DERLEME REVIEW

DOI:10.5336/pharmsci.2024-107415

Antiinflamatuar Etkinin Değerlendirilmesinde Kullanılan *in vitro* ve *in vivo* Yöntemler: Geleneksel Derleme

In vitro and *in vivo* Methods Used in Evaluation of Anti-Inflammatory Effect: A Traditional Review

Hilal ERDEM[a,b], Zeynep DOĞAN[c], İclal SARAÇOĞLU[b,d]

[a]Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Eczacılık Meslek Bilimleri Bölümü, Farmakognozi AD, Tokat, Türkiye
[b]Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Farmakognozi Programı, Ankara, Türkiye
[c]Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Eczacılık Meslek Bilimleri Bölümü, Farmakognozi AD, Ankara, Türkiye
[d]Lokman Hekim Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Eczacılık Meslek Bilimleri Bölümü, Farmakognozi AD, Ankara, Türkiye

ÖZET İnflamasyon, canlının her türlü yaralanmaya karşı verdiği olağan bir tepkidir. Bir dizi biyokimyasal olayı içeren, hücresel hasar tarafından tetiklenen, kızarıklık, ısı artışı, şişlik, ağrı ve fonksiyon kaybı ile karakterize, karmaşık bir doku reaksiyonudur. İnflamasyonun gerçekleştiği durumda canlıda hasarlı doku onarılmakta ve yeniden şekillenmektedir. İnflamasyon, organizma tarafından zararlı uyaranları ortadan kaldırmak için alınan koruyucu bir önlem olsa da kontrolsüz olduğu durumda hasara yol açmaktadır. Kontrol altına alınamayan inflamasyon romatoid artrit, diyabet, kanser, nörodejeneratif hastalıklar (Alzheimer vb.) ve aterosklerozun yanı sıra pulmoner, otoimmün ve kardiyovasküler hastalıkların gelişmesine neden olmaktadır. İnflamasyonun kontrol altına alınması için, antiinflamatuar etkili ilaçlar kullanılmaktadır. İnflamatuar, sürece müdahale edebilen antiinflamatuar ilaçlar tedavide önemlidir. Mevcut antiinflamatuar ilaçların yan etkilerinin ve maliyetlerinin fazla olması gibi olumsuzluklar, araştırmacıları yeni alternatif ilaç araştırmalarına yönlendirmektedir. Antiinflamatuar etkili olduğu düşünülen ajanın etkisinin değerlendirilmesinde ilk aşama olarak *in vitro* ve ardından *in vivo* yöntemler sıklıkla kullanılmaktadır. *İn vitro* yöntemler arasında en sık sitokinlerin miktar tayini, Western Blot analizi ve hücre içi oksidatif stres tayin yöntemleri kullanılırken, *in vivo* yöntemlerden ise karragenan ile oluşturulmuş pençe ödemi ve kroton yağı ile oluşturulmuş kulak ödemi deney modellerinin kullanıldığı görülmektedir. Bu derlemede, genç araştırmacılara yol gösterici olacağı düşünülerek, antiinflamatuar etkinin değerlendirilmesinde kullanılan *in vitro* ve *in vivo* yöntemler ile ilgili bilgiler sunulmuştur.

Anahtar Kelimeler: İnflamasyon; antiinflamatuar ajanlar; sitokinler

ABSTRACT Inflammation is a normal response of an organism to any injury. It is a complex tissue reaction involving a series of biochemical events, triggered by cellular damage and characterized by redness, warmth, swelling, pain and loss of function. Damaged tissue is repaired and reshaped. When inflammation occurs, damaged tissue in a living organism is repaired and remodeled. While inflammation is a protective measure taken by the body to eliminate harmful stimuli, it can cause damage if left uncontrolled. Uncontrolled inflammation is causes of rheumatoid arthritis, diabetes, neurodegenerative diseases (Alzheimer's disease, etc), cancer and atherosclerosis, as well as pulmonary, autoimmune, and cardiovascular diseases. Anti-inflammatory drugs are used to control inflammation. Anti-inflammatory drugs that can interfere with the inflammatory process are important in treatment. Disadvantages such as the high cost and side effects of the current anti-inflammatory drugs lead researchers to search for new alternative drugs. *in vitro* and *in vivo* methods are frequently used as the first step in evaluating the effect of the agent thought to be anti-inflammatory. Among the *in vitro* methods, the most frequently used methods are cytokine quantification, Western Blot analysis and intracellular oxidative stress determination, while among the *in vivo* methods, carrageenan-induced paw edema and croton oil-induced ear edema experimental models are used. In the present review, information about *in vitro* and *in vivo* methods used in the evaluation of anti-inflammatory effect is given, considering that it will guide to young researchers.

Keywords: Inflammation; anti-inflammatory agents; cytokines

KAYNAK GÖSTERMEK İÇİN:
Erdem H, Doğan Z, Saraçoğlu İ. Antiinflamatuar etkinin değerlendirilmesinde kullanılan *in vitro* ve *in vivo* yöntemler: Geleneksel derleme. J Lit Pharm Sci. 2025;14(2):54-67.

Correspondence: Hilal ERDEM
Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Eczacılık Meslek Bilimleri Bölümü, Farmakognozi AD, Tokat, Türkiye
E-mail: hilal.bacanak@hacettepe.edu.tr

Peer review under responsibility of Journal of Literature Pharmacy Sciences.

Received: 10 Dec 2024 ***Received in revised form:*** 25 Mar 2025 ***Accepted:*** 09 Jul 2025 ***Available online:*** 12 Aug 2025

2630-5569 / Copyright © 2025 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; yabancı bir etkene karşı immün sistemin cevabı olarak tanımlanmaktadır. Bu etken patojenler (bakteri, virüs, mantar gibi), ultraviyole (UV) ışınları, yaralanmalar, kimyasal irritanlar gibi çok çeşitli olabilmektedir.[1] İnflamasyon akut ve kronik inflamasyon olmak üzere 2'ye ayrılmaktadır. Akut bir inflamatuar yanıt, kızarıklık, şişlik, ısı artışı, ağrı ve bazen de fonksiyon kaybı ile karakterizedir. İnflamatuar yanıt sırasında vasküler geçirgenlik artmakta, kan akışı hızlanmakta ve sinir liflerinde hassasiyet oluşmaktadır. Oluşan bu yanıtın kontrollü ilerlemesi zararlı uyaranın yok edilmesini ve normal fizyolojinin devamını sağlayan faydalı bir süreçtir. Kronik inflamasyonda ise inflamatuar yanıt kontrollü değildir ve uzun sürer. İnflamasyonlu dokuda sürekli devam eden bir doku hasarı ve iyileşme süreci görülmektedir. İnflamasyon kontrol edilemezse, inflamatuar bağırsak hastalığı, sedef hastalığı, otoimmün hastalıklar, romatoid artrit, multiple skleroz, astım ve kanser gibi çok sayıda hastalığın ortaya çıkmasına sebep olabilir.[2]

İnflamatuar yanıtlar, kan lökositlerinin birikmesi, doku makrofaj aktivasyonu ve bir seri mediyatörün üretimi ile tetiklenir.[3] İnflamasyonda ilk olarak vasküler geçirgenlik artmakta, lökositler damar dışına çıkmakta ve hasarlı bölgeye göç etmektedir. Ardından granülom olmakta ve doku onarımı gerçekleşmektedir. Araşidonik asit metabolitleri, adezyon molekülleri, sitokinler, kemokinler ve trombosit aktive edici faktör diğer mediyatörlerin salınımını sağlamakta ve kemotaksiyi başlatmaktadır. Kompleman proteinleri ve pıhtılaşma sistemi, inflamatuar mediyatörlerin üretimini uyarmaktadır. Kompleman proteinleri ve kininler gibi çeşitli inflamatuar aracılar plazmada bulunurken; histamin, prostaglandinler ve sitokinler hücrelerden kaynaklanmaktadır.[2] İnterlökin-1β (IL-1β), interlökin-6 ve tümör nekroz faktörü-α (TNF-α) gibi sitokinler birincil uyaran görevi görmekte ve toll benzeri reseptörler (TBR) ile etkileşime girerek inflamasyonu başlatmaktadırlar. Bu sırada reseptörler uyarılmaktadır. Reseptörlerin uyarılmasından sonra nükleer faktör kappa-B (NF-κB), mitojenle aktive olan protein kinaz (MAPK) ve janus kinaz inhibitörleri gibi önemli sinyal yolakları aktive olmaktadır.[3]

İnflamasyon vücudun bir savunma mekanizmasıdır. İnflamasyona neden olan etkeni yok etmek, ortamdan uzaklaştırmak ve hasar gören dokuyu tamir etmek amaçlanmaktadır. Fakat inflamasyonun artığı ve bu savunma mekanizmasının vücuda yarardan çok zarar verdiği durumlarda inflamatuar cevabın kontrol altına alınması için antiinflamatuar etkili ilaçlar kullanılır. Günümüzde kullanılan antiinflamatuar ilaçlar (streroidal, non-steroidal, immünosupresanlar) inflamasyonun kontrol altına alınmasını sağlasa da özellikle uzun süreli kullanımlarında istenmeyen yan etkileri ortaya çıkmaktadır. Bu nedenle inflamasyonun tedavisinde daha güvenli, kolay erişilebilir ve uygun maliyetli tedavilere duyulan ihtiyaç, doğal kaynaklı ilaçların araştırılmasına yol açmıştır.[4]

Doğal kaynaklardan antiinflamatuar etkili ilaç geliştirme çalışmalarında çeşitli *in vitro* ve *in vivo* yöntemler kullanılmaktadır. Çalışmayı yaparken bu yöntemlerden hangisinin seçileceği oldukça önemlidir.

Bu derlemede, antiinflamatuar etkinin değerlendirilmesinde kullanılan *in vitro* ve *in vivo* deneysel modellerden bahsedilecektir.

ANTİİNFLAMATUAR ETKİNİN DEĞERLENDİRİLMESİNDE KULLANILAN YÖNTEMLER

Antiinflamatuar etkinin değerlendirilmesinde kullanılan yöntemler *in vitro* ve *in vivo* olmak üzere 2 ana başlık altında verilmiştir.

İN VİTRO YÖNTEMLER

MEMBRAN STABİLİZASYONU

İnflamasyon sırasında lökositler, bakterisidal enzimler ve proteazlar gibi lizozomal içeriklerini serbest bırakmakta ve daha fazla doku hasarına neden olmaktadır. Antiinflamatuar bileşikler lizozomal membran stabilitesini sağlayarak lizisi, dolayısıyla inflamasyonu önlemektedir. Eritrosit membranı lizozomal membrana benzerdir ve stabilizasyonu lizozomal membranların stabilizasyonu anlamına gelmektedir. Deneyde eritrositler hipotonik çözelti kullanılarak ya da ısı ile hemoliz edilmektedir. An-

tiinflamatuar etki hemoliz yüzdesi ölçülerek değerlendirilmektedir.[5]

ERİSTROSİT SÜSPANSİYONUN HAZIRLANMASI

Sağlıklı gönüllülerden alınan 3 ml taze kan 3000 rpm'de 10 dk santrifüj edilmektedir. Oluşan süpernatant atılmakta, çöken kırmızı kan hücrelerini çözmek için süpernatant hacmine eşdeğer izotonik NaCl çözeltisi eklenmektedir. Çözünen kırmızı kan hücrelerinin hacmi ölçülerek izotonik sodyum fosfat tamponu (10 mM, pH 7,4) ile %40 h/h olacak şekilde seyreltilmektedir.[6]

HİPOTONİK ÇÖZELTİ İLE ERİTROSİTLERİN HEMOLİZİ

Numuneler 1 ml fosfat tamponu, 2 ml hipotonik tuz çözeltisi, 0,5 ml eritrosit süspansiyonu ve 1 ml test çözeltisini içerecek şekilde hazırlanmaktadır. Kör çözeltisine test çözeltisi yerine tuz çözeltisi eklenmektedir. Numuneler 37 °C'de 30 dk inkübe edildikten sonra 3.000 rpm'de santrifüj edilmektedir. Süpernatant atılıp, hemoglobin içeriğinin absorbansı 560 nm'de ölçülmektedir. İlgili çalışmada referans bileşik olarak diklofenak sodyum (Horizon Bioceuticals Pvt Ltd., Hindistan) tercih edilmiştir.[7]

ISI İLE ERİTROSİTLERİN HEMOLİZİ

Numuneler 1 ml %10'luk eritrosit süspansiyonu ve 1 ml test çözeltisini içerecek şekilde hazırlanmaktadır. Kör çözeltisine test çözeltisi yerine tuz çözeltisi eklenmektedir. Hazırlanan numuneler 56 °C'de 30 dk inkübe edilmektedir. İnkübasyon sonrası deney ortamı soğuduktan sonra 2.500 rpm'de 5 dk santrifüjlenmektedir. Süpernatant alınarak 560 nm'de absorbansı ölçülmektedir. Referans bileşik olarak asetilsalisilik asit ve diklofenak tercih edilmektedir.[8]

FOSFOLİPAZ A_2 İNHİBİSYONUNUN ÖLÇÜMÜ

Fosfolipaz A_2 (FLA_2), fosfolipitleri yağ asitleri ve lizofosfolipitlere hidrolize eden bir enzim grubudur.[9] Serbest bırakılan yağ asidi araşidonik asit olduğunda, siklooksijenaz [cyclooxygenase (COX)] veya lipoksijenaz [lipoxygenase (LOX)] yolakları üzerinden inflamasyon oluşturmaktadır. Bu nedenle FLA_2'nin inhibisyonu inflamasyonun baskılanmasını sağlamaktadır.[10] Deneyde FLA_2 alt tabaka olarak lesitin (3.5 mM), NaTDC (3 mM), NaCl (100 mM), $CaCl_2$ (10 mM), bir kolorimetrik indikatör olan kırmızı fenol (0,055 mM) ve 100 ml su içeren karışım kullanılır. Reaksiyon karışımının pH'sı 7,6'ya ayarlanır; pG-IB, 0,002 µg/µl konsantrasyonda olacak şekilde %10 asetonitril içerisinde çözündürülür. Böylece FLA_2 çözeltisi hazırlanmış olur. 2 µl FLA_2 çözeltisi 2 µl numune çözeltisi ile oda sıcaklığında 20 dk boyunca inkübe edilir. Daha sonra bu karışıma 200 µl FLA_2 substratı eklenir. Kinetik hidroliz 5 dk süreyle spektrofotometrik olarak 558 nm'de takip edilir.[11]

COX VE LOX İNHİBİSYONUNUN ÖLÇÜMÜ

Araşidonik asit vücutta COX ve LOX olmak üzere 2 ana enzim yolağıyla uyarılmaktadır. Proinflamatuar enzimler olarak da bilinen bu enzimler, İnflamasyona neden olan lökotrienler, prostaglandinler ve tromboksan dâhil olmak üzere eikozanoidlerin fizyolojik üretimi için gereklidir. Dolayısıyla COX ve LOX enzim yolaklarının inhibisyonu araşidonik asit metabolizmasını, dolayısıyla inflamasyonu önlemektedir.[12]

COX enzim aktivitesi, prostaglandin E_2'nin prostaglandin H_2'ye indirgenmesi sırasında N,N,N',N'-tetrametil-*p*-fenilendiamin'in (TMPD) okside olması ile değerlendirilmektedir. Oksidasyonun derecesi kolorimetrik yöntemle ölçülmektedir. Ölçümü yapılacak numune çözeltisi Tris-HCl tamponu (5 mM, pH 8.0), EDTA (5 mM), hematin (5 mM) ve enzim (COX-1 veya COX-2) ile karıştırıldıktan sonra 25 ºC'de 5 dk inkübe edilmektedir. Ardından araşidonik asit ve TMPD'nin eklenmesiyle reaksiyon başlatılmaktadır. Enzim aktivitesi 610 nm'deki kolorimetrik ölçümle tayin edilmektedir. Enzimin inhibitör etkisi numune çözeltilerinin absorbansının, kör absorbansı ile karşılaştırılması ile tayin edilmektedir.[13]

LOX oksijen tüketen bir enzimdir ve reaksiyon ortamındaki oksijen konsantrasyonunu azaltmaktadır. Bu nedenle reaksiyon ortamındaki oksijenin azalma hızı LOX enzim aktivitesinin ölçüsüdür. LOX enzim aktivitesi, Clark'ın oksijen elektrodu ile pola-

rografik yöntem kullanılarak ölçülmektedir. Reaksiyon karışımı, 30 µl numune çözeltisi, 50-100 µl enzim, 10 µl araşidonik asit (40 mM) içermektedir. Son hacim 3 ml olacak şekilde potasyum fosfat tamponu (100 mM, pH 6,3) ile tamamlanmaktadır. Aktivite, birim/mg protein olarak ifade edilmektedir. Burada bir birim, dk'da tüketilen bir mikromol oksijen olarak tanımlanmaktadır. Sonuç olarak aktivite, dakikada tüketilen mikromol oksijen/mg protein cinsinden ifade edilmektedir.[14]

ANTİKOMPLEMAN ETKİ TAYİNİ

Kompleman sistem, doğal bağışıklık sisteminin önemli bir bileşenidir. Doğal bağışıklık ve kazanılmış bağışıklık arasında köprü görevi görmektedir.[15] Homeostazis, inflamasyon ve patojenlere karşı savunmada önemli bir işleve sahiptir. Serumda, doku sıvısında ve hücre zarlarının yüzeyinde bulunan enzim benzeri etkilere sahip 30'dan fazla proteinden oluşmaktadır. Kompleman sistem bileşenleri ısıya dayanıklı değildir.[16] Membrana bağlı düzenleyiciler ve reseptörlerin yanı sıra, bağışıklık sisteminin çeşitli hücreleri ve aracıları ile etkileşime girmektedirler. Bu etkileşimler, patofizyolojik duruma göre değişmekte ve farklı aşamalarda ortaya çıkmaktadır.[17] Kompleman sistemin aktivasyonu klasik yol, alternatif yol ve lektin yolu olmak üzere 3 farklı yoldan gerçekleşebilmektedir. Bu 3 yol C3'te (kanda en çok bulunan kompleman proteini) birleşmekte ve C3a, C3b, C5a aktivasyon ürünlerinin ve membran saldırı kompleksinin (C5b-9) oluşmasıyla sona ermektedir.[18] Antikompleman etki tayini klasik yol ve alternatif yol üzerinden yapılabilmektedir. Klasik yol için NaCl (145 mM, pH 7,3), dietilbarbitürik asit (4 mM), Ca^{2+} (0,25 mM), Mg^{2+} (0,83 mM), %0,1 jelatin ve %0,02 NaN_3 içeren barbital tamponu kullanılmaktadır. Alternatif yol için ise için yine NaCI (145 mM, pH 7,3), dietilbarbitürik asit (4 mM), $MgCI_2$ (7 mM), egtazik asit (EGTA) (10 mM), %0,1 jelatin ve %0,02 NaN_3 içeren barbital tamponu kullanılmaktadır. Numune, duyarlılaştırılmış koyun eritrositleri veya tavşan eritrositleri ile 37 °C'de 15 dk inkübe edilmektedir. Antikoagülan olarak EDTA varlığında koyun kırmızı kan hücresi, eritrosit veya insan plazması eklenmektedir. Alternatif yol için 30 dk, klasik yol için 60 dk 37 °C'de inkübasyon yapılmaktadır. Ortama EDTA (10 mM) içeren barbital tamponu eklenerek reaksiyon durdurulmaktadır. Eritrosit içeren çözelti 10 dk 1.600 rpm'de santrifüjlenmekte ve böylece eritrositler elde edilmektedir. Spektrofotometrede komplemanla parçalanan eritrositlerden salınan hemoglobin, 412 nm'de ölçülmektedir. Klasik yol ve alternatif yol için eritrositlerin %50'sini parçalamak için gerekli olan kompleman miktarını belirten değerler sırasıyla CH_{50} ve AH_{50}'dir. Numunenin CH_{50} ve AH_{50} değerleri üzerindeki etkisi ile antikompleman etki tayini yapılmaktadır.[19]

SİTOKİNLERİN MİKTAR TAYİNİ

İnflamasyon durumunda, makrofajlar lipopolisakkarit (LPS) gibi çeşitli uyaranlar tarafından uyarılmaktadır. Uyarılan makrofajlar, sitokinler (IL-1β, TNF-α vb.), nitrik oksit (NO) ve prostaglandinler gibi birçok inflamatuar aracıyı üretmektedir. Sitokinler hem akut hem de kronik İnflamasyona katılan, 30 kDa boyutunda, düşük moleküler ağırlıklı glikoproteinlerdir. Sitokinler hücre iletişiminde önemlidir ve hücreden hücreye iletilen sinyallerde görev almaktadır.[3]

TNF, hücrenin hayatta kalması, hücresel farklılaşma, inflamatuar tepkiler ve apoptoz için sinyal yolaklarını aktive eden çok işlevli bir sitokindir. Diğer sitokinler arasında haberleşmeyi sağlayan önemli bir İnflamasyon aracısıdır. TNF, TNF-α ve TNF-β olmak üzere 2 moleküler türe ayrılmakta ve interferonlar tarafından aktive edilmektedir.[3]

IL'ler, immün modülasyonda önemli rol oynayan diğer bir sitokin sınıfıdır. Bunlar arasında IL-1, reaktif oksijen türleri ve reaktif nitrojen türleri, kemokinler ve matriks metalloproteinazlar gibi inflamatuar moleküllerin sentezinde rol oynamaktadır. IL-1α ve IL-1β olmak üzere 2 tipi bulunmaktadır. IL-1α sitozol veya hücre zarında bulunmakta ve hücre içi ortamda çalışmaktadır. IL-1β, IL-1β dönüştürücü enzim tarafından aktif formuna dönüştürüldükten sonra hücre dışına salgılanmaktadır.[20]

Kemokinler, kimyasal çekici özelliğe sahip sitokinlerdir. Hücrenin hareketliliği, hayatta kalması, immünolojik ve inflamatuar reaksiyonlar sırasında hücre dışı matriks ile etkileşimler gibi birçok olayda yer almaktadır.[20]

Uyarılan makrofajlar sitokinler gibi indüklenebilir nitrik oksit sentaz (iNOS) enzimini de aktive etmekte ve enzim NO üretmeye başlamaktadır.[21] NO, enfeksiyon etkeni mikroorganizma ve parazitler üzerinde öldürücü etkiye sahiptir. Ancak NO aşırı üretildiğinde, birçok immünolojik reaksiyonla birlikte doku hasarına neden olmaktadır. NO sentezini inhibe eden veya oluşumunu azaltan bileşikler antiinflamatuar etkide önemli role sahiptir.[22] Bu nedenle antiinflamatuar etkinliği araştırılan bileşiklerin NO miktarı üzerindeki etkisi incelenmektedir.

Sitokinlerin ve NO'nun makrofaj hücrelerinin LPS ile uyarılması sonucu sentezi artmaktadır. Sitokinlerin sentezini inhibe eden ya da azaltan bileşikler antiinflamatuar aktiviteye sahiptirler. Dolayısıyla antiinflamatuar aktivitesi bilinmeyen bileşiklerin, bu sitokinler üzerindeki etkisi incelenerek aktif olup olmadıkları belirlenmektedir.[23]

RAW 264,7 hücreleri, %10 fetal sığır serumu [fetal bovine serum (FBS)] ve %1 antibiyotik içeren Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) vasatında 10^5-10^6 hücre/ml aralığında değişen konsantrasyonlarda 6 kuyucuklu plakalara ekilmektedir. Hücreler 24 saat 37 °C'de ve %5 CO_2 içeren inkübatörde bekletilerek hücrelerin çoğalmaları sağlanmaktadır. Sürenin sonunda kuyucuklardaki vasat uzaklaştırılarak yerine numunelerin vasat içerisinde hazırlanmış farklı konsantrasyonlarını içeren çözeltilerinden 100'er µl ve LPS (2 µg/ml) çözeltisinden 100 µl eklenmektedir. Hücreler 24 saat daha inkübasyona bırakılmaktadır. NO miktar tayini için inkübasyon sonunda, kuyucuklardaki vasatın 100 µl'si bir başka plakaya alınmakta ve üzerine 100 µl Griess reaktifi ilave edilmektedir. 10 dk sonra 577 nm'de absorbansları ölçülerek NO miktarı belirlenmektedir. Sitokinlerin miktar tayini için inkübasyonun sonunda "Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay" kiti kullanılmaktadır. Kitin belirlediği adımlar takip edilerek sitokinlerin miktar tayinleri gerçekleştirilmektedir.[24]

WESTERN BLOT ANALİZİ

iNOS, COX-2 ve NF-κB, MAPK, c-Jun N-terminal kinaz (JNK) ve ekstrasellüler sinyalle düzenlenen kinaz protein seviyelerinin ölçümünde Western Blot yöntemi kullanılmaktadır.[25] RAW 264.7 hücreleri, 10^5-10^6 hücre/ml aralığında değişen konsantrasyonlarda 6 kuyucuklu plakalara ya da 60 mm petri kaplarına ekilmektedir. Daha sonra kuyucuklara ya da petri kaplarına numune çözeltileri eklenmektedir. Hücreler 1 µg/mL konsantrasyonda LPS kullanılarak uyarılmaktadır. 6 saat sonra hücreler kaldırılıp, fosfat tamponu [Phosphate Buffered Saline (PBS)] ile yıkama işlemi yapılmakta ve 4 °C'de 1.200 rpm'de santrifüj edilmektedir. Çöken hücreler, 4 °C'de 40 dk boyunca fosfataz ve proteaz inhibitör karışımı içeren radyo immuno presipitasyon lizis tamponu (3 ml/g) ile parçalanmaktadır. Tüm hücre lizatlarını elde etmek için hücreler 4 °C'de 12.000 rpm'de santrifüjlenmektedir. Protein miktarı, üreticinin talimatlarına göre protein analiz kiti kullanılarak ölçülmektedir. Proteinler %7,5 (iNOS) veya %12 (NF-κB ve COX-2) poliakrilamit jelleri içindeki kuyulara yüklenmekte ve elektroforez işlemine tabii tutulmaktadır. Ayrılan proteinler poliviniliden diflorür membrana aktarılmaktadır. Membran %5-10 yağsız süt tozu ile bloklanmaktadır. iNOS, NF-κB, COX-2, p38 MAPK, JNK, ERK1/2 antikorları ile gece boyunca 4 °C'de tutulmaktadır. Daha sonra primer antikor ile uyumlu sekonder antikorlar ile 25 °C'de 1 saat inkübe edilmektedir. Görüntüleme için membranlar gelişmiş ışınlama reaktifleri kiti ile muamele edilmektedir. Görüntülerin analizi Image J (National Institutes of Health, ABD) gibi programlar kullanılarak yapılmaktadır.[24,26]

İNOS ENZİM İNHİBİSYONUNUN DEĞERLENDİRİLMESİ

NO, nitrik oksit sentaz (NOS) enzimi ile sentezlenmektedir. NOS enziminin bilinen 3 alt tipi vardır: Nöronal nitrik oksit sentaz (nNOS), endotelyal oksit sentaz ve iNOS. nNOS kalsiyuma bağımlı bir enzimken iNOS kalsiyumdan bağımsız bir enzimdir. LPS gibi proinflamatuar sitokinler ve kimyasal uyaranlar iNOS'u indükleyerek NO üretimini artırmaktadır. iNOS enziminin inhibe edilmesiyle NO üretimi durmaktadır. iNOS inhibisyonu, protein ekspresyonunun inhibisyonu ve/veya iNOS enzimatik etkisinin inhibisyonu yoluyla olmaktadır. Antiinflamatuar etkiye sahip olduğu düşünülen bileşiklerin iNOS inhibisyonu üzerindeki etkisi değerlendirilmektedir.[27]

NF-κB AKTİVASYONUNUN İNHİBE EDİLMESİ

NF-κB, p50 ve p65 olmak üzere 2 alt birimden oluşan bir transkripsiyon faktörüdür. İnaktif durumda sitoplazmada bulunmaktadır. İnflamatuar bir uyaran tarafından aktive edildiğinde COX-2, iNOS, sitokinler gibi inflamatuar mediyatörleri kodlayan çekirdekteki gen promotör bölgesine translokasyon yapmaktadır.[20] NF-κB sinyal yolağının farklı aşamalarda durdurularak NF-κB aktivasyonunun inhibe edilmesiyle antiinflamatuar aktivite sağlanmaktadır. Bu nedenle bir bileşiğin antiinflamatuar etkinliği, NF-κB sinyal yolağı üzerindeki etkisi üzerinden incelenebilmektedir.[28]

MAPK SİNYAL YOLAĞININ İNHİBİSYONU

MAPK'ler, ozmotik stres, mitojenler, ısı ve inflamatuar sitokinler gibi çeşitli uyaranlara hücresel tepkileri yönlendiren bir protein kinaz ailesidir. Hücre proliferasyonunu, farklılaşmasını ve apoptozu düzenlemektedirler. ERK, p38 MAP ve JNK'yi içermektedirler. ERK'ler genellikle mitojenler ve farklılaşma sinyalleri tarafından aktive edilirken, JNK ve p38 MAP inflamatuar ajanın yanı sıra çevresel ve genotoksik uyaranlar tarafından da aktive edilmektedir.[29,30] ERK, ERK1 ve ERK2 olmak üzere 2 formda bulunmaktadır. Ayrıca ERK3, ERK4, ERK5 ve ERK7 dâhil olmak üzere çeşitli atipik ERK formları da vardır. ERK1/2 sinyal yolu, hücrenin çoğalması, büyümesi, farklılaşması, hücre göçü, metabolizma ve transkripsiyon gibi çeşitli olaylarda rol oynamaktadır.[31] p38 MAPK ve JNK'ler de ERK'ler gibi hücre proliferasyonu, farklılaşması, hücrenin hayatta kalması ve spesifik hücre tiplerinin göçünü kontrol etmektedir. Ayrıca doku homeostazisinde ve İnflamasyonda önemli rollere sahiptirler.[30]

TBR İNHİBİSYONU

Patojenle ilişkili moleküller ekzojen cisimlerde ve patojenlerde bulunan ve bağışıklık hücreleri tarafından tanınan çeşitli molekül türleridir.[20] Bu moleküller, model tanıma reseptörleri (MTR) tarafından tanınmakta ve inflamatuar yanıtı tetiklemektedirler. MTR'nin TBR, C tipi lektin reseptörleri, retinoik asit ile indüklenebilir gen-I benzeri reseptörler ve nükleotid bağlayıcı oligomerizasyon alanı benzeri reseptörler gibi alt sınıfları bulunmaktadır. TBR, MTR'ler arasında üzerinde en çok çalışma bulunan gruptur. İnflamatuar yanıtın aktivasyonuna katılan transmembran proteinleridir.[29] TBR'lerin inhibisyonu üzerinden antiinflamatuar etkinin değerlendirilmesinde Gerçek Zamanlı Kantitatif Revers Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu [Real-Time Quantitative Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (qRT-PCR)] sıklıkla tercih edilmektedir.[32-34]

Gerçek Zamanlı Kantitatif Revers Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu PCR, ilk defa 1980'lerde Dr. Kary Mullis tarafından ortaya konmuştur. Yirminci yüzyılın en büyük bilimsel keşiflerinden biri olarak kabul edilmektedir. DNA'nın seçilen bir bölgesini tanımak ve milyonlarca kopyasını hızlı ve doğru bir şekilde çoğaltmak için kullanılan bir yöntemdir. PCR'nin kullanımı moleküler biyoloji, genetik ve bulaşıcı hastalıkların tanısı ve adli bilimler gibi çok çeşitli alanlarda önemlidir. Bugüne kadar, PCR yöntemini temel alan çeşitli yan teknikler geliştirilmiştir.[35] Gerçek zamanlı PCR veya kantitatif gerçek zamanlı PCR olarak da adlandırılan kantitatif PCR (qPCR), bir hedef DNA dizisinin amplifikasyonunu reaksiyondaki o DNA türünün konsantrasyonunun ölçümüyle birleştiren bir tekniktir.[36] Ters transkripsiyon qRT-PCR olarak bilinen başka bir teknikte ise, nükleik asit başlangıç şablonu olarak RNA kullanılmaktadır. Bu iki PCR tekniğinin birleşmesi ile qRT-PCR meydana gelmektedir.[35] Günümüzde qRT-PCR mRNA'nın miktarının belirlenmesi için tercih edilen yöntem hâline gelmiştir.[37]

RAW 264,7 hücreleri, LPS ve numune çözeltisi ile 6 kuyucuklu plakalarda 24 saat boyunca inkübe edilmektedir. 24 saatin sonunda toplam RNA, Trizol (Invitrogen, ABD) reaktifi veya bir izolasyon kiti kullanılarak hücrelerden ekstre edilmektedir. RNA'daki genomik DNA kontaminasyonunu önlemek için gDNA silgisi ile işlenmektedir.[32] RNA'nın saflığı ve konsantrasyonu UV spektrofotometre ile ölçülmektedir.[33] 1 µg RNA, kit kullanılarak cRNA'ya ters kopyalanmaktadır.[32] mRNA miktarı, bir floresan DNA bağlama boyası kullanılarak qPCR ile kantitatif ola-

rak analiz edilmektedir.[34] En yaygın kullanılan floresan DNA bağlama boyası SYBR Green I'dir. Bu floresan boya, çift iplikli DNA'ya bağlanmakta ve floresans yaymaktadır. Floresansın yoğunluğu PCR ürününün konsantrasyonuyla orantılı olarak artmaktadır.[35]

HÜCRE İÇİ OKSİDATİF STRES TAYİNİ

Oksidatif stres, reaktif oksijen türlerinin [reactive oxygen species (ROS)] üretimi ile antioksidanların veya radikal temizleyicilerin arasında dengesizlik olduğu durumda meydana gelmektedir. Dış kaynaklardan (çevre kirleticileri gibi) gelen veya vücut içinde ksantin oksidaz [xanthine oxidase (XO)], NOX (NADPH oxidase) veya mitokondriyal yolların aktivasyonu yoluyla) üretilen ROS seviyeleri yüksek olduğunda, vücutta hasara yol açmaktadır. Biyolojik sistemlerde üretilen ROS lipitler, proteinler ve DNA ile kolaylıkla reaksiyona girmekte ve hücre ölümüne neden olmaktadır.

ROS normalde vücutta düşük miktarlarda üretilmektedir. Hücre homeostazisi, sinyal iletimi, gen ekspresyonu ve reseptörlerin aktivasyonu gibi fonksiyonların korunmasını içeren süreçlerin düzenlenmesinde rol oynamaktadır.

ROS çok çeşitli serbest radikalleri, iyonları ve reaktif türleri kapsamaktadır. ROS'un enzimatik kaynakları XO, COX'lar, LOX'lar, miyeloperoksidazlar, sitokrom P450 monooksijenaz, eşlenmemiş NOS, peroksidazlar ve nikotinamid adenin dinükleotit fosfat oksidazdır [nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-NAD(P)H] (NOX). Enzimatik olmayan kaynakları ise elektron taşıma zincirinden sızıntı, serbest demir, ksenobiyotik vb.'dir.

Endotel, inflamatuar ve immün hücreler gibi hücreler tarafından vücut içinde üretilen ROS'un 2 işlevi bulunmaktadır: birincisi redoks sinyal iletimine katılımı, ikincisi ise oksidatif stresteki rolüdür. Düşük seviyede üretilen ROS, biyolojik süreçleri başlatmak için sinyal yollarının aktivasyonunu indüklemekte ve buna redoks sinyal iletimi denmektedir. Oksidatif stres ise, hasara yol açan yüksek seviyede üretilen ROS'u tanımlamaktadır. ROS'un sebep olduğu protein ve DNA hasarları, inflamasyonun merkezinde yer alan sinyallemeyi başlatmaktadır. İnflamatuar yanıtın bir parçası olarak üretilen ROS, enfeksiyona neden olan mikroorganizmaların temizlenmesini sağlamaktadır. Ancak uzun süre üretildiğinde oksidatif stresi ve kronik inflamasyonu uyarmaktadır. Asıl olarak inflamasyon, oksidatif strese neden olsa da oksidatif stresin inflamasyonu başlattığı durum da görülebilmektedir. Kısacası inflamasyon ve oksidatif stres birbiriyle yakından ilişkilidir ve ikisini ayırmadan değerlendirmek daha doğrudur.[38]

Süperoksit anyonu ($O_2^{\bullet-}$), moleküler oksijene 1 elektron eklenmesiyle oluşur. Bu reaksiyon NAD(P)H oksidaz, XO veya mitokondriyal elektron taşıma sistemi tarafından katalize edilir. Hücrede $O_2^{\bullet-}$ temel olarak mitokondride oluşmaktadır. Normalde elektronlar oksijenin suya indirgenmesi için mitokondriyal elektron taşıma sistemine aktarılmaktadır. Fakat elektronların yaklaşık %1-3'ü bu sistemden sızmakta ve $O_2^{\bullet-}$ meydana gelmektedir. NAD(P)H oksidaz lökositlerde, monositlerde ve makrofajlarda bulunmaktadır. Bu hücreler fagositoz sırasında bakterisidal etkiye neden olan bir süperoksit patlaması meydana getirmektedir. $O_2^{\bullet-}$, süperoksit dismutazların (SOD) etkisiyle hidrojen peroksite (H_2O_2) dönüşmektedir. H_2O_2, XO, amino asit oksidaz, NAD(P)H oksidaz gibi enzimler tarafından ve peroksizomlarda metabolik reaksiyonlar sonucu moleküler oksijenin tüketilmesiyle de açığa çıkabilmektedir. H_2O_2, plazma membranından kolayca yayılmaktadır. H_2O_2, Fe^{2+}, Cu^{2+} gibi metallerin varlığında hidroksil anyonuna parçalanabilmektedir.[39]

Bir başka ROS tipi olan hidroksil radikali en reaktif olanıdır. Organizmada proteinler, lipitler, şekerler, amino asitler, metallerle ve DNA ile etkileşmektedir.[40]

Diğer oksijen kaynaklı serbest radikaller peroksil radikalleridir. Bu radikallerin en yaygın biçimi hidroperoksil radikalidir. Bu radikal, yağ asidi peroksidasyonunda rol oynamaktadır. Serbest radikaller, bir yan zincirde yer alan metilen karbonundan bir hidrojen atomunu çıkararak lipid peroksidasyon zincir reaksiyonlarını tetiklemektedir. Lipid radikali daha sonra oksijenle reaksiyona girmekte ve peroksil radikalini meydana getirmektedir.[39]

Lipid peroksitler, 2 veya daha fazla çift bağa sahip çoklu doymamış yağ asitlerinin peroksitlenmesiyle açığa çıkan radikallerdir ve bir ayrışma ürünü olan düşük reaktiviteye sahip malondialdehit (MDA) üretmektedir. MDA'lar proteinler ve nükleik asitler gibi diğer hücresel makromoleküller için oldukça zararlıdırlar. MDA'lar ile nükleik asitlerin etkileşmesi sonucu DNA'nın yapısı bozulmakta ve genlerin ifadelerinde değişimler meydana gelmektedir. Sonuç olarak kanserli hücreler oluşabilmektedir.[41]

Hücreler, ROS'un neden olduğu oksidatif stresi dengelemek için çeşitli antioksidanlara sahiptir. Antioksidanlar, enzimatik ve enzimatik olmayanlar olarak 2'ye ayrılmaktadır. SOD, katalaz, glutatyon peroksidaz (GTPx), glutatyon transferaz enzimatik antioksidanlara örnektir. Askorbik asit (vitamin C), *a*-tokoferol (vitamin E), glutatyon, karotenoitler ve flavonoitler ise enzimatik olmayan antioksidanlara örnektir.[38]

SOD, hücredeki en güçlü ve radikallerin ilk karşılaştıkları antioksidan enzimdir. Görevi, $O_2^{\cdot-}$'yi H_2O_2'ye ve O_2'ye dönüştürmektir. SOD etkisini göstermek için bir metal kofaktörüne ihtiyaç duyan metalloenzimdir. Metal iyonu türüne göre, 3 tip SOD enzimi vardır. Bunlar: Fe-SOD, Mn-SOD ve Cu/Zn-SOD'dir.[42]

Katalaz, neredeyse tüm canlı dokularda yaygın olarak bulunan bir antioksidan enzimdir. Enzimde kofaktör olarak demir veya manganez yer almaktadır. SOD'nin $O_2^{\cdot-}$'yi H_2O_2'ye dönüştürerek oluşturduğu H_2O_2'in H_2O'ya parçalanmasını katalize etmektedir. Oldukça etkili bir enzimdir. Hidrojen peroksit, hücrelerde düşük miktarlarda bulunduğunda hücre çoğalması, hücre ölümü, karbonhidrat metabolizması, mitokondriyal fonksiyonlar, trombosit uyarılması ve normal tiyol redoks dengesinin korunması gibi bazı fizyolojik süreçler için faydalıdır. Fakat yüksek konsantrasyonlarda hücreler için tehdit oluşturmaktadır. Bu nedenle katalaz hücrede yüksek konsantrasyonda bulunan H_2O_2'i parçalayarak fizyolojik süreçlerin sorunsuz bir şekilde ilerlemesini sağlamaktadır.[42]

GTPx, etkisi genellikle selenyum kofaktörüne bağlı olan önemli bir hücre içi enzimdir. Bu nedenle selenosistein peroksidaz olarak da bilinmektedir. Görevi H_2O_2'i H_2O'ya, lipid peroksitleri ise mitokondride ya da sitozolde alkollerine parçalamaktır. Enzim, özellikle lipid peroksidasyon sürecini engellemede önemli bir rol oynamakta bu sayede hücreleri oksidatif stresten korumaktadır. GPx etkisi daha düşük olan bireylerde antioksidan korumanın bozulma eğiliminde olduğu, bu nedenle membran yağ asitleri ve fonksiyonel proteinlerde oksidatif stresten dolayı nörotoksik hasar oluştuğu ileri sürülmüştür. GPx, kanser ve kardiyovasküler hastalıklar dâhil olmak üzere birçok yaygın hastalığın gelişmesinde ve önlenmesinde de rol oynamaktadır.[42]

Aşağıda hücre içi oksidatif stres tayininde kullanılan enzimatik ve enzimatik olmayan yöntemler anlatılmıştır.

SOD, katalaz, MDA gibi biyobelirteçler plazma, kan veya bronkoalveolar sıvı örnekleri kullanılarak ölçülmektedirler.[43-45]

H_2O_2 TARAFINDAN OLUŞTURULMUŞ OKSİDATİF HASARIN TAYİNİ

RAW 264,7 hücreleri, %10 FBS, 10 µg/ml L-glutamin ve %1 antibiyotik içeren DMEM vasatı ile %5 CO_2'li ortamda 37 °C'de inkübasyona bırakılmaktadır. Daha sonra hücreler 10^5 hücre/ml konsantrasyonda 96 kuyucuklu plakalara ekilmekte ve 37 °C'de 24 saat inkübasyona bırakılmaktadır. Bu sürenin sonunda üstteki vasat atılmakta farklı konsantrasyonlarda numune içeren taze vasat kuyucuklara tutunmuş olan hücrelerin üzerine eklenmektedir. Hücreler 24 saat daha inkübe edilmektedir. 24 saatin sonunda üstteki vasat atılmakta negatif kontrol grubu dışında tüm hücrelerin üzerine IC_{50} konsantrasyonunda (IC_{50} konsantrasyonu, hücre canlılığı deneyi ile önceden tespit edilmektedir.) H_2O_2 eklenmektedir. Hücreler 37 °C'de 4 saat boyunca inkübe edilmektedir. Her bir kuyucuğa 20 µl 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür eklenmekte ve plaka 37 °C'de 4 saat daha inkübe edilmektedir. Kuyucuklardaki vasat atılmakta ve kuyucuklara 150 µl dimetil sülfoksit eklenmektedir. Ardından plaka oda sıcaklığında 20 dk çalkalanarak inkübe edilmektedir. Spektrofotometrede 492 nm'de absorbans ölçümü yapılmaktadır.[46]

İnsan endotel hücreleri olan EA.hy926 hücreleri, %10 FBS ve %1 antibiyotik içeren DMEM vasatında %5 CO_2'li ortamda 37 °C'de inkübasyona bırakılmaktadır. Hücre vasatı her 2 günde 1 değiştirilmektedir. Hücre yoğunluğu arttığında stok hücre çözeltisinden hücrenin konsantrasyonu 10^4 hücre/ml olacak şekilde 96 kuyucuklu plakalara ekilmekte ve 12 saat inkübe edilmektedir. Hücrelerde açlık durumunu oluşturmak için %1'lik FBS ve farklı konsantrasyonlarda numune çözeltisi içeren vasatla bir gece boyunca muamele edilmektedir. PBS ile 2 kez yıkandıktan sonra hücreler 30 µM diklorodihidrofluorescein diasetat içeren FBS'siz bir ortamda 37 °C'de 30 dk inkübe edilmektedir. ROS üretimi, 488 nm'de uyarıldıktan sonra 525 nm'de diklorofloresin floresansının floresans yoğunluğu ölçülmektedir.[47]

MDA, SOD, CAT VE GPX

RAW 264,7 hücreleri, %10 FBS içeren RPM 1640 (Hyclone Co. Ltd., ABD) vasatı ile ve %5 CO_2'li ortamda 37 °C'de inkübasyona bırakılmaktadır. Hücre yoğunluğu %80-90'a ulaştığında hücreler $2x10^5$ hücre/ml olacak şekilde 6 kuyucuklu plakaya ekilmektedir. Hücre yoğunluğu %80-90'a ulaştığında süpernatant atılmakta ve hücreler PBS ile yıkanmaktadır. Hücrelerin üzerine kör ve numuneyi farklı konsantrasyonlarda içeren vasat eklenmektedir. 24 saat inkübasyona bırakılmakta daha sonra vasat atılıp hücreler tekrar PBS ile yıkanmaktadır. Hücreler kit talimatlarına göre parçalanmakta ve süpernatant toplanmaktadır. Hücrelerdeki MDA, CAT, SOD ve GPx içerikleri kit talimatlarına göre belirlenmektedir.[48]

İN VİVO YÖNTEMLER

AKUT İNFLAMASYONDA ANTİİNFLAMATUAR ETKİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

KARRAGENAN İLE OLUŞTURULMUŞ PENÇE ÖDEMİ

Karragenan ile oluşturulmuş pençe ödemi deneyi *in vivo* olarak antiinflamatuar etkinin değerlendirilmesinde en sık kullanılan modeldir. Deneyde sıçan ve fareler kullanılır.[49,50] Test çözeltisi oral yoldan hayvana verildikten 30-60 dk sonra hayvanın arka pençesinin subplantar dokusuna 0,1 ml karragenan (%0,1'lik çözelti) enjekte edilmekte ve akut inflamasyon oluşturulmaktadır. Karragenan enjeksiyonundan sonra belirli zamanlarda (1, 2, 3, 4, 5. saatler gibi) pençe hacmi ölçülerek antiinflamatuar etki hesaplanmaktadır.[50] Referans bileşik olarak en sık indometazin tercih edilse de selekoksib ve aspirin (Solarbio Science and Technology Co., China) de kullanılabilir. Plasebo olarak karragenan (%0,1'lik çözelti) kullanılabilir.[49-51] Karragenan non-immünojenik, iyi araştırılmış ve yüksek oranda tekrarlanabilirdir. Karragenan ilavesiyle meydana gelen İnflamasyon, akut İnflamasyondur.[52]

FARKLI AJANLAR İLE OLUŞTURULMUŞ PENÇE ÖDEMİ

Karragenan yerine histamin, serotonin, prostaglandin ve bradikinin de kullanılabilmektedir.[53] Histamin, akut İnflamasyonun önemli bir aracısıdır; vasküler geçirgenliği artırmakta ve inflamatuar ajanlarla birlikte inflamasyonu uyarmaktadır. Aynı zamanda hücre farklılaşması, çoğalması, hematopoez ve hücre yenilenmesi gibi çeşitli fizyolojik fonksiyonlara da etki etmektedir. Plazma sıvısının ve proteinlerin hücre dışı boşluklara çıkmasına neden olmaktadır. Özellikle H_1, ve H_4 reseptörleri üzerinde etki etmekte, ödem oluşmasını hızlandırmaktadır.[54] Bradikinin de İnflamasyonda önemli bir rol oynamaktadır. Histamin ve prostaglandinler ile birlikte vazodilatasyona neden olmakta ve İnflamasyon oluşturmaktadır.[55] Histamin ya da bradikinin ile oluşturulmuş pençe ödemi deneyleri karragenan ile oluşturulmuş pençe ödemi deneyine alternatif olarak düşünülebilir. Karragenan ile oluşturulmuş pençe ödemi deneyinde farklı olarak karragenan yerine 0,1 ml histamin (%0,1'lik çözelti), serotonin (%0,02'lik çözelti), prostaglandin (1 nmol/pençe çözeltisi) ve bradikinin (10 nmol/pençe çözeltisi) kullanılabilmektedir.[53]

PLÖREZİ

Plörezi, eksudatif bir inflamasyonu temsil etmektedir. Deneyde fare kullanılmaktadır. Hayvana, karragenan, dekstran gibi inflamasyon yapıcı bir ajanın enjekte edilmesiyle inflamasyon oluşturulmaktadır. Plörezi deneyinde, plevral sıvının damar dışına çıkmasını, lökosit göçünü ve biyokimyasal parametreleri ölçmek ve böylece antiinflamatuar etkiyi

değerlendirmek mümkündür.[56,57] Test çözeltisi, hayvanlara oral yoldan uygulandıktan 1 saat sonra hayvanlara İnflamasyon yapıcı ajan (karragenan gibi) intraplevral olarak enjekte edilmektedir. 4 saat sonra hayvanlar öldürülmekte, lökositlerin ve toplam proteinlerin kantitatif analizi yapılmaktadır.[58]

KROTON YAĞI İLE OLUŞTURULMUŞ KULAK ÖDEMİ

Kroton yağı, protein kinaz C'nin aktivasyonuna bağlı olarak lökosit infiltrasyonu ve serbest radikallerin oluşması yoluyla lokal İnflamasyon geliştirmektedir. Bu enzim, fosfolipaz A_2 ve MAPK'ler gibi bir dizi enzimatik yolu indüklemektedir. Trombosit aktivasyon faktörü ve araşidonik asit salgılanmakta dolayısıyla vazodilatasyon oluşmaktadır. Serotonin ve histamin salınımını uyarmakta ve sırasıyla COX ve 5-LOX enzimi yoluyla prostaglandin ve lökotrien üretimini başlatmaktadır.[59] Topikal uygulanan, antiinflamatuar etkisi olduğu düşünülen numunelerin etkinliğini ölçmek için kullanılmaktadır.[60] Deneyde daha çok İsviçre fareleri kullanılmaktadır.[61] Kroton yağının asetondaki çözeltisi hayvanların sağ iç kulak yüzeyine topikal olarak uygulanırken sol kulaklarına sadece aseton çözeltisi uygulanmaktadır. Kroton yağı uygulandıktan sonra sağ kulaklarına test çözeltisi uygulanmaktadır. 1 saat sonra hayvanlar öldürülmekte ve kulaklar kesilmektedir. Her iki kulaktan alınan örneklerin ağırlıkları ölçülerek etki değerlendirilmektedir.[50,62] Referans bileşik olarak deksametazon (Sigma Chemical Co., ABD) ve indomethaazin (Sigma Chemical Co., ABD) sık kullanılmaktadır.[61] Kroton yağı yerine ksilen, sinnamilaldehit, kapsaisin, fenol gibi farklı ajanlar da kullanılabilmektedir.[61,62]

VASKÜLER GEÇİRGENLİK TAYİNİ

İnflamasyon sırasında, plazma bileşenlerinin enfekte dokuya erişmesini kolaylaştırmak için vasküler geçirgenlik artmaktadır. Vasküler geçirgenliğin artması ve ödem oluşmasıyla, plazma bileşenleri damar dışına çıkmaktadır. Histamin, prostaglandin ve serotonin ve diğer inflamatuar mediyatörlerin düzeyinde artış olmaktadır. İnflamasyona bağlı damar geçirgenliğindeki artışın ve inflamasyonlu bölgeye hücre göçünün inhibisyonunun derecesi vasküler geçirgenlik deneyi ile ölçülmektedir.[63] Deney hayvanı olarak sıçan veya fare kullanılmaktadır. Test çözeltisi, hayvanlara oral yoldan uygulandıktan 1 saat sonra hayvanlara intravenöz olarak Evans mavisi enjekte edilmektedir. 30 dk sonra asetik asit, tuzlu su içindeki %0,7'lik çözeltisi halinde intraperitonal olarak uygulanmaktadır. Asetik asit enjeksiyonundan 30 dk sonra hayvanlar öldürülerek Evans mavisinin damarlardan periton sıvısına sızma derecesi spektrofotometrik olarak ölçülmektedir.[64,65]

KARRAGENAN İLE OLUŞTURULMUŞ HAVA KESESİ

Sıçan ya da farenin deri altına karragenan uygulanmasıyla hava kesesi oluşturulmakta ve granülasyon dokusunun çoğalması sağlanmaktadır. Bu durum makrofaj ve lökosit infiltrasyonuna neden olmaktadır.[56] Eksüda protein konsantrasyonu, hayvanlarda karragenanla oluşturulmuş hava kesesinde artan damar geçirgenliğinin bir göstergesi olarak değerlendirilmektedir. Steril hava, hayvanların deri altına 3 gün ara ile 2 kez olacak şekilde enjekte edilmektedir. Altıncı günde, hayvanlara test çözeltisi oral yoldan uygulanmaktadır. 1 saat sonra hava kesesine karragenan enjekte edilmekte ve 24 saat sonra hayvanlar öldürülmektedir. Hava keselerinden eksüdalar toplanmakta ve lökosit sayımı yapılmaktadır Deksametazon, diklofenak sodyum gibi antiinflamatuar ajanlar referans bileşik olarak tercih edilmektedir.[66,67]

KRONİK İNFLAMASYONDA ANTİİNFLAMATUAR ETKİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

PAMUK PELLET ARACILIĞIYLA GRANÜLOM OLUŞTURULMASI

Granülomatöz İnflamasyon, lökositlerin çoğalması ve birikmesi ile karakterize, zayıf çözünür bir maddenin neden olduğu kronik inflamatuar yanıttır. Pamuk pellet aracılığıyla granülom oluşturulması deneyinde hayvanın deri altına pamuk pellet yerleştirilmekte böylece granülom oluşması uyarılmaktadır. Kronik İnflamasyonda antiinflamatuar etkinin incelenmesinde yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir. Kronik İnflamasyonun proliferatif ve transüdatif fazları üzerindeki etkisini ortaya koymaktadır. Deneyde sıçan kullanılmaktadır. Hayvanlara anestezi altında karnının her iki yanına birer tane olmak üzere deri al-

tına, tartılmış, steril, pamuk pellet yerleştirilmektedir. Test çözeltisi 7 gün boyunca günde 1 defa olacak şekilde hayvanlara oral olarak verilmektedir. Sekinci günde yine anestezi altında pamuk pelletler çıkarılmakta 60 °C'de 18 saat tutularak kurutulmaktadır. Kurutulan pamuk pelletler tekrar tartılmakta ve ortalama ağırlığı hesaplanmaktadır. Test çözeltisinin transüdatif ağırlığı, granülom oluşumu ve granülom inhibisyonu yüzdesi hesaplanmaktadır. Referans bileşik olarak diklofenak sodyum gibi antiinflamatuar etkinliğe sahip olduğu bilinen ajanlar kullanılmaktadır.[68]

FORMALİNLE OLUŞTURULMUŞ PENÇE ÖDEMİ

Bu deney modeli, insan artritine benzerlik göstermektedir ve kronik İnflamasyona karşı antiinflamatuar etkinin değerlendirilmesinde kullanılmaktadır. Formalin kaynaklı İnflamasyon bifaziktir. Erken bir nörojenik bileşene P-maddesi ve bradikinin aracılık eder, ardından histamin, 5-hidroksitriptamin, prostaglandinler ve bradikininin dâhil olduğu bilinen doku aracılı bir yanıt gelmektedir.[69] Deney hayvanı olarak sıçan ve fare kullanılmaktadır. Test çözeltisi hayvanlara oral yolla uygulandıktan 1 saat sonra, hayvanların sağ arka patisine formalin enjekte edilmektedir. Hayvanların formalin enjeksiyonundan sonra toplam yalama süresi erken faz (0-5 dk) ve geç faz (10-30 dk) olarak hesaplanmaktadır.[70,71]

Oksidatif stres ve inflamasyon arasındaki ilişki birçok çalışma ile ortaya konmuştur. Oksidatif stresin kronik inflamatuar hastalıklarda patojenik bir rol oynadığını kanıtlanmıştır.[72] Bu nedenle antiinflamatuar etkinin değerlendirildiği *in vivo* deneylerde hayvandan alınan örnekler üzerinde MDA ve antioksidan enzimlerin (SOD, CAT, GPx vb.) konsantrasyonu sıklıkla ölçülmektedir.[73-75]

SONUÇ

İnflamasyon ve inflamasyona bağlı gelişen hastalıklar dünyada sık görülmektedir. Günümüzde inflamasyonun tedavisi için kullanılan çeşitli ilaçlar olsa da güvenlik, etkinlik ve yüksek maliyet gibi nedenlerle yeni antiinflamatuar ilaçlara olan ilgi artmaktadır. Dünyanın birçok yerinde inflamasyonun tedavisinde geleneksel olarak doğal kaynaklar kullanılmaktadır. Özellikle bitkilerin geleneksel kullanımından yola çıkılarak bitkinin kendisinin ya da bitkiden elde edilen aktif bileşiklerin antiinflamatuar ajan olarak kullanılması değerlendirilmektedir. Bu çalışmada, antiinflamatuar etkisi olduğu düşünülen aktif bileşiklerin değerlendirilmesinde kullanılan *in vitro* ve *in vivo* deneyler derlenmiştir.

Finansal Kaynak

Bu çalışma sırasında, yapılan araştırma konusu ile ilgili doğrudan bağlantısı bulunan herhangi bir ilaç firmasından, tıbbi alet, gereç ve malzeme sağlayan ve/veya üreten bir firma veya herhangi bir ticari firmadan, çalışmanın değerlendirme sürecinde, çalışma ile ilgili verilecek kararı olumsuz etkileyebilecek maddi ve/veya manevi herhangi bir destek alınmamıştır.

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: *Hilal Erdem, Zeynep Doğan, İclal Saraçoğlu;* ***Tasarım:*** *Hilal Erdem, Zeynep Doğan, İclal Saraçoğlu;* ***Denetleme/Danışmanlık:*** *Zeynep Doğan, İclal Saraçoğlu;* ***Kaynak Taraması:*** *Hilal Erdem, Zeynep Doğan, İclal Saraçoğlu;* ***Makalenin Yazımı:*** *Hilal Erdem, Zeynep Doğan, İclal Saraçoğlu;* ***Eleştirel İnceleme:*** *Zeynep Doğan, İclal Saraçoğlu.*

KAYNAKLAR

1. Debnath T, Kim DH, Lim BO. Natural products as a source of anti-inflammatory agents associated with inflammatory bowel disease. Molecules. 2013;18(6):7253-70. [Crossref] [PubMed] [PMC]
2. Patil KR, Mahajan UB, Unger BS, Goyal SN, Belemkar S, Surana SJ, et al. Animal models of inflammation for screening of anti-inflammatory drugs: implications for the discovery and development of phytopharmaceuticals. Int J Mol Sci. 2019;20(18):4367. [Crossref] [PubMed] [PMC]
3. Megha KB, Joseph X, Akhil V, Mohanan PV. Cascade of immune mechanism and consequences of inflammatory disorders. Phytomedicine. 2021;91:153712. [PubMed] [PMC]
4. Gupta M, Singh N, Gulati M, Gupta R, Sudhakar K, Kapoor B. Herbal bioactives in treatment of inflammation: an overview. S Afr J Bot. 2021;143:205-25. [Link]
5. El Nashar HAS, Mostafa NM, Eldahshan OA, Singab ANB. A new antidiabetic and anti-inflammatory biflavonoid from Schinus polygama (Cav.) Cabrera leaves. Nat Prod Res. 2022;36(5):1182-90. [Crossref] [PubMed]
6. Anosike CA, Ako AC, Nwodo OFC. Anti-inflammatory and membrane stabilization activities of methanol extract of Cissus aralioides leaves. Res J Pharm Biol Chem Sci. 2018;9(4):18-28. [Link]
7. Singh S, Devi B. Anti-inflammatory activity of Cucumis melo L. subsp. agrestis (Naudin) Pangalo. Int J Pharm Sci Res. 2020;11(8):3819-23. [Crossref]
8. Heydari H, Saltan Işcan G, Eryilmaz M, Bahadir Acikara Ö, Yilmaz Sarialtin S, Tekin M, et al. Antimicrobial and anti-inflammatory activity of some Lathyrus L. (Fabaceae) species growing in Turkey. Turk J Pharm Sci. 2019;16(2):240-5. [PubMed] [PMC]
9. Sato H, Taketomi Y, Murakami M. Metabolic regulation by secreted phospholipase A2. Inflamm Regen. 2016;36:7. [PubMed] [PMC]
10. Lehr M. Phospholipase A2 inhibitors in inflammation. Expert Opin Ther Pat. 2001;11 (7):1123-36. [Crossref]
11. Mohamed Tap F, Abd Majid FA, Ismail HF, Wong TS, Shameli K, Miyake M, et al. In Silico and in vitro study of the bromelain-phytochemical complex inhibition of phospholipase A2 (Pla2). Molecules. 2018;23(1):73. [Crossref] [PubMed] [PMC]
12. Nguyen HT, Vu TY, Chandi V, Polimati H, Tatipamula VB. Dual COX and 5-LOX inhibition by clerodane diterpenes from seeds of Polyalthia longifolia (Sonn.) Thwaites. Sci Rep. 2020;10(1):15965. [Link]
13. Azad R, Babu NK, Gupta AD, Reddanna P. Evaluation of anti-inflammatory and immunomodulatory effects of Premna integrifolia extracts and assay-guided isolation of a COX-2/5-LOX dual inhibitor. Fitoterapia. 2018;131:189-99. [Link]
14. Rajaram A, Vanaja GR, Vyakaranam P, Rachamallu A, Reddy GV, Anilkumar K, et al. Anti-inflammatory profile of Aegle marmelos (L) Correa (Bilva) with special reference to young roots grown in different parts of India. J Ayurveda Integr Med. 2018;9(2):90-8. [PubMed] [PMC]
15. Nesargikar PN, Spiller B, Chavez R. The complement system: history, pathways, cascade and inhibitors. Eur J Microbiol Immunol (Bp). 2012;2(2):103-11. [Crossref] [PubMed] [PMC]
16. Ding X, Qamar A, Liu H. The complement system testing in clinical laboratory. Clin Chim Acta. 2023;541:117238. [PubMed]
17. Markiewski MM, Lambris JD. The role of complement in inflammatory diseases from behind the scenes into the spotlight. Am J Pathol. 2007;171(3):715-27. [Crossref] [PubMed] [PMC]
18. Sarma JV, Ward PA. The complement system. Cell Tissue Res. 2011;343(1):227-35. [PubMed] [PMC]
19. Moon HI, Jung S, Lee YC, Lee JH. Anticomplement activity of isolated compounds from Artemisia montana. Immunopharmacol Immunotoxicol. 2012;34(1):113-5. [Crossref] [PubMed]
20. Tasneem S, Liu B, Li B, Choudhary MI, Wang W. Molecular pharmacology of inflammation: medicinal plants as anti-inflammatory agents. Pharmacol Res. 2019;139:126-40. [Crossref] [PubMed]
21. Xu J, Zhao Y, Aisa HA. Anti-inflammatory effect of pomegranate flower in lipopolysaccharide (LPS)-stimulated RAW264.7 macrophages. Pharm Biol. 2017;55(1):2095-101. [Crossref] [PubMed] [PMC]
22. Song MY, Jung HW, Kang SY, Kim KH, Park YK. Anti-inflammatory effect of Lycii radicis in LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages. Am J Chin Med. 2014;42(4):891-904. [PubMed]
23. Zargar OA, Bashir R, Ganie SA, Hamid R. The effect of Elsholtzia densa methanolic extract modulates inflammation in vitro and in vivo. Orient Pharm Exp Med. 2019;19(1):49-58. [Crossref]
24. Dogan Z, Telli G, Tel BC, Saracoglu I. Scutellaria brevibracteata Stapf and active principles with anti-inflammatory effects through regulation of NF-κB/COX-2/iNOS pathways. Fitoterapia. 2022;158:105159. [Crossref] [PubMed]
25. Özbilgin S, Küpeli Akkol E, Süntar I, Tekin M, Saltan İşcan G. Wound-healing activity of some species of Euphorbia L. Rec Nat Prod. 2018;13(2):104-13. [Link]
26. Kumar A, Kour G, Chibber P, Saroch D, Kumar C, Ahmed Z. Novel alantolactone derivative AL-04 exhibits potential anti-inflammatory activity via modulation of iNOS, COX-2 and NF-κB. Cytokine. 2022;158:155978. [PubMed]
27. Abdel Maksoud MS, El Gamal MI, Gamal El Din MM, Choi Y, Choi J, Shin JS, et al. Synthesis of new triarylpyrazole derivatives possessing terminal sulfonamide moiety and their inhibitory effects on PGE and nitric oxide productions in lipopolysaccharide-induced RAW 264.7 macrophages. Molecules. 2018;23(10):2556. [PubMed] [PMC]
28. Achoui M, Appleton D, Abdulla MA, Awang K, Mohd MA, Mustafa MR. In vitro and in vivo anti-inflammatory activity of 17-O-acetylacuminolide through the inhibition of cytokines, NF-κB translocation and IKKβ activity. PLoS One. 2010;5(12):e15105. [Crossref] [PubMed] [PMC]
29. Chen L, Deng H, Cui H, Fang J, Zuo Z, Deng J, et al. Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs. Oncotarget. 2017;9(6):7204-18. [Crossref] [PubMed] [PMC]
30. Wagner EF, Nebreda AR. Signal integration by JNK and p38 MAPK pathways in cancer development. Nat Rev Cancer. 2009;9(8):537-49. [Crossref] [PubMed]
31. Lu N, Malemud CJ. Extracellular signal-regulated kinase: a regulator of cell growth, inflammation, chondrocyte and bone cell receptor-mediated gene expression. Int J Mol Sci. 2019;20(15):3792. [PubMed] [PMC]
32. Zhang CH, Sheng JQ, Sarsaiya S, Shu FX, Liu TT, Tu XY, et al. The anti-diabetic activities, gut microbiota composition, the anti-inflammatory effects of Scutellaria-coptis herb couple against insulin resistance-model of diabetes involving the toll-like receptor 4 signaling pathway. J Ethnopharmacol. 2019;237:202-14. [PubMed]
33. Chen YX, Zhang XQ, Yu CG, Huang SL, Xie Y, Dou XT, et al. Artesunate exerts protective effects against ulcerative colitis via suppressing Toll‑like receptor 4 and its downstream nuclear factor‑κB signaling pathways. Mol Med Rep. 2019;20(2):1321-32. [PubMed] [PMC]
34. Gao H, Kang N, Hu C, Zhang Z, Xu Q, Liu Y, et al. Ginsenoside Rb1 exerts anti-inflammatory effects in vitro and in vivo by modulating toll-like receptor 4 dimerization and NF-kB/MAPKs signaling pathways. Phytomedicine. 2020;69:153197. [PubMed]
35. Jalali M, Zaborowska J, Jalali M. The polymerase chain reaction: PCR, qPCR and RT-PCR. In Basic Science Methods for Clinical Researchers. 1st ed. London: Academic Press; 2016. p.1-15. [Crossref] [PubMed]

36. Dymond JS. Explanatory chapter: quantitative PCR. Methods Enzymol. 2013;529:279-89. [PubMed]
37. Nolan T, Hands RE, Bustin SA. Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. Nat Protoc. 2006;1(3):1559-82. [PubMed]
38. Chatterjee S. Oxidative stress inflammation and disease. Dziubla T, Butterfield A. Oxidative Stress and Biomaterials. 1st ed. London: Academic Press.; 2016. p.35-58. [Crossref] [PubMed]
39. Birben E, Sahiner UM, Sackesen C, Erzurum S, Kalayci O. Oxidative stress and antioxidant defense. World Allergy Organ J. 2012;5(1):9-19. [Crossref] [PubMed] [PMC]
40. Pisoschi AM, Pop A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: a review. Eur J Med Chem. 2015;97:55-74. [Crossref] [PubMed]
41. Shahreza FD. Oxidative stress, free radicals, kidney disease and plant antioxidants. Immunopathol Persa. 2017;3(2):e11. [Crossref] [PubMed]
42. Ighodaro OM, Akinloye O. A. First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. Alex J Med. 2018;54(4):287-93. [Link]
43. Yilgor A, Demir C. Determination of oxidative stress level and some antioxidant activities in refractory epilepsy patients. Sci Rep. 2024;14(1):6688. [Crossref] [PubMed] [PMC]
44. Cordiano R, Di Gioacchino M, Mangifesta R, Panzera C, Gangemi S, Minciullo PL. Malondialdehyde as a potential oxidative stress marker for allergy-oriented diseases: an update. Molecules. 2023;28(16):5979. [Crossref] [PubMed] [PMC]
45. Krishna H, Avinash K, Shivakumar A, Al Tayar NGS, Shrestha AK. A quantitative method for the detection and validation of catalase activity at physiological concentration in human serum, plasma and erythrocytes. Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc. 2021;251:119358. [Crossref] [PubMed]
46. Mei S, Song X, Wang Y, Wang J, Su S, Zhu J, et al. Studies on protection of astaxanthin from oxidative damage induced by H2O2 in RAW 264.7 cells based on 1H NMR metabolomics. J Agric Food Chem. 2019;67(49):13568-76. [Crossref] [PubMed]
47. Zhang L, Zhang H, Li X, Jia B, Yang Y, Zhou P, et al. Miltirone protects human EA.hy926 endothelial cells from oxidized low-density lipoprotein-derived oxidative stress via a heme oxygenase-1 and MAPK/Nrf2 dependent pathway. Phytomedicine. 2016;23(14):1806-13. [Crossref] [PubMed]
48. Su J, Zhang X, Kan Q, Chu X. Antioxidant activity of acanthopanax senticosus flavonoids in H2O2-induced RAW 264.7 cells and dss-induced colitis in mice. Molecules. 2022;27(9):2872. [Crossref] [PubMed] [PMC]
49. Zhang X, Retyunskiy V, Qiao S, Zhao Y, Tzeng CM. Alloferon-1 ameliorates acute inflammatory responses in λ-carrageenan-induced paw edema in mice. Sci Rep. 2022;12(1):16689. [Crossref] [PubMed] [PMC]
50. Karim N, Khan I, Khan W, Khan I, Khan A, Halim SA, et al. Anti-nociceptive and anti-inflammatory activities of asparacosin a involve selective cyclooxygenase 2 and inflammatory cytokines inhibition: an in-vitro, in-vivo, and in-silico approach. Front Immunol. 2019;10:581. [Crossref] [PubMed] [PMC]
51. Bidian C, Filip GA, David L, Moldovan B, Baldea I, Olteanu D, et al. Viburnum opulus fruit extract-capped gold nanoparticles attenuated oxidative stress and acute inflammation in carrageenan-induced paw edema model. GCLR. 2022;15(2):319-35. [Crossref] [PubMed]
52. Sarkhel S. Evaluation of the anti-inflammatory activities of Quillaja saponaria Mol. saponin extract in mice. Toxicol Rep. 2015;3:1-3. [Crossref] [PubMed] [PMC]
53. Ben IO, Gamey LE, Harley BK, Agyei PEO, Woode E. Effect of Trichilia monadelpha (Thonn.) J. J. de Wilde (Meliaceae) extracts on C-reactive proteins levels and acute inflammation. Sci Afr. 2022;16:e01119. [Crossref] [PubMed]
54. Branco ACCC, Yoshikawa FSY, Pietrobon AJ, Sato MN. Role of histamine in modulating the immune response and inflammation. Mediators inflamm. 2018;2018:9524075. [Crossref] [PubMed] [PMC]
55. Pirahanchi Y, Sharma S. Physiology, Bradykinin. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2025. Available from: [Link]
56. Patel MMuruganathan, Shivalinge Gowda KP. In vivo animal models in preclinical evaluation of antiinflammatory activity-A review. IJPRAS. 2012;1(2):1-5. [Link]
57. Rachmawati H, Safitri D, Pradana AT, Adnyana IK. TPGS-stabilized curcumin nanoparticles exhibit superior effect on carrageenan-induced inflammation in Wistar Rat. Pharmaceutics. 2016;8(3):24. [Crossref] [PubMed] [PMC]
58. Leitão MM, Radai JAS, Ferrari IC, Negrão FJ, Silva Filho SE, Oliveira RJ, et al. Effects of an ethanolic extract and fractions from Piper glabratum (Piperaceae) leaves on pain and inflammation. Regul Toxicol Pharmacol. 2020;117:104762. [Crossref] [PubMed]
59. Sadeghi H, Parishani M, Akbartabar Touri M, Ghavamzadeh M, Jafari Barmak M, Zarezade V, et al. Pramipexole reduces inflammation in the experimental animal models of inflammation. Immunopharmacol Immunotoxicol. 2017;39(2):80-6. [Crossref] [PubMed]
60. Tubaro A, Dri P, Delbello G, Zilli C, Della Loggia R. The croton oil ear test revisited. Agents Actions. 1986;17(3-4):347-9. [Crossref] [PubMed]
61. Camponogara C, Casoti R, Brusco I, Piana M, Boligon AA, Cabrini DA, et al. Tabernaemontana catharinensis leaves exhibit topical anti-inflammatory activity without causing toxicity. J Ethnopharmacol. 2019;231:205-16. [Crossref] [PubMed]
62. Hijazy HHA, Dahran N, Althagafi HA, Alharthi F, Habotta OA, Oyouni AAA, et al. Thymoquinone counteracts oxidative and inflammatory machinery in carrageenan-induced murine paw edema model. Environ Sci Pollut Res Int. 2023;30(6):16597-611. [Crossref] [PubMed]
63. Li CW, Wu XL, Zhao XN, Su ZQ, Chen HM, Wang XF, et al. Anti-inflammatory property of the ethanol extract of the root and rhizome of Pogostemon cablin (Blanco) Benth. Sci World J. 2013;2013:434151. [Crossref] [PubMed] [PMC]
64. Ratnasooriya WD, Jayakody JR, Handunnetti SM, Ratnasooriya CD, Weerasekera KR. Antiinflammatory activity of hot water infusion of nyctanthes arbo-tristis flowers. Indian J Pharm Sci. 2015;77(5):613-9. [Crossref] [PubMed] [PMC]
65. Hassan S, Sajjad N, Khan SU, Gupta S, Bhat MA, Ali R, et al. Dipsacus inermis wall. modulates inflammation by inhibiting NF-κB pathway: an in vitro and in vivo study. J Ethnopharmacol. 2020;254:112710. [Crossref] [PubMed]
66. Mayovi AA, Alabi AO, Oyibo AO, Joseph OO. Antioedematogenic and anti-inflammatory actions of Phragmanthera incana (Schum) Balle leaf in carrageenan-induced inflammation models in rats. Adv Tradit Med. 2021;21(4):701-11. [Crossref] [PubMed]
67. Ahn JH, Park YL, Song AY, Kim WG, Je CY, Jung DH, et al. Water extract of Artemisia scoparia Waldst. & Kitam suppresses LPS-induced cytokine production and NLRP3 inflammasome activation in macrophages and alleviates carrageenan-induced acute inflammation in mice. J Ethnopharmacol. 2021;268:113606. [Crossref] [PubMed]
68. Ashok P, Koti BC, Thippeswamy AH, Tikare VP, Dabadi P, Viswanathaswamy AH. Evaluation of antiinflammatory activity of centratherum anthelminticum (L) kuntze seed. Indian J Pharm Sci. 2010;72(6):697-703. [Crossref] [PubMed] [PMC]
69. Alhadidi KM, Ahmed ZA, Numan IT, Hussain SA. Dose-dependent anti-inflammatory effect of silymarin in experimental animal model of chronic inflammation. Afr J Pharm Pharmacol. 2009;3(5):242-7. [Link]
70. Ariyo OO, Ajayi AM, Ben Azu B, Aderibigbe AO. Anti-nociceptive and anti-inflammatory activities of ethanol extract and fractions of Morus mesozygia Stapf (Moraceae) leaves and its underlying mechanisms in rodents. J Ethnopharmacol. 2020;259:112934. [Crossref] [PubMed]

71. Nascimento WM, Oliveira JRS, Cunha RX, Gambôa DSR, Silva APS, Lima VLM. Evaluation of the treatment of fever, pain and inflammation with Indigofera suffruticosa Miller Leaves Aqueous Extract. J Ethnopharmacol. 2022;287:114958. [Crossref] [PubMed]

72. Hussain T, Tan B, Yin Y, Blachier F, Tossou MC, Rahu N. Oxidative stress and inflammation: what polyphenols can do for us? Oxid Med Cell Longev. 2016;2016:7432797. [Crossref] [PubMed] [PMC]

73. Huang SS, Chiu CS, Lin TH, Lee MM, Lee CY, Chang SJ, et al. Antioxidant and anti-inflammatory activities of aqueous extract of Centipeda minima. J Ethnopharmacol. 2013;147(2):395-405. [Crossref] [PubMed]

74. Patro G, Bhattamisra SK, Mohanty BK, Sahoo HB. In vitro and in vivo antioxidant evaluation and estimation of total phenolic, flavonoidal content of mimosa pudica L. Pharmacognosy Res. 2016;8(1):22-8. [Crossref] [PubMed] [PMC]

75. Agrawal M, Bansal S, Chopra K. Evaluation of the in vitro and in vivo antioxidant potentials of food grade Phycocyanin. J Food Sci Technol. 2021;58(11):4382-90. [Crossref] [PubMed] [PMC]