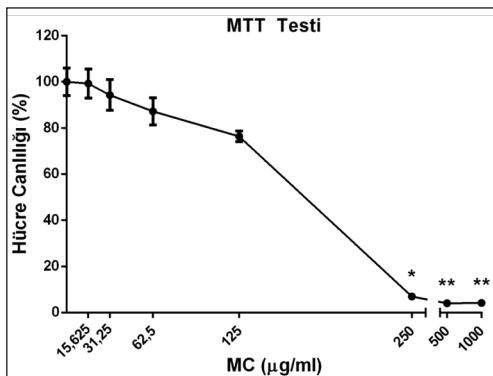
IL-6: İnterlökin-6; TNF- $\alpha$ : Tümör nekrozis faktör alfa; IL-10: İnterlökin-10; COX-2: Siklooksijenaz-2; iNOS: Uyarılabilir sitrik oksit sentaz; NF $\kappa$ B: Nükleer faktör kappa B;  $\beta$ -Actin: Beta aktin. \*Katalog no:330001, Qiagen, Almanya.



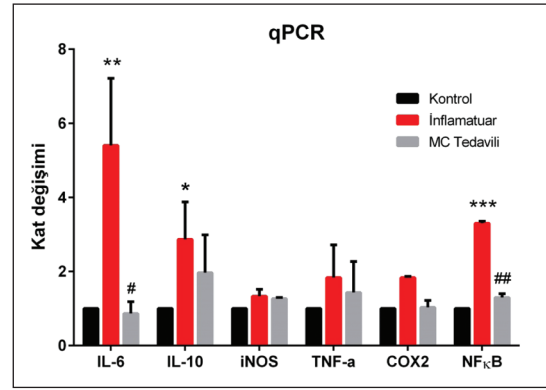
2 ve TNF- $\alpha$  düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı bir ekspresyon değişimi olmamıştır (sırasıyla  $p=0,11634$ ;  $0,49251$ ;  $0,11002$ ). MC uygulanan hücre grubunda NF $\kappa$ B gen ekspresyonu 1,32 katlık bir artış gösterirken ( $p=0,036306$ ), IL-6, IL-10, iNOS, TNF- $\alpha$ , COX-2 gen ekspresyonları kontrol grubu ile benzer saptanmıştır (sırasıyla  $p=0,331379$ ;  $0,441955$ ;  $0,195919$ ;  $0,843449$ ;  $0,873501$ ). İnflamatuar hücre grubuna kıyasla MC uygulanan grupta NF $\kappa$ B ekspresyon düzeylerinde 3.32 kattan 1.32 katlık ekspresyon düzeyine düşüş anlamlı bulunmuştur ( $p=0,000105$ ). Aynı şekilde IL-6'nın ekspresyon düzeyi, MC uygulanan grupta inflamatuar hücre grubuna göre anlamlı bir düşüş göstermiştir ( $p=0,000012$ ) (Şekil 2).

### ELISA

IL-6 düzeyleri karşılaştırıldığında kontrol grubu (95,38 ng/L) ile inflamasyon grubu hücreler (112 ng/L) arasında anlamlı bir fark bulunmuş, inflamatuar hücre modelinin oluşturulduğu grupta IL-6 düzeylerinin kontrol grubuna göre arttığı saptanmıştır (Şekil 3,  $p=0,0051$ ). MC uygulanan hücrelerde ise IL-6 düzeylerinin (105,8 ng/L) kontrol grubu ile benzer olduğu ( $p=0,3502$ ) görölmüştür (Şekil 3). Aynı şekilde, IL-10 düzeylerinin kontrole göre karşılaştırmasında, inflamasyon modeli oluşturulan hücrede IL-10 düzeyleri (163,5 pg/mL) anlamlı biçimde artarken ( $p=0,0049$ ), MC uygulanan hücre grubunda IL-10 düzeyleri (153,9 pg/mL) kontrol grubu ile istatistiksel olarak benzer ( $p=0,3463$ ) bulunmuştur (Şekil 3). TNF- $\alpha$  ve iNOS düzeyleri tüm gruplarda benzer bulunmuştur (Şekil 3,  $p>0,05$ ).

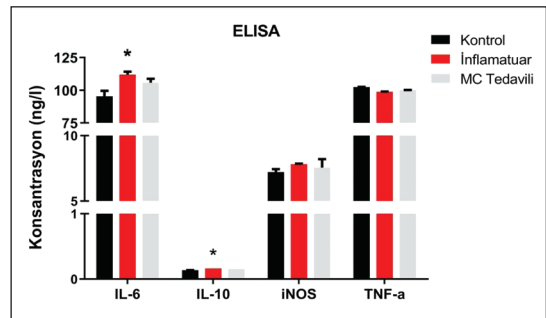


ŞEKİL 1: MC esansiyel yağının farklı konsantrasyonlarının (0-1000 µg/ml) BEAS 2B hücre hattında hücre canlılığına etkisi. MC: *Myrtus communis* L; \* $p=0,0049$ ; \*\* $p=0,0001$ .



ŞEKİL 2: IL-6, IL-10, iNOS, TNF- $\alpha$ , COX-2 ve NF $\kappa$ B gen ekspresyon seviyelerinin kontrol, inflamatuar (10 ng/mL IL-1 $\beta$ ) ve MC uygulanan (10 ng/mL IL-1 $\beta$  + 15,625 µg/mL MC) gruplarda 24. saatteki değişimleri (\* $p=0,03070$ ; \*\* $p=0,00032$ ; \*\*\* $p=0,00001$ ; # $p=0,000012$ ; ## $p=0,000105$ ).

\*: Kontrol grubuna kıyasla bulunan anlamlı farklılıklar; #: inflamatuar grubuna kıyasla bulunan anlamlı farklılıklar; IL-6: İnterlökin-6; IL-10: İnterlökin-10; iNOS: Uyarılabilir sitrik oksit sentaz; TNF- $\alpha$ : Tümör nekrozis faktör alfa; COX-2: Siklooksijenaz-2; NF $\kappa$ B: Nükleer faktör kappa B;  $\beta$ -Actin: Beta aktin.



ŞEKİL 3: IL-6, IL-10, iNOS ve TNF- $\alpha$  protein düzeylerinin kontrol, inflamatuar (10 ng/mL IL-1 $\beta$ ) ve MC uygulanan (10 ng/mL IL-1 $\beta$  + 15,625 µg/mL MC) gruplarda 24. saatteki değişim grafiği (\* $p=0,0051$ ; \*\* $p=0,0049$ ).

\*: Kontrol grubuna kıyasla bulunan anlamlı farklılıklar. IL-6: İnterlökin-6; IL-10: İnterlökin-10; iNOS: Uyarılabilir sitrik oksit sentaz; TNF- $\alpha$ : Tümör nekrozis faktör alfa; ELISA: Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay.

## TARTIşMA

İnflamasyon insan patojenleri ve virüsler dâhil olmak üzere yabancı bir organizmaya verilen, kapsamlı bir fizyolojik yanıt sürecidir. Konak savunmasında çok önemli olmasına karşın, stimülasyona uzun süre maruz kalmanın bir sonucu olarak kalıcı inflamasyon doku hasarının meydana gelebileceği kronik faza yol açabilir. Kronik inflamasyon artrit, astım ateroskleroz, otoimmün hastalıklar, diyabet ve kanseri de içine

alan çok sayıda kronik hastalığa ve hatta yaşlanma sürecine katkıda bulunmaktadır.<sup>4,21</sup> Hücre kültürü ile yapılan inflamasyon çalışmalarında, inflamatuvar yolak çeşitli uyananlarla (IL-1 $\beta$ , LPS, TNF- $\alpha$ ) tetiklenebilmektedir. Bu uyananların 3'ü de kanonik NF $\kappa$ B yolağını aktive ederek, proinflamatuvar sitokinlerin ekspresyonunu upregüle eder.<sup>22</sup> IL-1 $\beta$ 'nin özellikle akciğer epitel hücrelerinde, proinflamatuvar sitokin ve kemokinleri sentezlemek üzere uyardığı ve inflamasyonu tetiklediği bildirilmiştir.<sup>20,23,24</sup> Çalışmamızda inflamatuvar hücre modeli oluşturmak amacıyla IL-1 $\beta$  tercih edilmiştir.

İnflamasyona bağlı hastalıkların tedavisinde kullanılan ilaçların sınırlayıcı yan etkilerinden dolayı doğal bileşenlere ilgi her geçen gün artmaktadır. MC esansiyel yağının son yıllarda çok sayıda çalışmada antibakteriyel, antifungal, antioksidan, antiinflamatuvar, antiparaziter, hemostatik etkileri bildirilmiştir.<sup>12,14-19,25-27</sup> IL-1 $\beta$  ile 4 saatlik muamele sonrasında inflamasyonun indüklendiği insan bronşiyal epitel hücre hattı olan BEAS-2B hücrelerinde MC esansiyel yağının antiinflamatuvar etkilerinin araştırıldığı bu çalışmada elde edilen bulgular, MC esansiyel yağının antiinflamatuvar etkileri olduğunu doğrular niteliktedir.

İnflamasyon proinflamatuvar (IL-6, TNF- $\alpha$ ) ve antiinflamatuvar (IL-10) sitokinlerin, NF $\kappa$ B gibi transkripsiyon faktörlerinin, İNOS ve COX-2 gibi bir dizi aracının dâhil olduğu karmaşık bir süreçtir ve hücre dışı mediyatörlerin, aynı derecede karmaşık olan hücre içi sinyal mekanizmalarıyla eşleştirilerek kontrol edilir.<sup>6</sup> Çalışmamızda bahsi geçen inflamatuvar mediyatörlerin, BEAS 2B hücrelerinde inflamasyon oluşumunu takiben, MC esansiyel yağı uygulandığı durumdaki ekspresyon ve protein düzey değişimleri incelenmiştir. NF $\kappa$ B ve COX-2, sadece gen ekspresyonu düzeyinde incelenmiştir. NF $\kappa$ B'nin majör düzenleyici olması nedeniyle artması, beklenen ilk etkidir.<sup>22,28</sup> İnflamatuvar yolaktaki birçok mediyatörün değişimi bu noktadan sonra farklılık gösterebilmektedir. NF $\kappa$ B tarafından ekspresyonu uyarılan TNF- $\alpha$ 'nın, COX-2 üzerinden prostoglandin E2 ekspresyonunu artırarak inflamasyonu tetiklediği bildirilmiştir.<sup>29</sup> Bu nedenle TNF- $\alpha$  düzeylerindeki değişimin COX-2 değişimlerine yansıtacağı düşünülerek COX-2 de NF $\kappa$ B gibi gen ekspresyonu düzeyinde incelenmiştir.

Özbeyli ve ark. 2019 yılında ratlarda cerulein indüklü akut pankreatitise karşı MC yaprak ekstraktlarının koruyucu etkilerini araştırdıkları bir çalışmada, IL-6 düzeylerini ELISA ile belirlemişler, MC uygulanan grupta IL-6 düzeylerinin düştüğünü bildirmişlerdir.<sup>27</sup> Çalışmamızda da bu çalışma ile benzer olarak IL-1 $\beta$  ile inflamasyonun tetiklendiği grupta kontrol grubuna göre anlamlı artış gösteren IL-6 protein düzeylerinin, MC uygulanan grupta düştüğü görülmüştür.

MC meyvesinden elde edilen esansiyel yağların ve bileşiklerin insan umbilikal kord damar endotel hücrelerinde sepsis kaynaklı endotel hasarı üzerine etkilerinin araştırıldığı bir başka çalışmada MC yağı ve MC bileşenleri kullanılmıştır. Sepsis modeli oluşturmak üzere hücrelerin lipopolisakkarid (LPS) ile uyarıldığı çalışmada, MC uygulanan hücre hattında LPS'nin neden olduğu hasar onarılamamış; IL-6, TNF- $\alpha$  gen ekspresyon seviyeleri düşmemiştir. Ancak MC bileşenlerinden 1,8 sineol ve  $\alpha$ -pinen uygulanan gruplarda IL-6, TNF- $\alpha$  seviyeleri azalmıştır.<sup>30</sup> Bu çalışmadan farklı olarak bizim çalışmamızda MC uygulanan grupta proinflamatuvar belirteçler olan IL-6 ve NF $\kappa$ B genlerinin ekspresyonunda azalma saptanmıştır. IL-6 ve NF $\kappa$ B ekspresyon düzeylerinin MC uygulanan grupta kontrol düzeylerine inmesi inflamasyonun geriletildiğinin bir göstergesi olarak dikkat çekmektedir. NF $\kappa$ B gen ekspresyon değişimlerinin inflamatuvar biyobelirteç olarak kabul edildiği düşünülecek olursa; IL-1 $\beta$  ile artırılmış ekspresyon düzeyinin kontrol düzeyine geriletilmiş olması, MC yağının anti-inflamatuvar özelliğini göstermektedir.

MC esansiyel yağının topikal olarak uygulandığı bir başka çalışmada, farelerde IL-6, TNF- $\alpha$  serum düzeylerinin düştüğü, kulak ödemi azalttığı ve MC esansiyel yağının antiinflamatuvar aktivite gösterdiği bildirilmiştir.<sup>31</sup> Söz konusu çalışma, metodolojik açıdan farklılık gösterse de MC esansiyel yağının antiinflamatuvar aktivitesi açısından benzer sonuçlara ulaşılmıştır.

Çalışmamızda TNF- $\alpha$  protein düzeylerinin gruplar arasında anlamlı bir değişim göstermediği saptanmıştır. TNF, NF $\kappa$ B ile indüklenebilir, ancak tam aktivasyon için mRNA yarı ömrünü, pro-TNF iş-

lenmesi ve salınımını kontrol eden ek sinyal mekanizmalarının etkinleştirilmesi gerekir.<sup>32</sup> Dolayısıyla 4 saatlik inflamasyon uyarısının TNF- $\alpha$  salınımı için yetersiz kaldığı olası görünmektedir.

Özbeyle ve ark.nın yaptığı çalışmada, MC uygulanan grupta IL-10 düzeyleri yükselmiştir.<sup>27</sup> Yapmış olduğumuz bu çalışmada ise MC uygulanan grupta IL-10 düzeyleri kontrole göre artış gösterse de istatistiksel bir anlamlılık saptanmamıştır. Antiinflamatuvar bir belirteç olan IL-10 düzeylerinin inflamasyonun tetiklendiği grupta anlamlı bir artış göstermesinin sebebinin inflamasyonu geriletme olduğunu düşünmekteyiz. MC uygulanan grupta ise inflamasyon gelişmemesi nedeniyle IL-10 ekspresyon düzeyleri düşmüş ve kontrol grubu ile benzer düzeylerde eksprese edilmiştir. Aynı şekilde ELISA sonuçlarımızda da inflamasyonu indüklediğimiz grupta IL-10 düzeyleri kontrol grubuna göre artış gösterirken, MC uygulanan grupta IL-10 seviyesinin kontrol grubu ile istatistiksel olarak benzer bulunmuş olması gen ekspresyon verilerimizle uyumaktadır. Ancak bahsi geçen çalışmada, akut pankreatitis modeli geliştirilen ratlarda hem 6 saatlik bir inflamasyon neticesinde analizlerin yapılmış olması hem de bu analizlerin dokudan örnek alınarak yapılmış olması çalışmamızda farklı bulgulara ulaşmamıza neden olabilir. Bu çalışmamız, daha önce yapmış olduğumuz A549 hücre hattında yeni sentezlenen benzimidazol türevlerinin antiinflamatuvar etkilerini araştırdığımız çalışmamız gibi hücre kültürü temelli bir çalışmadır.<sup>33</sup> Her 2 çalışmamızda da inflamasyonun geriletildiği gruplarda IL-10 düzeylerinin azalması benzerlik göstermektedir.

iNOS ve COX-2 gen ekspresyon düzeyleri açısından gruplar arasında istatistiksel bir farklılık saptanmamış olmasına karşın COX-2 gen ekspresyon düzeylerinin inflamasyonu indüklediğimiz grupta kontrole göre artışı ve MC esansiyel yağ uygulanan grupta kontrol seviyesine gerilemesi dikkat çekicidir. Ancak istatistiksel olarak anlamlı bir farklılığın görülebilmesi nedeniyle MC yağının bir COX inhibitörü olarak antiinflamatuvar etki gösterdiğini söyleyebilmek için daha farklı MC yağ konsantrasyonlarıyla ilave çalışmalar yapılması gerekmektedir.

Çoğu hücre tipinde iNOS ekspresyonunun maksimum indüksiyonu için çoklu sitokin sinerjistik etkisine ihtiyaç olduğu bildirilmiştir.<sup>34</sup> Özellikle TNF- $\alpha$ , iNOS indüksiyonunda önemli bir mediyatördür. Çalışmamızda TNF- $\alpha$  ekspresyon seviyelerinin değişmemiş olması iNOS indüksiyonunu kısıtlayıcı bir faktör olarak değerlendirilmiştir.

## SONUÇ

Yapmış olduğumuz bu çalışmada, MC yağının, IL-1 $\beta$  ile uyarılmış sağlıklı insan bronşiyal epitel hücrelerindeki proinflamatuvar sitokinlerin ekspresyonunu inhibe ederek antiinflamatuvar etki gösterdiğini saptadık. Güçlü bir antiinflamatuvar etkiye sahip olan MC esansiyel yağının potansiyel bir terapötik ajan olarak değerlendirilebilmesi için farklı konsantrasyon ve uygulama sürelerinin de dâhil edildiği daha fazla araştırma yapılması gerekmektedir.

### Teşekkür

*Myrtus communis L esansiyel yağının temini ve içeriğinin belirlenmesindeki katkılarından dolayı Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tıbbi Bitkiler Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Durmuş Alparslan KAYA'ya teşekkür ederiz.*

### Finansal Kaynak

*Bu çalışma Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğüne 20.M.007 numaralı proje olarak desteklenmiştir.*

### Çıkar Çatışması

*Bu çalışma ile ilgili olarak yazarların ve/veya aile bireylerinin çıkar çatışması potansiyeli olabilecek bilimsel ve tıbbi komite üyeliği veya üyeleri ile ilişkisi, danışmanlık, bilirkişilik, herhangi bir firmada çalışma durumu, hissedarlık ve benzer durumları yoktur.*

### Yazar Katkıları

**Fikir/Kavram:** Gülay Gülbol Duran; **Tasarım:** Gülay Gülbol Duran; **Denetleme/Danışmanlık:** Gülay Gülbol Duran; **Veri Toplama ve/veya İşleme:** Gülay Gülbol Duran, Menderes Yusuf Terzi; **Analiz ve/veya Yorum:** Gülay Gülbol Duran, Menderes Yusuf Terzi; **Kaynak Taraması:** Gülay Gülbol Duran; **Makalenin Yazımı:** Gülay Gülbol Duran, Menderes Yusuf Terzi; **Eleştirel İnceleme:** Gülay Gülbol Duran, Menderes Yusuf Terzi; **Kaynaklar ve Fon Sağlama:** Gülay Gülbol Duran, Menderes Yusuf Terzi; **Malzemeler:** Gülay Gülbol Duran.

## KAYNAKLAR

- Dinarello CA. Anti-inflammatory agents: Present and future. *Cell*. 2010;140(6):935-50. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
- Hwang D, Kang MJ, Jo MJ, Seo YB, Park NG, Kim GD. Anti-Inflammatory Activity of  $\beta$ -thymosin Peptide Derived from Pacific Oyster (*Crassostrea gigas*) on NO and PGE2 Production by Down-Regulating NF- $\kappa$ B in LPS-Induced RAW264.7 Macrophage Cells. *Mar Drugs*. 2019;17(2):129. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
- Liu M, Fang G, Yin S, Zhao X, Zhang C, Li J, et al. Caffeic Acid Prevented LPS-Induced Injury of Primary Bovine Mammary Epithelial Cells through Inhibiting NF- $\kappa$ B and MAPK Activation. *Mediators Inflamm*. 2019;2019:1897820. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
- Germolec DR, Shipkowski KA, Frawley RP, Evans E. Markers of inflammation. *Methods Mol Biol*. 2018;1803:57-79. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
- Singh N, Baby D, Rajguru JP, Patil PB, Thakkanavar SS, Pujari VB. Inflammation and cancer. *Ann Afr Med*. 2019;18(3):121-6. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
- Turner MD, Nedjai B, Hurst T, Pennington DJ. Cytokines and chemokines: At the crossroads of cell signalling and inflammatory disease. *Biochim Biophys Acta*. 2014;1843(11):2563-82. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
- Liu T, Zhang L, Joo D, Sun SC. NF- $\kappa$ B signaling in inflammation. *Signal Transduct Target Ther*. 2017;2:17023-. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
- Zhu F, Du B, Xu B. Anti-inflammatory effects of phytochemicals from fruits, vegetables, and food legumes: A review. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2018;58(8):1260-70. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
- Lombardo GE, Cirmi S, Musumeci L, Pergolizzi S, Maugeri A, Russo C, et al. Mechanisms underlying the anti-inflammatory activity of bergamot essential oil and its antinociceptive effects. *Plants (Basel)*. 2020;9(6):704. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
- Lorençoni MF, Figueira MM, Toledo E Silva MV, Pimentel Schmitt EF, Endringer DC, Scherer R, et al. Chemical composition and anti-inflammatory activity of essential oil and ethanolic extract of *Campomanesia phaea* (O. Berg.) Landrum leaves. *J Ethnopharmacol*. 2020;252:112562. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
- Santos SMD, de Oliveira Junior PC, de Matos Balsalobre N, Kassuya CAL, Cardoso CAL, Pereira ZV, et al. Variation in essential oil components and anti-inflammatory activity of *Allophylus edulis* leaves collected in central-western Brazil. *J Ethnopharmacol*. 2021;267:113495. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
- Santos SMD, de Oliveira Junior PC, de Matos Balsalobre N, Kassuya CAL, Cardoso CAL, Pereira ZV, et al. Variation in essential oil components and anti-inflammatory activity of *Allophylus edulis* leaves collected in central-western Brazil. *J Ethnopharmacol*. 2021;267:113495. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
- Ozcan O, Ipekci H, Alev B, Ustundag UV, Ak E, Sen A, et al. Protective effect of Myrtle (*Myrtus communis*) on burn induced skin injury. *Burns*. 2019;45(8):1856-63. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
- Ulutaş HZ, Duran GG. Antioxidant effects of *Myrtus communis* L.'s Essential Oils in BEAS-2B cells induced by oxidative stress with hydrogen peroxide. *Acta Medica Alanya*. 2020;4(1):21-8. [[Crossref](#)]
- Soomro S, Mesaik MA, Shaheen F, Khan N, Halim SA, UI-Haq Z, et al. Inhibitory Effects of Myrtucommuacetalone 1 (MCA-1) from *Myrtus communis* on Inflammatory Response in Mouse Macrophages. *Molecules*. 2019;25(1):13. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
- Barac A, Donadu M, Usai D, Spiric VT, Mazzarello V, Zanetti S, et al. Antifungal activity of *Myrtus communis* against *Malassezia* sp. isolated from the skin of patients with pityriasis versicolor. *Infection*. 2018;46(2):253-7. Erratum in: *Infection*. 2018. Apr;46(2):253-257. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
- Rahimvand L, Niakan M, Naderi NJ. The antibacterial effect of aquatic and methanolic extract of *Myrtus communis* on *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* and *Prevotella intermedia*. *Iran J Microbiol*. 2018;10(4):254-7. [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
- Mahboubi M. Effectiveness of *Myrtus communis* in the treatment of hemorrhoids. *J Integr Med*. 2017;15(5):351-8. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
- Hennia A, Miguel MG, Nemmiche S. Antioxidant Activity of *Myrtus communis* L. and *Myrtus nivellei* Batt. & Trab. Extracts: A Brief Review. *Medicines (Basel)*. 2018;5(3):89. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
- Bilgic N, Duran GG. Chemical Composition of *Myrtus communis* L. and Proapoptotic Effects on the A549 cell line. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*. 2020;23(6):1283-95. [[Crossref](#)]
- Arulselvan P, Fard MT, Tan WS, Gothai S, Faku-razi S, Norhaizan ME, et al. Role of antioxidants and natural products in inflammation. *Oxid Med Cell Longev*. 2016;2016:5276130. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
- Jarosz M, Olbert M, Wyszogrodzka G, Mlyniec K, Librowski T. Antioxidant and anti-inflammatory effects of zinc. Zinc-dependent NF- $\kappa$ B signaling. *Inflammopharmacology*. 2017;25(1):11-24. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
- Liou CJ, Huang WC. Casticin inhibits interleukin-1 $\beta$ -induced ICAM-1 and MUC5AC expression by blocking NF- $\kappa$ B, PI3K-Akt, and MAPK signaling in human lung epithelial cells. *Oncotarget*. 2017;8(60):101175-188. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
- Khan YM, Kirkham P, Barnes PJ, Adcock IM. Brd4 is essential for IL-1 $\beta$ -induced inflammation in human airway epithelial cells. *PLoS One*. 2014;9(4):e95051. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
- Ebrahimi F, Mahmoudi J, Torbati M, Karimi P, Valizadeh H. Hemostatic activity of aqueous extract of *Myrtus communis* L. leaf in topical formulation: In vivo and in vitro evaluations. *J Ethnopharmacol*. 2020;249:112398. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
- Jabri MA, Hajaji S, Rtibi K, Sebai H. Role of Anti-Inflammatory, Reactive Oxygen Species Scavenging Activity and Nematicidal Properties of Myrtle Berry Seeds on Helminthiasis Treatment. *J Med Food*. 2021;24(4):377-84. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
- Ozbeyli D, Sen A, Cilingir Kaya OT, Ertaş B, Aydemir S, Ozkan N, et al. *Myrtus communis* leaf extract protects against cerulein-induced acute pancreatitis in rats. *J Food Biochem*. 2020;44(2):e13130. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
- Cheng Z, Li L. Ginsenoside Rg3 ameliorates lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice through inactivating the nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) signaling pathway. *Int Immunopharmacol*. 2016;34:53-9. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
- Lee IS, Uh I, Kim KS, Kim KH, Park J, Kim Y, et al. Anti-Inflammatory Effects of Ginsenoside Rg3 via NF- $\kappa$ B Pathway in A549 Cells and Human Asthmatic Lung Tissue. *J Immunol Res*. 2016;2016:7521601. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
- Kutlu Z, Gulaboglu M, Halıcı Z, Cinar İ, Diyarbakır B. Biochemical research of the effects of essential oil obtained from the fruit of *Myrtus communis* L. on cell damage associated with lipopolysaccharide-induced endotoxemia in a human umbilical cord vein endothelial cells. *Biochem Genet*. 2021;59(1):315-34. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
- Maxia A, Frau MA, Falconieri D, Karchuli MS, Kasture S. Essential oil of *Myrtus communis* inhibits inflammation in rats by reducing serum IL-6 and TNF- $\alpha$ . *Nat Prod Commun*. 2011;6(10):1545-8. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
- Mitchell S, Vargas J, Hoffmann A. Signaling via the NF $\kappa$ B system. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med*. 2016;8(3):227-41. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
- Duran GG, Küçük MU, Algül Ö, Terzi MY. Investigation of new benzimidazole derivative compounds' effects on A549 cell line. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 2020;63. [[Crossref](#)]
- Lee M, Wang C, Jin SW, Labrecque MP, Beischlag TV, Brockman MA, et al. Expression of human inducible nitric oxide synthase in response to cytokines is regulated by hypoxia-inducible factor-1. *Free Radic Biol Med*. 2019;130:278-87. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]