T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

Tez Yöneticisi
Prof. Dr. Hakan ERBAŞ

İkinci Tez Yöneticisi
Prof. Dr. İlker DIBIRDIK

ENFLAMATUAR BAĞIRSAK HASTALIĞI TEDAVİSİ İÇİN SEMİSENTETİK FİTOKİMYASAL YAPI GELİŞTİRİLMESİ

(Yüksek Lisans Tezi)

Tuğçe Buket ÖZDEMİR

Referans no: 10387363

EDİRNE-2023

T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

Tez Yöneticisi
Prof. Dr. Hakan ERBAŞ

İkinci Tez Yöneticisi
Prof. Dr. İlker DIBIRDIK

ENFLAMATUAR BAĞIRSAK HASTALIĞI TEDAVİSİ İÇİN SEMİSENTETİK FİTOKİMYASAL YAPI GELİŞTİRİLMESİ

(Yüksek Lisans Tezi)

Tuğçe Buket ÖZDEMİR

Destekleyen Kurum: TÜBAP 2021/98

EDİRNE-2023

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca beni her konuda destekleyen değerli danışmanlarım Prof. Dr. Hakan ERBAŞ ve Prof. Dr. İlker DIBIRDIK'a, benden bilgi ve birikimlerini esirgemeyen Tıbbi Biyokimya AD'daki tüm kıymetli hocalarıma, her zaman beni güler yüzle karşılayan Tıbbi Biyokimya AD asistanlarına, bu tezin yürütülebilmesi için proje desteği sağlayan Trakya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimine (TÜBAP, Proje no: 2021/98) teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

GİRİŞ VE AMAÇ **1**
GENEL BİLGİLER **3**
ENFLAMATUAR BAĞIRSAK HASTALIĞI **3**
ENFLAMATUAR BAĞIRSAK HASTALIĞININ TEDAVİSİ **19**
FİTOKİMYASAL YAPILAR **23**
GEREÇ VE YÖNTEMLER **28**
BULGULAR **41**
TARTIŞMA **67**
SONUÇLAR **73**
ÖZET **75**
SUMMARY **76**
KAYNAKLAR **78**
ŞEKİLLER LİSTESİ **100**
ÖZGEÇMİŞ **104**

SİMGE VE KISALTMALAR

CH : Crohn Hastalığı

COX : Cyclooxygenase

DMSO : Dimetil Sülfoksit

EBH : Enflamatuar Bağırsak Hastalığı

ELISA : Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay

FTIR : Fourier-Transform Infrared Spectroscopy

GA : Glikozamin

GAL : Gallik Asit

GİS : Gastrointestinal Sistem

^{1}H-NMR : Proton Nükleer Manyetik Rezonans

H_2O_2 : Hidrojen Peroksit

HT-29 : İnsan Kolon Adenokarsinom Hücre Hattı

BEH : Bağırsak Epitel Hücresi

IL-1β : İnterlökin-1 Beta

IL-6 : İnterlökin-6

IFN-λ : İnterferon Lambda

iNOS : İndüklenebilir Nitrik Oksit Sentaz

JAK : Janus Kinases

LPS : Lipopolisakkarit

MA : Moleküler Ağırlık

MDA : Malondialdehit

MAMM : Mikropla İlişkili Moleküler Modeller

MS : Mass Spectrometry

MTT : (3-(4,5-Dimetiltiyazol-2-il)-2,5- difeniltetrazolyum bromür)

NF-κB : Nükleer Faktör Kappa B

NO : Nitrik Oksit

NSAID : Nonsteroidal Antiinflammatory Drugs

PBS : Fosfat Tamponlu Salin

PRR : Patojen Tanıma Reseptörleri

ROS : Reaktif Oksijen Türleri

SCFA : Kısa Zincirli Yağ Asitleri

SI1 : Gallik asit konjuge glikozamin

SI4 : İndol-2-karboksilik asit konjuge glikozamin

SI6 : 3,5-Dimetoksibenzoik asit konjuge glikozamin

SI9 : 4-Metoksibenzoik asit konjuge glikozamin

STAT : Signal Transducer and Activator of Transcription

T Hücreleri : Adaptif Bağışıklık Hücreleri

Th : T yardımcı hücreleri

TLR : Toll Benzeri Reseptör

TReg : Düzenleyici T Hücresi

TNF-α : Tümör Nekrozis Faktör Alfa

ÜK : Ülseratif Kolit

® : Tescilli Marka

GİRİŞ VE AMAÇ

21. yüzyılın başlarında enflamatuar bağırsak hastalığı (EBH) toplumların giderek batılılaştığı Asya, Güney Amerika ve Afrika'nın yeni sanayileşmiş ülkelerinde görülme sıklığının artmasıyla birlikte küresel bir hastalık haline gelmiştir (1). Avrupa'da 3 milyon kişi EBH' den mustaripken küresel olarak bakıldığında 2017 verilerine göre bu sayının 6.8 milyon kişiye kadar ulaştığı görülmektedir (2,3). EBH, temelde genetik duyarlılık, çevresel faktörler gibi unsurlar ile ilişkilendirilmiştir ve sıklıkla hastaneye yatış, cerrahi girişim gibi prosedürler gerektiren komplikasyonlara neden olur (4). Yapılan çalışmalar kronik enflamasyonun karsinogenez ile ilişkisini destekler niteliktedir bu nedenle uzun süredir devam eden EBH, kolorektal kanser için de bir risk faktörü olarak kabul edilmiştir (5). Buna karşın EBH'nin kesin bir tedavisi bulunmamaktadır.

Enflamatuar bağırsak hastalığı yönetiminde tedavi hedefleri genellikle semptomları en aza indirerek yaşam kalitesini iyileştirmek ve klinik remisyonu sürdürebilmek üzerinedir (6). Yeni sanayileşmiş ülkelerde EBH'nin prevalansının düşük olmasına rağmen bu ülkelerin çoğunda tespit edilen insidanstaki artış göz önüne alındığında hastalıktan etkilenen kişi sayısıyla birlikte antienflamatuar ilaç tüketiminin de artacağı öngörülmektedir (7). EBH için ilaç tedavisi açısından, aminosalisilik asit türevi ilaçlar, kortikosteroidler ve immünosupresanlar olmak üzere başlıca üç tür klasik ilaç vardır. Azatiyoprin ve metotreksat gibi immünosupresanlar ile tedavi sonrasında nükseden hastalar, remicade, humria ve simponi gibi TNF-α (tümör nekrozis faktör alfa) inhibitörü ilaçları ile tedavi edilebilirler. Bununla birlikte, bu ilaçların uzun süreli kullanımı bağışıklığın azalmasına öncülük edebilir ve

enfeksiyonlara yatkınlık, potansiyel peptik ülser, miyopati, davranış değişiklikleri, katarakt riskinde artış dahil olmak üzere birçok yan etkiye sebep olabilir (8).

Klasik tedavi seçeneklerine farklı bir bakış açısı olarak son yıllarda bitki kaynaklı doğal ürünlerin bariz bir yan etkisi olmaksızın bağırsak sağlığına faydalı olduğu kanıtlanmıştır (9). Bu bağlamda polifenoller, terpenoidler, flavonoidler ve alkaloidler gibi çeşitli kimyasal yapıları kapsayan doğal oluşumlu fitokimyasallar EBH tedavisi için alternatif adaylar olarak dikkat çekmektedir. Bu yapıların oksidatif stresin azaltılması, enflamasyonun baskılanması ve hücre proliferasyonu gibi geniş bir aktivite yelpazesini etkilediği, çok sayıda sinyal iletim yolağını modüle ettiği ve apoptozu indüklediği bildirilmiştir. Ek olarak fitokimyasalların çoğunun, ilaç tasarımı ve geliştirmede lider olarak anılan şirketler tarafından üretilen birçok biyoaktif ve terapötik molekülün kaynağı olarak kullanıldığı da bilinmektedir (10,11). Bu veriler, EBH gibi karmaşık ve maliyetli bir hastalığı yönetmek için en iyi yanıtı elde etmeye ve yan etki riskini en aza indirmeye yardımcı olabilecek yüksek etkinlikli, düşük toksisiteye sahip yeni tedavilere yönelik araştırmalara olan ihtiyacı vurgulamaktadır.

Bu çalışmanın amacı da antienflamatuar özellikte bir fitokimyasalın mevcut aktivitesini arttıracak yönde bir türevinin semi-sentetik yollarla geliştirilip izolasyonun sağlanması ve bu yapıların karakterize edildikten sonra in-vitro ortamda etkileyebilecekleri spesifik mekanizmalara yanıtının gözlenmesidir. Bu amaç doğrultusunda semi-sentetik fitokimyasal türevi bileşikler sentezlenerek ‘‘Fourier-Transform Infrared Spectroscopy (FTIR)’’, ‘‘Mass Spectrometry (MS)’’, proton nükleer manyetik rezonans (^{1}H-NMR) gibi yöntemlerle yapısı aydınlatılmıştır. Sonrasında insan kolon adenokarsinom hücre hattı (HT-29) kullanılarak H_2O_2 (hidrojen peroksit) uyarımlı in-vitro EBH modeli oluşturulup elde edilen bileşiklerin hücre viabilitesine etkileri MTT (3-(4,5-Dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür) analizi ile belirlenmiş ve en uygun dozlar tespit edilmiştir. Griess reaksiyonu aracılığıyla HT-29 hücrelerinden salgılanan nitrik oksit (NO) seviyeleri kontrol edildikten sonra sentezlenen bileşiklerin antienflamatuar etkilerini inceleyebilmek için enflamatuar sitokinlerin TNF-α, IL-6 (interlökin-6), IL-1β (interlökin-1 beta) seviyeleri “Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA)” kitleri kullanılarak ölçülmüştür.

Bu çalışmada elde edilen semi-sentetik fitokimyasal yapıların ileri çalışmalar ile desteklenerek ülkemize katma değer sağlayabilecek bir ürüne dönüştürülebileceğini düşünmekteyiz.

GENEL BİLGİLER

ENFLAMATUAR BAĞIRSAK HASTALIĞI

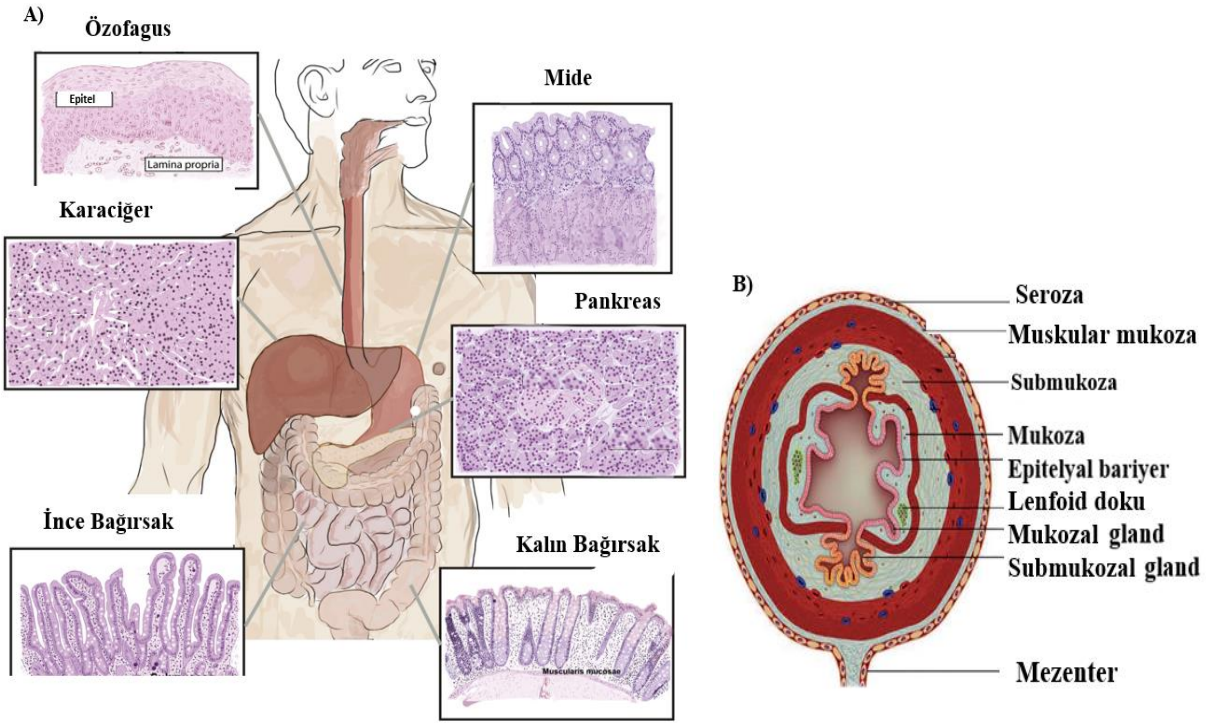
Gastrointestinal sistem (GİS) uzun yıllar boyunca en çok göz ardı edilen birim olmuş fakat mineral ve besin maddelerinin geri emilimi, atıkların vücuttan uzaklaştırılması, patojenlerin ve istenmeyen maddelerin vücuda zarar vermesini engelleyen seçici bir bariyer görevi görmesi gibi işlevleriyle son zamanların önde gelen araştırma konularından olmayı başarmıştır (12).

Yaşam ve tüm metabolik süreçler, doğrudan veya dolaylı olarak GİS'in düzgün çalışmasına bağlıdır. GİS'in ana unsurları ağız boşluğu, yutak, yemek borusu, mide, ince bağırsak, kalın bağırsak, rektum ve anüsten oluşur (13). Besinler sisteme mekanik sindirimin başladığı ağız yoluyla girer ve küçük parçalara ayrılırken tükürük ile karıştırılarak sindirim sistemi boyunca ilerlemesi hızlandırılır (14). Ağızda bolus oluşumu, dişlerin, dilin ve tükürük salgılama mekanizmasının koordineli çabasıyla gerçekleştirilen deformasyon, bozulma ve parçalanma süreçlerini içerir (15). Bolus, yutma işlemi sırasında farinks tarafından ağızdan özofagusa itilir ve yutma sırasında dilin yüzeyinde 10 kPa'lık bir basınç oluşturulabilir. Özofagusun peristaltik kasılmaları bolusu mideye aktarır (16). "J'' şeklinde kaslı bir kese olan midede, sindirilen besinler mekanik ve kimyasal bir parçalanma sürecinden geçer. Uyarıcı ve stimüle edici kompleks mekanizmaları içeren bağırsak aşaması gıdanın varlığı ile başlayan gastrik fazdan 1 ila 3 saat sonra yiyeceklerin mideyi terk etmeye başlamasıyla görevi devralır (17). Yiyecekleri vücudun kullanabileceği uygun biçimlere dönüştüren süreçlerin çoğu,

besinlerin emildiği ince bağırsakta gerçekleşir. İnce bağırsak, gastrointestinal sistemin en uzun (yaklaşık 6-7 m) kısmıdır ve karın boşluğuna sığacak şekilde katlanır (18).

Mide ve kolon arasındaki bağlantıyı sağlayan ince bağırsağın ana bölümleri duodenum, jejunum ve ileumdur. Sinirler ve hormonlar tarafından kontrol edilen salgıların çoğu duodenumda meydana gelirken ince bağırsağın diğer kısımlarında salgılar minimaldir (19). İnce bağırsağın çapı 3–4 cm'dir ancak toplam emici yüzey alanı yaklaşık 4500 metrekareyi bulmaktadır. Mukozanın çok sayıda eş merkezli kıvrımı bu geniş emici yüzeyin oluşmasını sağlar (20). Sonraki adım olan kalın bağırsağın çapı yaklaşık 6 cm'dir ve ince bağırsaktan daha kısadır (yaklaşık 150 cm). Kalın bağırsak, anaerobik bir ortama sahiptir ve esas olarak zorunlu anaerobik bakteriler tarafından oluşturulan bir mikroorganizma topluluğu tarafından kolonize edilir. Su kalın bağırsaktan vücuda emilir ve kalan atık anüs yoluyla uzaklaştırılarak sindirim süreci tamamlanır (21). GİS günde 9 litreye kadar sıvı içeriği salgılayabilir. Bu sıvı; sindirim enzimleri, safra, iyonlar, su ve mukus barındırır. GİS kanalındaki konumlarına bağlı olarak yapı ve işlev bakımından farklılık gösteren epitel hücreleri yapılan salgılama ve emilim işlemlerinde önemli roldedir (22).

Bir güvenlik bariyeri gibi işleyen bağırsak duvarı; seroza, kas mukozası, submukoza ve mukoza olmak üzere dört katmana ayrılır ve epitel hücreleri de içinde barındırır (Şekil 1) (23,24). Mukoza epitel, lamina propria ve muskularis mukozadan oluşan sıkı bağlantı proteinlerinin yardımıyla güçlü bir sızdırmazlık sağlayan en içteki tabakadır. Epitel, lümene mukus ve sindirim enzimleri salgılayan ve gastrointestinal hormonları kana salan ekzokrin bez hücreleri ve endokrin hücreleri içerir. Lamina propriada, küçük kan damarları, sinir lifleri ve lenfatik hücreler/dokular içerir. Muskularis mukoza adı verilen ince kas tabakası mukozal kan akışını ve gastrointestinal sekresyonunu kontrol etmekten sorumludur. Submukoza, içinden geçen submukozal sinir pleksusu adı verilen bir sinir hücreleri ağıyla birlikte ana kan ve lenfatik damarların bulunduğu bir bağ dokusudur. Muskularis eksterna kalın bir kastır ve kasılması bağırsak hareketliliğine (segmentasyon ve peristaltik) katkıda bulunur. Seroza, esas olarak bağ dokularından oluşan ve karın duvarına bağlanan, böylece karın boşluğundaki gastrointestinal yolu destekleyen en dış tabakadır (25-27).



Şekil 1. GİS'in incelenmesi A) GİS ve yardımcı organlarının anatomisi ve histolojisi (28). B) Bağırsak duvarının dört katmanlı (mukoza, submukoza, muskular mukoza ve seroza) organizasyonu (26)

Bariyer bozulduğunda, mukozal geçirgenlikte ortaya çıkan artış, bakteri ve toksinlerin bağırsak lümeninden submukozaya translokasyonuna izin vererek iltihaplanma gelişimini tetikler. Gelişen enflamasyon bariyerin mikro ortamında dengesizliğe ve bağırsak mikrobiyotasının değişmesine neden olur (29,30). Bunun sonucunda GİS bozukluklarına ait tekrarlayan karın ağrısı ve şişkinlik, mide ekşimesi, bulantı, kusma, ishal ve kabızlık gibi semptomlar gözlenebilir (22).

Enflamasyon, homeostatik mekanizmalar yetersiz olduğunda fizyolojik fonksiyonları savunmak ve eski haline getirmek için devreye giren, genellikle tahriş edici ajan ortadan kaldırıldığında düzelen, kendi kendini sınırlayan koruyucu bir tepkidir (31) ve kızarıklık, sıcaklık, şişme, ağrı ve işlev kaybı olmak üzere 5 ana klinik belirti ile tanınır. Bu klinik belirtiler, enflamatuar yanıt sırasında aktive olan biyokimyasal ve hücresel süreçlerle açıklanabilir (32). Yanıt sürecinde insan vücudu, 'kendi' ve 'kendi olmayan' bileşenleri tanımak için bağışıklığa güvenir ve patojenlerin istilasına karşı bu yolla korunur.

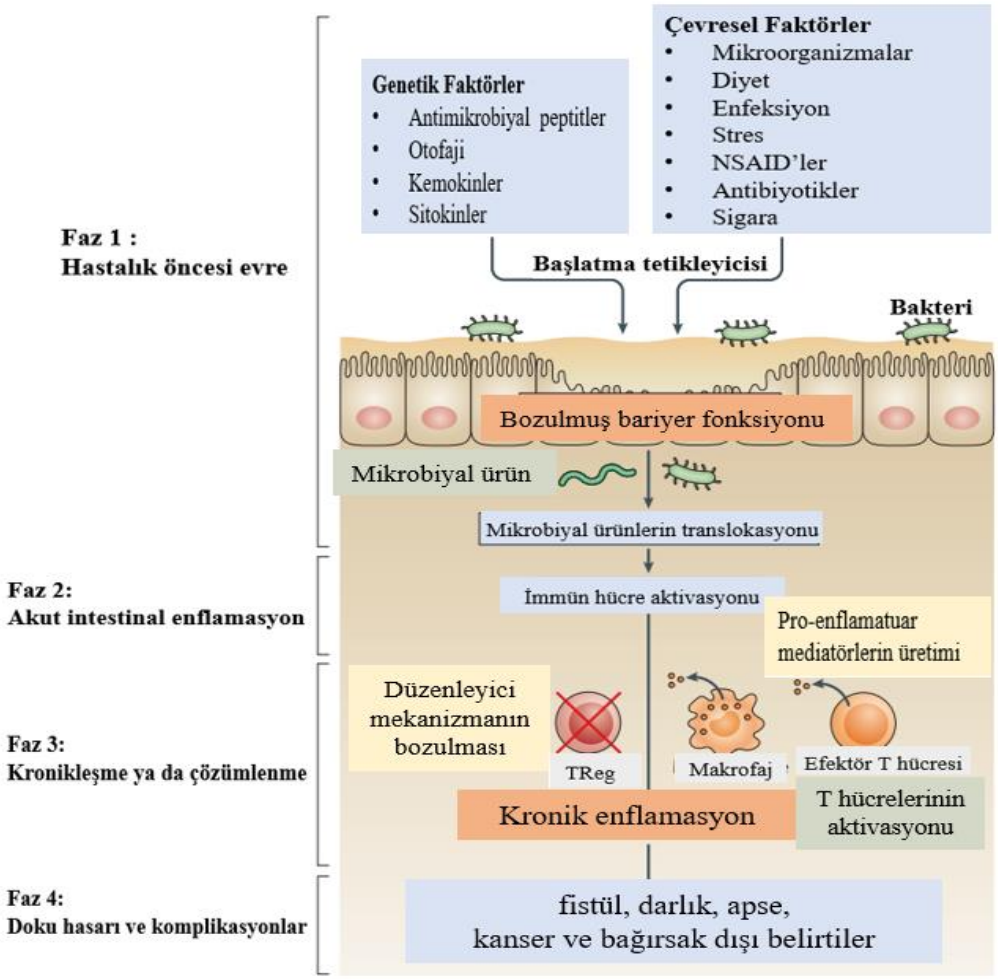
Bağışıklık, insanlarda doğuştan gelen (innate) ve kazanılmış bağışıklık (adaptif) olarak ayrılan fizyolojik işlevlerden biridir (33). Doğuştan gelen bağışıklıkta tanıma işlemine germ

hattı kodlu reseptörler aracılık eder, bu da her reseptörün özgüllüğünün genetik olarak önceden belirlendiği anlamına gelir (34). Ancak sorun şu ki, her organizmanın kendi genomunda kodlayabileceği gen sayısının bir sınırı vardır. Bu nedenle adaptif bağışıklık, doğuştan gelen bağışıklığın bir tamamlayıcısı ve patojen tanıma için kesin bir çözüm olarak görülmüştür (35).

Mikroorganizmalar insan vücudunun normal fizyolojik fonksiyonlarını sürdürmesine yardımcı olur ve bağırsak başta *Bacteroides, Bifidobacterium, Actinomyces, Firmicutes* ve *Proteobacteria* türleri gibi anaerobik bakteriler olmak üzere yaklaşık 1.150 türe ev sahipliği yapar (36-38). Bağırsakların mukozal dokusu, insan vücudunda bulunan bağışıklık sisteminin en büyük bölümünü içerir ve kommensal mikrobiyota veya istilacı patojenler dahil olmak üzere gıda ve mikroorganizmalardan türetilen olağanüstü yüksek bir antijen yüküne maruz kalır (39). Bağışıklık sistemi hücrelerinin yaklaşık %70'ini barındıran bağırsakta sürekli olarak zararsız veya patojenik antijenler arasında ayrım yapılarak antijenlere karşı bir tolerans durumu ile patojenlerle savaşma yeteneği arasında hassas bir denge kurulmuştur (40). Hem doğal hem de adaptif bağışıklık hücreleri bu dengeyi korumak için uyum halinde çalışır.

Modern yaşam tarzının yaygınlaşmasıyla birlikte beslenme alışkanlıklarında görülen değişim bağırsaktaki mikrobiyal dengeyi ve bileşimi büyük ölçüde etkilemiştir. İnsanlar lif içeren dengeli diyetler yerine işlev bozukluğuna ve disbiyoza yol açan yağ ve şeker açısından zengin gıda maddelerini tüketmeye yönelmişlerdir (41,42). İnnate bağışıklık sistemi oral toleransı korurken (43), bağışıklık sisteminin adaptif kolunu tetikleyerek otoimmün hastalığı teşvik etmeye veya inhibe etmeye yönelik sitokinler üretebilir (44).

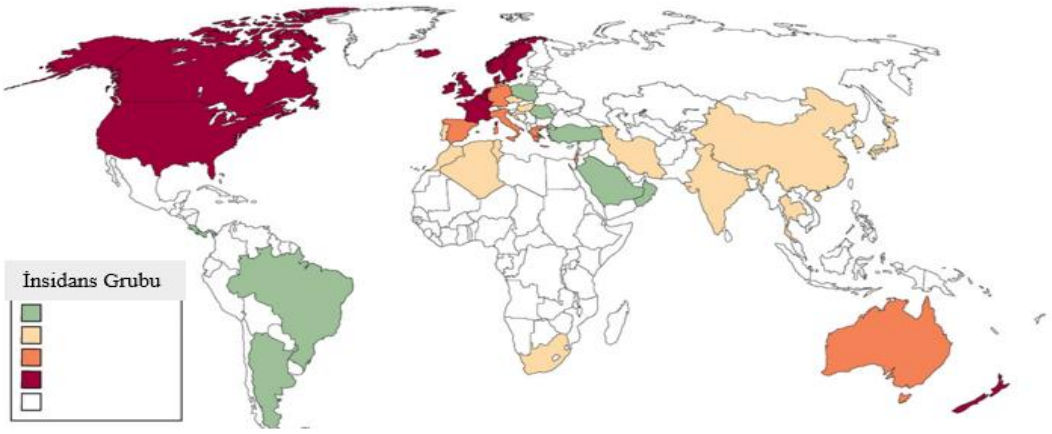
Sitokinler, sinyallerinin karmaşık ve sıkı bir şekilde düzenlenmiş olması ve sinerjistik olarak hareket edebilmeleri nedeniyle etkili bir bağışıklık tepkisinin oluşmasına aracılık eder**.** Sitokinlerin salınım miktarı ve süresi enflamatuar tepkilerin doğasını şekillendirir ve bu tepkiler, koruyucu bağışıklığı harekete geçirmek gibi yararlı veya immünopatolojinin indüklenmesi gibi zararlı olabilir (45). Plazma ve lökositlerin (özellikle granülositlerin) kandan hasarlı dokulara artan yönelimi ile sağlanan akut mukozal enflamasyon, antienflamatuar mekanizmalar ve pro-enflamatuar immün yanıtların baskılanması ile çözülemezse, kronik enflamasyona dönüşür ve doku tahribatına neden olabilir (Şekil 2) (46).



Şekil 2. EBH'nin patogenezi için kavramsal çerçeve (46)

NSAID: ‘‘Nonsteroidal Antiinflammatory Drugs’’; **TReg** : Düzenleyici T hücresi.

Enflamatuar bağırsak hastalığı, tipik olarak Crohn hastalığı (CH) ve ülseratif kolit (ÜK) başta olmak üzere üst ve alt gastrointestinal sistemi tutan, bağışıklık sisteminin disregülasyonunun neden olduğu kronik, tekrarlayan enflamasyon ile karakterize bir hastalık grubudur (47). EBH'nin kesin etiyolojisi henüz tam olarak anlaşılamamıştır. Fakat mevcut çalışmalar risk faktörleri arasında genetik yatkınlık, stres, antibiyotik kullanımı, oral kontraseptif ajanlar, çevresel faktörler, bağırsak mikrobiyomunun disbiyozu ve anormal bağışıklık sistemi işlevi gibi unsurların olduğunu göstermiştir (48,49). Özellikle gelişmiş ülkelerde EBH prevalansı ve insidansı artmasına rağmen (Şekil 3), nadiren ölümcüldür. Bununla birlikte, neden olduğu ağrı, kusma, ishal ve sosyal olarak kabul edilemez diğer semptomlar nedeniyle yaşam kalitesini büyük ölçüde azaltabilir (50). Ek olarak artan kolorektal kanser riski de (yılda %0,5'ten %20'ye kadar) EBH'nin ciddi bir komplikasyonu olarak göze çarpmaktadır (51).



Şekil 3. İnflamatuar barsak hastalığının küresel haritası:

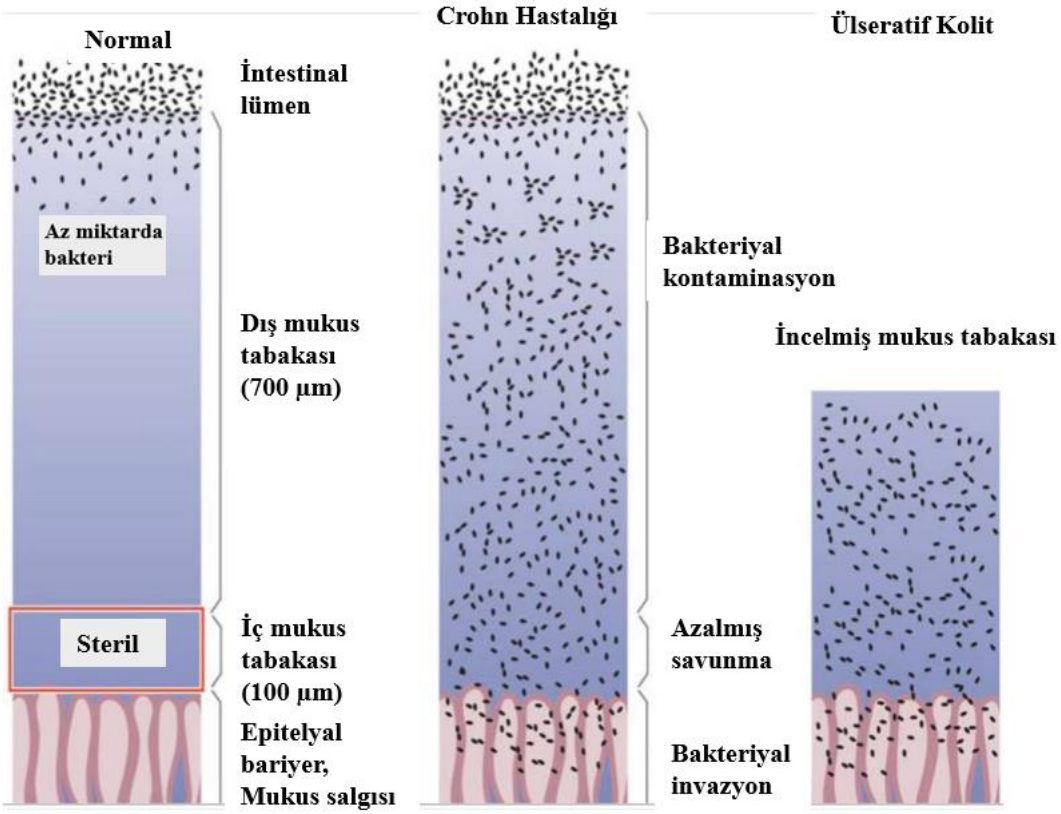
Kırmızı renk: 10/105'ten yüksek yıllık insidansı; **Turuncu renk:** 5–10/105 insidansı; **Yeşil renk:** 4/105'ten az insidansı; **Sarı renk:** Sürekli artan düşük insidansı ifade eder. Rengin olmaması veri olmadığını gösterir (52).

Çocukluk çağında CH erkeklerde daha fazla görülürken, ergenlik dönemine gelindiğinde bu durumun tersine döndüğü ve yetişkinlik döneminde ise kadınlarda daha fazla karşılaşıldığı bilinmektedir. ÜK içinse yaşam boyunca erkeklerde daha fazla görüldüğü tespit edilmiştir (53). Bu açıdan bakıldığında EBH her yaş grubundan her iki cinsiyeti de kapsayan bir sorundur ve tedavi edilmesi hem toplumun yaşam kalitesi hem de sağlık harcamalarının düşürülebilmesi yönünden elzemdir.

Semptomlarıyla yaşamı olumsuz etkileyen EBH'nin teşhisi doğru tedavi seçeneklerinin uygulanabilmesi için mühimdir. Ancak EBH'nin unsurları olan ÜK veya CH'yi tek bir test ile teşhis etmek mümkün değildir. Tanı için medikal öykü, fizik muayene, enflamatuvar parametrelerin kontrolü (c-reaktif protein (CRP) vb.), tam kan sayımı, kalprotektinin dışkıda ölçümü gibi laboratuvar testleri (54) ve endoskopiyle birlikte biyopsinin bir araya gelmesi gerekmektedir (55). Bu bağlamda doku biyopsisi ile endoskopik inceleme, EBH'nin teşhisi ve ayrımı için standart olmaya devam etmektedir. Kolonoskopi, bu amaçla kullanılan en yaygın endoskopik testtir (56). Ancak bu ve benzeri teknikler bağırsak kanalının içindeki ve dışındaki durumları aynı anda inceleyemez ve hastalarda bazı komplikasyonları beraberinde getirebilir. Bu nedenle, BT (bilgisayarlı tomografi) enterografi incelemesi önerilmiştir ve çalışmalar, BT enterografinin lezyonun yayılımının, bağırsağın iç ve dış tutulumunun tüm incelemelerini

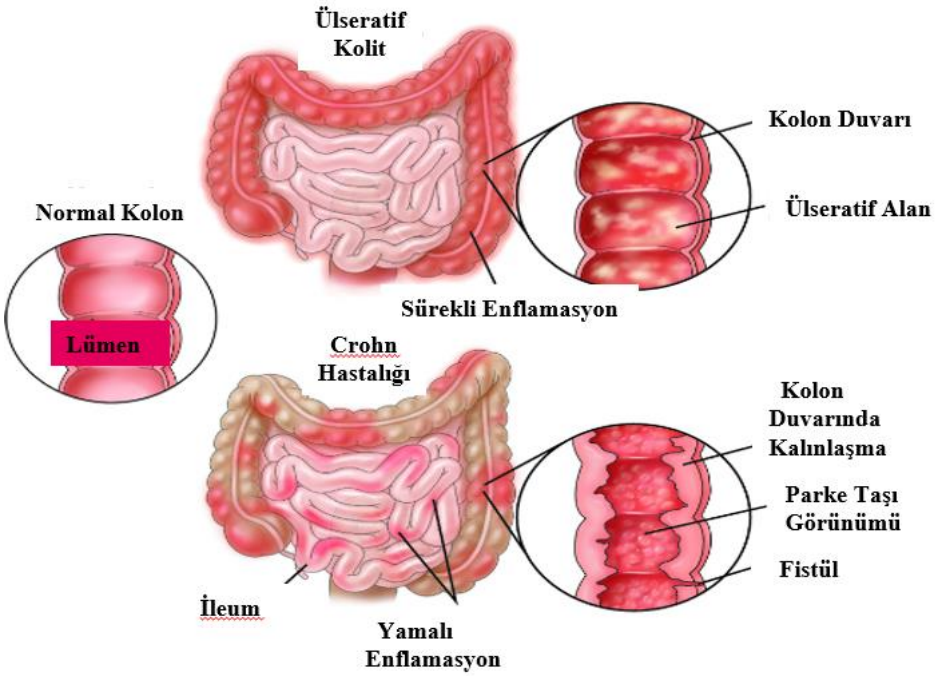
yapabilmede daha etkili olduğunu göstermiştir (57). Bölgeler içinde ve bölgeler arasında enflamatuar değişikliklerin heterojen dağılımı, birkaç farklı anatomik bölgeden çoklu numunelerin incelenmesini zorunlu kılmıştır (58). Bu nedenle EBH'nin güvenilir bir teşhisi için, ileum, kolon ve rektum boyunca en az beş bölgeden en az iki endoskopik biyopsi alınması önerilmektedir (59). Mayo skoru, Montreal klasmanı, ülseratif kolit endoskopik şiddet indeksi, Amerikan gastroenteroloji sınıflandırma kılavuzu, Avrupa Crohn ve Kolit Organizasyonu yönergeleri gibi birçok skorlama ve sınıflandırma sistemi, hastalık aktivitesini ve iyileşme sürecini değerlendirebilmek için yaygın olarak kullanılan indekslerdir (60,61). Bu indekslerin temelinde hastalığın şiddetini değerlendirmek, kategorize etmek ve tedavi sırasında hastaları izlemek için dışkılama sıklığı, mukozal görünüm, rektal kanama gibi faktörleri içeren bir puanlama sistemi oluşturularak hastalığın etkin bir şekilde yönetiminin sağlanması vardır. Tüm bu incelemeler ışığında ÜK ve CH'nin teşhisi benzer bir yol izlese de bu hastalıkların gelişimi önemli ölçüde farklılık gösterir ve bireysel olarak değerlendirilir (62).

Mukozal bariyer, epitel tabakası ve onun üzerindeki goblet hücresi müsinlerinden ve epitelden salgılanan intrinsik peptit antibiyotiklerden (defensinler) oluşan antibakteriyel mukus tabakasından oluşur. ÜK'de kusurlu, incelmiş bir mukus tabakası görülürken (63) CH'de, kriptlerin tabanındaki paneth hücreleri ve kusurlu defensin oluşumunun merkezi bir rol oynadığı belirlenmiştir (Şekil 4) (64).



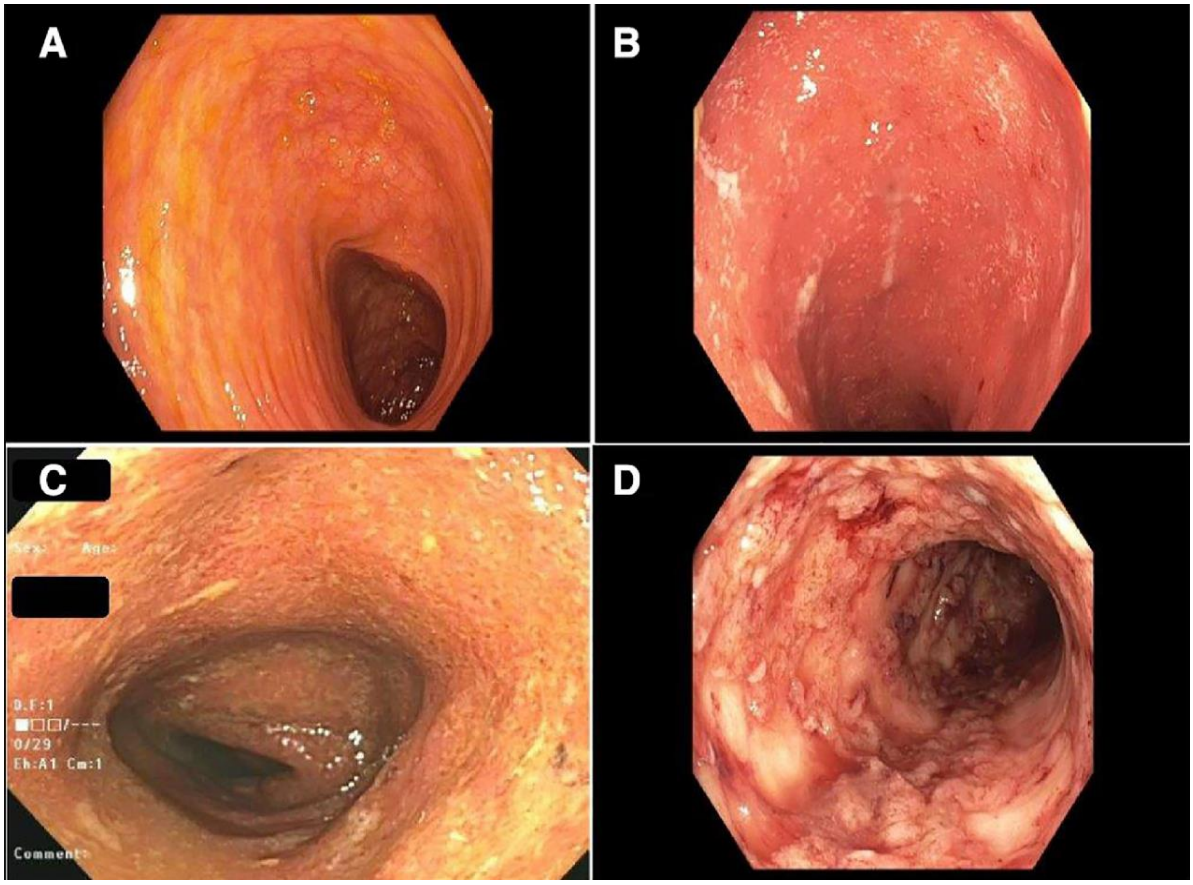
Şekil 4. Sağlıklı bireyde, CH'de ve ÜK'de mukozal bariyer (63)

Ülseratif kolitte, mukozal ve submukozal tabakaların tutulumu, muskular mukozanın kalınlaşmasına ve kolonun kısalmasına veya sertleşmesine katkıda bulunabilen ekstraselüler matriks birikimine neden olurken, CH'de enflamatuar sürecin transmural doğası vardır. Bunu bağırsak duvarı kalınlaşması ve sonunda stenoz oluşumu izler (Şekil 5) (65). CH'ye sahip hastaların yaklaşık üçte biri, onları tekrarlayan bağırsak darlığı oluşumuna yatkınlaştıran belirgin bir fibrostenoz edici fenotipe sahiptir (66). Bağırsak darlıkları, bağırsak iltihabı bölgelerinde düzensiz yara iyileşmesi sırasında hücre dışı matris proteinlerinin anormal ve aşırı birikmesinin bir sonucu olarak ortaya çıkar (67). Darlık gelişen çoğu hastada bağırsak tıkanıklığı semptomlarını gidermek için ameliyat gerekmektedir. Ne yazık ki, cerrahi nadiren uzun vadeli bir çözüm sağlar ve birçok hastada çoğunlukla önceki rezeksiyon bölgesinin hemen proksimalinde, hastalık nüksü görülmüştür (68).



Şekil 5. ÜK ve CH ayırımı (69)

Ülseratif kolitli hastalarda iltihaplı ve iltihaplı olmayan bağırsak arasında belirgin bir sınır ile eritem, normal vasküler patern kaybı, granülerlik, erozyonlar, kanama ve ülserasyonlar ile karakterize sürekli halde uzanan kolonik enflamasyonun varlığı görülmektedir (Şekil 6) (70). ÜK'deki klasik histolojik değişiklikler arasında, gerçek granülomların yokluğunda azalmış kript yoğunluğu, kript mimarisi bozulması, düzensiz mukozal yüzey ve ağır diffüz transmukozal enflamasyon yer alır (71). Lezyonlar genellikle yaygın ve yüzeyseldir. Derin ülserasyonlar sadece şiddetli hastalığı olan hastalarda görülür. Normal kolonun ortalama duvar kalınlığının 2-3 mm olmasına karşılık ortalama duvar kalınlığının 8 mm olduğu duvar kalınlaşmaları ÜK için ayırt edici BT bulgusu olarak görülmektedir (72).



Şekil 6. Kolonoskopi bulguları A: Normal kolon; B: Hafif şiddette kolit; C: Orta şiddette kolit, D: Şiddetli kolit gösteren kolonoskopi görüntüleri (72)

Kronik EBH'den etkilenen hastaların küçük bir kısmı, CH ya da ÜK olarak bilinen iki formdan birine sınıflandırılamaz ve her ikisine ait özellikler gösterebilirler. Bu tür hastaların çoğunluğu zamanla bu ana hastalık türlerinden birine dönüşecek olsa da önemli bir kısmı sınıflandırılmamış-EBH veya belirsiz kolit kategorisinde kalır (73). Bu nedenle, EBH heterojenliğini yönlendiren biyomolekülleri ve farklı hücresel mekanizmaları anlamak, hasta bakımının iyileştirilmesi ve gelecekteki ilaç inhibitörlerinin geliştirilmesi için hayati önem taşımaktadır (74). ÜK ve CH için bilinen benzer ve farklı yönlerden bazıları referanslara dayalı olarak oluşturulan Tablo 1'de sunulmuştur.

Tablo 1. ÜK ve CH için bilinen benzer ve farklı özellikler (75-77)

	CH	ÜK
Hastalığın Yeri	kolon mukozal tabakasını etkiler	tüm GİS'i etkiler
Tutulum Şekli	süreksiz yamalı enflamasyon	sürekli enflamasyon
Yayılım Özelliği	transmural	mukozal ve submukozal tabakalar
Klinik Özellikler	Ateş, karın ağrısı, kanlı ishal, kilo kaybı	
Bağırsak Komplikasyonları	fibrotik ve stenotik darlıklar, yaygın fistüller, derin ülserler, parke taşı görünümü, perianal hastalık	darlıklar yok, fistüller yok, noktalı ülserler, psödopolipler, perianal hastalık yok
İltihaplanma Şekli	transmural yapı, kript apsesi, granülom var	öncelikle mukozal yapı, kriptit ya da kript apsesi yok, granülom yok
Kanser Riski	%1-3	%5-25

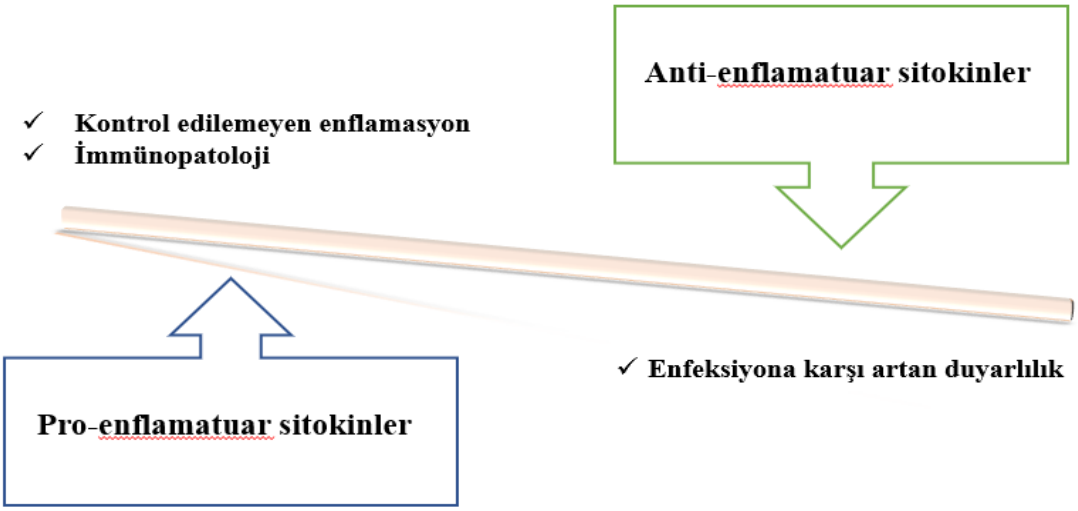
Enflamatuar Bağırsak Hastalığının Hücresel Mekanizması

Pro-oksidanlar ve antioksidanlar arasındaki dengesizlik olarak tanımlanan oksidatif stres, enflamatuar yanıtlarla sıkı bir ilişki içinde olması nedeniyle EBH'nin yayılmasında ve alevlenmesinde önemli rol oynamaktadır (78). EBH'nin patogenezi, lipid peroksidasyonu, DNA hasarı, protein modifikasyonu, hücre apoptozu ve pro-enflamatuar tepki ile sonuçlanan hem NO ve peroksinitrit ($^{-}$OONO) gibi reaktif nitrojen türlerinin hem de süperoksit anyonları (O_2^{-}), H_2O_2 ve hidroksil radikali ($^{-}$OH) gibi reaktif oksijen türlerinin (ROS) aşırı üretimini içerir (79-81). Çalışmalar, bu serbest radikallerin mukozal tabakaya zarar verebileceğini ve çeşitli enzimlerin ve pro-enflamatuar sitokinlerin konsantrasyonunu değiştirerek ya da enflamatuar yanıtları uyararak bağırsak homeostazını bozabileceğini göstermiştir (82,83). Biyolojik zarların lipit bileşenleri, oksidatif stresin birincil hedefleridir ve lipit peroksidasyonu, bağırsak iltihabında yer alan oksidatif stresin etkilerini yönlendiren kritik bir süreçtir (84). Bir lipid peroksidasyon ürünü olan malondialdehit (MDA), oksidatif hasarın ve enflamasyonun ciddiyetini yansıtan lizin amino grubu, histidin imidazol grubu veya sistein merkapto grubu ile reaksiyona girerek protein hasarına neden olur.

Yapılan çalışmalar EBH'li hastalarda yüksek bir MDA seviyesinin varlığını doğrular niteliktedir (85). Bununla birlikte, reaktif oksijen ve nitrojen türlerinin artan üretimi, kritik

düzenleyici genlerde mutasyonları indükleyerek onkogen aktivasyonuna veya tümör baskılayıcıların inaktivasyonuna neden olabilir. Örneğin, ÜK hastalarının iltihaplı kolonlarında 247 ve 248 kodonlarındaki p53 mutasyonları, artan iNOS (indüklenebilir nitrik oksit sentaz) ekspresyonu ile ilişkili bulunmuştur (86).

Tersine, NO, süperoksit anyonu ve ilgili ROS'lar düşük miktarlarda mevcut olduklarında, paradoksal olarak birçok ROS aracılı yanıtın, redoks homeostazının indüklenmesi yoluyla hücreleri oksidatif strese karşı koruyabildiği sinyalleşme süreçlerinde düzenleyici aracılar olarak önemli bir rol oynarlar (87). Yani genel olarak bakıldığında hücresel homeostazın korunması için pro-oksidanların aktivitesinin antioksidanlar tarafından dengelenmesi gerekmektedir (Şekil 7) (88).



Şekil 7. Düzenlenmemiş sitokin aktivasyonundan kaynaklanan immünopatolojinin şematik gösterimi (89)

Enflamasyon, sitokinler, büyüme faktörleri, eikosanoidler (prostaglandinler, vb.) ve peptitler dahil olmak üzere bir dizi hücre dışı aracı ve düzenleyici tarafından kontrol edilir (90).

NOD benzeri reseptör ailesinin bir üyesi olan NOD2, tüm gram negatif ve gram pozitif bakterilerin hücre duvarlarındaki bakteriyel peptidoglikanı (muramil dipeptid) tanır ve bağırsaktaki hücreleri ve bağışıklık yanıtlarını korumak için bağırsak antimikrobiyal peptidlerin üretimini tetikler (91). NOD2 aktivasyonu, NF-κB (nükleer faktör kappa B) aktivasyonuna ve IL-1β, TNF-α, IL-6, IL-8 (interlökin 8) ve α-defensinlerin üretimine yol açar (92,93). Bu da

onu doğuştan gelen bağışıklık tepkilerinde ve kommensal mikrobiyotanın düzenlenmesinde kilit bir oyuncu yapar.

İstilacı bakteriler, hem doğuştan gelen bağışıklık hücrelerini (granülositler, makrofajlar, dendritik hücreler) hem de adaptif bağışıklık hücrelerini (T hücreleri) içeren bir enflamatuar yanıtı indükler. Efektör T hücrelerinin aracılık ettiği enflamatuar yanıtlar, genellikle karakteristik sitokin üretim modelleriyle tanımlanan T yardımcı 1 (Th1), Th2 ve Th17 tipi yanıtlara bölünmüştür. Örneğin, CH'de Th'ler artmış ve mukozal Th1/Th17 tipi yanıtlara sahip olmaları ile karakterize edilirken, ÜK hastalarında mukozal Th2 aracılı enflamasyonun geliştiği izlenmiştir (94-96).

Doğal öldürücü hücreler, doğuştan gelen lenfoid hücreler, makrofajlar ve dendritik hücreler gibi innate bağışıklık sistemi unsurları, lümen antijenlerini örnek alır ve bir tolerojenik bağışıklık tepkisini indükler (97). Homeostatik koşullar altında, bu immün sürveyans bir pro-enflamatuar yanıtı başlatmaz; aksine, Treg'i indükler. Bu bağışıklık hücreleri antijenleri yakalayarak lenfositleri aktive etmek ve bağışıklık tepkilerini düzenlemek için lenfoid dokulara göç eder (98). Laminer propriada, makrofajlar ve dendritik hücreler diğer bağışıklık hücrelerini çeken ve aktive eden sitokinler ve kemokinler üretir, bu da adaptif immünolojik tepkilerin aktivasyonu ile sonuçlanır (99).

Mikrobiyota, lipopolisakkaritler (LPS'ler), peptidoglikan ve flagellin gibi mikropla ilişkili moleküler modeller (MAMM'ler) olarak adlandırılan yüksek düzeyde korunmuş yapısal bileşenlerin konak tarafından tanınması yoluyla konakçı ile doğrudan iletişim kurabilir. MAMM'lerin tanınması, öncelikle bağırsak epitel hücreleri (BEH'ler) ve bağışıklık hücreleri tarafından ifade edilen patojen tanıma reseptörlerine (PRR'ler) bağlanarak elde edilir (100).

En önemli PPR'ler olarak, Toll benzeri reseptörler (TLR'ler), doğal ve adaptif bağışıklık tepkilerinin aktivasyonundan ve birlikteliğinden sorumludur ve bağırsakta homeostazın korunmasında önemli bir rol oynar. TLR'ler bir transmembran reseptör ailesidir ve insanlarda 13 adet TLR tanımlanmıştır (101).

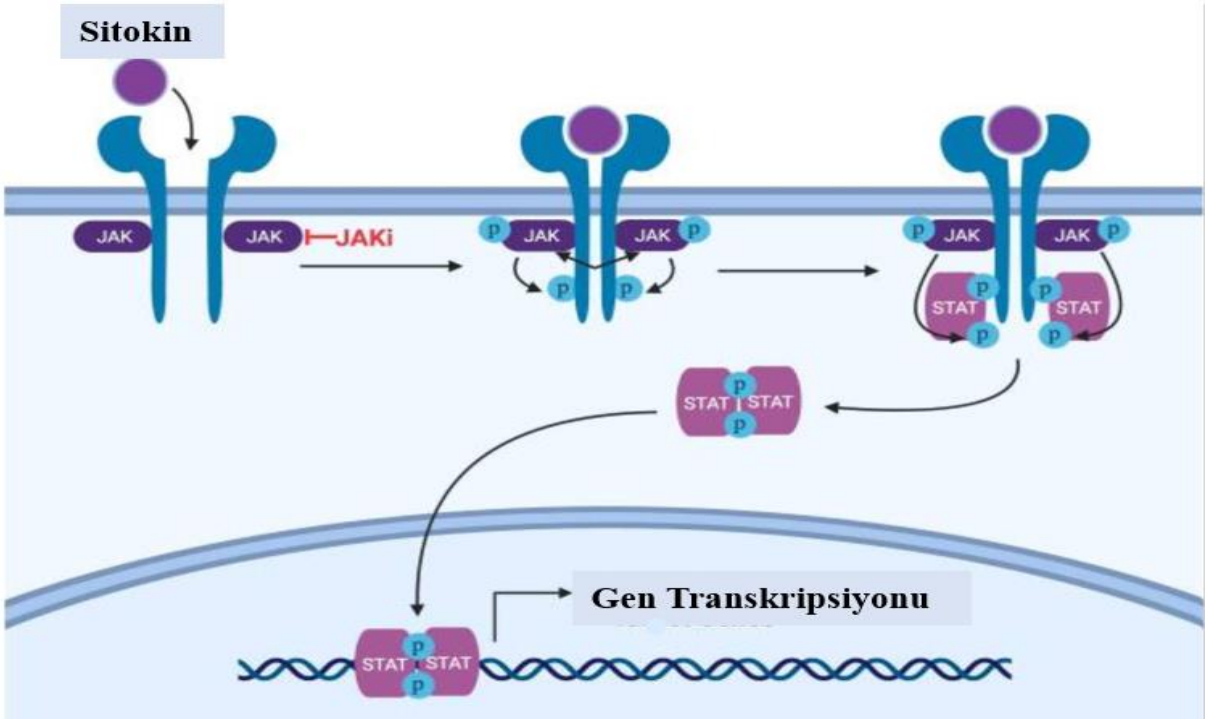
Memeli TLR'leri, mikrobiyal patojenleri doğrudan yok edebilen iNOS ve antimikrobiyal peptitler gibi çeşitli efektör molekülleri indükler. Çeşitli bağışıklık hücrelerinde ve epitelyal/endotelyal hücrelerde yaygın olarak eksprese edilen TLR4, TLR ailesinin önemli bir üyesidir ve klasik bir enflamasyon aracısı olarak doğal ve adaptif bağışıklık ile enflamasyon ve enfeksiyon arasında bir sinyal molekülü görevi görür (102-104). TLR polimorfizmleri ve aktivasyonları, enflamasyon kaskadını uyarmak için gerekli olan NF-κB gibi transkripsiyon

faktörlerinin aktivasyonuna yol açan anormal doğal ve adaptif immün tepkilerle sonuçlanır. NF-κB'nin aktivasyonu, pro-enflamatuar genleri indükler, böylece lamina propria immün hücrelerinin uyarılmasından, aktivasyonundan ve farklılaşmasından sorumlu olan ve kalıcı mukozal enflamasyona yol açan enflamatuar sitokin üretimini arttırır (105).

Sitokinler, farklı hücreler arasındaki hayati iletişim araçlarıdır ve hedef hücrelerdeki spesifik reseptörlere bağlanarak işlem yaparlar. Pek çok sitokin reseptörü aşağı akış sinyalini doğrudan aktive edebilirken, diğerleri intrinsik kinaz aktivitesinden yoksundur ve sinyallerini iletmek için "Janus Kinases / Signal Transducer and Activator of Transcription (JAK/STAT)'' yolağına güvenirler. Aslında, interferon lambda (IFN-λ), IL-2, IL-6, IL-12 ve IL-23 dahil 50'den fazla sitokin, JAK-STAT yolağına dayanır (106).

Sitokinlerin çoğunun işlevlerini JAK/STAT aracılığıyla gösteriyor olması nedeniyle EBH'de çeşitli bağırsak hücrelerinin işleyişini ve etkileşimini JAK/STAT yolu aracılığıyla anlamaya çalışmak doğru bir yaklaşım olacaktır. JAK/STAT sinyal yolu esas olarak üç üyeden oluşur bunlar tirozin kinaz ile ilişkili reseptörler, JAK'lar ve STAT'lardır. Üyelere ait dört JAK proteini (JAK1, JAK2, JAK3 ve TYK2) ve yedi adet STAT proteini (STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5A, STAT5B ve STAT6) bulunmaktadır (107,108).

Sitokinler spesifik reseptörlere bağlandığında, sitoplazmada bulunan JAK'ların (JAK1, JAK2, JAK3 ve tirozin kinaz 2 dahil) moleküler yapısı değişir ve JAK'ların otofosforilasyonu veya transfosforilasyonu tetiklenmiş olur (109). Ardından hücre içi sitokin reseptörü tirozin kalıntılarının fosforilasyonuna yol açar. Sitokin reseptörü kuyruğundaki bu fosfotirozinler daha sonra sitozolik STAT proteinlerinin spesifik alanları için bağlanma bölgeleri olarak hizmet eder ve STAT'lerin C-terminalleri içinde JAK aracılı tirozin fosforilasyonuna yol açar. STAT proteinleri aktive edildikten sonra reseptörden ayrılır, homodimerize veya heterodimerize olur ve hızla sitoplazmadan çekirdeğe doğru yer değiştirir. Orada, hedef genlerin spesifik gen düzenleyici DNA dizilerini tanır ve bunlara bağlanarak gen transkripsiyonunu indükler veya baskılar (Şekil 8) (110-112).



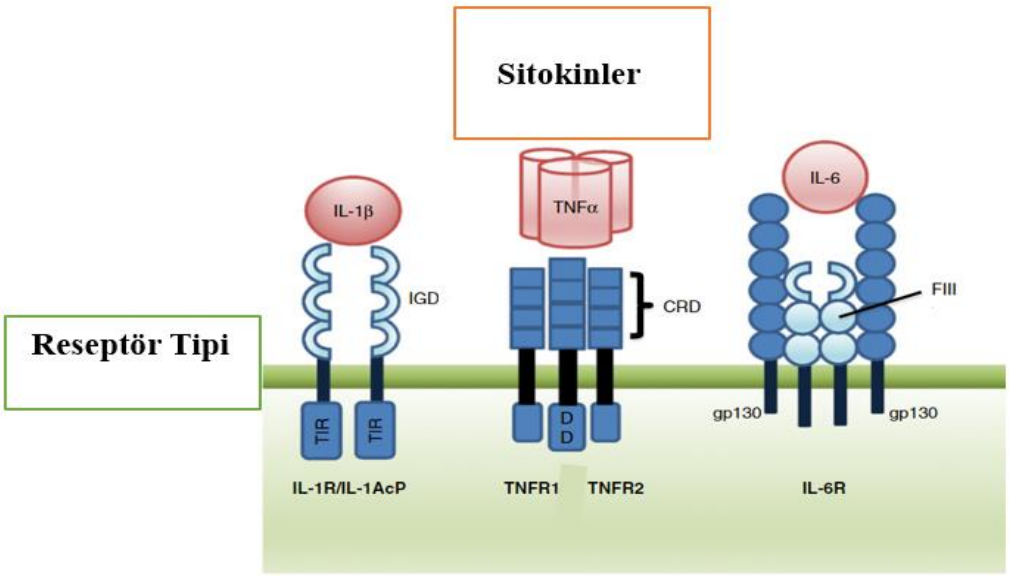
Şekil 8: JAK/STAT yolu (113)

JAKi: JAK inhibitörü

Sitokinlerin JAK-STAT kullanımında hem özgüllük hem de çoğulluk mevcuttur. Örneğin, IFN-γ, sırayla STAT1'i etkinleştiren JAK1 ve JAK2 aracılığıyla sinyal verirken; IL-6 ise JAK1, JAK2 ve/veya tirozin kinaz 2 aracılığıyla sinyal verebilir ve STAT3'ü etkinleştirir (114). Yaralanma ve enfeksiyon dahil olmak üzere dış faktörler, paneth hücrelerinin kapsamlı olgunlaşmasını ve farklılaşmasını destekleyebilen JAK2/STAT5 sinyallerinin aktivasyonuna neden olabilmektedir (115). STAT1'in yüksek seviyeli IFN-λ ile aktivasyonu, paneth hücrelerinde kaspaz 8'i artırarak, CH gelişiminde rol oynadığı düşünülen apoptoz yerine hücre ölümüne yol açmaktadır (116). Tip 1 IFN'ler epitel bariyer bütünlüğünü korurken STAT1 ve STAT2 aracılığıyla BEH'lerde bakteri ve virüslere karşı direnç gösterir (117). STAT3 ve STAT6'nın aktivasyonu, epitel hücrelerinin çoğalmasını ve göçünü doğrudan teşvik ederken aynı zamanda zararlı dış faktörlerin uyarılmasına da direnç gösterir. STAT3'ün BEH'lerin işlevini sürdürdüğü, STAT3'ün aşırı aktivasyonunun ise BEH'lerde LPS tarafından indüklenen enflamasyonda önemli bir rol oynadığı gösterilmiştir. Bu, EBH hastalarının kolon dokusundaki yüksek fosforlanmış STAT3 seviyeleri ile ilişkilendirilmiştir (118).

Gram negatif bakterilerin başlıca biyolojik olarak aktif bir ajanı olan LPS, sistemik bir enflamasyon yanıtının gelişmesinde, özellikle IL-6 ve TNF-α gibi pro-enflamatuar sitokinlerin ekspresyonunda anahtar rol oynar (119). IL-6, EBH'de merkezi bir sitokindir ve STAT3

aktivasyonunu indükleyerek enflamasyonlu bölgede lamina propriada gelişmiş T hücresi sağkalımına ve apoptoz direncine katkıda bulunur (120,121). IL-6, T hücreleri, B hücreleri, monositler, fibroblastlar, osteoblastlar, endotel hücreleri ve bazı tümör hücreleri gibi çeşitli hücreler tarafından üretilir. Bu sitokin spesifik olarak IL-6 reseptörüne veya reseptörün çözünebilir formuna bağlanarak aktivasyon gösterebilir (122). IL-6 diğerlerinin yanı sıra fagositik hücrelerin ve lenfositlerin kronik enflamasyonun meydana geldiği yere göçünü uyarır. Bu nedenle, IL-6, EBH'nin gelişimi ve sürdürülmesi üzerinde önemli bir etkiye sahip olabilir. Şiddetli CH'li hastalarda IL-6 konsantrasyonunun serumda ve iltihaplı bağırsak duvarında genellikle daha yüksek olduğu da çalışmalar tarafından gösterilmiştir. IL-6'nın pro-enflamatuar etkisinin, gp130 (glikoprotein 130) ko-reseptörünün mevcudiyetinde çözünür zar reseptörünün uyarılmasından kaynaklanan transmembran sinyallemenin bir sonucu olduğu düşünülmektedir. (Şekil 9) (123).



Şekil 9. Sitokinler ve reseptörleri (124)

IGD: Ligandın bağlandığı hücre dışı immünoglobulin alanları; **IL-1R/IL-1AcP:** İnterlökin 1 reseptörü kompleksi; **TIR:** Sinyali ileten Toll/IL-1R alanı; **TNFR:** TNF reseptörü; **CRD:** sistein açısından zengin alanlar; **DD:** reseptörün ölüm alanı; **IL-6R:** İnterlökin 6 reseptörü; **gp130:** Glikoprotein 130; **FIII:** Fibronektin 3

Sitokinler, ligand bağlanması için farklı hücre dışı alanlara ve sinyal iletimine izin veren hücre içi alanlara sahip transmembran reseptörleri aracılığıyla sinyal verir. IL-1 reseptörü, ligandın hücre dışı immünoglobulin alanlarına bağlanmasının ardından oluşan bir IL-1R1/IL1-AcP kompleksidir; hücre içi sinyalleşmeye Toll/IL-1 reseptörü alanı aracılık eder.

Trimerik TNFα, TNF reseptörü önceden monte edilmiş trimerlerinin sistein açısından zengin alanlarına bağlanır ve sinyalleşmeye, reseptörün ölüm alanı aracılık eder. Son olarak IL-6R, gp130 ile kompleks oluşturan IL-6R zincirlerine sahip multimerik bir yapıdır. Ligand bağlama bölgesi, IL-6R zincirlerinin fibronektin 3 modülleri içindedir, ancak sinyal iletimi, ilgili gp130 molekülleri aracılığıyla gerçekleşir (124).

Merkezi bir pro-enflamatuar sitokin olan TNF-α, esas olarak makrofajlarda ve monositlerde üretilir. TNF-α, hücreler üzerinde pleiotropik bir etkiye sahiptir ve diğerlerinin yanı sıra, NF kB'nin hücre içi plazmadan çekirdeğe göçünü uyarır (125). Çeşitli pro-enflamatuar moleküllerin üretimini, hücre proliferasyonunu, anjiyogenezi uyarır ve protrombotik bir etkiye sahiptir. Etkisi sonuçta hücre nekrozuna veya apoptoza yol açar. TNFα, hücre zarı reseptörleri TNF reseptörü-1 veya TNF reseptörü-2'ye bağlanarak hücreler üzerinde etki eder (126).

Tümör nekroz faktör alfa, bağırsak da dahil olmak üzere birçok doku ve organda enflamasyonun hem oluşumunda hem de sürdürülmesinde çok önemli bir rol oynar. Hem ÜK hem de CH'de sağlıklı popülasyondan daha yüksek serum TNF-α seviyeleri gözlenmiştir. Ayrıca EBH seyrinde enflamasyon oluşmuş bağırsak mukozasında TNF-α salgılayan hücrelerin sayısında da artış tespit edilmiştir. Bu nedenle, EBH tedavisi dahil olmak üzere, TNF-α'nın etkisini bloke eden maddeler araştırma konusu olmuştur (127). Bu bilgilere dayanarak birçok farklı yanıtın ortak mekanizması olsa da EBH'nin formları arasındaki farklılıklar da göz önünde bulundurularak EBH'de iltihaplanmayı teşvik etmek için hücre aktivasyonuna aracılık eden aynı anda birkaç sitokini hedefleyen JAK inhibitörlerinin yalnızca tek bir sitokini hedefleyen monoklonal antikorlardan daha etkili bir seçim olacağı aşikardır.

ENFLAMATUAR BAĞIRSAK HASTALIĞININ TEDAVİSİ

Küresel bir hastalık olan EBH, insan sağlığını ciddi şekilde tehlikeye atmanın yanı sıra bireylere, ailelere ve topluma ağır mali yükler getirmektedir. EBH'nin kesin nedeni bilinmediğinden, bunun ve ilişkili komplikasyonlarının spesifik bir tedavisi de yoktur. EBH tedavisinin birincil amacı, şiddetli bir alevlenme sırasında yan etkileri azaltmak, ayrıca remisyonu sürdürmek ve bağırsaktaki enflamatuar sürecin yeniden aktifleşmesini önlemek için kronik enflamasyonu kontrol etmektir. (128)

Son birkaç yılda EBH'nin terapötik seçeneklerinin arttığı görülmektedir. Geleneksel tedaviler aminosalisilatlar, kortikosteroidler, immünomodülatörler ve biyolojik ilaçlar dahil olmak üzere farmakoterapi ve diğer genel önlemlerle birlikte gerekirse cerrahi rezeksiyon yoluyla semptomları kontrol etmek üzerine yoğunlaşmıştır. Spesifik monoklonal inhibitörlerinin piyasaya sürülmesi, hastalık yönetiminde ufuk açan bir başarıdır ve hastaların önemli bir bölümünde uzun süreli remisyonla birlikte EBH seyrinin değiştirilmesini sağlamıştır (129). İnflamasyonun EBH hastalıklarının temel nedeni olduğu düşünüldüğünde, hastalığı yönetmek için öncelikle bir dizi antienflamatuar ilaç tercih edilmiştir.

Salisilik asit 1860 yılında kimyasal olarak sentezlenmiş ve antiseptik, ateş düşürücü ve antiromatizmal olarak kullanılmıştır. Kısa bir süre sonra, aspirine benzer etkilere sahip diğer ilaçlar keşfedilmiş ve NSAID'ler olarak da adlandırılan bu yapıların iltihaplanma, şişme, ağrı ve ateşe neden olan prostaglandinlerin oluşumuna yol açan ''Cyclooxygenase (COX)'' enziminin aktivitesini inhibe ettiği kanıtlanmıştır. NSAID'lerin hem terapötik etkileri (COX-2'nin inhibisyonu) hem de yan etkileri (COX-1'in inhibisyonu) bu mekanizma üzerinden ilerlemektedir (130,131). Yapılan çalışmalar ibuprofen, naproksen, diklofenak, selekoksib gibi NSAID'lerinde COX-1 ve COX-2'nin aktivitesini inhibe etme ve böylece pro-enflamatuar uyaranların oluşumunu azaltma yeteneğini paylaştığını göstermiştir (132-135). 5-Aminosalisilatlar, ÜK'li hastalarda antienflamatuar tedavi için sıklıkla kullanılırken CH'de klinik semptomların ve doku iltihabının çözülmesini sağlamada çok az etkinlik gösterdiği belirtilmiştir. 5-Aminosalisilat'lar için, COX inhibisyonu yoluyla prostaglandin sentezinin azaltılması, pro-enflamatuar sitokin üretiminin ve oksijensiz radikallerin baskılanması, lipoksijenazın inhibisyonu gibi çeşitli etki mekanizmaları önerilmiştir (136,137).

Kortikosteroidler, enflamatuar barsak hastalığında remisyonu başlatmak ve sürdürmek için tek başına veya uygun bir mesalamin formülasyonu ile kombinasyon halinde kullanılabilir (138). Prednizolon dozları 40 mg/gün'ün üzerine çıktığında yan etki insidansının arttığı görülmektedir. Azatiyoprin, steroidleri koruyucu özelliği ile daha düşük dozda steroidlerle birlikte verilebilir (139). EBH'li hastalarda steroidlere verilen yanıt üç genel sınıfa ayırılır: steroide yanıt veren, steroide bağımlı ve steroide yanıt vermeyen. Steroide yanıt veren hastalar genellikle bir ila iki hafta içinde klinik olarak iyileşir ve steroid dozu azaltılıp kesilince remisyonda kalır. Steroide bağımlı hastalar da glukokortikoidlere yanıt verirler ancak steroid dozu azaltıldıkça semptomların tekrarlaması görülür. Steroide yanıt vermeyen hastalar, uzun süreli yüksek doz steroidlerle bile iyileşme göstermezler (140). Bununla birlikte, genellikle ağırlaştırılmış hastalık durumlarında kullanılan hızlı etkili steroidlerin kan şekerinde yükselme,

osteoporoz ve enfeksiyon riskinde artış gibi bir takım yan etkileri vardır ve bu nedenle hekimler steroidleri mümkün olan en kısa sürede ve güvenli bir şekilde azaltmaya çalışırlar (141).

Gastroenteroloji otoriteleri tarafından yayınlanan klavuzlarda yeterli glukokortikoid tedavisine yanıt vermeyen orta ila şiddetli derecede aktif CH'ye sahip hastalarda TNF-α monoklonal antikorların (infliximab, adalimumab veya certolizumab vb.) veya immünmodülatörlerin kullanılması önerilmektedir (142). ACCENT 1 çalışmasında, 10. haftada CH'li 99 hastadan oluşan bir alt grupta mukozal iyileşme (ülser yokluğu) araştırılmış ve başlangıçta yalnızca bir infliksimab uygulaması alan hastaların %3'üne kıyasla, infliximab (0., 2. ve 6. haftalarda 5 mg/kg) ile tedavi edilen hastaların %29'unda mukozal iyileşmeyi indükleyebildiği gözlenmiştir. Daha sonra infliksimab ile idame tedavisi (8 haftada bir) süren hastalarda (%44'ünde) 54. haftada mukozal iyileşme tespit edilmiştir (143). Anti-TNF-α ajanları, EBH'de en etkili antisitokin tedavisi olmasına rağmen, hastaların önemli bir kısmı indüksiyon tedavisine yanıt vermez ve/veya zamanla yararını kaybeder veya intoleranslı hale gelir. Doz uyarlamasının ve bir anti-TNF-α ajanından diğerine geçişin, anti-TNF-α tedavisine direncin üstesinden gelmek için etkili olabileceği gösterilmiştir (144). Ek olarak, düşük ekonomiye sahip ülkelerin sağlık sistemi için maliyet temelinde uygun bir tedavi yöntemi değildirler.

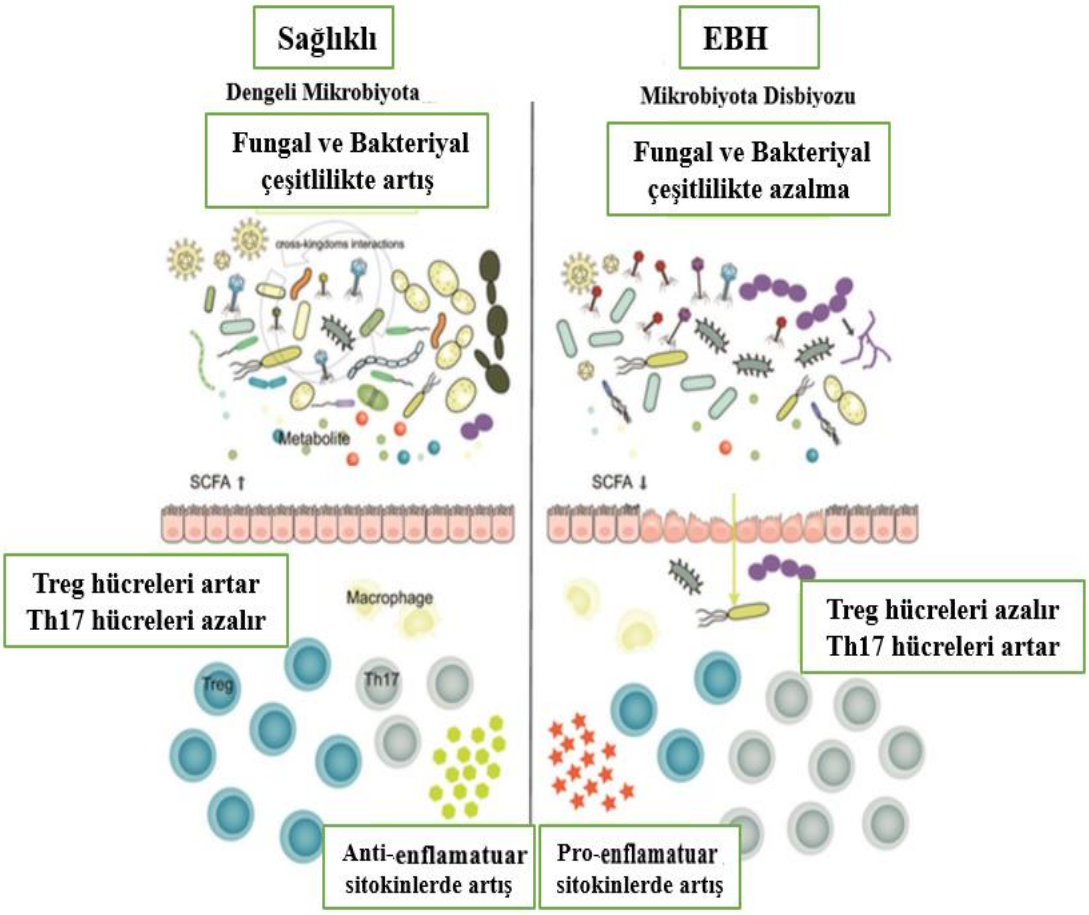
İmmünomodülatörler, EBH'li hastalar için önemlidir ve temel olarak tiopürinler, metotreksat, kalsinörin inhibitörleri ve JAK inhibitörlerini içerir. Düşük dozlarda metotreksat, DNA sentezi ile ilgili birkaç enzimin işlevini inhibe edebilir ve çeşitli enflamatuar sitokinleri (IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, vb. gibi) aşağı regüle edebilir, böylece T lenfositlerin proliferasyonunu ve enflamatuar yanıtı inhibe eder. Bir çalışma, aktif CH'li hastaların %72'sinin 3 aylık metotreksat tedavisinden sonra klinik remisyona ulaştığını bulmuştur. Aksine metotreksatın ÜK'de remisyonu indüklemede etkinliği kanıtlanmamıştır (145-147).

Tofasitinib, tüm JAK'ları, tercihen JAK1 ve JAK3'ü inhibe edebilen bir oral küçük moleküllü JAK inhibitörüdür ve tofacitinib'in orta ila şiddetli aktif ÜK'nin tedavisi için etkinliği onaylanmıştır (148). Tofacitinib hızlı bir etki başlangıcına sahiptir ve akut şiddetli ÜK veya anti-TNF-α'ya dirençli vakalarda bile etkili görünmektedir. Buna karşın tofasitinibin zona ve tromboz gibi yan etkileriyle birlikte uzun vadeli güvenliği araştırma konusudur (149,150).

Fonksiyonel sentetik ilaçların çoğu geniş bir yan etki çerçevesine sahiptir. Medikal tedaviye yanıt vermeyen hastalar için cerrahi müdahale sağlanabilir fakat bu yöntem de birçok

girişimsel sebepli komplikasyonu beraberinde getirmektedir. Bu sebeple tedavi seçeneklerinde diyet gibi alternatif tedavi yöntemlerinin seçilmesi farklı bir bakış açısına yer açmıştır.

Bağırsak mikrobiyotasının CH dahil EBH'nin patogenezindeki ve ilerlemesindeki rolü düşünüldüğünde çeşitli diyet uygulamalarının tedavi amaçlı kullanımı için yapılan çalışmalar giderek artmıştır. Laktozsuz veya glutensiz diyetler gibi EBH hastaları tarafından kullanılan eliminasyon diyetlerinin mikrobiyal çeşitliliği bozduğu gösterilmiştir. Öte yandan, kısmi enteral beslenmeyle birlikte (CH dışlama diyetleri) sadece CH'nin remisyonunu sağlamakla kalmamış aynı zamanda mikrobiyota üzerinde de olumlu bir etki göstermiştir (151). Bağırsak florası, asetik asit, propiyonik asit ve bütirik asit gibi bağırsaktaki karbonhidratları sindirirken bir dizi metabolit kısa zincirli yağ asitleri (SCFA'lar) üretir. SCFA'lar bağırsakta pH'ı düşürür, asitliği artırır, patojenik bakterilerin büyümesini engeller ve faydalı bakterilerin çoğalmasını sağlayarak bağırsak florasının homeostazını iyileştirir. Asetik asit, SCFA'nın ana kaynağıdır, bunu propiyonik asit ve bütirat takip eder. Bütirat, kolon hücreleri için tercih edilen bir enerji kaynağıdır ve BEH'lerde hücre yenilenmesini destekler. Bu arada, sıkı bağlantı proteininin ekspresyonu yukarı regüle edilir ve epitel bariyerin bütünlüğü korunur (Şekil 10) (152-154).



Şekil 10. Bağırsak mikobiyomunun EBH patogenezindeki potansiyel rolü (155)

Enflamatuar bağırsak hastalığının tedavisi için farmakolojik müdahale önemlidir ve ilaçlar temel olarak aminosalisilatları, kortikosteroidleri, immünomodülatörleri, biyolojikleri içermektedir fakat EBH'nin tedavisi ve yönetiminde daha güvenli ve daha etkili tedavi edici stratejilere yönelik belirgin bir talep vardır.

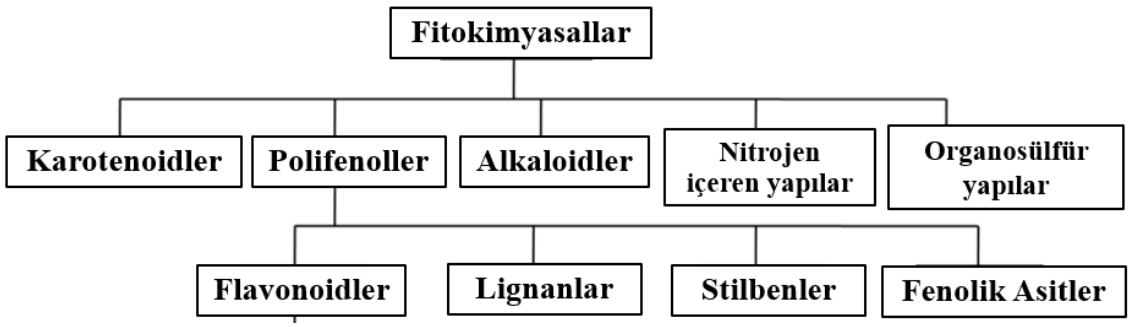
FİTOKİMYASAL YAPILAR

Binlerce yıldır bitkiler birincil ilaç kaynağı olarak kullanılmıştır (156). Çoklu terapötik uygulamalara sahip fitokimyasallar, antienflamatuar, antialerji, antikanser, antibiyoz, antiviral ve analjezik fonksiyonlar dahil olmak üzere çeşitli biyolojik fonksiyonlara sahiptir (157). Fitokimyasallar, bitkiler tarafından otçul hayvanlardan, böceklerden vb. korunmak ve hayatta

kalmak için birincil ve ikincil metabolizma yoluyla üretilen besleyici olmayan maddelerdir (158). Araştırmalar sonucu antienflamatuar, antikanserojenik, antioksidan, antimikrobiyal özelliklere sahip birçok fitokimyasal keşfedilmiştir ve bunların büyük bir kısmını polifenoller oluşturmaktadır (159).

Fenolik bileşikler, elma, üzüm, çilek, kereviz, havuç gibi meyve veya sebzelerde yaygın olarak bulunan flavonoidler, fenolik asitler, stilbenler, lignanlar, kurkuminoidler, tanenler gibi yapıları içeren geniş bir kimyasal grubudur ve fenolik halkalar, yan zincirlerin sayısı gibi özelliklerine göre sınıflandırılmışlardır (160). Potansiyel antienflamatuar ajanlar olarak flavonoidler fenolik bileşiklerin en geniş alt grubudur, enflamasyon sırasında aktive olan birkaç enzimi inhibe ettiği ve ayrıca antioksidan/serbest radikal süpürücü etkiler sergileyerek onları EBH tedavisi için uygun hale getirdiği rapor edilmiştir (161).

Fitokimyasallar polifenollerin yanısıra terpenoidler, organosülfür bileşikleri, fitosteroller ve alkaloidler gibi birçok grubu kapsar ve her sınıfın birden fazla alt grubu bulunmaktadır (Şekil 11) (162).



Şekil 11. Fitokimyasalların sınıflandırılması (162)

Fitokimyasal kökenli ilaçlar, kanseri aktive eden enzimleri ve hormonları inhibe ederek, DNA onarım mekanizmasını uyararak, koruyucu enzimlerin üretimini teşvik ederek, antioksidan etkiyi indükleyerek ve bağışıklığı güçlendirerek çoklu terapötik etkiler göstermektedir. Tıbbi bitkilerin sentetik ilaçlara göre tedavi için kullanılmasının avantajı, daha az yan etkileri, yüksek potansiyelleri, daha az hasta toksisitesi, satın alınabilirlikleri ve çevre dostu olmalarıdır. Sekonder metabolitler, antienflamatuvar etkilerinin yanı sıra antikanser, antidiyabetik, antiobezite ve bağışıklığı güçlendirici özelliklere de sahiptir. Bu özellikleriyle, ilaç teknolojilerinin aktif ilaç adayı geliştirme yolunda birçok etken fitokimyasal maddeyi doğrudan ya da modifiye ederek kullanması kaçınılmaz olmuştur (163). Vindesin ve vinorelbin

diğer kemoterapötik ilaçlarla karıştırılarak çeşitli kanserlerin tedavisinde yararlı olan vinka alkaloidlerinin yarı sentetik analoglarıdır ve sarkom, meme kanseri, lösemi, testis kanseri, akciğer kanserleri ve lenfomaları tedavi etmek için kullanılırlar (164).

Podofillotoksin, Podophyllum peltatum L. Berberidaceae ve Podophyllum emodi Wall'dan ekstrakte edilen antikanser kemoterapisi için kullanılan bir yapıdır. Podofillotoksin antimitotik doğal bir üründür. Hücre büyümesi üzerindeki inhibe edici aktivitesi, klinik açıdan değerli antikanser ajanlar olan etoposid, teniposid ve etoposid fosfatın gelişmesine yol açmıştır. Bu ilaçlar çeşitli kanser türlerini tedavi etmek için klinik ajanlar olarak kullanılmaktadır (165).

T. wallichiana bitki türlerinden elde edilen taksanların antienflamatuar, analjezik, antipiretik, antialerjik, immünomodülatör, antikonvülsan, antikonseptif, antiosteoporotik, antiplatelet, antifungal ve antibakteriyel aktivitelerin yanı sıra antispazmodik etkileri vardır. Paklitaksel ayrıca romatoid artrit, sedef hastalığı ve multipl skleroz gibi kanser olmayan hastalıkları tedavi etme potansiyeline de sahiptir. Taksan grubu ilaçların yarı sentetik bir türevi olan dosetaksel başta meme kanseri olmak üzere kanser tedavisinde kullanılmaktadır (166,167).

Doğal bir kinolin olan kamptotesin antikanser aktiviteye sahiptir ve topoizomeraz 1'i inhibe eder; ayrıca tümörleri ve metastatik kolorektal kanseri tedavi etmek için kemoterapötik bir ilaç olarak kullanılır ve irinotekanın biyoyararlı bir türevi olarak bilinir. Topotekan da ayrıca yumurtalık kanseri ve küçük hücreli akciğer kanserini tedavi eden bir kamptotesin türevidir (168). Sistemik bir enflamatuar yanıt olan sepsis tedavisi için yapılan bir çalışmada RAW 264.7 makrofajlarındaki antienflamatuar aktiviteleri açısından bir dizi indol-2-karboksamid türevinin sentezi yapılmış ve incelenmiştir. Bu türevlerin çoğunun, TNF-α ve IL-6'nın LPS ile indüklenen ekspresyonunu etkili bir şekilde inhibe ettiği, LPS kaynaklı enflamasyonu ve bir dizi enflamatuar aracının aşırı ekspresyonunu etkili bir şekilde azalttığı bulunmuştur. Ayrıca etkili olduğu tespit edilen türevlerin in-vivo sepsis kaynaklı akciğer hasarı modelinde tatbikatı, organlarda toksisite olmaksızın farelerde kayda değer histopatolojik iyileşmeleri ile sonuçlanmıştır (169-171).

Benzoik asit, antibakteriyel ve antifungal özellikleriyle gıda ve yemlerde koruyucu olarak geniş bir kullanım alanına sahiptir. Son yıllarda yapılan çalışmalar sindirim, emilim ve bariyer başta olmak üzere birçok bağırsak fonksiyonunun iyileştirilmesine katkısı olabileceğini göstermiştir. İnsan bağırsak fizyolojisinin domuzunkine benzer olmasından yola çıkarak domuz bağırsak epitel hücreleriyle yapılan birçok çalışma, uygun benzoik asit seviyelerinin kullanılmasının enzim aktivitesini, redoks dengesini, bağışıklık ve mikrobiyotayı destekleyerek

bağırsak fonksiyonlarının iyileştirilmesini desteklediğini fakat aşırı maruziyetin de redoks dengesini bozarak bağırsak sağlığına zarar verebileceğini göstermiştir (172).

Gallik asit (GAL), 3,4,5-trihidroksibenzoik asit olarak da bilinen doğal bir ikincil metabolittir ve çeşitli meyve, bitki ve sert kabuklu yemişlerden yaygın olarak izole edilir. GAL'ın bitki kaynağı çok zengin olmasına rağmen, düşük ekstraksiyon oranı GAL uygulamasını sınırlamaktadır. Farmakokinetik çalışmalara göre, oral uygulamadan sonra GAL'ın emilimi ve eliminasyonu hızlı olduğu bildirilmiştir (173). Umut verici bir şekilde, toksisite çalışmaları, GAL'ın çeşitli hayvan deneylerinde ve klinik deneylerde nadiren belirgin toksisiteye veya yan etkilere sahip olduğunu göstermiştir. GAL'ın ÜK üzerindeki etkisi değerlendirilmek üzere 2, 4, 6-trinitrobenzene sülfonik asit uygulanmış Balb-c fareler ve IL-1β ile indüklenen hücreler ile yapılan çalışmanın sonuçları GA uygulamasının IL-4 ve IL-10 ifadelerini önemli ölçüde artırırken, IL-1, IL-6, IL-12, IL-17, IL-23 ve TNF-α'yı aşağı regüle ettiğini, GAL'ın NF-κB yolunu inhibe ederek ÜK'de antienflamatuar bir rol oynadığını göstermiştir (174,175).

Curcuma Longa L. ve *Curcuma amada*'nın ribozomlarında bol miktarda bulunan fenolik bir bileşik olan kurkumin, antienflamatuar, antioksidan, antitümör ve diğer birçok biyolojik aktivitelere sahiptir. Kurkumin Çin tıbbında ve Ayurveda'da enflamatuar hastalıkların tedavisi olarak tanımlanmıştır. Kurkuminin TLR'lere bağlanarak NF-κB yolağını modifiye ederek, mitojenle aktive olan protein kinazları (MAPK), aktivatör protein 1'i (AP-1), JAK/STAT ve diğer enflamatuar sinyal yolaklarının akışını regüle ederek enflamatuar aracıları düzenlediği ve enflamatuar hastalıkların tedavisinde etkin olduğu belirtilmiştir. Enflamatuar hücre ve hayvan modellerinde yapılan çalışmalarda kurkuminin IL-1, IL-1β, IL-6, IL-8, IL-17, TNF-α, iNOS ve NO gibi pro-enflamatuar aracıların düzeylerini azaltmıştır. Randomize, çift kör, plasebo kontrollü bir klinik araştırmada günlük 80 mg kurkumin, c-reaktif protein (CRP) ve TNF'nin plazma seviyelerinde istatiksel olarak anlamlı iyileşmeye neden olmuştur (176,177).

Glikozamin (GA), eklem sağlığını geliştirmek için bir besin takviyesi olarak yaygın şekilde kullanılır ve eklem hastalıklarının neden olduğu ağrıyı azaltabilir. GA, hayvansal olarak kitinin işlenmesinden üretildiği gibi bitkisel olarak mısır ve mısırın *Aspergillus niger* mantarı kullanılarak fermantasyonundan elde edilir (178). GA, eklem koruyucu etkilerine ek olarak antienflamatuar aktiviteler sergiler ve enflamatuar hastalıkları iyileştirir.

Örneğin GA, LPS ile aktive olan mikrogliada iNOS ekspresyonunu inhibe eder ve insan göğüs kanseri hücrelerinde COX-2 ekspresyonunu azaltır. GA, in-vivo antienflamatuar etkiler

gösterir, beyin iltihabını, iltihaplı bağırsak hastalığını, akciğer iltihabını, aterosklerozu, deneysel otoimmün ensefalomiyeliti ve renal fibrözü iyileştirir. GA'nın pirin alanı 3 içeren nükleotit bağlayıcı oligomerizasyon alanı benzeri reseptör (NLRP3) inflazomunu inhibe ettiği gösterilmiştir (179-181). 2,4,6-trinitrobenzen sülfonik asit (TNBS) uyarılı kolit modelinde GA, oksidatif stress ve enflamatuar markırları baskılamış ve kolonik enflamasyonun şiddetini azaltmıştır (182). Enflamatuar artrit modelinde GA, PGE2, MMP-3, TNF-α, IL-1β, IL-6, iNOS ve NF-κB düzeylerini baskılamıştır (183).

Modifiye fitokimyasallar güncel birçok farmasötik formülün temelini oluşturmaktadır. Fitokimyasalları köken alan terapötik maddeler enflamatuvar ve karsinojenik birçok mekanizma için etkili olurken aynı zamanda zayıf biyoyararlanım, düşük çözünürlük, geçirgenlik ve hedefleme potansiyelinin olmaması, eliminasyon gibi farmakokinetik ve farmakodinamik sorunlar nedeniyle de geliştirilmeye muhtaçtır. Bizim de hedefimiz daha önceki çalışmalarda antienflamatuvar özelliklerinin aktif olduğunu tespit ettiğimiz benzoik asit, GA vb. yapıların türevlerini alkilasyon, esterleştirme, açilasyon ve farklı organik bileşiklerle konjugasyon gibi prosedürlerle modifiye ederek enflamatuvar bağırsak hastalığında kullanılmak üzere geliştirmektir (184,185).

GEREÇ VE YÖNTEMLER

Bu çalışma, Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya ve Eczacılık Fakültesi Farmasötik Kimya AD laboratuvarında gerçekleştirildi.

Deneylerde kullanılan kimyasal madde ve diğer malzemeler Tablo 2 ve Tablo 3 ’de gösterilmiştir.

Tablo 2. Deneylerde kullanılan kimyasallar

Kimyasal Madde Detayları	**Marka Bilgisi**
Penisilin-streptomisin	Thermo Fisher Scientific
Trypsin-EDTA çözeltisi	WISENT
Fosfat tamponlu salin (PBS) tablet	Bioshop
Fetal Sığır Serumu	Thermo Fisher Scientific
McCoy’s 5A besiyeri	WISENT
(1E,6E)-1,7-bis (4-hidroksi-3-metoksifenil) -1,6- heptadien-3,5-dion (Kurkumin)	BLD Pharmatek
Dimetil sülfoksit (DMSO)	TEKKİM
Tripan mavisi çözeltisi	Thermo Fisher Scientific

Tablo 2. Devam Deneylerde kullanılan kimyasallar

Kimyasal Madde Detayları	**Marka Bilgisi**
MTT	Bio Basic
Sodyum nitrit	ISOLAB
N-(1-Naftil) etilendiamin	Sigma-Aldrich
Sülfanilamid	ISOLAB CHEMICALS
Orto-fosforik asit	Sigma-Aldrich
LPS	Sigma-Aldrich
Etanol	ISOLAB CHEMICALS
Sodyum nitrat	MERCK
Aspirin	Sigma-Aldrich
Diklofenak	Deva ilaç
İbuprofen	Nobel ilaç

Tablo 3. Deneylerde kullanılan sarf malzemeler ve kitler

Malzeme Açıklaması	**Marka Bilgisi**
Şırınga filtresi 0,22 mikron	ISOLAB
Steril şırınga (enjektör)	AYSET
%5 CO_2'li İnkübatör	Thermo Fisher Scientific
Inverted faz kontrast mikroskop	OLYMPUS (CKX53)
Steril santrifüj tüpü (15ml -50ml)	ISOLAB
Vorteks	ISOLAB
Mikro pipet ucu (10 ul -1000 ul arası değişen hacimlerde)	NOKE ve ISOLAB
Hassas tartı	SHIMADZU
Buzdolabı	Arçelik
25 cm^2 - 75 cm^2 Hücre flaskı	NEST
Kemilüminesans görüntüleme cihazı	Bio-Rad
10 mL Serolojik pipet	ISOLAB
Steril Çalışma Kabini	Thermo Fisher Scientific
Hemositometre	ISOLAB
Santrifüj cihazı	DLAB
Mikroplaka okuyucu	Thermo Scientific™ Multiskan™ GO
Cryo Tüp	NEST
6 kuyucuklu plaka	NEST
96 kuyucuklu mikro plaka	NEST
Pipet tabancası	ISOLAB

Tablo 3. Devam Deneylerde kullanılan sarf malzemeler ve kitler

Malzeme Açıklaması	Marka Bilgisi
Mikro pipet (0.5 ul - 1000 ul arası değişen hacimlerde)	ISOLAB (CAPP®)
TNF-α ELISA Kit	AFG bioscience
IL-6 ELISA Kit	AFG bioscience
IL-1β ELISA Kit	AFG bioscience
Su banyosu	Daihan Scientific
Saf su cihazı	Nüve NS245
8 kanallı mikro pipet	ISOLAB (CAPP®)
Streril sıvı aktarım kabı	ISOLAB

Tablo 4. Bileşiklerin sentezinde kullanılan kimyasalların özelliklerine ilişkin bilgiler

Ürün Adı	Ürün Özellikleri	Marka Bilgisi
Gallik asit	MA: 170,12 g/mol,	Sigma-Aldrich
İndol-2-karboksilik asit	MA: 175.2 g/mol,	Sigma-Aldrich
3,5-Dimetoksibenzoik asit	MA: 182.17 g/mol,	Sigma-Aldrich
p-Anisik asit	MA: 152.15 g/mol,	Sigma-Aldrich
D-(+)-Glikozamin hidroklorit kristalin	Saflık: ≥99.0%, MA: 215,63 g/mol	Sigma-Aldrich
N-Hidroksisüksinimid	Saflık: ≥%97.0 (T), MA: 115,09 g/mol	Sigma-Aldrich
N-(3-Dimetilaminopropil)-N'-etilkarbodiimid hidroklorit	MA: 191,70 g/mol, Çözünürlük:≤100 mg/mL	Sigma-Aldrich
Diklorometan	Saflık: ≥%99, MA: 84,93 g/mol, Yoğunluk: 1,33 g/cm^3	Merck
n-Hekzan	MA: 86.18 g/mol, Yoğunluk: 0.66 g/cm³,	Merck
Etil Asetat	Saflık: ≥%99.8, MA: 88.11 g/mol, Yoğunluk: 0.90 g/cm³,	Merck

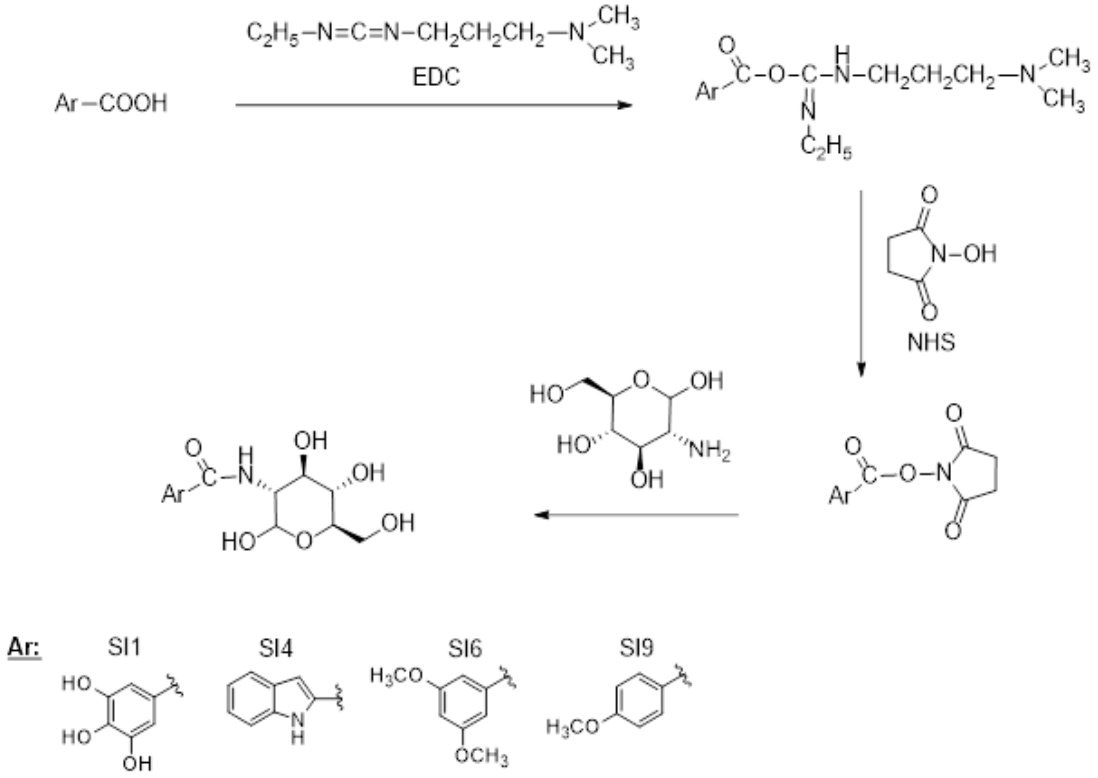
ÇALIŞMA İLAÇLARI VE BİLEŞİKLERİNİN HAZIRLANMASI VE UYGULANMASI

Çalışmamızda kullanılan SI1, SI4, SI6 ve SI9 ilaçlarının sentezi Trakya Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Kimya AD'de Dr. Öğr. Üyesi Serap YILMAZ ÖZGÜVEN'in kontrolünde gerçekleştirilmiştir.

SEMİSENTETİK FİTOKİMYASAL TÜREVİNİN SENTEZİ

Glikozaminin çeşitli aromatik yapıdaki asitlerle amidifikasyon reaksiyonu sonucunda sübstitüe N-glikozbenzamid türevleri sentezlenmiştir. Sentez için sübstitüe benzoik asit türevlerinden 10 mmol alınarak 20 ml etanol içerisinde çözülmüş ve karışıma 10 mmol 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimid eklenmiştir. 20 dakika buz banyosu içerisinde manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır.

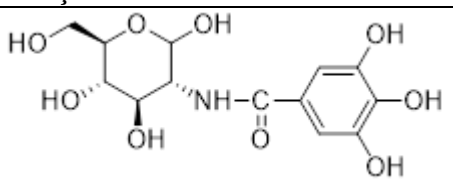
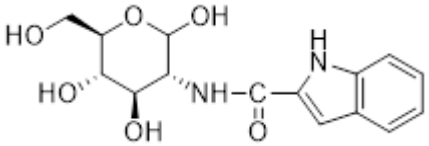
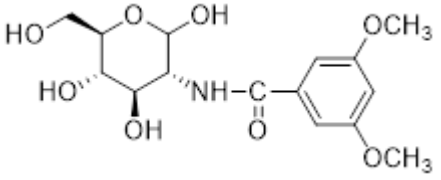
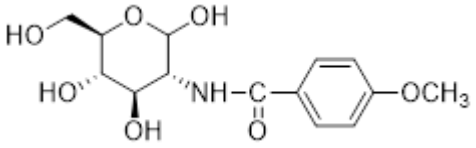
Ardından karışma 10 mmol *N*-hidroksisüksinimid eklenmiş ve 10 dakika daha buz banyosunda karıştırmaya devam edilmiştir. Ardından 10 mmol GA eklenerek 30 dakika buz banyosu, sonrasında 24 saat oda ısısında manyetik karıştırıcıda karıştırılarak reaksiyon devam edilmiştir (Şekil 12). Reaksiyon ince tabaka kromatografisiyle takip edilmiş mobil faz olarak 1:1 hekzan:etilasetat çözücü çifti kullanılmıştır. Reaksiyon sonunda balon içerisindeki karışım rotarievaporatör kullanılarak içindeki çözücü buharlaştırılmış ve kalan bakiye etil asetat / hekzan çözücüleri içinde kristallendirilerek sonuç ürünler olan SI1, SI4, SI6 ve SI9 (Tablo 5) elde edilmiştir (186,187).



Şekil 12. Sübstitüe N-glikozbenzamid türevlerinin sentez reaksiyonu

SI1: Gallik asit konjuge glikozamin; **SI4:** İndol-2-karboksilik asit konjuge glikozamin; **SI6:** 3,5-Dimetoksibenzoik asit konjuge glikozamin; **SI9:** 4-Metoksibenzoik asit konjuge glikozamin; **EDC:** 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimid

Tablo 5. Sentezlenen sübstitüe N-glikozbenzamid türevleri

Kod	Bileşik Formülü	Kimyasal okunuşu
SI1		3,4,5-trihidroksi-N-(glikoz-3-il) benzamid
SI4		N-(glikoz-3-il) indol-2-karboksamid
SI6		3,5-dimetoksi-N-(glikoz -3-il) benzamid
SI9		4-metoksi-N-(glikoz-3-il) benzamid

SENTEZLENEN BİLEŞİKLERİN YAPI TAYİNİ

Tez çalışması kapsamında yeni sentezlenen bileşiklerin yapılarının aydınlatılması amacıyla FTIR, ^{1}H-NMR ve sıvı kromotografisi-kütle spektroskopisi (LC/MS) analizleri gerçekleştirilmiştir.

FTIR Analizi

Sentezlenen bileşiklerin FTIR spektral analizleri Perkin Elmer Spectrum IR 10.6.2, ATR FTIR cihazı (Seri no: 116312) ile gerçekleştirilmiştir. FTIR spektrumları 450-4000 cm^{-1} aralığında 4 cm^{-1} spektral çözünürlükte kaydedilmiş ve bileşikleri oluşturan bağlar arasındaki eğilim ve titreşim hareketleri tespit edilmiştir.

^{1}H-NMR Analizi

Sentezlenen bileşiklerin ^{1}H-NMR spektrumları, Avance Neo 500 OneBay 500 MHz NMR Spektrometresi (Bruker) ile gerçekleştirilmiştir. Çözücücü olarak dimetil sülfoksit (DMSO.d6), iç standart olarak tetrametilsilan (TMS) kullanılmış ve kimyasal kaymalar TMS'ye göre ppm (δ) olarak rapor edilmiştir.

Sıvı Kromotografisi-Kütle Spektroskopisi (LC/MS) Analizi

Sentezlenen bileşiklerinin moleküler ağırlığına ilişkin bilgiler Agilent 6400 Series Triple Quadrupole B.09.00 (B9037.0) marka cihaz ve AB-SCIEX 3200QTRAP aparatı kullanılarak elde edilmiştir.

İnsan Kolon Adenokarsinom HT-29 Hücre Hattı

İn vitro enflamatuar bağırsak hastalığı modeli intestinal epiteliyal hücreler kullanılarak oluşturuldu. Bu bağlamda çalışma süresince yapılan tüm deneylerde ATCC (Amerikan Tipi Kültür Koleksiyonu) protokolüne uygun olarak çoğaltılan HT-29 insan kolon adenokarsinom hücreleri kullanıldı (ATCC®HTB-38TM).

HÜCRE HATTININ HAZIRLANMASI VE HÜCRE KÜLTÜRÜ

Deneylerde kullanılmak üzere hücre besiyeri ortamı olarak McCoy's 5A miktarının %10'u kadar fetal sığır serumu ve %1'i kadar penisilin-streptomisin içeren karışım hazırlanarak sonraki kullanımlar için porsiyonlandı.

Azot tankında muhafaza edilmiş olan HT-29 hücreleri kuru buz ile dolu bir kaba aktarıldıktan sonra 37ºC'ye ayarlanmış su banyosuna transfer edildi ve tamamı çözünene kadar beklendi. Çözünen HT-29 hücreleri uygun miktarda besiyeri ile falkon tüpte karıştırıldı ve santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatan uzaklaştırıldı ve elde edilen hücre pelleti bir miktar besiyeri ile süspanse edilip 25 cm^2'lik flaska aktarıldı. Hücrelerin çoğalması için flask 37ºC'de %5 CO2'li ortam şartlarını sağlayan inkübatöre yerleştirildi. Düzenli aralıklarla hücreler mikroskopta kontrol edildi ve çoğalma durumlarına göre besiyeri ihtiyacı belirlendi. Besiyeri değişimi için kültür ortamı flasktan uzaklaştırıldı ve flaskın taban alanı bir miktar PBS çözeltisi ile yıkandı. Flaska uygun miktarda besiyeri eklenerek inverted mikroskopta yoğunluğu kontrol edilen hücreler 37ºC'de %5 CO2'li ortam şartlarını sağlayan inkübatörde tekrar çoğalmaya bırakıldı.

Hücre Pasajlama Prosesi

Uygun ortam koşullarındaki inkübatörde çoğalmaya bırakılan hücreler istenilen yoğunluğa ulaştığında pasajlanabilmesi için flasktaki kültür ortamı uzaklaştırıldı. Flaskın taban alanı steril PBS ile yıkandı. Yıkama işleminin ardından flaskın taban alanı Tripsin-EDTA

çözeltisi ile muamele edilerek 37ºC'de %5 CO2'li ortamda inkübasyona bırakıldı. Böylece hücrelerin tutundukları flask yüzeyinden ayrılması sağlandı.

Deneylerde kullanılacak hücre miktarı göz önünde bulundurularak 75 cm^2'lik flaska aktarım yapılması planlandı. İnkübasyon sürecini tamamlayan flask içindeki Tripsin-EDTA / hücre süspansiyonu steril falkon tüpe alındı ve santrifüj yapıldı. Santrifüj sonrası süpernatan uzaklaştırıldı ve kalan canlı hücre peleti üzerine bir miktar besiyeri eklenip pipetaj yapılarak homojenizasyon sağlandı. Elde edilen bu karışım içerisine uygun miktarda besiyeri eklenmiş 75 cm^2'lik flaska aktarıldı ve 37ºC'de % 5 CO_2'li ortam şartlarını sağlayan inkübatörde çoğalmaya bırakıldı.

Hücre Dondurma ve Saklama İşlemi

Çoğaltılan HT-29 hücreleri çalışma esnasında ve sonrasında ihtiyaç halinde kullanılabilmek üzere dondurularak saklandı. Hücre dondurma işlemi için dondurulacak hücre miktarına uygun olacak şekilde %5 DMSO içeren besiyeri karışımı hazırlandı 2-8 derece dolapta soğumaya bırakıldı. Hücre yoğunluğu artan flasktaki besiyeri uzaklaştırıldı ve hücrelerin yapıştığı yüzey yeterli miktarda PBS ile yıkandı. Sonrasında pasajlama prosesinde olduğu gibi flask tabanı Tripsin-EDTA çözeltisi ile muamele edilerek uygun koşullarda inkübasyon sağlandı.

İnkübasyon sonrası hücrelerin yapıştıkları yüzeyden ayrıldığı mikroskop ile gözlendi. Flasktaki karışım falkona aktarılarak santrifüjlendi. Santrifüj sonrası süpernatan uzaklaştırıldı, hücre sayımı yapıldı, kalan hücre peleti üzerine soğutulmuş besiyeri karışımı eklenerek cryo tüplere porsiyonlandı ve tüpler etiketlenerek buz kalıbının üzerine alındı. -80°C dolapta bir gece bekletilen tüpler ertesi gün sıvı azot tankına transfer edildi.

Hücre Sayısının Tespiti

Hücre sayımında hemositometre kullanıldı. Hücre sayımı işlemi için kültür ortamı flasktan uzaklaştırıldı ve hücrelerin yapıştığı flask tabanı bir miktar PBS ile yıkandı. Flaska Tripsin-EDTA çözeltisi eklendi ve hücreler 37ºC'de % 5 CO2'li ortamda inkübasyona bırakıldı. Flask içindeki Tripsin-EDTA / hücre süspansiyonu falkon tüpe alındı. Santrifüj sonrası süpernatan uzaklaştırılarak elde edilen pelet bir miktar besiyeri ile homojenize edildi. Oluşan hücre süspansiyonundan ve tripan mavisi çözeltisinden eşit hacimlerde alınarak hücre sayımı

için karışım hazırlandı. Hemositometrenin hücre sayım alanına bir miktar bu karışımdan damlatıldı yapılan işlem iki kez tekrarlanarak ortalama canlı hücre sayısı belirlendi.

Hücre Sayısının Optimizasyonu

İnsan kolon adenokarsinom HT-29 hücreleri $10x10^3$-10^4 hücre/ml olacak şekilde artan sayıda 96 kuyucuklu mikroplakaya ekildi ve 37 ºC'de % 5 CO2'li ortam koşullarını sağlayan inkübatöre yerleştirildi. Mikroplakanın yüzeyindeki hücre yoğunluğu belirli aralıklarla mikroskopta kontrol edildi ve gerektiğinde besiyeri değiştirildi. İnkübasyon sonrasında her kuyucuk için hücre canlılığı tespiti yapıldı. Kuyucukların yüzeyini en az %90 oranında kaplayan ve proliferasyonun yüksek olduğu hücre sayısının $10x10^4$ hücre/ml olduğu belirlendi ve yapılan çalışmalarda bu hücre ekim dozu kullanıldı.

SENTEZLENEN BİLEŞİKLERİN UYGULANMA PROSEDÜRLERİ

Daha önce yapmış olduğumuz denemelere dayanarak SI1, SI4 için en yüksek doz 50µM, SI6 ve SI9 için en yüksek doz 500µM olacak şekilde belirlenen konsantrasyonlar kullanıldı. Toz halinde bulunan bu maddelerin stok çözeltilerinin hazırlanması için DMSO kullanıldı.

Literatür verileri dikkate alınarak Kurkumin'in en yüksek dozu 100µM, Aspirin'in en yüksek dozu 5000µM (188), İbuprofen'in en yüksek dozu 800µM (189), Diklofenak'ın en yüksek dozu 300µM (190) olacak şekilde farklı konsantrasyonları hazırlandı.

Test moleküllerinin ve antienflamatuvar ilaçların çözeltileri analizlerden önce taze olarak hazırlandı ve steril membran filtreden geçirildikten sonra kullanıldı. Yapılan uygulamalarda dimetil sülfoksit oranı %0,5 'in altında tutuldu. HT-29 hücreleri $1x10^4$ hücre/kuyucuk olacak şekilde 96 kuyucuklu mikroplakalara ekildi ve hücrelerin yüzeye tutunması için 24 saat uygun koşullarda inkübe edildi. İnkübasyon sonrası planlanan konsantrasyonlardaki SI1, SI4, SI6, SI9, Aspirin, İbuprofen, Diklofenak ve Kurkumin kuyu başına toplam hacim 200 µl olacak şekilde uygulandı. Tekrar inkübasyona bırakılan mikroplakalara farklı bekleme süreleri uygulanarak hücre proliferasyonu ve sitotoksisitesi, kolorimetrik bir test yöntemi olan MTT ile değerlendirildi. MTT deneyi sonucunda test molekülleri ve antienflamatuvar ilaçların muhtemel fonksiyonel olabilecekleri dozları hesaplandı. Elde edilen dozlara göre, ilaç etkileşim çalışmaları yapıldı. Test molekülleri ve

antienflamatuvar ilaçların konsantrasyonlarının kombinasyonundan elde edilen değerler ile sinerjistik etkiler değerlendirildi.

MTT TESTİ İLE HÜCRE SAĞKALIM TAYİNİ

Hücre canlılığının tespiti için yapılan MTT testinin temeli, çoğu canlı hücre için mitokondriyal aktivitenin sabit olması ve bu nedenle canlı hücrelerin sayısındaki bir artışın veya azalmanın mitokondriyal aktivite ile doğrusal olarak ilişkili olmasına dayanır. Hücrelerin mitokondriyal aktivitesi, tetrazolyum tuzunun canlı hücrelerdeki mitokondri membranında lokalize olan mitokondriyal süksinat dehidrojenaz enzimine bağlanarak formazan kristalleri oluşturup sonrasında çözündürülmesiyle yansıtılır. Böylece canlı hücre sayısındaki herhangi bir artış veya azalma, 540 ve 720 nm'de bir plaka okuyucu kullanılarak optik yoğunluğa yansıyan çözünmüş formazan kristallerinin konsantrasyonu ölçülerek tespit edilebilir (191,192).

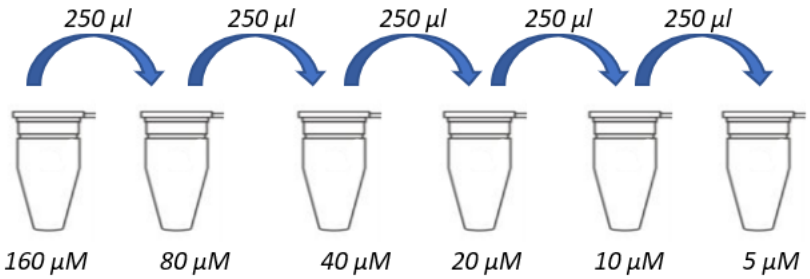
Çalışmamızda test moleküllerinin ve antienflamatuar ilaçların sitotoksik etkileri MTT analiziyle tespit edildi. 96 kuyucuklu mikroplakaya daha önce yapılan çalışmalara dayanarak $1x10^4$ hücre/kuyucuk olacak şekilde HT-29 hücresi ekildi. Ekim yapılan mikroplaka 37ºC'de %5 CO_2'li ortam koşullarında 24 saat inkübasyona bırakıldı. İlaç uygulaması sonrası tekrar 24-72 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresi sonunda hücre sağkalım oranı, MTT kullanılarak spektrofotometrik yöntemle kantitatif olarak saptandı. Bu amaçla mikroplakadaki besiyeri tazelendi ve PBS içinde hazırlanmış MTT (1 mg/ml) uygulaması yapıldı. 37ºC'de %5 CO_2'li ortamda 4 saat inkübe edildikten sonra MTT solüsyonu uzaklaştırıldı ve dimetil sülfoksit ilave edildi. Ardından 570 nm dalga boyundaki absorbans değerleri kaydedildi.

NİTRİK OKSİT TARAMA TESTİ

Nitrik Oksit, fizyolojik yolları düzenler ve vasküler gevşeme, antienflamasyon, antiplatelet, antitromboz, antibakteriyel ve antiviral özellikler gibi terapötik etkiler gösterir. Bununla birlikte, gaz halindeki NO yüksek reaktiviteye ve kısa bir yarı ömre sahiptir (193). NO, iltihaplı bağırsakta, iltihaplanmamış bağırsaktan çok daha fazla miktarda lokal olarak üretilir ve salınır (194). NO'nun, EBH'de enflamasyonun başlaması ve sürdürülmesi ile ilişkilendirilmiş olması NO metabolitlerinin ölçümünü hastalık aktivitesinin izlenmesi için önemli kılar.

Bu çalışmada tarama testi olarak in vitro EBH modelinde HT-29 hücrelerinden salgılanan NO seviyelerini belirlemek için Green, L.C ve arkadaşlarında belirtildiği gibi Griess reaktifi kullanıldı (195,196).

Sodyum nitrit distile suda çözülerek 10mM'lık stok çözelti hazırlandı ve oda sıcaklığında karanlık ortamda muhafaza edildi. 5µM ile 160 µM arasında değişen konsantrasyonlarda standart çözelti elde edilebilmesi için stok solüsyonu PBS ile aşağıdaki şekil 13'te olduğu gibi seri seyreltildi.



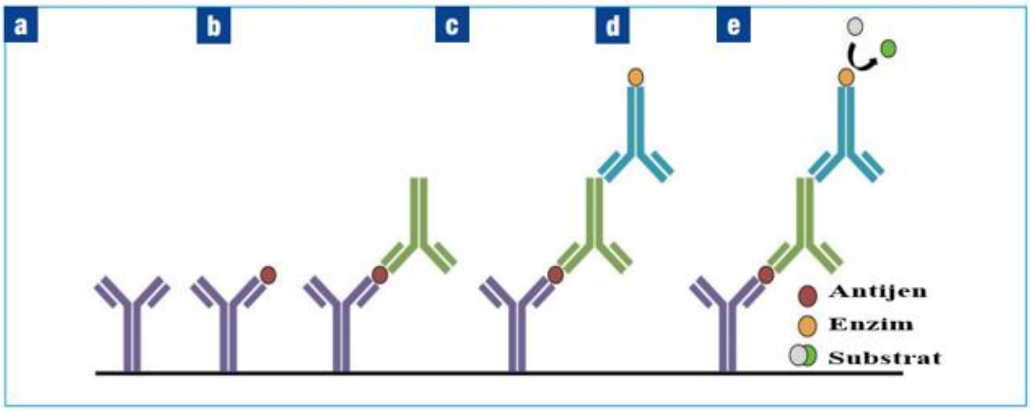
Şekil 13. NO tayininde kullanılacak standartların hazırlanması

Griess reaktifi hazırlanırken %0,1 oranında N-(1-Naftil) etilendiamin dihidroklorür deiyonize suda çözüldü ve üzerine %2,5 oranında orto-fosforik asit eklendi elde edilen karışıma %1 oranında sülfanilamid ilave edildi. Griess reaktifi her kullanımda taze olarak hazırlandı. 96 kuyucuklu mikroplakaya 48 saatlik ilaç uygulamaları sonrasında elde edilen numuneler ve hazırlanan standart çözeltiler pipetlendi, üzerine 1:1 oranında Griess reaktifi ilave edilerek karanlık ortamda 37°C'de 15 dakika boyunca inkübasyona bırakıldı. Sonrasında mikroplaka okuyucu ile 570nm'deki absorbansları ölçüldü.

SANDVİÇ ELISA YÖNTEMİ İLE TNF-α, IL-6, IL-1β'NIN TESPİT EDİLMESİ

Sandviç ELISA tekniği, belirli bir numune antijenini tespit etmek için kullanılır. Testin adı, tasarımının bir antijeni iki antikor arasında 'sandviç' yapabilmesinden gelmektedir. Kuyu yüzeyi, istenen antijeni yakalamak için bilinen miktarda bağlı antikorla hazırlanır. Spesifik olmayan bağlanma bölgeleri bloke edildikten sonra, antijen içeren numune plakaya uygulanır. Daha sonra antijeni "sandviç" yapan spesifik bir birincil antikor eklenir. Birincil antikora bağlanan, enzim bağlantılı ikincil antikorlar uygulanır. Bağlanmayan antikor-enzim

konjugatları yıkanır. Substrat eklenir ve enzimatik olarak daha sonra ölçülebilen bir renge dönüştürülür. Optik yoğunluğun ölçümü, numunedeki antijen miktarı ile orantılıdır (Şekil 14) (197).

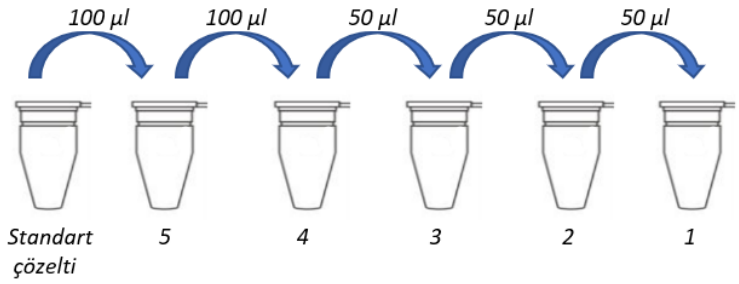


Şekil 14. Sandviç ELISA yöntemi (198)

Bu çalışmada TNF-α, IL-6, IL-1β parametreleri ELISA testi ile ölçülmüştür.

Tüm parametrelerin tespit edilmesinde tek bir standart metod kullanılarak metodlar arası hata kaynaklarının ortadan kaldırılması amaçlanmıştır. ELISA kitlerinde yer alan prospektüse uygun olarak biyokimyasal parametrelerin ölçümü aşağıdaki gibi yapılmıştır:

- İlaç uygulamaları sonucunda elde edilen -20°C'de muhafaza edilmiş numuneler dolaptan çıkarılarak deney öncesinde oda koşullarına getirildi.
- Yıkama tamponu hazırlanması için kitin içinde yer alan 20 ml'lik konsantre yıkama tamponu çözeltisi deiyonize su ile 30 kat hacimde seyreltildi.
- Standart çözeltilerin hazırlanması için 5 adet mikrotüp etiketlenerek her tüpe 50µl standart seyreltici pipetlendi. En yüksek konsantrasyonun olacağı tüpe 100µl standart çözeltiden pipetlendi ve aşağıdaki Şekil 15'te olduğu gibi seri seyreltme yapılarak diğer konsantrasyonlar elde edildi. Standart seyreltme çözeltisi deneyde kör "boş kuyu" (0 ng/L) olarak kullanıldı.



Şekil 15. Standart çözelti konsantrasyonlarının hazırlanması

- 96 kuyucuklu mikroplakada her bir numune kuyusuna numune seyreltici solüsyondan 40µl pipetlendi ve üzerine 10 µl numune eklendi. Standartlar için ayrılan kuyulara ise önceden hazırlanan standart çözeltilerden 50 µl pipetlendi.
- Kitin içindeki yapışkan şerit ile mikroplakanın üzeri kapatılarak karanlık ortamda 37°C'de 30 dakika boyunca inkübasyona bırakıldı.
- İnkübasyon sonrası yıkama işlemi için yapışkan şerit açılarak kuyucuklardaki karışım uzaklaştırıldı, her bir kuyucuğa yıkama çözeltisinden yeteri kadar pipetlenerek 30 saniye süre ile bekletildi bu işlem 5 kez tekrar edilerek yıkama işlemi sonlandırıldı.
- Kör kuyu hariç olacak şekilde her kuyucuğa enzim-konjugat reaktifinden 50µl pipetlendi.
- Daha önce yapılan inkübasyon ve yıkama işlemleri sırasıyla tekrarlandı.
- Yıkama işlemi sonrasında her kuyuya kromojen solüsyonu A'dan 50 µl ve kromojen solüsyonu B'den 50 µl pipetlenerek mikroplaka 37°C'de 15 dakika boyunca inkübe edildi.
- İnkübasyon sonrası reaksiyonu durdurmak için durdurma solüsyonundan her kuyucuğa 50µl pipetlendi 450 nm'de absorbans değerleri okundu.
- Standart solüsyonlardan elde edilen optik dansite değerlerine karşılık gelen konsantrasyonlar ile standart grafiği hazırlandı ve standart eğrinin lineer regresyon denklemi çıkarıldı.
- Numunelerin optik dansite değerleri bu denklemde yerine koyularak konsantrasyonları hesaplandı.

Kullanılan kitlerin hassasiyet değerleri ve ölçüm aralıkları Tablo 6'da verilmiştir.

Tablo 6. Kitlerin hassasiyet ve ölçüm aralığı değerleri

Ölçülen Parametre	Ölçüm Aralığı	Hassasiyet
TNF-α	15ng/L -300ng/L	3ng/L
IL-6	0.2 ng/L -8 ng/L	0.05ng/L
IL-1β	1 ng/L-20 ng/L	0.2ng/L

İSTATİSTİKSEL DEĞERLENDİRME

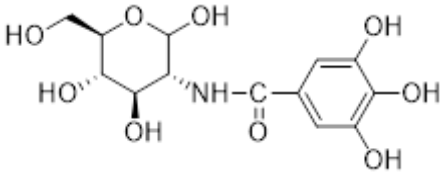
Yapılan çalışmalar sonucunda elde edilen verilerin istatistiksel analizleri için SPSS (Windows, versiyon 25; SPSS Inc., Chicago, IL, A.B.D. Lisans no: 10240642) yazılımı kullanıldı. Deney gruplarının karşılaştırılması ve istatiksel olarak farklılığının belirlenmesi amacıyla Dunnett's testi uygulandı. Sonuçlar, minimum 3 paralel çalışmaya ait sonuçların ortalaması±standart hata olarak ifade edildi ve istatistiksel anlamlılık değeri $p \leq 0.05$'in altındaki farklılıklar istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

BULGULAR

ELDE EDİLEN BİLEŞİKLERİN ANALİZ BULGULARI

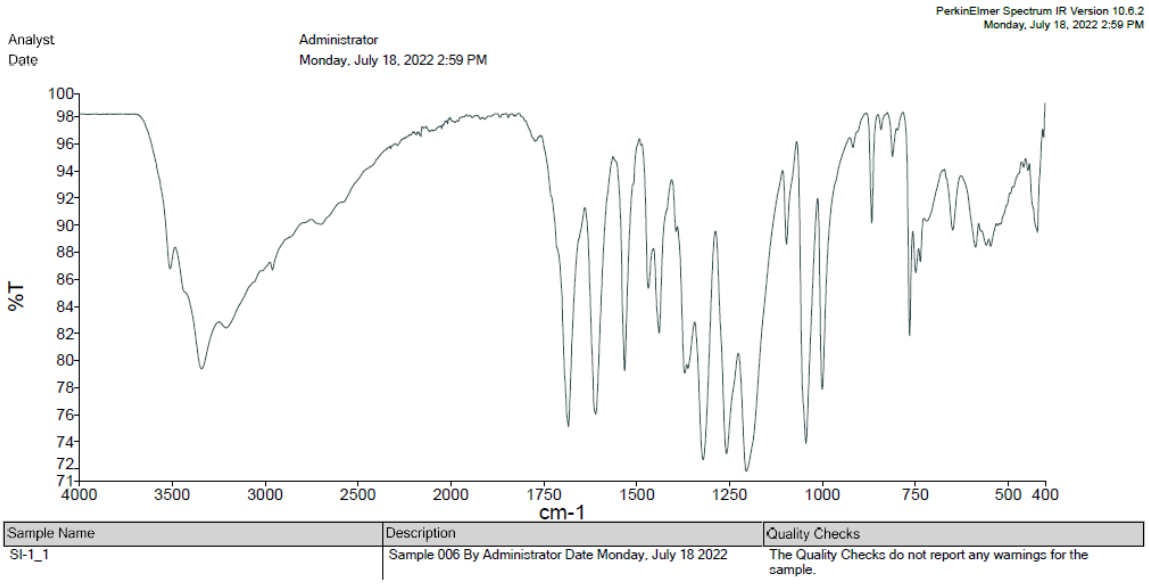
Sentezlenen SI1 Bileşiğinin Bulguları

Sentezlenen SI1 bileşiği için yapı Şekil 16'da yer almaktadır. Kapalı formülü $C_{13}H_{17}NO_9$ olarak bulunmuş ve molekül ağırlığı 331,27 g/mol olarak hesaplanmıştır.



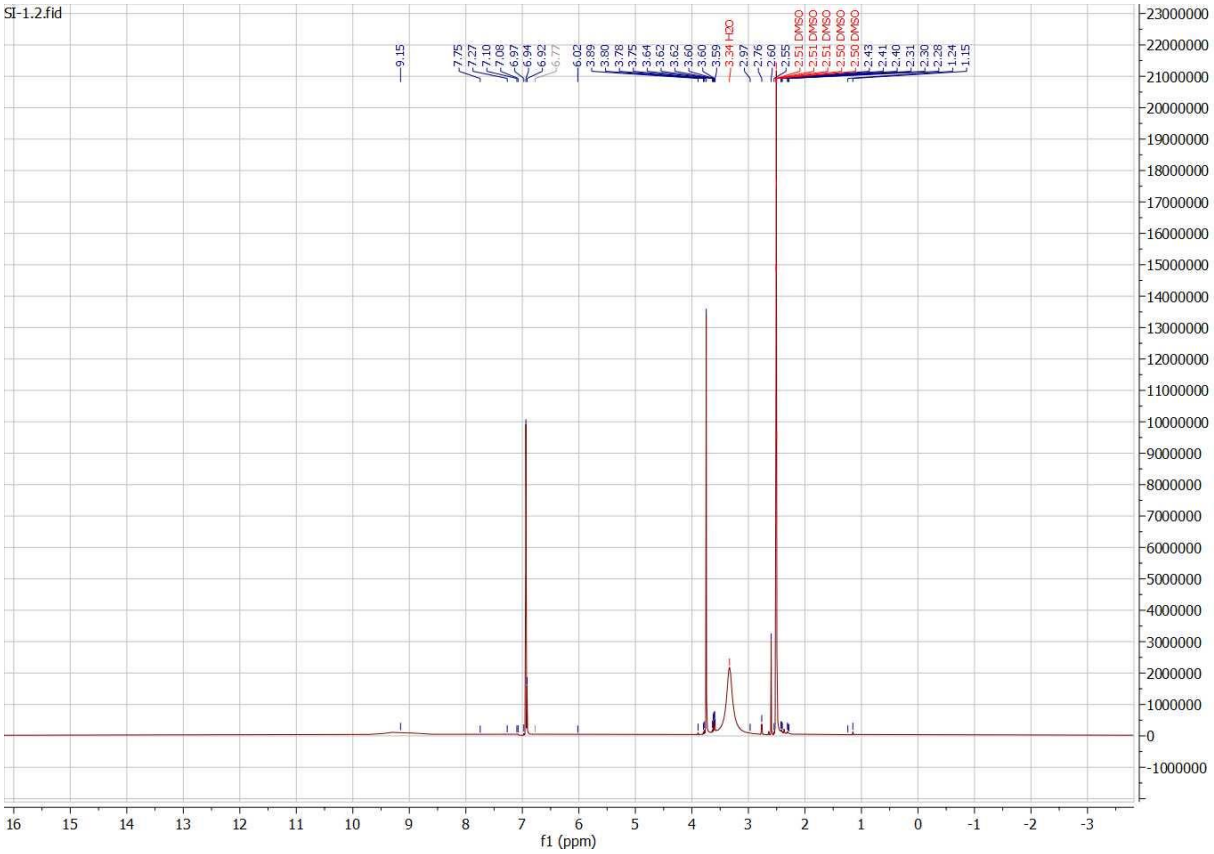
Şekil 16. SI1 bileşiğinin yapısı

Sentezlenen SI1 Bileşiğinin FTIR spektrumu incelendiğinde 3514cm^{-1} ¯OH grubuna ait gerilim piki, 3344cm^{-1} ¯NH grubuna ait gerilim piki, 3212-2962cm^{-1} ¯CH gruplarına ait gerilim pikleri, 1684cm^{-1} ¯CONH yapısındaki karbonil gerilim piki, 1532-1439cm^{-1} C-H eğilim pikleri, 1258-1204cm^{-1} C-O gerilim pikleri, 764cm^{-1} sübstitüe benzene ait C-H eğilim piki gözlenmiştir (Şekil 17).



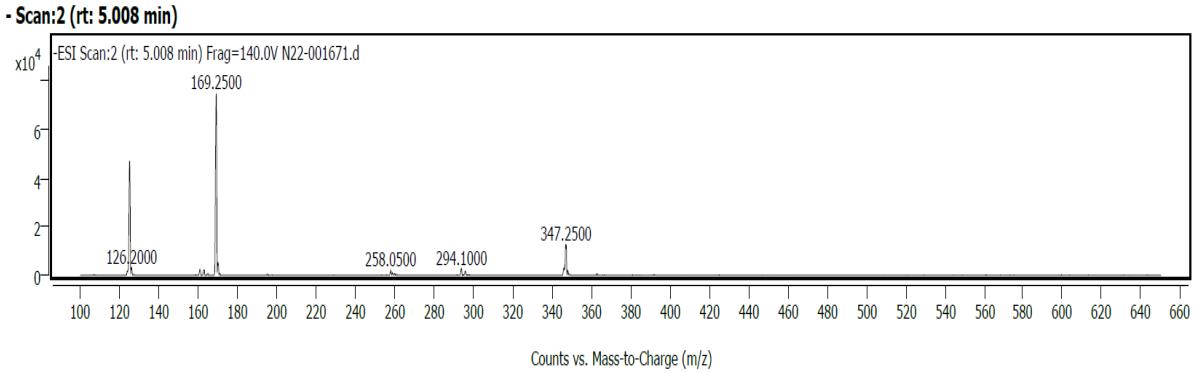
Şekil 17. Sentezlenen SI1 bileşiğinin FTIR spektrumu

Sentezlenen SI1 Bileşiğinin ^{1}HNMR spektrumu incelendiğinde, 2,55 ppm'de singlet şeklindeki pik glikozda yer alan C-H'lere, 3,75 ppm'de singlet şeklideki pik $^-CH_2$ grubuna6,92 ppm'de singlet şeklindeki pik benzendeki C-H'lere, 9,15 ppm'de yayvan singlet şeklindeki pik $^-$NH grubuna karşılık olarak gözlenmiştir (Şekil 18).



Şekil 18. SI1 bileşiğinin^{1}HNMR spektrumu

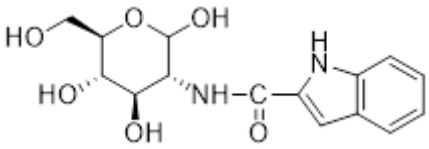
SI1 Bileşiğinin kütle spektrumu incelendiğinde 347m/z M^++18-1 piki su molekülüyle birlikte moleküler iyon pikini göstermektedir. 169 m/z piki M^+-166 molekülde glikozun ayrıldığı fragmanını, 126m/z piki M^+-205 GAL'a ait fragmanı göstermektedir (Şekil 19).



Şekil 19. SI1 bileşiğinin kütle spektrumu

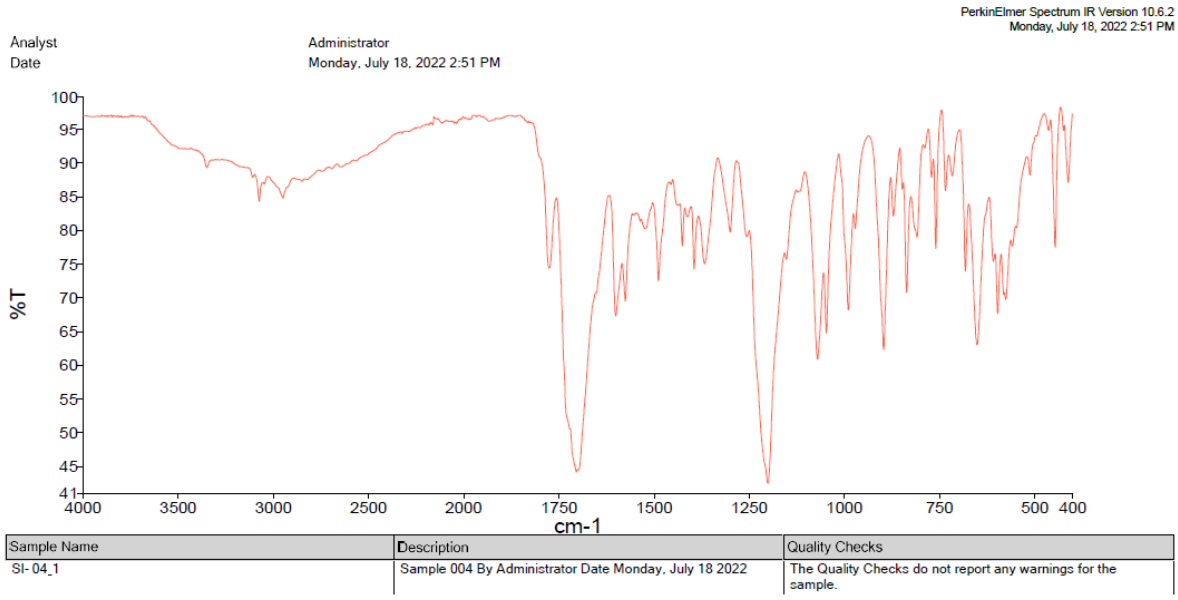
Sentezlenen SI4 Bileşiğinin Bulguları

Sentezlenen SI4 bileşiğinin yapısı Şekil 20'de gösterilmiştir. Kapalı formülü $C_{15}H_{18}N_2O_6$ olarak bulunmuş ve molekül ağırlığı 322,17 g/mol olarak hesaplanmıştır.



Şekil 20. SI4 bileşiğinin yapısı

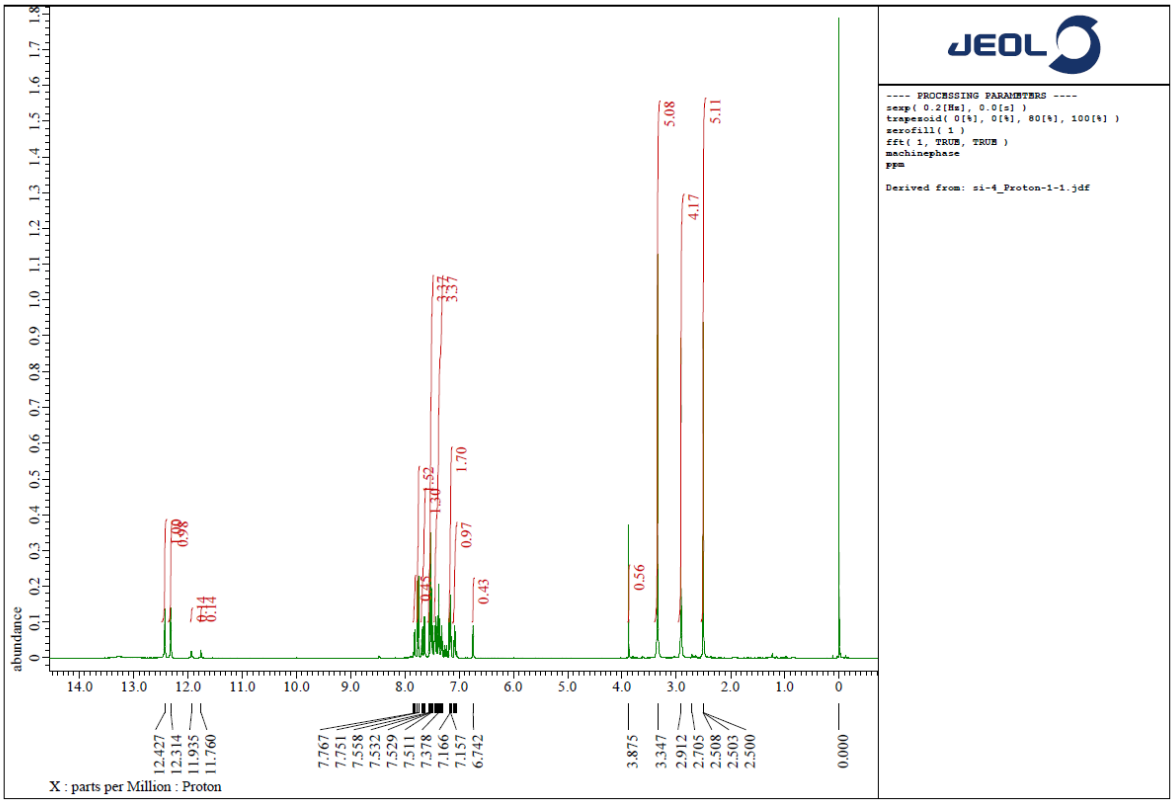
Sentezlenen SI4 Bileşiğinin FTIR spektrumu incelendiğinde 3353cm^{-1} ¯NH grubuna ait gerilim piki, 3111-2852cm^{-1} ¯CH gruplarına ait gerilim pikleri, 1704cm^{-1} ¯CONH yapısındaki karbonil gerilim piki, 1575-1412cm^{-1} C-H eğilim pikleri, 1200cm^{-1} C-O gerilim piki, 896 - 759cm^{-1} indol halkasına ait C-H eğilim pikleri gözlenmiştir (Şekil 21).



Şekil 21. Sentezlenen SI4 bileşiğinin FTIR spektrumu

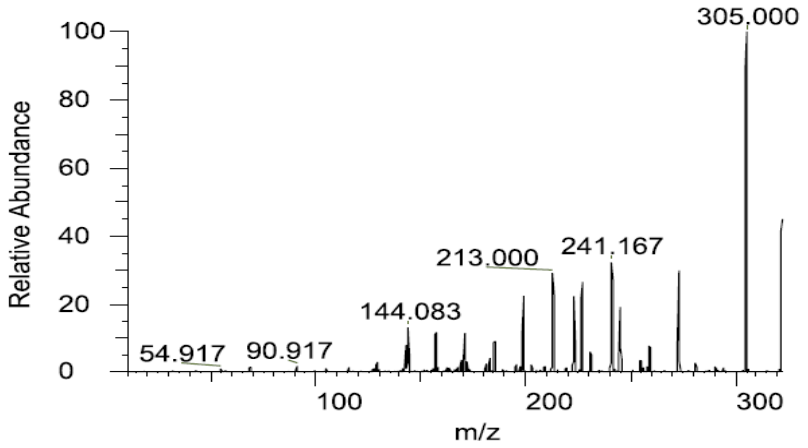
Sentezlenen SI4 Bileşiğinin ^{1}HNMR spektrumu incelendiğinde, 2,50-2,91ppm'de singlet şeklindeki pikler glikozda yer alan C-H'lere, 3,34 ppm'de singlet şeklideki pik ¯CH_2 grubuna, 6,74-7,76 ppm arasında çıkan pikler indol halkasındaki C-H'lere, 12,31 ppm'de

singlet şeklindeki pik indol yapısının ¯NH grubuna, 12,42 ppm'de singlet şeklindeki pik amid yapısının ¯NH grubuna karşılık olarak gözlenmiştir (Şekil 22).



Şekil 22. SI4 bileşiğinin¹HNMR spektrumu

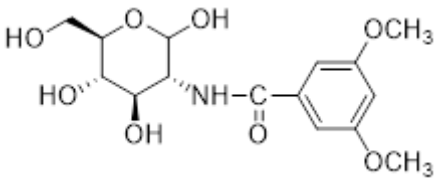
Sentezlenen SI4 Bileşiğinin kütle spektrumu incelendiğinde 305 m/z M+1-1-18 piki moleküler iyon pikini göstermektedir. 144 m/z piki M^{+}-178 amid yapısının parçalanması sonucu oluşan indol-2-karboksilik asidin fragmanını göstermektedir (Şekil 23).



Şekil 23. SI4 bileşiğinin kütle spektrumu

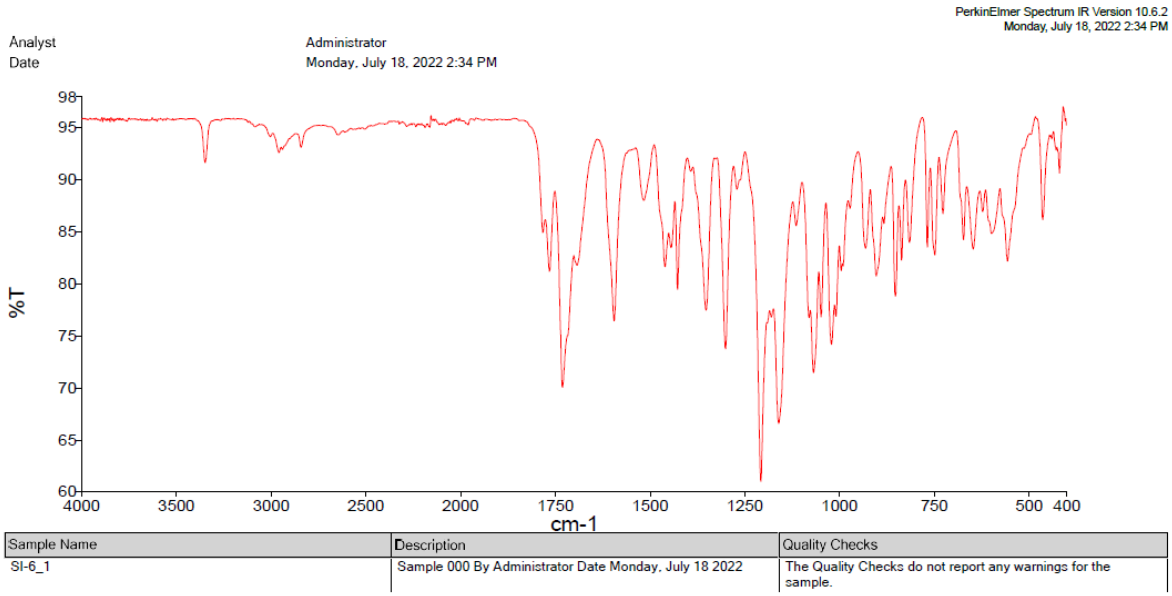
Sentezlenen SI6 Bileşiğinin Bulguları

Sentezlenen SI6 bileşiğinin yapısı Şekil 24'te gösterilmiştir. Kapalı formülü $C_{15}H_{21}NO_8$ olarak bulunmuş ve molekül ağırlığı 343,33 g/mol olarak hesaplanmıştır.



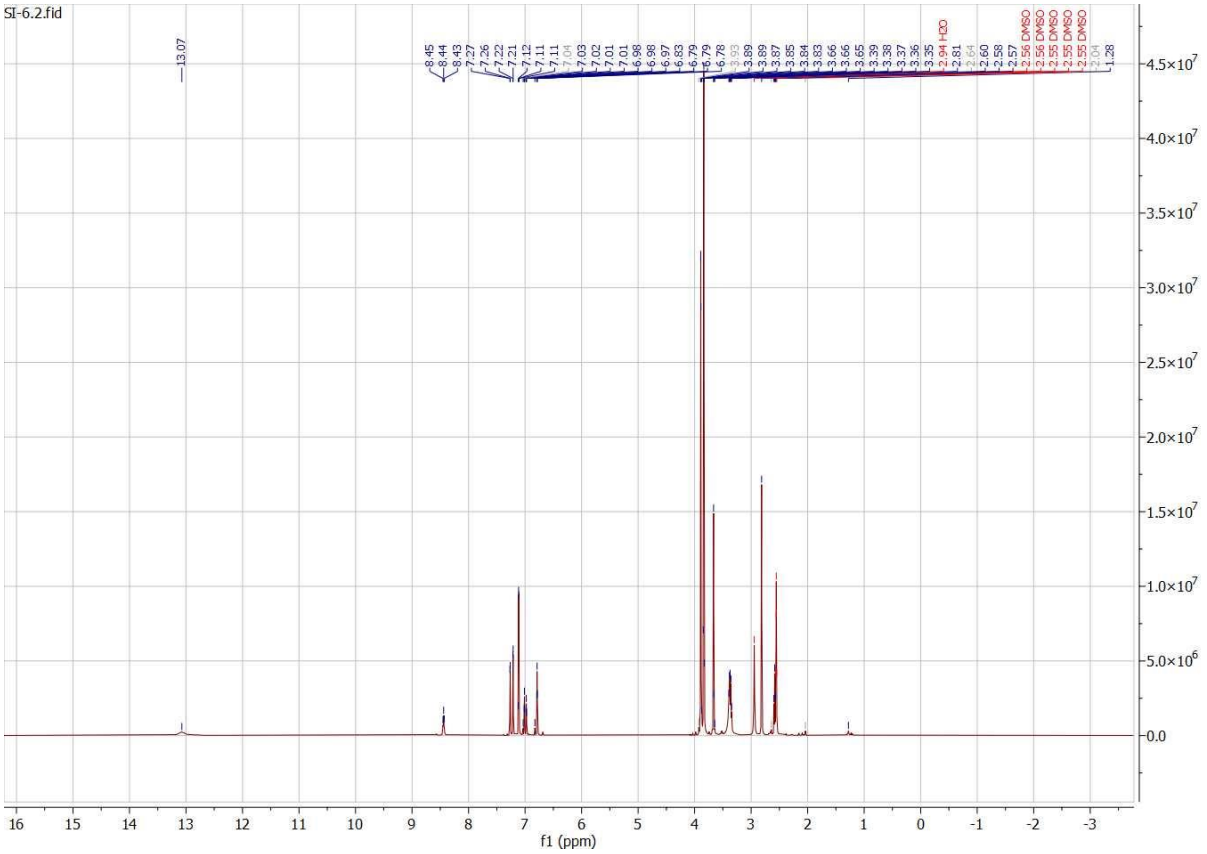
Şekil 24. SI6 bileşiğinin yapısı

Sentezlenen SI6 Bileşiğinin FTIR spektrumu incelendiğinde 3351cm^{-1} ¯NH grubuna ait gerilim piki, 3084-2960cm^{-1} ¯CH gruplarına ait gerilim pikleri, 1731cm^{-1} ¯CONH yapısındaki karbonil gerilim piki, 1516-1460cm^{-1} C-H eğilim pikleri, 1207-1160cm^{-1} C-O gerilim pikleri, 726cm^{-1} trisübstitüe benzene ait C-H eğilim piki gözlenmiştir (Şekil 25).



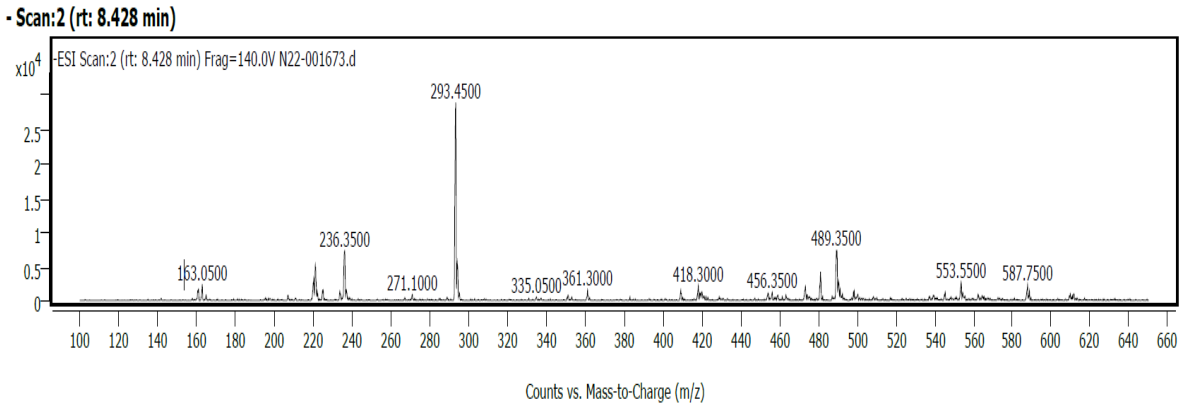
Şekil 25. Sentezlenen SI6 bileşiğinin FTIR spektrumu

Sentezlenen SI6 Bileşiğinin ^{1}HNMR spektrumu incelendiğinde, 2,58-2,81 ppm'de sırasıyla triplet ve singlet şeklindeki pikler glikoz yapısındaki C-H'lere, 3,66 ppm'de singlet şeklindeki pik $^{-}OCH_3$ grubuna, 3,84-3,89 ppm'de dublet şeklideki pikler $^{-}CH_2$ grubuna, 6,78 ve 7,27 ppm'de dublet ve triplet şeklindeki pikler benzendeki C-H'lere, 13,07 ppm'de yayvan singlet şeklindeki pik ^{-}NH grubuna karşılık olarak gözlenmiştir (Şekil 26).



Şekil 26. SI6 bileşiğinin¹HNMR spektrumu

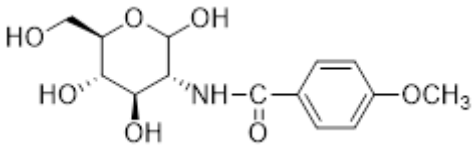
Sentezlenen SI6 Bileşiğinin kütle spektrumu incelendiğinde 361 m/z M^+-1+18 piki moleküler iyon piki su molekülüyle birlikte tespit edilmiştir. 163 m/z piki M^+-166 glikoz fragmanını göstermektedir (Şekil 27).



Şekil 27. SI6 bileşiğinin kütle spektrumu

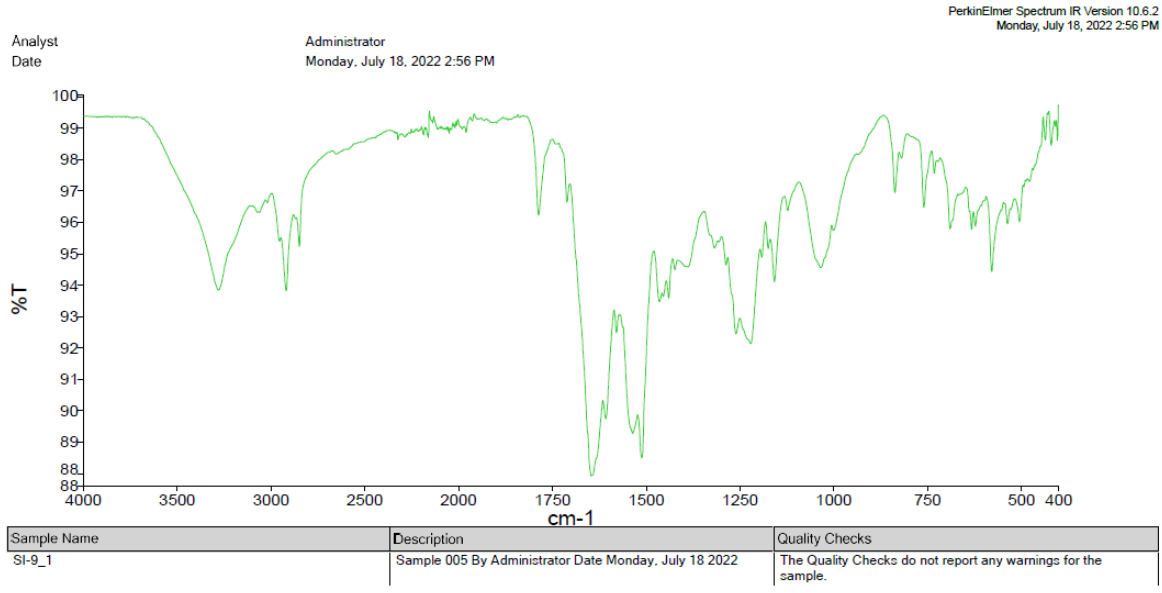
Sentezlenen SI9 Bileşiğinin Bulguları

Sentezlenen SI9 bileşiğinin yapısı Şekil 28'de gösterilmiştir. Kapalı formülü $C_{14}H_{19}NO_7$ olarak bulunmuş ve molekül ağırlığı 313,30 g/mol olarak hesaplanmıştır.



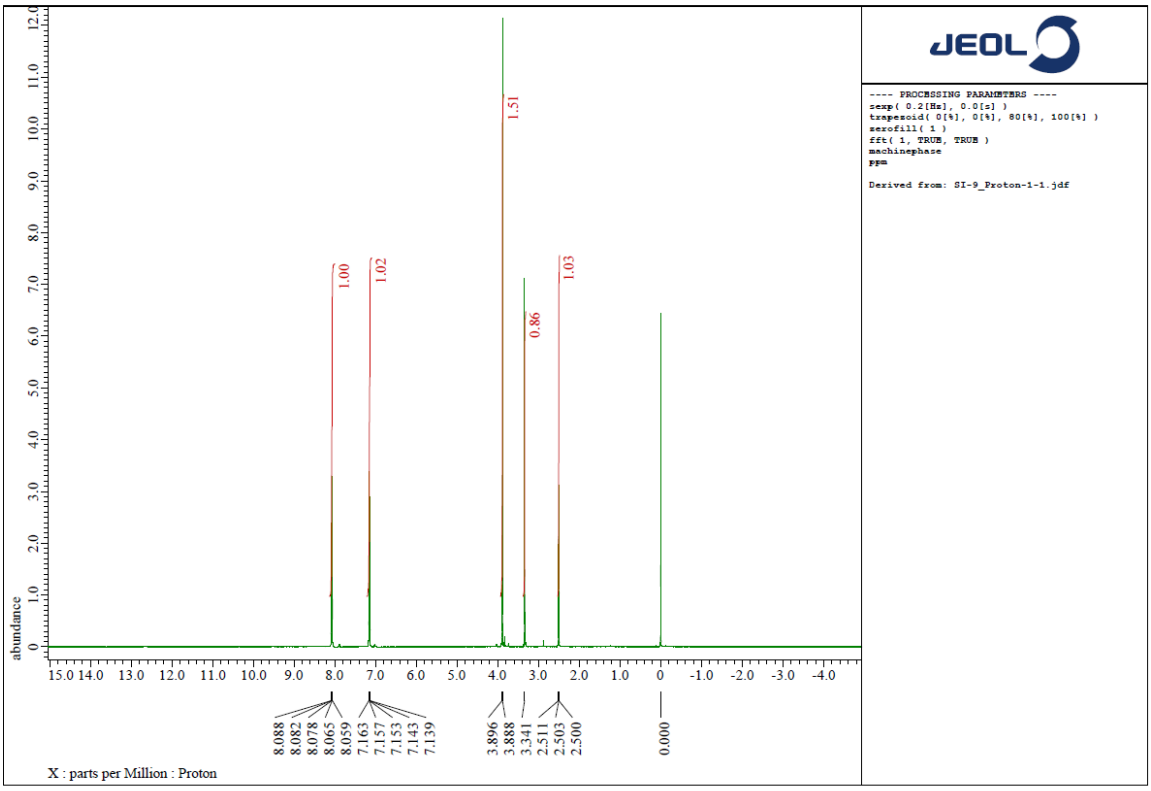
Şekil 28. SI9 bileşiğinin yapısı

Sentezlenen SI9 Bileşiğinin FTIR spektrumu incelendiğinde 3283cm^{-1} ¯NH grubuna ait gerilim piki, 3073-2850cm^{-1} ¯CH gruplarına ait gerilim pikleri, 1646cm^{-1} ¯CONH yapısındaki karbonil gerilim piki, 1515-1439cm^{-1} C-H eğilim pikleri, 1260-1220cm^{-1} C-O gerilim pikleri, 577cm^{-1} disübstitüe benzene ait C-H eğilim piki gözlenmiştir (Şekil 29).



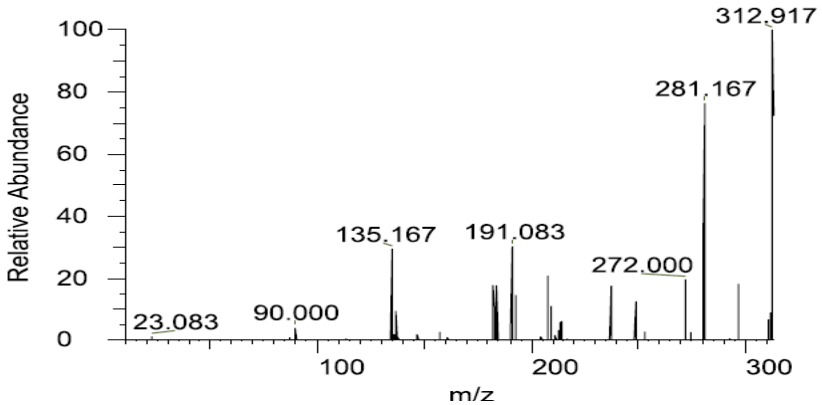
Şekil 29. Sentezlenen SI9 bileşiğinin FTIR spektrumu

Sentezlenen SI9 Bileşiğinin ^{1}HNMR spektrumu incelendiğinde, 2,50 ppm'de singlet şeklindeki pik glikoz yapısındaki C-H'lere, 3,34 ppm'de singlet şeklideki pik ¯CH_2 grubuna, 3,89 ppm'de singlet şeklindeki pik ¯OCH_3 grubuna, 7,15 ve 8,07 ppm'de singlet şeklindeki pikler benzendeki C-H'lere karşılık olarak gözlenmiştir (Şekil 30).



Şekil 30. SI9 bileşiğinin^{1}HNMR spektrumu

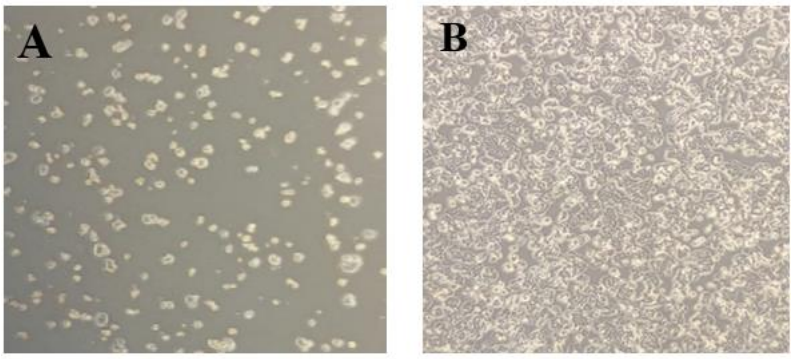
Sentezlenen SI9 Bileşiğinin kütle spektrumu incelendiğinde 312m/z M+1-1-18 piki moleküler iyon pikini göstermektedir. 281m/z piki M^+-31 glikoz yapısından $^-OCH_3$ ayrılmasıyla oluşan fragmanı, 135 m/z piki M^+-178 amid yapısının parçalanması sonucu oluşan p-metoksi benzoik asidin fragmanını göstermektedir (Şekil 31).



Şekil 31. SI9 bileşiğinin kütle spektrumu

SENTEZLENEN ÖZGÜN BİLEŞİKLERİN FONKSİYONALİTE TESTLERİ

Enflamatuar bağırsak hastalığı modeli oluşturabilmek için kullanılan HT-29 hücreleri pasajlandıktan sonra 8 saat aralıklarla invert mikroskopta kontrol edildi. Hücrelerin 8. saatte flask yüzeyine tutunmaya başladığı, 24. saatte dublike oldukları gözlemlendi. Takipler sırasında hücreler flask yüzeyine tutunmaya başladığında (0. gün) ve taban alanına oranla en az %80 yoğunluğa ulaştığında (4. gün) görüntüleri kaydedildi (Şekil 32).



Şekil 32. HT-29 hücrelerinin mikroskop görüntüsü A: Düşük yoğunlukta (0. gün); B: Yüksek yoğunlukta (4. gün)

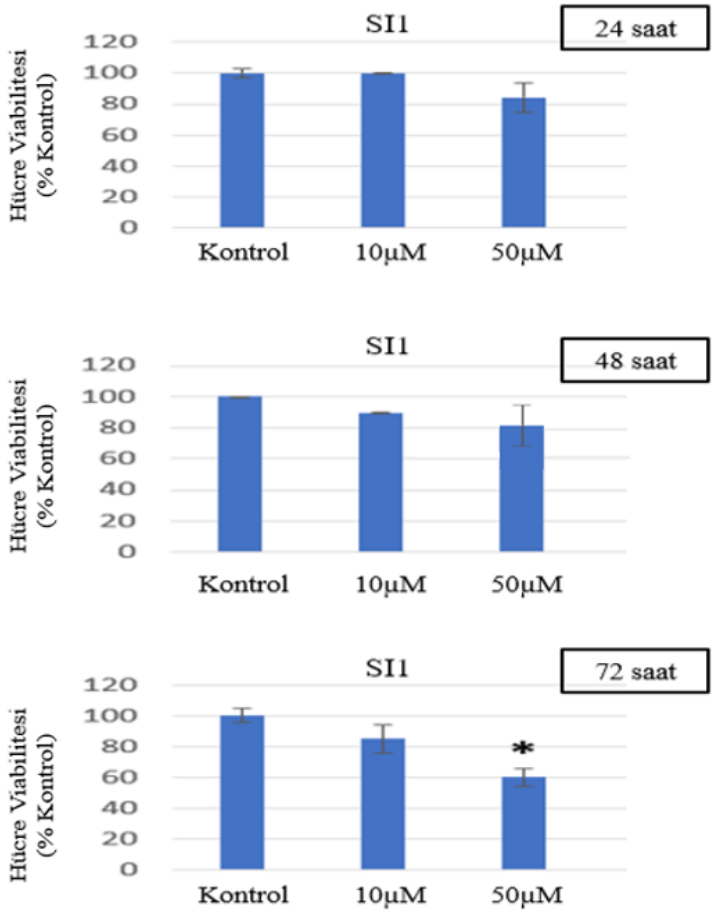
Görüntülerin HT-29 hücrelerinin kaynağı olan ATCC® (American Type Culture Collection) ile uyumlu olduğu görülmüştür (199).

Viabilite Analizi Bulguları

Sentezlenen özgün bileşiklerin hücre canlılığına etkilerinin tespiti için MTT analizi kullanıldı. Her bileşik için 24, 48 ve 72 saatlik maruziyet sonrası elde edilen sonuçlara Dunnett's testi uygulandı. Sonuçlar, minimum 3 paralel çalışmaya ait sonuçların ortalaması±standart hata olarak ifade edildi.

Sentezlenen SI1 bileşiğinin HT-29'da hücre viabilitesine etkisinin değerlendirilebilmesi için mikroplakalara hücre ekildikten 24 saat sonra SI1 uygulaması yapıldı. Anlamlı sitotoksik etkinin hücrelerin 72 saatlik SI1 maruziyeti sonrasında 50 µM konsantrasyonda başladığı tespit edildi. HT-29 hücrelerinin 24 saatlik SI1 maruziyeti sonrası kontrole göre 10 µM doz için hücre canlılığı %100,22±0,39 ve 50 µM doz için %84,36±9,69'dur. Benzer şekilde 48 saatlik uygulama için de 10 µM dozda %89,77±0,11 iken 50 µM dozda %79,27±0,07 olarak tespit

edilmiştir. SI1 uygulaması sonrası 72. saatte yapılan ölçümler için kontrole kıyasla en düşük hücre canlılığı 50 µM dozda (%59,94±5,61) gözlenmiştir (Şekil 33).

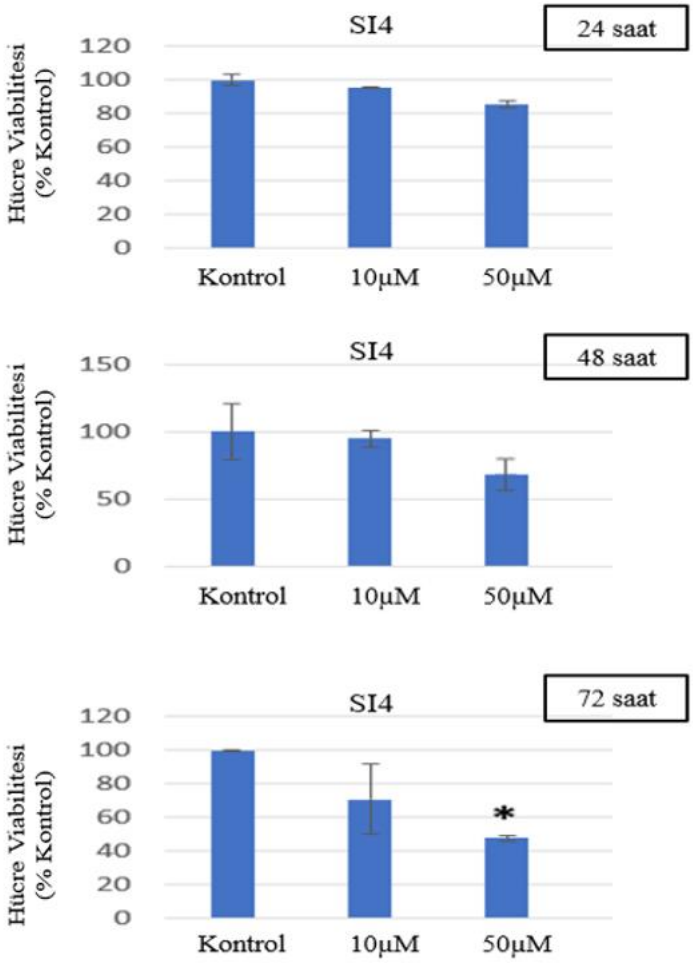


Şekil 33. SI1 bileşiğinin sitotoksik etkisi

(*p<0.05 kontrol ile karşılaştırıldığında)

Sentezlenen SI4 bileşiğinin HT-29 hücrelerindeki sitotoksik etkisinin değerlendirilebilmesi için 24, 48 ve 72 saatlik uygulamalar yapılmıştır. 24 saatlik SI4 maruziyeti sonrasında kontrole göre 10µM dozda hücre viabilitesi %95,16±0,33 ve 50µM dozda %85,63±1,98'dir. 48 saatlik uygulama yapılan grupta SI4'ün 10µM dozda (%94,73±6,54) sitotoksik etkisinin olmadığı, 50µM doz için de benzer şekilde anlamlı bir değişim olmadığı tespit edildi. SI4 bileşiğinin 72 saatlik uygulamasında 10 µM doz için kontrole göre hücre canlılığındaki değişim %29,03'dur ve en düşük hücre canlılığının 50µM

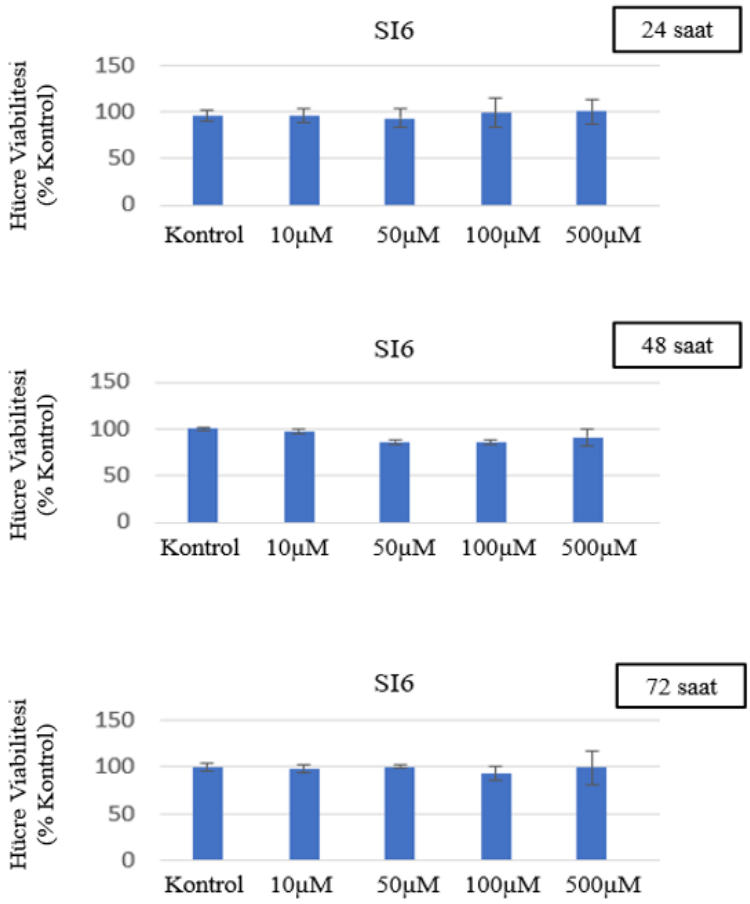
dozda (%47,71±1,63) olduğu belirlenmiştir. Buna göre SI4'ün anlamlı sitotoksik etkisinin 72 saatlik maruziyette 50µM dozda başladığı tespit edilmiştir (Şekil 34).



Şekil 34. SI4 bileşiğinin sitotoksik etkisi

(*p<0.05 kontrol ile karşılaştırıldığında)

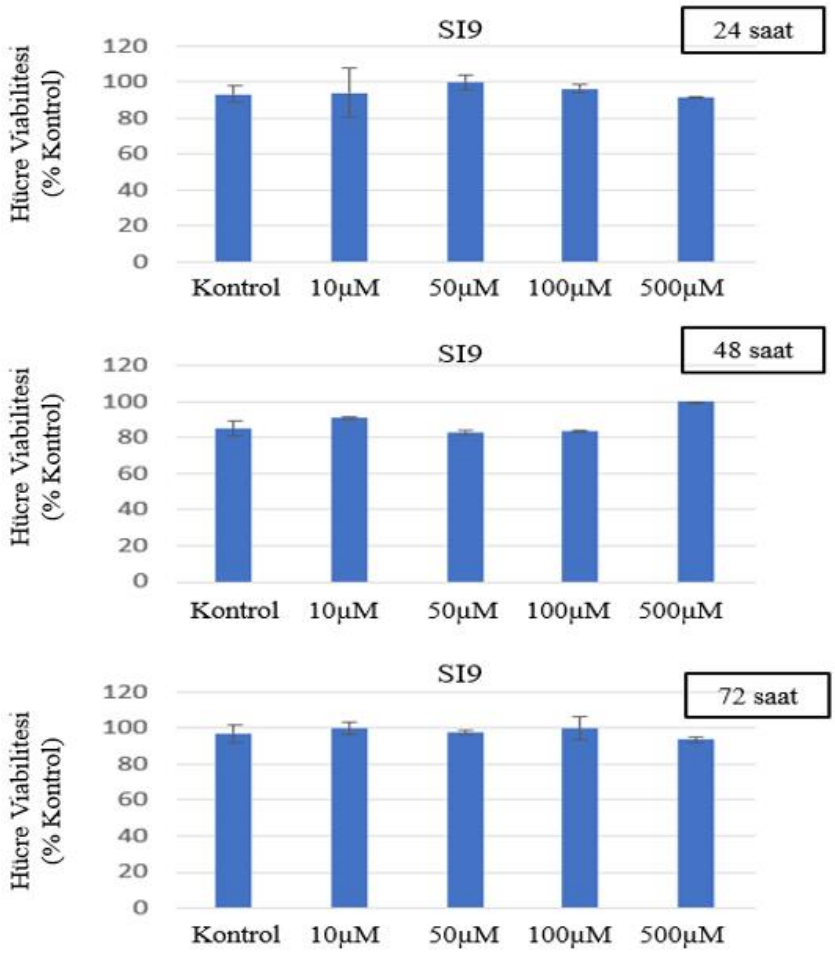
Sentezlenen SI6'nın HT-29 hücrelerindeki sitotoksik etkisi Şekil 35'te gösterilmiştir. Etki değerlendirmesi için HT-29 hücrelerine 10µM, 50µM, 100µM ve 500µM dozlarda 24, 48 ve 72 saatlik sürelerde SI6 uygulaması yapılmıştır. 24 saat için en düşük hücre canlılığı 50µM dozda %93,22±1,34 bulunurken 48 saat için 100µM dozda %84,51±3,78 ve 72 saat için 100µM dozda %96.08±5,47 olarak tespit edilmiştir. 24 saatlik uygulama için 100 µM ve 500µM konsantrasyonlarda hücre canlılığının kontrole göre sırasıyla %3,92 ve %4,86 daha fazla olduğu görülmüş ve SI6 uygulamasının HT-29 hücrelerinde kontrole kıyasla zaman ve doza bağlı olarak önemli bir sitotoksik etkisinin olmadığı kanısına varılmıştır.



Şekil 35. SI6 bileşiğinin sitotoksik etkisi

(*p<0.05 kontrol ile karşılaştırıldığında)

Sentezlenen SI9, 4 farklı konsantrasyonda (10µM, 50µM, 100µM, 500µM) 24, 48 ve 72 saatlik uygulama grupları oluşturularak HT-29 hücrelerine tatbik edildi. 24 saatlik SI9 maruziyeti için en düşük hücre canlılığının 500µM dozda kontrole kıyasla %89,63±0,42 olduğu, 50µM dozda ise hücre canlılığının kontrole göre %9,88 artış gösterdiği tespit edildi. 48 saat SI9 uygulamasında hücre viabilitesi kontrole kıyasla 50 µM dozda %17,69 arttı ve 100µM dozda kontrole göre %3,92 değişimle anlamlı bir fark olmadığı belirlendi. 72 saatlik SI9 bileşiği maruziyetinde kontrole kıyasla 10µM, 50µM ve 100µM dozda çoğalmaya devam eden HT-29 hücreleri için SI9'un önemli bir sitotoksik etkisi gözlenmemiştir. Ek olarak 72 saatte en düşük hücre canlılığının %4,99 değişim ile 500µM dozda olduğu tespit edilmiştir. Buna göre 24, 48, 72 saatlik sürelerde SI9 maruziyetinin 10µM-500µM dozları arasında HT-29 hücre viabilitesine kontrole kıyasla zaman ve doza bağlı olarak belirgin bir etkisinin olmadığına karar verilmiştir (Şekil 36).

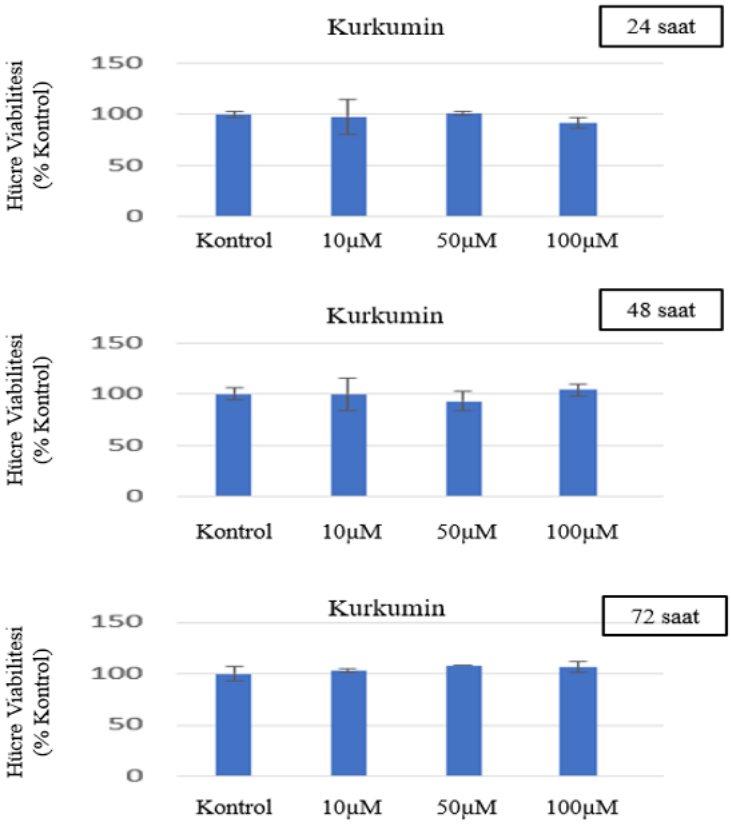


Şekil 36. SI9 bileşiğinin sitotoksik etkisi

(*p<0.05 kontrol ile karşılaştırıldığında)

Kurkumin tedavisinin IFN-λ, COX-1, COX-2, TNF-α, NF-κB ve iNOS ekspresyonunu azalttığı bilinmektedir. Ayrıca kurkumin tedavisinin MAPK, ERK vb. çeşitli yolakları etkileyerek, antioksidanları artırarak ve serbest radikalleri azaltmayı indükleyerek inflamatuar bağırsak hastalığını hafiflettiği bildirilmiştir (200). Literatürdeki bilinen etkilerine dayanarak yapmış olduğumuz deneylerde kurkumin fitokimyasal pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. HT-29 hücrelerine 10µM, 50µM ve 100µM dozlarda kurkuminin sitotoksik etkisi 24, 48 ve 72 saatlik uygulamalar ile test edilmiştir (Şekil 37). 24 saatlik kurkumin maruziyeti sonrası kontrole göre 50µM dozda hücre canlılığı %101,13±2,16 ve 10 µM dozda %97,88±16,97'dir, en az hücre canlılığı ise %91,29±5,51'le 100 µM dozda gözlenmiştir. Hücrelerin 48 saatlik kurkumin maruziyetinde hücre viabilitesine etkisi kontrole göre 10 µM ve 100 µM dozda sırasıyla %99,97±15,63 ve %103,95±6,26 bulunmuştur. 72 saatlik uygulama sonrası yapılan

ölçümlerde kontrole göre %3,38 (10µM doz), %7,92 (50µM doz) ve %6.20 (100µM doz) hücre canlılığında artış olduğu gözlenmiştir.



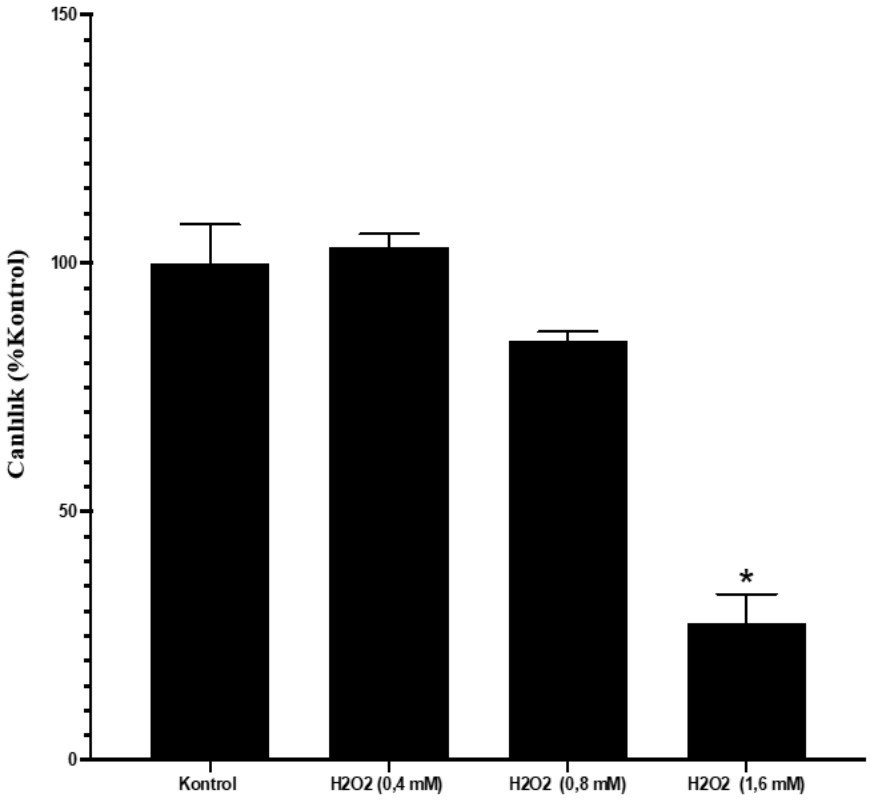
Şekil 37. Kurkuminin hücre viabilitesine etkisi

(*p<0.05 kontrol ile karşılaştırıldığında)

Yaptığımız sitotoksisite çalışmalarında; SI1, SI4, SI6, SI9 ve kurkuminin 24, 48 ve 72 saatlik uygulamaları tamamlanmış elde edilen veriler hücre viabilitelerine etkileri açısından karşılaştırılmıştır. 48 saatlik uygulamanın her bir madde için etkinlik açısından ortak nokta olduğuna karar verilerek sonraki çalışmalar 48 saatlik uygulamalar baz alınarak yapılmıştır.

Akut enflamasyon oluşumu ve sürdürülmesine ait mekanizmalardaki rolü bilinen bir endotoksin olan LPS (201) kullanılarak çalışmamız için gereken in-vitro EBH modeli oluşturulması planlanmış fakat pandemi döneminde dolapta yaşanan teknik arıza nedeniyle tedarik edilen LPS'nin bulunduğu soğuk zincir koşullarının sağlanamaması üzerine çalışmalarımız H_2O_2 uyarımlı in-vitro EBH modelinde sürdürülmüştür.

Hidrojen peroksit uyarımlı EBH modelinin oluşturulabilmesi için optimal dozun saptanması adına literatür taraması ile uyumlu olacak şekilde 0,4mM, 0,8mM ve 1,6mM H_2O_2 konsantrasyonları seçildi (202,203). Belirlenen dozlarda H_2O_2, HT-29 hücrelerine 48 saat boyunca uygulandı. 48 saatlik maruziyet sonucunda yapılan değerlendirmelerde 0,4mM doz uygulanan grupta kontrole kıyasla hücre canlılığında bir miktar artış (%106,38±2,15) olduğu ve 0,8mM dozda H_2O_2'nin HT-29 hücreleri için sitotoksik olmadığı (%80,70±0,19) kontrole kıyasla hücre canlılığında anlamlı değişimin 1,6mM doz uygulanan grupta (%29,20±5,62) olduğu tespit edildi (Şekil 38). Buna dayanarak çalışmalarımızda H_2O_2 uyarımlı EBH modeli oluşturulması için sitotoksik etkisi olmayan 0,8mM konsantrasyonu seçildi.



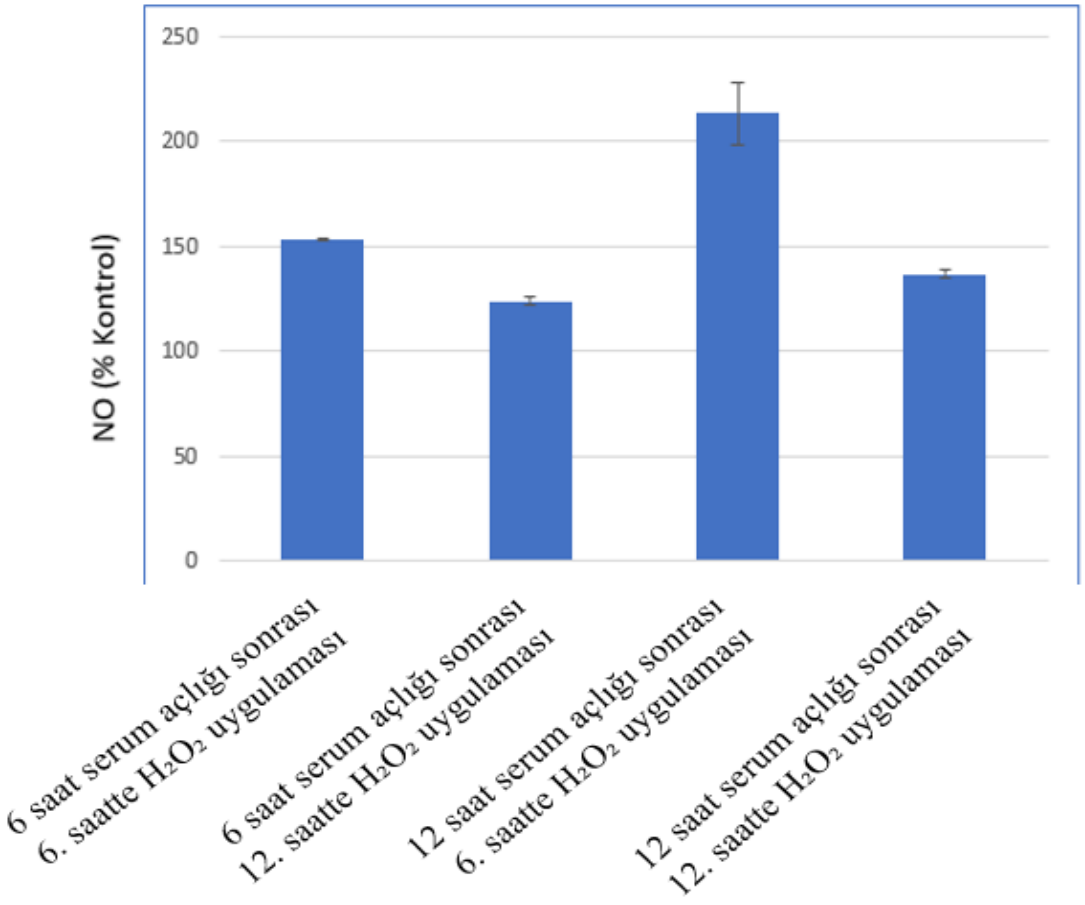
Şekil 38. 48 saatlik H_2O_2 maruziyetinin HT-29 hücre canlılığına etkisi

(*p>0.001 kontrol ile karşılaştırıldığında)

Nitrik Oksit Üretim Analizi Bulguları

Sentezlenen SI1, SI4, SI6, SI9 bileşikleri ve kurkuminin HT-29 hücrelerindeki NO üretim seviyesine etkisinin incelenebilmesi için serum açlığı protokolü uygulandı (204,205).

Deneyler 4 set halinde tamamlandı. HT-29 hücreleri 6 kuyucuklu plakaya ekildi 6-12 saat serum açlığı sağlandıktan 6-12 saat sonra 0,8mM dozda H_2O_2 uygulaması yapıldı. H_2O_2 uyarımını takiben 48. saatte Griess reaktifiyle NO üretim seviyesi ölçüldü (Şekil 39). Sonuçlar analiz edildiğinde 36 saat inkübasyonun ardından 12 saat serumsuz ortamı takiben 6. saatte H_2O_2 uygulamasının kontrole kıyasla NO üretimini en üst düzeyde arttırdığı tespit edildi ve çalışmaların devamı için bu protokol seçildi.

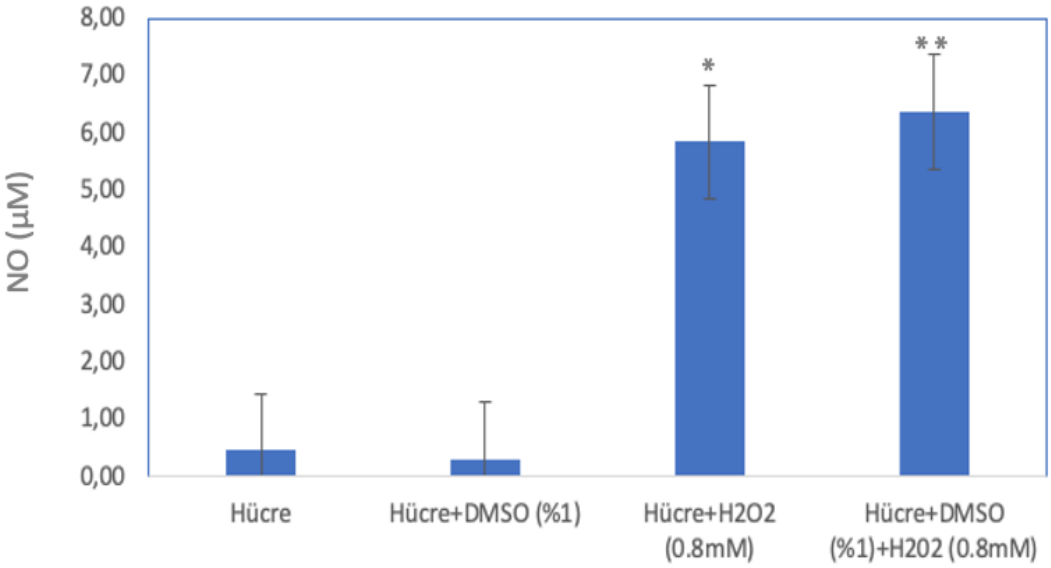


Şekil 39. Değişen sürelerde serum açlığı ve H_2O_2 uyarımının HT-29 hücrelerindeki NO üretim düzeylerine etkisi

(*p<0.05 kontrol ile karşılaştırıldığında)

Çalışmalarımızda in-vitro H_2O_2 uyarımlı EBH modeli oluşturulması için kullanılan 0,8mM dozda H_2O_2 ve madde uygulamaları sırasında çözücü olarak kullanılan kültür ortamına oranla maksimum %1 olacak şekilde ayarlanmış DMSO'nun HT-29 hücrelerindeki NO üretim seviyesine etkisi 12 saatlik serum açlığı protokolü ile değerlendirildi. Yapılan deneyler sonucunda elde edilen verilere göre NO üretim düzeylerinin kontrole kıyasla yalnızca H_2O_2

içeren ortamda 4 kattan fazla arttığı, H_2O_2 ile birlikte %1 DMSO içeren ortam ile yalnızca H_2O_2 içeren ortamlar arasında ölçülen NO miktarları arasında anlamlı bir fark tespit edilmedi (Şekil 40).

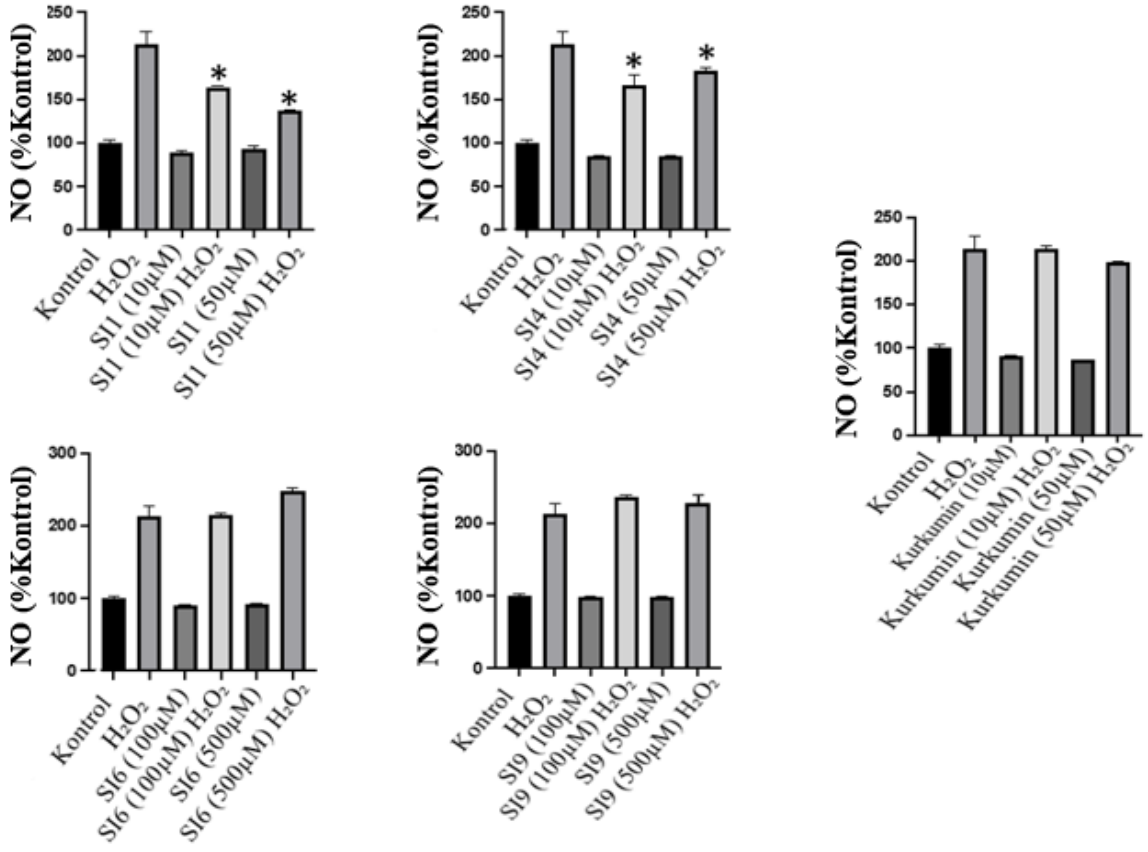


Şekil 40. DMSO ve H_2O_2'nin HT-29 hücrelerindeki NO üretim düzeylerine etkisi

DMSO : Dimetilsülfoksit; **H_2O_2:** Hidrojen peroksit; (*p<0.05 kontrol ile karşılaştırıldığında; **p<0.05 H_2O_2 ile karşılaştırıldığında)

Sentezlenen özgün SI1 (10-50µM), SI4 (10-50µM), SI6 (100-500µM), SI9 (100-500µM) bileşikleri ve kurkuminin (10-50µM) HT-29 hücrelerindeki NO üretim düzeylerine etkisini incelemek için 12 saat serum açlığının sağlanmasını takiben madde uygulaması yapıldı ardından 6. saatte H_2O_2 uyarımı sağlanarak 48 saat sonra Griess reaktifiyle NO seviyeleri ölçüldü. Elde edilen sonuçlar incelendiğinde SI6, SI9 ve kurkuminin çalışılan dozlarında kontrole kıyasla hem spontan NO seviyelerine hem de H_2O_2 uyarımı varlığındaki NO düzeylerine anlamlı bir etkisinin olmadığı tespit edilmiştir. Aksine sentezlemiş olduğumuz özgün bileşiklerden SI4 ve SI6'nın 10µM ve 50µM dozlarda hücrelerin H_2O_2 uyarımı varlığındaki NO seviyelerini anlamlı düzeyde baskıladığı dolayısıyla antienflamatuar özelliği bilinen kurkuminden daha etkili olduğu gözlenmiştir. SI4 ve SI6'nın spontan hücre NO düzeyini baskılamada kontrole göre anlamlı bir etki göstermediği ancak H_2O_2 uyarımı varlığındaki NO seviyelerini SI1'in 10µM dozda %23,0 ve 50µM dozda %35,7 azalttığı, SI4'ün ise 10µM dozda benzer şekilde %21,6 ve 50µM dozda %14,5 azalttığı belirlenmiştir (Şekil 41).

Sonuçta sentezlemiş olduğumuz özgün SI1 ve SI4 bileşikleri H_2O_2 uyarımı varlığındaki NO seviyelerini önemli düzeyde baskılayarak antienflamatuar etki göstermişlerdir. Bunlardan SI1'in etkisi doza bağımlı iken SI4'ün doza bağımlı olmadığı gözlenmiştir (Şekil 41).

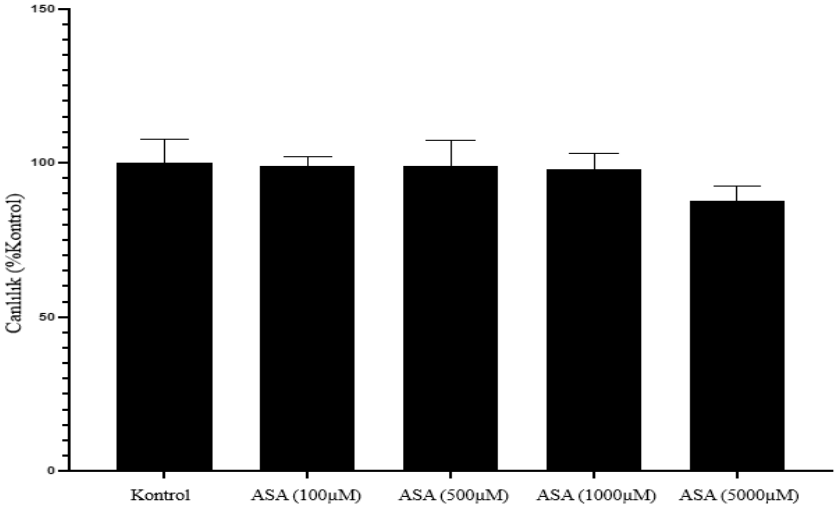


Şekil 41. HT-29 hücrelerinde 12 saat serumsuz ortamı takiben yapılan SI1, SI4, SI6, SI9 ve Kurkumin uygulamasının 6. saatinde H_2O_2 tatbiki sonrası NO üretim seviyeleri

H_2O_2: Hidrojen peroksit; (*"H_2O_2 kontrol" karşısında $p<0.05$)

Deneylerimiz sonunda etkili olduğunu tespit ettiğimiz SI1 ve SI4 bileşiklerinin 10 µM ve 50µM dozları hem karşılaştırma hem de muhtemel sinerjistik etkilerinin incelenebilmesi amacıyla pro-enflamatuar uyaranların oluşumunu azaltma yeteneği bilinen NSAID'lerden aspirin, ibuprofen ve diklofenakla birlikte çalışılmıştır. Sinerjistik etkinin gözlemlenebilmesi adına yapılacak deneylerde kullandığımız in-vitro modelde sitotoksik olmayan kullanılacak dozların tespit edilmesi için öncelikle aspirin (188,206), ibuprofen (207) ve diklofenak (208) için doz çalışmaları yapılmıştır.

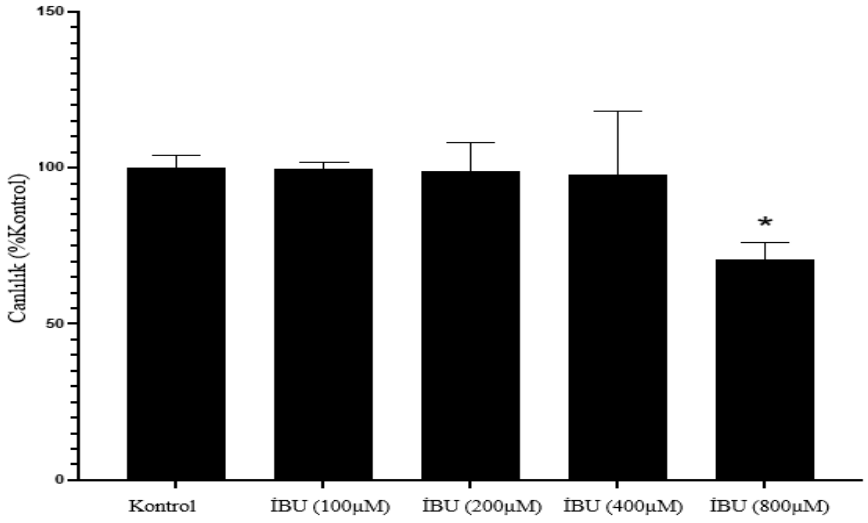
Aspirin için 100µM-5000µM dozları 48 saatlik uygulama yapılarak çalışılmıştır. Elde edilen veriler incelendiğinde kontrole kıyasla aspirinin 5000µM doza kadar (%79,84±1,62) hücre canlılığına anlamlı bir etkisinin olmadığı tespit edilmiştir (Şekil 42). Yapılan literatür taramasına da uygun olarak (209) 100µM ve 200µM dozlarının kullanılmasına karar verilmiştir.



Şekil 42. Aspirin uygulamasının HT-29 hücre canlılığına etkisi

ASA: Aspirin; (Kontrol ile karşılaştırıldığında 5000µM'ye kadar anlamlı etkisi yoktur.)

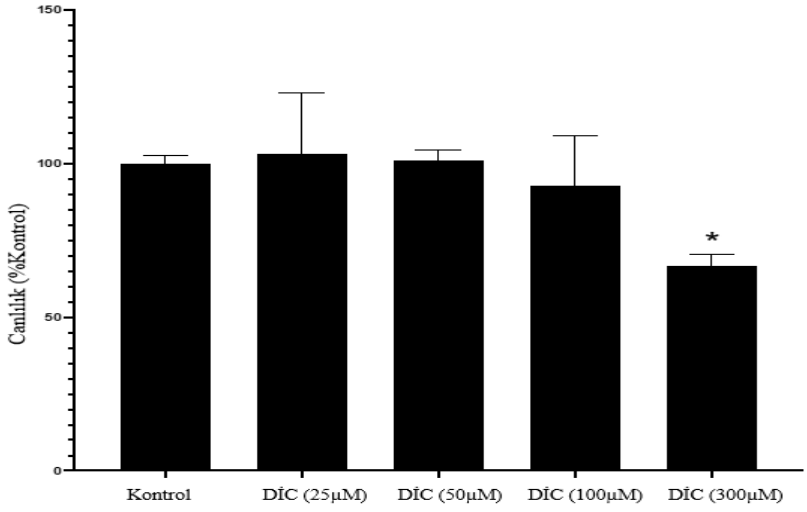
İbuprofen için 100µM-800µM doz aralığında gerçekleştirilen denemelerde 48 saat uygulama süresi kullanılmıştır. Deney sonucunda elde edilen verilere göre ibuprofenin 400µM doza kadar HT-29 hücreleri için sitotoksik olmadığı 800µM dozda kontrole kıyasla hücre canlılığını %30,94 azalttığı tespit edildi (Şekil 43). Yapılan literatür taramasına da uygun olarak (207) 10µM ve 20µM dozlarının kullanılmasına karar verildi.



Şekil 43. İbuprofen uygulamasının HT-29 hücre canlılığına etkisi

İBU: İbuprofen; (*p<0.01 kontrol ile karşılaştırıldığında)

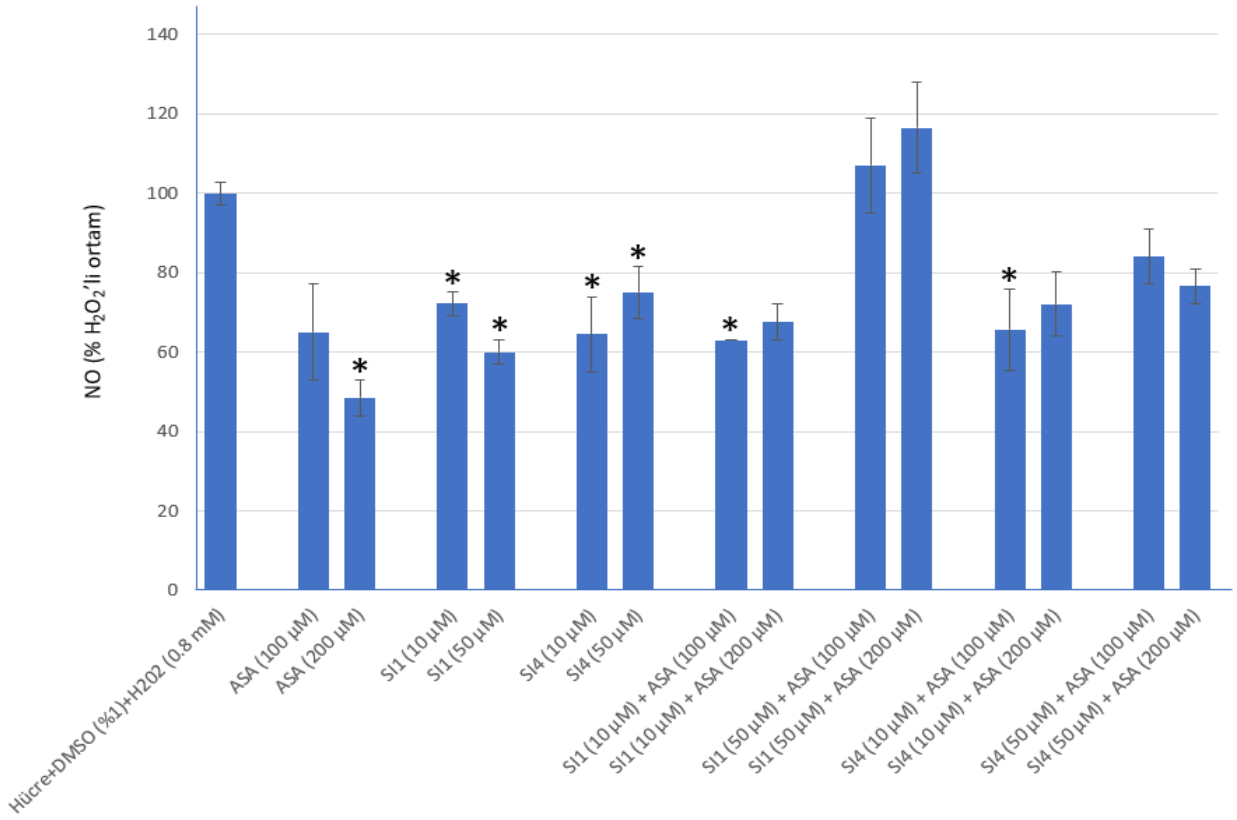
Diklofenak için 25µM-300µM doz aralığında 48 saat uygulama süresi kullanılarak deney yapıldı. Elde edilen verilere göre diklofenak için 100µM doza kadar HT-29 hücreleri için sitotoksik olmadığı 300µM konsantrasyonun kontrole kıyasla hücre canlılığını %28,74 azalttığı tespit edildi (Şekil 44). Yapılan literatür taramasına da uygun olarak (208,210) 1µM ve 5µM dozlarının kullanılmasına karar verildi.



Şekil 44. Diklofenak uygulamasının HT-29 hücre canlılığına etkisi

DIC: Diklofenak; (*p<0.05 kontrol ile karşılaştırıldığında)

Hem karşılaştırma hem de muhtemel sinerjistik etki çalışması için antienflamatuar etkisi olduğunu saptadığımız SI1 ve SI4 bileşiklerinin 10µM ve 50µM dozları ile aspirinin HT-29 hücre viabilitesine etki etmediğini gözlemlediğimiz 100µM ve 200µM dozları 12 saat serumsuz ortamın sağlanmasını takiben hücrelere uygulandı 6. saatte H_2O_2 uyarımı sonrasında 48. saatte Griess reaktifiyle hücre NO düzeyleri analiz edildi. SI1 10µM-aspirin 100µM ve SI4 10µM-aspirin 100µM kombinasyonları için kontrole kıyasla H_2O_2 uyarımı varlığındaki NO düzeylerinin sırasıyla %38,81 ve %34,95 baskılandığı belirlenmiş bu kombinasyonların antienflamatuar açıdan etkili olduğu diğer kombinasyonların anlamlı bir baskılama düzeyi yakalayamadığı kanısına varılmıştır (Şekil 45). Yapılan analizlerde sinerjistik etki oluşturan bir kombinasyona rastlanmamıştır.

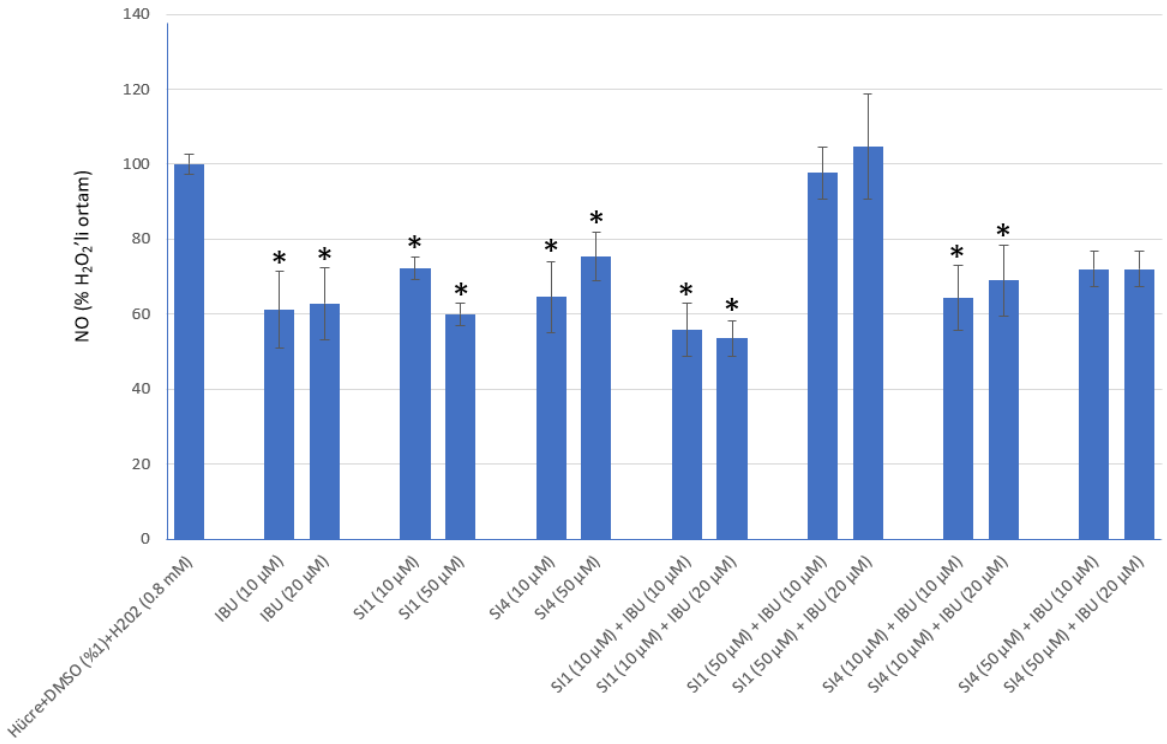


Şekil 45. HT-29 hücrelerinde 12 saat serumsuz ortamı takiben yapılan SI1, SI4 bileşiklerinin Aspirin ile kombine uygulamasının NO üretim seviyelerine etkisi

ASA: Aspirin; (*p<0.05 kontrol ile karşılaştırıldığında)

Sinerjistik etki çalışması için antienflamatuar etkisi olduğunu saptadığımız SI1 ve SI4 bileşiklerinin 10µM ve 50µM dozları ile ibuprofenin HT-29 hücre viabilitesine etki etmediğini

gözlemlediğimiz 10µM ve 20µM dozları 12 saat serumsuz ortamın sağlanmasını takiben hücrelere uygulandı 6. saatte H_2O_2 uyarımı sonrasında 48. saatte Griess reaktifiyle hücre NO düzeyleri analiz edildi. SI1 10µM-ibuprofen 10µM ve SI1 10µM-ibuprofen 20µM kombinasyonları için kontrole kıyasla H_2O_2 uyarımı varlığındaki NO düzeylerinin sırasıyla %49,10 ve %47,28 baskılandığı benzer şekilde SI4 10µM-ibuprofen 10µM ve SI4 10µM-ibuprofen 20µM kombinasyonları için de sırasıyla %37,93 ve %32,76 baskılandığı tespit edilmiştir. Buna dayanarak SI1 ve SI4'ün ibuprofenin 10µM ve 20µM dozlarıyla yapılan kombinasyonların HT-29 hücrelerinde antienflamatuar olarak etkili olduğu hücre NO düzeylerini belirgin düzeyde baskıladığı tespit edilmiştir (Şekil 46). Fakat yapılan analizlerde sinerjistik etki oluşturan bir kombinasyona rastlanmamıştır.

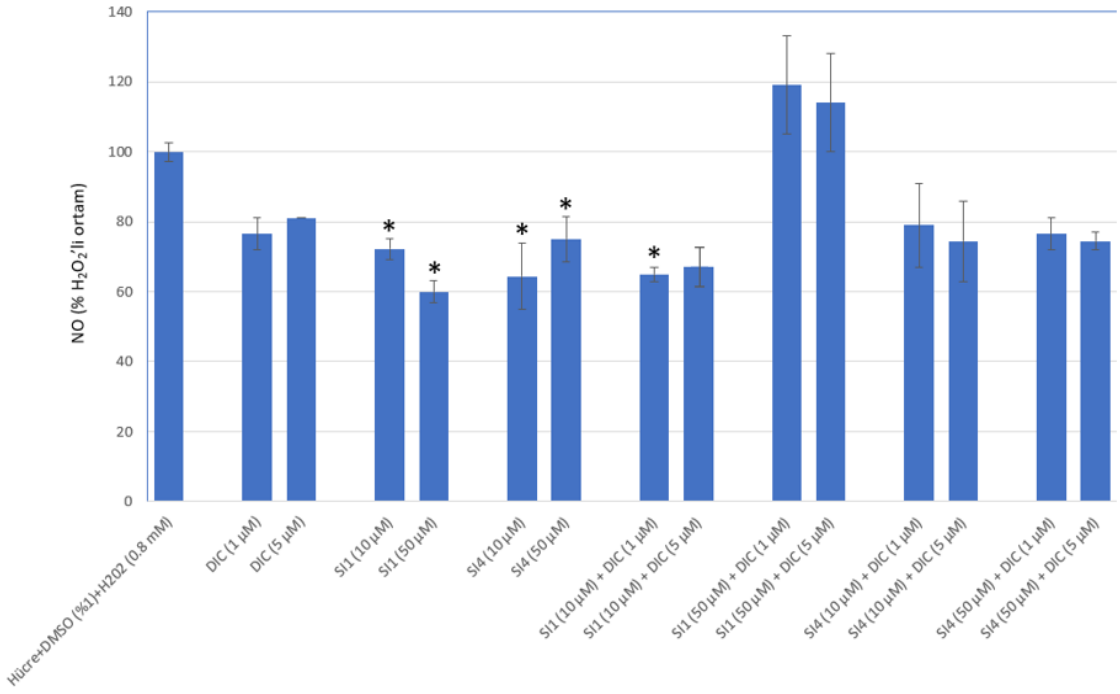


Şekil 46. HT-29 hücrelerinde 12 saat serumsuz ortamı takiben yapılan SI1, SI4 bileşiklerinin İbuprofen ile kombine uygulamasının NO üretim seviyelerine etkisi

IBU: İbuprofen; (*p<0.05 kontrol ile karşılaştırıldığında)

Yapılan sinerjistik etki çalışmalarında antienflamatuar etkisi olduğunu saptadığımız SI1 ve SI4 bileşiklerinin 10µM ve 50µM dozları ile diklofenak için HT-29 hücre viabilitesine etki

etmediğini gözlemlediğimiz 1µM ve 5µM dozları 12 saat serumsuz ortamın sağlanmasını takiben hücrelere uygulandı 6. saatte H_2O_2 uyarımı sonrasında 48. saatte Griess reaktifiyle hücre NO düzeyleri analiz edildi. SI1 10µM-diklofenak 1µM kombinasyonu için kontrole kıyasla H_2O_2 uyarımı varlığındaki NO düzeylerinin %35,89 azaldığı belirlendi. Bu kombinasyon dışında Şekil 47'de görülen diğer kombinasyonların H_2O_2 uyarımlı EBH modeli için hücre NO düzeylerinde etkili olmadığı SI1 10µM-diklofenak 1µM kombinasyonun anlamlı ölçüde NO düzeylerini baskılayarak antienflamatuar özellik gösterdiği tespit edildi (Şekil 47). Yapılan analizlerde sinerjistik etki oluşturan bir kombinasyona rastlanmamıştır.



Şekil 47. HT-29 hücrelerinde 12 saat serumsuz ortamı takiben yapılan SI1, SI4 bileşiklerinin Diklofenak ile kombine uygulamasının NO üretim seviyelerine etkisi

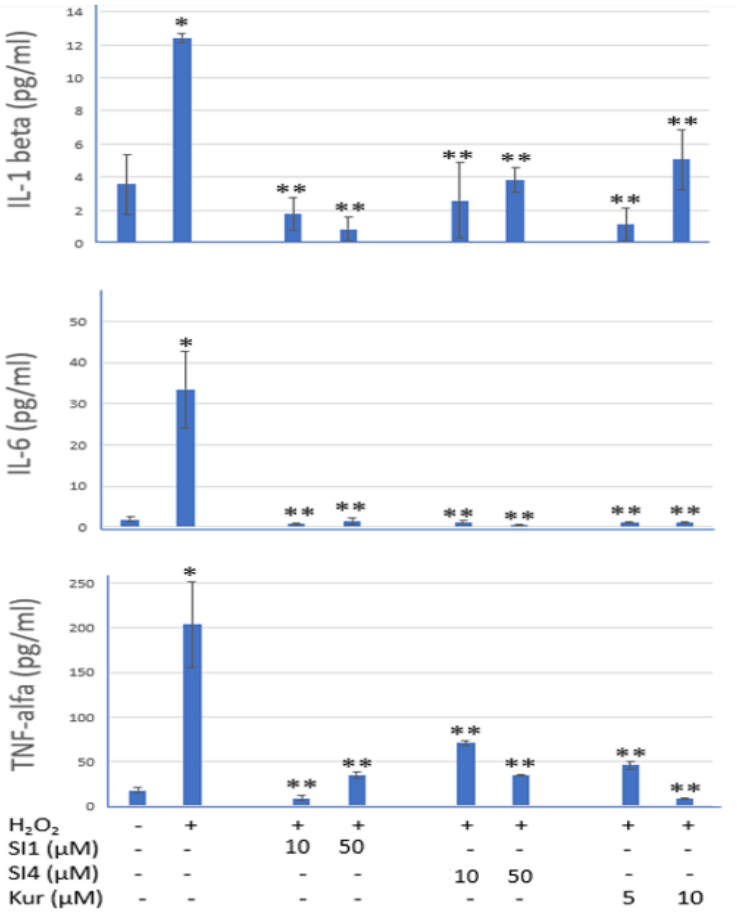
DIC: Diklofenak; (*p<0.05 kontrol ile karşılaştırıldığında)

Hidrojen Peroksit Uyarımlı İn-Vitro Enflamatuar Bağırsak Hastalığı Modelinde TNF-α, IL-6 ve IL-1β'nın Analiz Bulguları

Sentezlenen özgün SI1 (10µM ve 50µM dozda) ve SI4 (10µM ve 50µM dozda) bileşikleriyle pozitif kontrol olarak kullanılan kurkuminin 5µM ve 10 µM dozlarının pro-

enflamatuar sitokin üretimindeki inhibe edici etkilerini araştırmak amacıyla oluşturduğumuz H_2O_2 uyarımlı EBH modelinde 12 saatlik serum açlığını takiben yapılan uygulama ardından 6. saatte H_2O_2 tatbik edilmiş ve 48 saat sonra toplanan örneklerde ELISA kitleri ile TNF-α, IL-1β ve IL-6 seviyeleri analiz edilmiştir.

Yapılan değerlendirme sonucunda H_2O_2 ile uyarılan HT-29 hücrelerinin önemli ölçüde pro-enflamatuar sitokin seviyelerini arttırdığı (*p<0.05), H_2O_2 ile uyarılan kontrol grubuna kıyasla SI1, SI4 ve kurkuminin etkileri karşılaştırıldığındaysa SI1 ve SI4'ün IL-6'yı maksimum düzeyde baskıladığı, SI1'in doz bağımlı olarak IL- 1β seviyelerini düşürdüğü, SI4'ün TNF-α'yı doz bağımlı olarak baskıladığı tespit edilmiştir (**p<0.05)(Şekil 48).



Şekil 48. H_2O_2 ile HT-29 hücrelerinde oluşturulmuş deneysel kolit modelinde SI1, SI4 ve Kurkumin uygulaması sonrası TNF-α, IL-6, IL-1β seviyelerinin tespiti

IL-1β: İnterlökin 1 beta; **IL-6:** İnterlökin 6; **TNF-alfa:** Tümör nekroz faktör alfa; **Kur:** Kurkumin; (*p<0.05 kontrol ile karşılaştırıldığında; **p<0.05 H_2O_2 ile karşılaştırıldığında)

TARTIŞMA

Enflamasyon, bağışıklık sisteminin yaralanmalara, enfeksiyonlara ve toksinlere karşı doğal tepkisidir. Bununla birlikte vücudun virüsler ve bakteriler gibi yabancı istilacılara karşı savunması ve hasarlı dokuları iyileştirip onarması için bağışıklık sistemlerine sinyal göndermesinin de bir yoludur. Çözümlenemeyen enflamasyon süreci kronik enflamasyon haline gelerek bağışıklık sistemini sağlıklı doku ve organlara saldırması için tetikleyebilir (211). EBH sindirim sisteminde uzun süreli iltihaplanmaya neden olan genellikle ishal, karın ağrısı, ateş vb. semptomlar ile karakterize bir hastalıktır. Alt ve üst gastrointestinal sistemi tutan ÜK ve CH olmak üzere başlıca iki alt tipi olan EBH'nin görülme sıklığı giderek artmaktadır (52). Buna rağmen kesin bir tedavisi bilinmemektedir ve var olan tedavi yaklaşımları genellikle semptomları en aza indirerek yaşam kalitesini iyileştirmek ve klinik remisyonu sürdürebilmek üzerinedir. EBH tedavisi için, aminosalisilik asit türevi ilaçlar, kortikosteroidler ve immünosupresanlar olmak üzere başlıca üç tür klasik yaklaşım vardır. İmmünosupresanlar ile tedavi sonrasında nükseden hastalar için TNF-α inhibitörü ilaçlar tercih edilebilmektedir fakat bu ilaçların uzun süreli kullanımı bağışıklığın azalmasına da öncülük etmektedir (8,212).

Konvansiyonel ve biyolojik ilaçlar güncel durumda EBH tedavisi için ideal gözükmemektedir. Bu tedavi rejimlerinin yan etkilerinin fazla olması ve monoklonal teröpotikler gibi seçeneklerin ekonomik olarak elde edilmesinin zorluğu tedaviyi dezavantajlı hale getirmektedir. Bu bağlamda daha az toksisiteye sahip elde edilebilirliği daha yüksek antienflamatuvar özellikteki fitokimyasal türevi bileşiklerin tedavi amaçlı kullanılmasına yönelik çalışmalar giderek artmaktadır (10).

Bizde çalışmamızda antienflamatuar etkileri bilinen mısırdan ve mısırın *Aspergillus niger* mantarı kullanılarak fermantasyonundan elde edilebilen GA (178) ve doğada yaygınca bulunan bir fenolik asit olan GAL türevlerini kullanarak çeşitli aromatik yapıdaki asitlerle amidifikasyon reaksiyonu sonucunda sübstitüe N-glikozbenzamid türevleri sentezledik ve izole ederek yapılarının aydınlatılması amacıyla FTIR, ^{1}H-NMR ve sıvı kromotografisi-kütle spektroskopisi (LC/MS) analizlerini gerçekleştirdik.

Analizler sonucunda SI1, SI4, SI6 ve SI9 olarak adlandırdığımız özgün bileşiklerin FTIR sonuçları incelendiğinde amidifikasyon sonucu oluşan amid bağına ait C=O geriliminin 1768-1674 cm-1 aralığında çıktığı saptanmıştır. Bununla birlikte yaklaşık 3500 cm-1 O-H gerilimi, 3300cm-1 N-H gerilimi, 3000cm-1 C-H gerilimi, 1200 cm-1 C-O gerilimine ait bantlar gözlenmiştir. Bileşiklerin 1H-NMR spektrumları incelendiğinde 12ppm civarında N-H ait proton yayvan singlet olarak, 6,8-7,5ppm aralığında benzen ait protonlar, 3,5-4ppm aralığında piran halkasına ait alisiklik protonlar, 2,5-2,8 ppm aralığında da alifatik protonlara ait pikler gözlenmiştir. Bileşiklerin LC/MS analiz sonuçları moleküler iyon piki M+-1 veya M+-1+18 su molekülü taşıyarak saptanmıştır. Bileşiklerin parçalanması sonucunda ortaya çıkan çeşitli fragmanlar da uygun pikler şeklinde gözlenmiştir.

Sentezlenen özgün bileşiklerden SI1 ve SI4'ün 48 saatlik maruziyette 50µM doza kadar HT-29 hücreleri üzerinde sitotoksik etki göstermemiş olmaları bu aralıktaki dozların H_2O_2 uyarımlı EBH modelimiz için uygun olduğuna işaret etmektedir. Çalışmalarımızda elde edilen sitotoksisite verileri SI1, SI4, SI6 ve SI9 ile yapılacak ileri çalışmalar için bir referans niteliğinde olacak ilk verileri oluşturması açısından önemlidir.

Enflamatuar bağırsak hastalığı TNF-α, IL-6 ve IL-1β gibi sitokinler tarafından ve iNOS, COX-2 ve ROS gibi birçok pro-enflamatuar genin indüklenmesiyle düzenlenen karmaşık bir süreçtir. Birçok çalışma, EBH hastalarının bağırsak dokularında pro-enflamatuar sitokinlerin (IL-6, IL-1β, TNF-α ve IL-8) seviyelerinin yükseldiğini göstermiştir (46). Bu nedenle tedavi geliştirilebilmesi için EBH'dan muzdarip hastalarda pro-enflamatuar sitokinleri ve enflamatuar proteinleri etkili bir şekilde baskılayabilen yeni faktörlerin tanımlanmasına ihtiyaç vardır.

Triticum aestivum'dan elde edilen fermente edilmiş ve fermente edilmemiş tam buğday ununun fenolik profili incelenmiş GAL, vanilik asit ve 3-hidroksibenzoik asit'in ana bileşenler olarak öne çıktığı ortaya konmuştur. Elde edilen ürünle yapılan çalışmada in-vitro HT-29 hücrelerinde antioksidan aktivitesinin yanı sıra TNF-α üzerindeki antienflamatuar etkisi değerlendirilmiş ve fermente edilmiş izolatın edilmemiş olandan daha yüksek bir antioksidan

aktivite gösterdiği, iltihaplı HT-29 hücrelerinde fermente edilmiş izolatın, IL-8 ve COX-2 enflamatuar aracılarının ekspresyonunu önemli ölçüde azaltarak TNF-α kaynaklı değişiklikler üzerinde daha iyi bir koruyucu etki sergilediği gözlenmiştir. Ayrıca, enflamatuar saldırı altında fermente edilmiş izolatın edilmemiş olana oranla, ROS aşırı üretimini daha iyi normalize ettiği tespit edilmiştir (213).

Lithospermumery throrhizon'un köklerinden ekstrakte edilen doğal bir naftokinon olan shikonin, antioksidan, antienflamatuar ve antitümör etkiler dahil olmak üzere birçok farmakolojik özelliğe sahip olması nedeniyle HT-29 hücrelerinde H_2O_2 kaynaklı oksidatif hasara karşı etkisinin araştırılması ve altta yatan moleküler mekanizmanın belirlenmesi amacıyla yapılan bir in-vitro çalışmada malondialdehit, süperoksit dismutaz, kaspaz-9 ve kaspaz-3'ün aktiviteleri spektrofotometrik testler kullanılarak ölçülmüş, Bcl-2, Bax ve sitokrom c'nin ekspresyon seviyeleri western blotlama ile belirlenmiştir. Sonuçlar, shikonin'in H_2O_2 ile indüklenmiş HT-29 hücrelerinde hücre canlılığını arttırdığını, hücre içi ROS artışlarını önemli ölçüde engellediğini, mitokondriyal membran potansiyelini geri kazandırdığını, H_2O_2 ile indüklenmiş HT-29 hücrelerinde süperoksit dismutaz ve malondialdehit seviyelerini düşürdüğünü göstermiştir. Shikonin'in ROS'u ortadan kaldırarak, mitokondriyal disfonksiyonu iyileştirerek, DNA oksidatif hasarını hafifleterek ve mitokondriyal yol aracılı apoptozu inhibe ederek H_2O_2 kaynaklı oksidatif hasara karşı koruduğu tespit edilmiştir (214).

Ilex rotunda Thunb. geleneksel tıpta romatoid artrit tedavisinde, ağrı ve hazımsızlığı gidermek için kullanılmaktadır. Yapılan in-vitro çalışmada, *I. rotunda* ekstraktından bilinen sekiz bileşikle birlikte üç yeni kafeik asit benzil ester analoğu izole edilmiştir. LPS ile indüklenen makrofaj (RAW 264.7) ve HT-29 hücrelerinde anti-enflamatuar aktiviteleri araştırılmış izole edilen bazı bileşiklerin, pro-enflamatuar mediatör olan NO üretimini baskıladığı, türevlerden bazılarının iNOS, COX-2 ve fosforile hücre dışı düzenlenmiş kinazın (pERK)1/2'nin LPS ile indüklenen ifadesini azalttığı ortaya konmuştur (215).

Çalışmamızda sentezlenen SI1, SI4, SI6, SI9 bileşiklerinin HT-29 hücrelerindeki NO üretim seviyesine etkisinin incelenebilmesi için serum açlığı protokolü (12 saat serumsuz ortamı takiben 6. saatte H_2O_2 uygulaması) varlığında elde edilen veriler değerlendirilip kontrole kıyasla SI1 ve SI4 bileşiklerinin H_2O_2 uyarımı varlığındaki NO seviyelerini önemli düzeyde baskılayarak antienflamatuar etki gösterdiği, bunlardan SI1'in etkisinin doza bağımlı iken SI4'ün etkisinin doza bağımlı olmadığı gözlenmiştir.

Yapılan bir in-vivo çalışmada *R. communis* yaprakları ekstresi fitokimyasal taramaya tabi tutulmuş analiz sonucunda alkoloid, flavanoid vb. fitokimyasal yapılardan zengin bir içeriği olduğu görülmüştür. Bilinen bir NSAID olan aspirin uygulamasının gastrik asidik pH'sı, asit hacmi, ülser skoru ve ülser indeksinde anlamlı bir artış gösterdiği tespit edilen çalışmada *R. communis* ekstresi ile tedavinin, aspirinin ülserojenik etkilerini önemli ölçüde azalttığı ayrıca, *R. communis* ile tedavi edilen grupların, antioksidan biyobelirteçlerinde doza bağlı bir artış ve oksidatif stres biyobelirteçlerinde azalma olduğu gözlenmiştir. Histopatolojik inceleme, *R. communis* ile tedavi edilen hayvanlarda mide mukozasının normalleştiğini göstermiş ayrıca, *R. communis'in* ranitidine kıyasla aspirine karşı mide ülseri koruması gösterdiği belirtilmiş ve *R. communis* yaprak özütünün NSAID alan hastalarda mide koruması sağlayabileceği sonucuna varılmıştır (216).

Bir dut türü olan *V. meridionale Swartz'ın* (Andean dutu) kimyasal karakterizasyonunun yapıldığı bir in-vitro çalışmada başta GAL olmak üzere yüksek bir polifenol içeriğine sahip olduğu tespit edilmiş, LPS ile uyarılan RAW 264.7 makrofajlarından gelen antienflamatuar belirteçlerin modülasyonunda aspirin ile birleştirilmiş Andean dutu ekstraktının etkisi araştırılmıştır. LPS ile uyarılan makrofajlarla karşılaştırıldığında, Andean dutu ekstraktının, aspirin ve kombinasyonlarıyla NO ve ROS üretimini azalttığı, pro-enflamatuar kontrol (LPS) ile karşılaştırıldığında Andean dutu ekstraktının, IL-1β düzeyini azalttı; aspirin ile kombine tedavisinin IL-1R'yi azalttığı gözlenmiştir. Bu sonuçlar fitokimyasal kökenli yapıların enflamatuar kaynaklı durumların çözümünde aspirin gibi bilinen ilaçlarla yardımcı adjuvan etkisini doğrulamaktadır (217).

Deneylerimiz sonunda etkili olduğunu tespit ettiğimiz SI1 ve SI4 bileşiklerinin 10 µM ve 50µM dozları hem muhtemel sinerjistik etkileri hem de etkinlik karşılaştırması yapılması amacıyla pro-enflamatuar uyaranların oluşumunu azaltma yeteneği bilinen NSAID'lerden aspirin, ibuprofen ve diklofenakla birlikte çalışılmıştır. NO ölçümlerinde bileşiklerimiz SI1 ve SI4 antienflamatuar aspirin ve ibuprofen düzeyinde etki gösterirken diklofenaktan çok daha iyi performans sergilemişlerdir (Şekil 45-48). Yapılan kombinasyonlardan; SI1 10µM-aspirin 100µM ve SI4 10µM-aspirin 100µM kombinasyonlarının antienflamatuar açıdan etkili olduğu benzer şekilde SI1 ve SI4'ün ibuprofenin 10µM ve 20µM dozlarıyla yapılan kombinasyonların HT-29 hücrelerinde antienflamatuar olarak etkili olduğu ve hücre NO düzeylerini belirgin düzeyde baskıladığı, SI1 10µM-diklofenak 1µM kombinasyonun anlamlı ölçüde NO düzeylerini baskılayarak antienflamatuar özellik gösterdiği tespit edilmiştir. Fakat yapılan analizlerde sinerjistik etki oluşturan bir kombinasyona rastlanmamıştır.

Rosmarinik asidin bildirilen anti-enflamatuar etkilerine dayanarak rosmarinik asit 4′-O-β-glukozit'in potansiyel anti-tümör etkileri, beş insan karsinoma hücre hattında (MCF-7, MDA-MB-231, HT-29, Caco-2) değerlendirilmiştir ve MTT tahlili sonuçlarında tümörijenik olmayan meme epitel hücre hattı (MCF-12A) ile Caco-2 hücre hattına karşı en yüksek sitotoksik aktiviteyi gösterdiği bildirilmiştir. Bununla birlikte rosmarik asit, deneyde kullanılan tüm hücre hatlarına karşı türevinden önemli ölçüde daha yüksek genel antiproliferatif/sitotoksik aktivite sergilemiştir (218). Çalışmamızda antienflamatuar etkinlik gösterdiğini tespit ettiğimiz SI1ve SI4 bileşikleriyle birlikte diğer sentezlenen bileşiklerinde farklı in-vitro ortamlarda sitotoksik etkilerinin incelenebilceği düşünülmektedir.

Yapılan başka bir çalışma tilki kuyruğu darı kepeğinden türetilen iç kabuğun bağlı polifenollerinin, LPS ile indüklenen HT-29 hücrelerinde ve farelerde antienflamatuar etkiler gösterebileceğini belirtmiştir. Elde edilen darı kepeği türevi bileşiklerin, çeşitli pro-enflamatuar sitokinlerin (IL-1β, IL-6, IL-8) seviyesini sınırladığı ve NF-κB'yi bloke ederek antienflamatuar sitokin (IL-10) ekspresyon seviyesini arttırdığı tespit edilmiştir (219).

Brassicaceae özleri, potansiyel doğal antienflamatuar ajanlar olarak hareket edebilir. Gerçekten de, taze bitki ekstresi *Iberis amara'*nın (veya STW 6), temel olarak EBH tedavisinde kullanılan batı bitkisel ilacı Iberogast®'ın (veya STW 5) ana bileşeni olduğu gözlemlenmiştir. Oluşturulan 2,4,6-trinitrobenzensülfonik asit (TNBS)-sıçan enflamasyon modelinden izole edilen bağırsak preparasyonlarında sabit bitkisel kombinasyon ürünü STW 5'in ve ana bileşeni STW 6'nın enflamatuar yanıtını azaltma yeteneğini ortaya koyan çalışmada her iki bileşik de bağırsak kas tabakasının morfolojik ve kasılma hasarlarına karşı koymayı başarmıştır. Bu tür etkilerin, STW 5 tarafından pro-enflamatuar mediatör TNF-α salınımının inhibisyonuna ve STW 6 tarafından TNF-α yolundan bağımsız olarak IL-10 yolunun aktivasyonuna atfedildiği öne sürülmüştür. Bu çalışma ana bileşen STW 6 tüm üründen daha etkili olduğunu *Brassicaceae'nin* antienflamatuar ilaçlar olarak terapötik değere sahip olabileceğini göstermektedir (220).

Bizde çalışmamızda sentezlenen özgün SI1 (10μM ve 50μM dozda) ve SI4 (10μM ve 50μM dozda) bileşikleriyle pozitif kontrol olarak kullanılan kurkuminin 5μM ve 10 μM dozlarının pro-enflamatuar sitokin üretimindeki inhibe edici etkilerini karşılaştırdığımızda H_2O_2 ile uyarılan kontrol grubuna göre SI1 ve SI4'ün IL-6'yı maksimum düzeyde baskıladığı, SI1'in doz bağımlı olarak IL- 1β seviyelerini düşürdüğü, SI4'ün TNF-α'yı doz bağımlı olarak baskıladığını tespit ettik.

Bu sonuçlar sentezlemiş olduğumuz bileşiklerin antienflamatuar özelliklerini doğrular niteliktedir. Elde edilen bileşiklerin JAK/STAT vb. sinyal yolaklarına etki mekanizmalarının incelenerek EBH tedavisi için ilaç adayı olma özelliği yapılacak deneylerle desteklenmelidir.

Çalışmamızda elde edilen özgün bileşiklerin EBH modelinde enflamasyona karşı etkinliği değerlendirilmiş olmasına karşın bileşiklerin farklı çözücülerdeki çözünürlüğü, uzun süreli kullanımdaki kimyasal stabiliteleri, biyoyararlanımı ve in-vivo fonksiyonel aktivitesi, metabolizması, farmakokinetiği ile farmakolojik etkisi arasındaki ilişki, toksisitesi gibi parametreler için yapılması gereken çalışmalar vardır. Ancak sentezlenen bileşiklerden etkili olanların birer ilaç adayı olduğu, ileri çalışmalar ile desteklenerek ülkemize ekonomik ve bilimsel anlamda yüksek katkı sağlayabileceği de unutulmamalıdır.

SONUÇLAR

Antienflamatuar özellikte bir fitokimyasal olan GA'nın mevcut aktivitesini arttıracak yönde bir türevi semi-sentetik yollarla sentezlenip izolasyonun sağlandı ve elde edilen SI1, SI4, SI6 ve SI9 bileşiklerinin karakterizasyonu tamamlandıktan sonra HT-29 hücreleri kullanılarak oluşturulan H_2O_2 uyarımlı in-vitro EBH modelinde sitotoksik etkileri MTT analizi ile belirlendi. Sentezlenen bileşiklerin antienflamatuar etkilerini inceleyebilmek için Griess reaktifi kullanılarak hücre NO üretimine etkileri kontrol edildi ve enflamatuar sitokinlerin (TNF-α, IL-6, IL-1β) seviyeleri ELISA kitleri kullanılarak ölçüldü.

Yapılan çalışmalar sonucunda:

1. Glikozamin ve GAL türevlerini kullanarak amidifikasyon reaksiyonu sonucunda sübstitüe N-glikozbenzamid türevleri sentezlenmiş ve yeni sentezlenen bileşiklerin yapılarının aydınlatılması amacıyla FTIR, ^{1}H-NMR ve sıvı kromotografisi-kütle spektroskopisi (LC/MS) analizleri gerçekleştirilmiştir. Analizler sonucunda SI1, SI4, SI6 ve SI9 olarak adlandırılan özgün bileşiklerinin karakterizasyonu yapılmıştır.
2. Elde edilen özgün bileşiklerin HT-29 hücrelerindeki sitotoksik etkilerinin değerlendirilebilmesi için yapılan deneylerde antienflamatuar özelliği bilinen fitokimyasal kurkumin pozitif kontrol olarak kullanıldı, SI1 ve SI4 için 50μM doza kadar sitotoksik etkisi görülmezken bu değerin SI6 ve SI9 için 500 μM doza kadar çıktığı tespit edildi, buna dayanarak kullanılan dozların enflamasyon deneyleri için uygun olduğuna karar verilmiştir.

3. Akut enflamasyon oluşumu ve sürdürülmesine ait mekanizmalardaki rolü bilinen H_2O_2 kullanılarak uyarımlı EBH modeli oluşturulması için sitotoksik etkisi olmayan 0,8mM H_2O_2 konsantrasyonu seçildi.
4. Sentezlenen SI1, SI4, SI6, SI9 bileşikleri ve kurkuminin HT-29 hücrelerindeki NO üretim seviyesine etkisinin incelenebilmesi için serum açlığı protokolü uygulandı. Sonuçlar analiz edildiğinde 12 saat serumsuz ortamı takiben 6. saatte H_2O_2 uygulamasının kontrole kıyasla NO üretimini belirgin düzeyde arttırdığı tespit edildi ve çalışmaların devamı için bu protokol uygulanarak sentezlemiş olduğumuz özgün SI1 ve SI4 bileşiklerinin H_2O_2 uyarımı varlığındaki NO seviyelerini önemli düzeyde baskılayarak antienflamatuar etki gösterdiği, bunlardan SI1'in etkisinin doza bağımlı iken SI4'ün etkisinin doza bağımlı olmadığı gözlendi.
5. Deneylerimiz sonunda etkili olduğunu tespit ettiğimiz SI1 ve SI4 bileşiklerinin 10 μM ve 50μM dozları muhtemel sinerjistik etkilerinin incelenebilmesi için pro-enflamatuar uyaranların oluşumunu azaltma yeteneği bilinen NSAID'lerden aspirin, ibuprofen ve diklofenakla birlikte çalışıldı. Yapılan kombinasyonlardan; SI1 10μM-aspirin 100μM ve SI4 10μM-aspirin 100μM kombinasyonlarının antienflamatuar açıdan etkili olduğu benzer şekilde SI1 ve SI4'ün ibuprofenin 10μM ve 20μM dozlarıyla yapılan kombinasyonların HT-29 hücrelerinde antienflamatuar olarak etkili olduğu ve hücre NO düzeylerini belirgin düzeyde baskıladığı, SI1 10μM-diklofenak 1μM kombinasyonun anlamlı ölçüde NO düzeylerini baskılayarak antienflamatuar özellik gösterdiği tespit edildi. Fakat yapılan analizlerde sinerjistik etki oluşturan bir kombinasyona rastlanmamıştır.
6. Sentezlenen özgün SI1 (10μM ve 50μM dozda) ve SI4 (10μM ve 50μM dozda) bileşikleriyle pozitif kontrol olarak kullanılan kurkuminin 5μM ve 10 μM dozlarının pro-enflamatuar sitokin üretimindeki inhibe edici etkilerinin değerlendirilmesi için yapılan deneyler sonucunda H_2O_2 ile uyarılan HT-29 hücrelerinin önemli ölçüde pro-enflamatuar sitokin seviyelerini arttırdığı ($*p<0.05$), H_2O_2 ile uyarılan kontrol grubuna kıyasla SI1, SI4 ve kurkuminin etkileri karşılaştırıldığındaysa SI1 ve SI4'ün IL-6'yı maksimum düzeyde baskıladığı, SI1'in doz bağımlı olarak IL- 1β seviyelerini düşürdüğü, SI4'ün TNF-α'yı doz bağımlı olarak baskıladığı gözlendi.

ÖZET

Enflamatuar bağırsak hastalığı, bireylerin yaşamının her yönünü etkileyen, sağlık sistemi ve toplum için önemli maliyetlere neden olan kronik, engelleyici gastrointestinal bozukluklardır. Yeni epidemiyolojik veriler, enflamatuar bağırsak hastalığı insidansının ve prevalansının giderek arttığını göstermektedir. Bu durum tıbbi tedavi ve hastalık yönetiminin son yıllarda önemli ölçüde değişip gelişmesine sebep olmuştur.

Enflamatuar bağırsak hastalığı tedavisinde kullanılan aminosalisilik asit türevleri, kortikosteroidler ve immünosupresanlar gibi klasik ilaçların yan etki profilleri ve kesin bir çözüm sağlayamayışı daha az toksisiteye sahip antienflamatuvar özellikteki doğal bileşiklere yönelimi tetiklemiştir.

Bu çalışmada, enflamatuar bağırsak hastalığı tedavisi için glikozamin ve gallik asit türevleri kullanılarak amidifikasyon reaksiyonu sonucunda sübstitüe N-glikozbenzamid türevleri kimyasal yöntemlerle sentezlenmiştir. Elde edilen bileşikler saflaştırıldıktan sonra, proton nükleer manyetik rezonans gibi çeşitli spektroskopik yöntemlerle yapısı aydınlatılmış ve elde edilen bileşiklerin antienflamatuar fonksiyonunun etkileyebileceği spesifik mekanizmalara yanıtı in vitro enflamatuar bağırsak hastalığı modelinde değerlendirilmiştir. Sentezlediğimiz özgün bileşiklerden ikisinin hidrojen peroksit uyarımı varlığındaki nitrik oksit seviyelerini önemli düzeyde baskılayarak antienflamatuar etki gösterdiği ayrıca tümör nekroz faktör alfa ve interlökin 6 gibi proenflamatuar sitokinlerin seviyelerini de baskıladığı tespit edilmiştir.

Anahtar kelimeler: enflamasyon, enflamatuar bağırsak hastalığı, fitokimyasal

DEVELOPMENT OF SEMISYNTHETIC PHOTOCHEMICAL STRUCTURE FOR THE TREATMENT OF INFLAMMATORY BOWEL DISEASE

SUMMARY

Inflammatory bowel disease are chronic, disabling gastrointestinal disorders that affect every aspect of individual's lives and cause significant costs to the healthcare system and society. Recent epidemiological data indicate that the incidence and prevalence of inflammatory bowel disease is increasing. This has led to a significant impact on medical treatment and disease management in recent years.

Side effect profiles of classical drugs such as aminosalicylic acid derivatives, corticosteroids and immunosuppressants used in the treatment of inflammatory bowel disease and the inability to provide a definitive solution have triggered the tendency to natural compounds with antiinflammatory properties with less toxicity.

In this study, substituted N-glucosbenzamide derivatives were synthesized by chemical methods as a result of amidification reaction by using glucosamine and gallic acid derivatives for the treatment of inflammatory bowel disease. After the obtained compounds were purified, their structures were elucidated by various spectroscopic methods such as proton nuclear magnetic resonance, and the response of the obtained compounds to specific mechanisms that could affect the anti-inflammatory function was evaluated in an in vitro inflammatory bowel disease model. It was determined that two of the unique compounds we synthesized showed anti-inflammatory effects by significantly suppressing nitric oxide levels in the presence of

hydrogen peroxide stimulation, and also suppressed the levels of proinflammatory cytokines such as tumor necrosis factor alpha and interleukin 6.

Keywords: enflammation, enflammatory bowel disease, phytochemical

KAYNAKLAR

1. Ng SC, Shi HY, Hamidi N, Underwood FE, Tang W, Benchimol EI, et al. Worldwide incidence and prevalence of inflammatory bowel disease in the 21st century: a systematic review of population-based studies. Lancet. 2017;390(10114):2769-78.

2. Burisch J, Munkholm P. The epidemiology of inflammatory bowel disease. Scand J Gastroenterol. 2015;50(8):942-51.

3. Collaborators GBDIBD. The global, regional, and national burden of inflammatory bowel disease in 195 countries and territories, 1990-2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. Lancet Gastroenterol Hepatol. 2020;5(1):17-30.

4. Hammer T, Nielsen KR, Munkholm P, Burisch J, Lynge E. The Faroese IBD Study: Incidence of Inflammatory Bowel Diseases Across 54 Years of Population-based Data. J Crohns Colitis. 2016;10(8):934-42.

5. Torre LA, Siegel RL, Ward EM, Jemal A. Global Cancer Incidence and Mortality Rates and Trends--An Update. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2016;25(1):16-27.

6. Sairenji T, Collins KL, Evans DV. An Update on Inflammatory Bowel Disease. Prim Care. 2017;44(4):673-92.

7. Kaplan GG. The global burden of IBD: from 2015 to 2025. Nat Rev Gastroenterol Hepatol. 2015;12(12):720-7.

8. Fakhoury M, Negrulj R, Mooranian A, Al-Salami H. Inflammatory bowel disease: clinical aspects and treatments. J Inflamm Res. 2014;7:113-20.

9. Yang W, Zhao P, Li X, Guo L, Gao W. The potential roles of natural plant polysaccharides in inflammatory bowel disease: A review. Carbohydr Polym. 2022;277:118821.

10. Somani SJ, Modi KP, Majumdar AS, Sadarani BN. Phytochemicals and their potential usefulness in inflammatory bowel disease. Phytother Res. 2015;29(3):339-50.

11. Hur SJ, Kang SH, Jung HS, Kim SC, Jeon HS, Kim IH, et al. Review of natural products actions on cytokines in inflammatory bowel disease. Nutr Res. 2012;32(11):801-16.

12. Hossen I, Hua W, Ting L, Mehmood A, Jingyi S, Duoxia X, et al. Phytochemicals and inflammatory bowel disease: a review. Crit Rev Food Sci Nutr. 2020;60(8):1321-45.

13. Denbow DM. Chapter 14 - Gastrointestinal Anatomy and Physiology. In: Scanes CG, editor. Sturkie's Avian Physiology (Sixth Edition). San Diego: Academic Press; 2015. p. 337-66.

14. Chen JJFh. Food oral processing—A review. 2009;23(1):1-25.

15. Mosca AC, Chen JJCOiFS. Food oral management: physiology and objective assessment. 2016;9:11-20.

16. Bornhorst GM, Gouseti O, Wickham MS, Bakalis S. Engineering Digestion: Multiscale Processes of Food Digestion. Journal of food science. 2016;81(3):R534-43.

17. Brandstaeter S, Fuchs SL, Aydin RC, Cyron CJJGM. Mechanics of the stomach: A review of an emerging field of biomechanics. 2019;42(3):e201900001.

18. Lentle RG, Janssen PWJCrifs, nutrition. Manipulating digestion with foods designed to change the physical characteristics of digesta. 2010;50(2):130-45.

19. Rogers K. The digestive system: Britannica Educational Publishing; 2010;61-86.

20. Saladin KS, McFarland RK. Human anatomy: McGraw-Hill New York; 2008;653-678.

21. Kahai P, Mandiga P, Wehrle CJ, Lobo S. Anatomy, abdomen and pelvis, large intestine. StatPearls [Internet]: StatPearls Publishing; 2021.

22. Greenwood-Van Meerveld B, Johnson AC, Grundy D. Gastrointestinal Physiology and Function. Handb Exp Pharmacol. 2017;239:1-16.

23. Reed KK, Wickham R. Review of the gastrointestinal tract: from macro to micro. Semin Oncol Nurs. 2009;25(1):3-14.

24. Schlegel N, Boerner K, Waschke J. Targeting desmosomal adhesion and signalling for intestinal barrier stabilization in inflammatory bowel diseases-Lessons from experimental models and patients. Acta Physiol (Oxf). 2021;231(1):e13492.

25. Thibodeau GA, Patton KT. Anatomy & physiology: Mosby; 2003.

26. Rao JN, Wang JY. Regulation of gastrointestinal mucosal growth / Rao N. Jaladanki and Jian-Ying Wang. Second edition. ed. San Rafael, California]: San Rafael, California : Morgan & Claypool; 2017.

27. Chang EB, Leung PS. Regulation of Gastrointestinal Functions. In: Leung PS, editor. The Gastrointestinal System: Gastrointestinal, Nutritional and Hepatobiliary Physiology. Dordrecht: Springer Netherlands; 2014. p. 3-34.

28. Miranda-Bautista J, Bañares R, Vaquero J. The Gastrointestinal System. Gastrointestinal Tissue2017. p. 3-20.

29. Wang Z, Li R, Tan J, Peng L, Wang P, Liu J, et al. Syndecan-1 Acts in Synergy with Tight Junction Through Stat3 Signaling to Maintain Intestinal Mucosal Barrier and Prevent Bacterial Translocation. Inflamm Bowel Dis. 2015;21(8):1894-907.

30. Goto Y, Kiyono H. Epithelial barrier: an interface for the cross-communication between gut flora and immune system. Immunol Rev. 2012;245(1):147-63.

31. Kotas ME, Medzhitov R. Homeostasis, inflammation, and disease susceptibility. Cell. 2015;160(5):816-27.

32. Zigterman BGR, Dubois L. [Inflammation and infection: cellular and biochemical processes]. Ned Tijdschr Tandheelkd. 2022;129(3):125-9.

33. Medzhitov R, Janeway C, Jr. Innate immunity. N Engl J Med. 2000;343(5):338-44.

34. Xiao TS. Innate immunity and inflammation. Cell Mol Immunol. 2017;14(1):1-3.

35. Huang Y, Chen Z. Inflammatory bowel disease related innate immunity and adaptive immunity. Am J Transl Res. 2016;8(6):2490-7.

36. Ley RE, Peterson DA, Gordon JI. Ecological and evolutionary forces shaping microbial diversity in the human intestine. Cell. 2006;124(4):837-48.

37. Honda K, Littman DR. The microbiome in infectious disease and inflammation. Annu Rev Immunol. 2012;30:759-95.

38. Qin J, Li R, Raes J, Arumugam M, Burgdorf KS, Manichanh C, et al. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. Nature. 2010;464(7285):59-65.

39. de Bruyn M, Vandooren J, Ugarte-Berzal E, Arijs I, Vermeire S, Opdenakker G. The molecular biology of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in inflammatory bowel diseases. Crit Rev Biochem Mol Biol. 2016;51(5):295-358.

40. de Kivit S, Tobin MC, Forsyth CB, Keshavarzian A, Landay AL. Regulation of Intestinal Immune Responses through TLR Activation: Implications for Pro- and Prebiotics. Front Immunol. 2014;5:60.

41. Singh RK, Chang HW, Yan D, Lee KM, Ucmak D, Wong K, et al. Influence of diet on the gut microbiome and implications for human health. J Transl Med. 2017;15(1):73.

42. Shan Y, Lee M, Chang EB. The Gut Microbiome and Inflammatory Bowel Diseases. Annu Rev Med. 2022;73:455-68.

43. Kraus TA, Mayer L. Oral tolerance and inflammatory bowel disease. Curr Opin Gastroenterol. 2005;21(6):692-6.

44. Kuchroo VK, Ohashi PS, Sartor RB, Vinuesa CG. Dysregulation of immune homeostasis in autoimmune diseases. Nat Med. 2012;18(1):42-7.

45. Kopf M, Bachmann MF, Marsland BJ. Averting inflammation by targeting the cytokine environment. Nat Rev Drug Discov. 2010;9(9):703-18.

46. Neurath MF. Cytokines in inflammatory bowel disease. Nat Rev Immunol. 2014;14(5):329-42.

47. Kim N. Sex/Gender-Specific Medicine in the Gastrointestinal Diseases: Springer Nature Singapore; 2022.

48. Rogler G, Vavricka S. Exposome in IBD: recent insights in environmental factors that influence the onset and course of IBD. Inflamm Bowel Dis. 2015;21(2):400-8.

49. Moura FA, de Andrade KQ, Dos Santos JCF, Araujo ORP, Goulart MOF. Antioxidant therapy for treatment of inflammatory bowel disease: Does it work? Redox Biol. 2015;6:617-39.

50. Rogler G. Gastrointestinal and liver adverse effects of drugs used for treating IBD. Best Pract Res Clin Gastroenterol. 2010;24(2):157-65.

51. May D, Pan S, Crispin DA, Lai K, Bronner MP, Hogan J, et al. Investigating neoplastic progression of ulcerative colitis with label-free comparative proteomics. J Proteome Res. 2011;10(1):200-9.

52. Cosnes J, Gower-Rousseau C, Seksik P, Cortot A. Epidemiology and natural history of inflammatory bowel diseases. Gastroenterology. 2011;140(6):1785-94.

53. Shah SC, Khalili H, Chen CY, Ahn HS, Ng SC, Burisch J, et al. Sex-based differences in the incidence of inflammatory bowel diseases-pooled analysis of population-based studies from the Asia-Pacific region. Aliment Pharmacol Ther. 2019;49(7):904-11.

54. Ashton JJ, Borca F, Mossotto E, Phan HTT, Ennis S, Beattie RM. Analysis and Hierarchical Clustering of Blood Results Before Diagnosis in Pediatric Inflammatory Bowel Disease. Inflamm Bowel Dis. 2020;26(3):469-75.

55. Jose FA, Heyman MB. Extraintestinal manifestations of inflammatory bowel disease. J Pediatr Gastroenterol Nutr. 2008;46(2):124-33.

56. Hommes DW, van Deventer SJ. Endoscopy in inflammatory bowel diseases. Gastroenterology. 2004;126(6):1561-73.

57. Jiang F, Fu X, Kuang K, Fan D. Artificial Intelligence Algorithm-Based Differential Diagnosis of Crohn's Disease and Ulcerative Colitis by CT Image. Comput Math Methods Med. 2022;2022:3871994.

58. Magro F, Doherty G, Peyrin-Biroulet L, Svrcek M, Borralho P, Walsh A, et al. ECCO Position Paper: Harmonization of the Approach to Ulcerative Colitis Histopathology. Journal of Crohn's and Colitis. 2020;14(11):1503-11.

59. Lang-Schwarz C, Agaimy A, Atreya R, Becker C, Danese S, Fléjou J-F, et al. Maximizing the diagnostic information from biopsies in chronic inflammatory bowel diseases: recommendations from the Erlangen International Consensus Conference on Inflammatory Bowel Diseases and presentation of the IBD-DCA score as a proposal for a new index for histologic activity assessment in ulcerative colitis and Crohn’s disease. 2021;478(3):581-94.

60. Paine ER. Colonoscopic evaluation in ulcerative colitis. Gastroenterol Rep (Oxf). 2014;2(3):161-8.

61. Verstockt B, Bressler B, Martinez-Lozano H, McGovern D, Silverberg MS. Time to Revisit Disease Classification in Inflammatory Bowel Disease: Is the Current Classification of Inflammatory Bowel Disease Good Enough for Optimal Clinical Management? Gastroenterology. 2022;162(5):1370-82.

62. Liu D, Saikam V, Skrada KA, Merlin D, Iyer SS. Inflammatory bowel disease biomarkers. Med Res Rev. 2022;42(5):1856-87.

63. Wehkamp J, Gotz M, Herrlinger K, Steurer W, Stange EF. Inflammatory Bowel Disease. Dtsch Arztebl Int. 2016;113(5):72-82.

64. Feakins RM, British Society of G. Inflammatory bowel disease biopsies: updated British Society of Gastroenterology reporting guidelines. J Clin Pathol. 2013;66(12):1005-26.

65. Burke JP, Mulsow JJ, O'keane C, Docherty NG, Watson RWG, O'connell PRJOjotACoG, et al. Fibrogenesis in Crohn's disease. 2007;102(2):439-48.

66. Pergolizzi S, Alesci A, Centofanti A, Aragona M, Pallio S, Magaudda L, et al. Role of Serotonin in the Maintenance of Inflammatory State in Crohn's Disease. Biomedicines. 2022;10(4).

67. Mulsow J. Prof Ronan O'Connell Festschrift: Stricture pathogenesis in Crohn's disease-the role of intestinal fibroblasts. Ir J Med Sci. 2018;187(4):1139-42.

68. Rieder F, Fiocchi C. Intestinal fibrosis in inflammatory bowel disease: progress in basic and clinical science. Curr Opin Gastroenterol. 2008;24(4):462-8.

69. Ülseratif kolit ve Crohn hastalığı ayırımı
Erişim tarihi: 01.12.2022 https://patient.gastro.org/inflammatory-bowel-disease-ibd/.

70. Jera J. Histomorphological Diagnosis of Ulcerative Colitis and Associated Conditions. In: Partha P, editor. Ulcerative Colitis. Rijeka: IntechOpen; 2022. p. Ch. 4.

71. Loughrey MB, Shepherd NA. Diagnostic dilemmas in chronic inflammatory bowel disease. Virchows Archiv. 2018;472(1):81-97.

72. Gajendran M, Loganathan P, Jimenez G, Catinella AP, Ng N, Umapathy C, et al. A comprehensive review and update on ulcerative colitis(). Dis Mon. 2019;65(12):100851.

73. Kirschner BS. Inflammatory Bowel Disease Unclassified (IBD-U)/Indeterminate Colitis. In: Guandalini S, Dhawan A, editors. Textbook of Pediatric Gastroenterology, Hepatology

and Nutrition: A Comprehensive Guide to Practice. Cham: Springer International Publishing; 2022. p. 393-9.

74. M'Koma AE. Inflammatory Bowel Disease: Clinical Diagnosis and Surgical Treatment-Overview. 2022;58(5):567.

75. Hoter A, Naim HY. The Functions and Therapeutic Potential of Heat Shock Proteins in Inflammatory Bowel Disease-An Update. Int J Mol Sci. 2019;20(21).

76. Kaser A, Zeissig S, Blumberg RS. Inflammatory bowel disease. Annu Rev Immunol. 2010;28:573-621.

77. Kúsulas-Delint D, González-Regueiro JA, Rodríguez-Aldama JC, García-Miranda FS, García-Santos RA, Lizardo AE, et al. Crohn's disease. Review and current concepts. 2017;23(1):10-20.

78. Tian T, Wang Z, Zhang JJOm, longevity c. Pathomechanisms of oxidative stress in inflammatory bowel disease and potential antioxidant therapies. 2017;2017.

79. Denis MC, Desjardins Y, Furtos A, Marcil V, Dudonne S, Montoudis A, et al. Prevention of oxidative stress, inflammation and mitochondrial dysfunction in the intestine by different cranberry phenolic fractions. Clin Sci (Lond). 2015;128(3):197-212.

80. Klaunig JE, Kamendulis LM, Hocevar BA. Oxidative stress and oxidative damage in carcinogenesis. Toxicol Pathol. 2010;38(1):96-109.

81. Pizzino G, Irrera N, Cucinotta M, Pallio G, Mannino F, Arcoraci V, et al. Oxidative Stress: Harms and Benefits for Human Health. Oxidative Medicine and Cellular Longevity. 2017;2017:8416763.

82. Moura FA, Goulart MOF, Campos SBG, da Paz Martins AS. The Close Interplay of Nitro-Oxidative Stress, Advanced Glycation end Products and Inflammation in Inflammatory Bowel Diseases. Current medicinal chemistry. 2020;27(13):2059-76.

83. Grzybowska-Chlebowczyk U, Wysocka-Wojakiewicz P, Jasielska M, Cukrowska B, Więcek S, Kniażewska M, et al. Oxidative and Antioxidative Stress Status in Children with Inflammatory Bowel Disease as a Result of a Chronic Inflammatory Process. Mediators of Inflammation. 2018;2018:4120973.

84. Duryee MJ, Ahmad R, Eichele DD, Hunter CD, Mitra A, Talmon GA, et al. Identification of Immunoglobulin G Autoantibody Against Malondialdehyde-Acetaldehyde Adducts as a Novel Serological Biomarker for Ulcerative Colitis. Clinical and translational gastroenterology. 2022;13(4):e00469.

85. Liu W, Dong Z, Liu K, Lu Y, Wu W, Qi J, et al. Targeting strategies of oral nano-delivery systems for treating inflammatory bowel disease. Int J Pharm. 2021;600:120461.

86. Rubin D, Shaker A, Levin M. Chronic intestinal inflammation: inflammatory bowel disease and colitis-associated colon cancer. 2012;3.

87. Kim YJ, Kim EH, Hahm KB. Oxidative stress in inflammation-based gastrointestinal tract diseases: challenges and opportunities. J Gastroenterol Hepatol. 2012;27(6):1004-10.

88. Chang JT. Pathophysiology of Inflammatory Bowel Diseases. N Engl J Med. 2020;383(27):2652-64.

89. Bello RO, Chin VK, Abd Rachman Isnadi MF, Abd Majid R, Atmadini Abdullah M, Lee TY, et al. The Role, Involvement and Function(s) of Interleukin-35 and Interleukin-37 in Disease Pathogenesis. Int J Mol Sci. 2018;19(4).

90. Mokhtari Y, Pourbagheri-Sigaroodi A, Zafari P, Bagheri N, Ghaffari SH, Bashash DJJoC, et al. Toll-like receptors (TLRs): An old family of immune receptors with a new face in cancer pathogenesis. 2021;25(2):639-51.

91. Shaw MH, Kamada N, Warner N, Kim Y-G, Nuñez GJTii. The ever-expanding function of NOD2: autophagy, viral recognition, and T cell activation. 2011;32(2):73-9.

92. Caruso R, Warner N, Inohara N, Núñez GJI. NOD1 and NOD2: signaling, host defense, and inflammatory disease. 2014;41(6):898-908.

93. Negroni A, Pierdomenico M, Cucchiara S, Stronati LJJoir. NOD2 and inflammation: current insights. 2018;11:49.

94. Shale M, Schiering C, Powrie FJIr. CD 4+ T-cell subsets in intestinal inflammation. 2013;252(1):164-82.

95. Fuss IJ, Heller F, Boirivant M, Leon F, Yoshida M, Fichtner-Feigl S, et al. Nonclassical CD1d-restricted NK T cells that produce IL-13 characterize an atypical Th2 response in ulcerative colitis. 2004;113(10):1490-7.

96. Strober W, Fuss IJ. Proinflammatory cytokines in the pathogenesis of inflammatory bowel diseases. Gastroenterology. 2011;140(6):1756-67.

97. Kumar S, Kumar A. Microbial pathogenesis in inflammatory bowel diseases. Microb Pathog. 2022 Feb;163:105383.

98. Belkaid Y, Rouse BT. Natural regulatory T cells in infectious disease. Nature Immunology. 2005;6(4):353-60.

99. de Souza HSP, Fiocchi C. Immunopathogenesis of IBD: current state of the art. Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology. 2016;13(1):13-27.

100. Sanders David J, Inniss S, Sebepos-Rogers G, Rahman Farooq Z, Smith Andrew M. The role of the microbiome in gastrointestinal inflammation. Bioscience Reports. 2021;41(6).

101. Ciesielska A, Matyjek M, Kwiatkowska KJC, sciences ml. TLR4 and CD14 trafficking and its influence on LPS-induced pro-inflammatory signaling. 2021;78(4):1233-61.

102. Newton K, Dixit VM. Signaling in innate immunity and inflammation. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2012 Mar 1;4(3):a006049.

103. Dai W, Long L, Wang X, Li S, Xu H. Phytochemicals targeting Toll-like receptors 4 (TLR4) in inflammatory bowel disease. Chinese Medicine. 2022;17(1):53.

104. Dejban P, Nikravangolsefid N, Chamanara M, Dehpour A, Rashidian A. The role of medicinal products in the treatment of inflammatory bowel diseases (IBD) through inhibition of TLR4/NF-kappaB pathway. Phytother Res. 2021;35(2):835-45.

105. Madka V, Rao CV. Anti-inflammatory phytochemicals for chemoprevention of colon cancer. Current cancer drug targets. 2013;13(5):542-57.

106. Kisseleva T, Bhattacharya S, Braunstein J, Schindler CJG. Signaling through the JAK/STAT pathway, recent advances and future challenges. 2002;285(1-2):1-24.

107. O'Shea JJ, Schwartz DM, Villarino AV, Gadina M, McInnes IB, Laurence AJArom. The JAK-STAT pathway: impact on human disease and therapeutic intervention. 2015;66:311-28.

108. Yamaoka K, Saharinen P, Pesu M, Holt VET, Silvennoinen O, O'Shea JJ. The Janus kinases (Jaks). Genome Biology. 2004;5(12):253.

109. Salas A, Hernandez-Rocha C, Duijvestein M, Faubion W, McGovern D, Vermeire S, et al. JAK–STAT pathway targeting for the treatment of inflammatory bowel disease. Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology. 2020;17(6):323-37.

110. Coskun M, Salem M, Pedersen J, Nielsen OH. Involvement of JAK/STAT signaling in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. Pharmacological Research. 2013;76:1-8.

111. Lei H, Crawford MsS, McCole DF. JAK-STAT Pathway Regulation of Intestinal Permeability: Pathogenic Roles and Therapeutic Opportunities in Inflammatory Bowel Disease. 2021;14(9):840.

112. Cordes F, Foell D, Ding JN, Varga G, Bettenworth D. Differential regulation of JAK/STAT-signaling in patients with ulcerative colitis and Crohn's disease. World journal of gastroenterology. 2020;26(28):4055-75.

113. Wang A, Singh K, Ibrahim W, King B, Damsky W. The Promise of JAK Inhibitors for Treatment of Sarcoidosis and Other Inflammatory Disorders with Macrophage Activation: A Review of the Literature. The Yale journal of biology and medicine. 2020;93(1):187-95.

114. Gadina M, Johnson C, Schwartz D, Bonelli M, Hasni S, Kanno Y, et al. Translational and clinical advances in JAK-STAT biology: The present and future of jakinibs. 2018;104(3):499-514.

115. Liu R, Moriggl R, Zhang D, Li H, Karns R, Ruan H-B, et al. Constitutive STAT5 activation regulates Paneth and Paneth-like cells to control Clostridium difficile colitis. 2019;2(2).

116. Günther C, Ruder B, Stolzer I, Dorner H, He G-W, Chiriac MT, et al. Interferon lambda promotes paneth cell death via STAT1 signaling in mice and is increased in inflamed ileal tissues of patients with Crohn's disease. 2019;157(5):1310-22. e13.

117. Martin-Gallausiaux C, Larraufie P, Jarry A, Béguet-Crespel F, Marinelli L, Ledue F, et al. Butyrate produced by commensal bacteria down-regulates indolamine 2, 3-dioxygenase 1 (IDO-1) expression via a dual mechanism in human intestinal epithelial cells. 2018;9:2838.

118. Wang L, Hu Y, Song B, Xiong Y, Wang J, Chen D. Targeting JAK/STAT signaling pathways in treatment of inflammatory bowel disease. Inflammation Research. 2021;70(7):753-64.

119. Ramachandran GJV. Gram-positive and gram-negative bacterial toxins in sepsis: a brief review. 2014;5(1):213-8.

120. Wittkopf N, Pickert G, Billmeier U, Mahapatro M, Wirtz S, Martini E, et al. Activation of Intestinal Epithelial Stat3 Orchestrates Tissue Defense during Gastrointestinal Infection. PLOS ONE. 2015;10(3):e0118401.

121. Mudter J, Neurath MF. Il-6 signaling in inflammatory bowel disease: Pathophysiological role and clinical relevance. Inflammatory Bowel Diseases. 2007;13(8):1016-23.

122. Bouguen G, Chevaux JB, Peyrin-Biroulet L. Recent advances in cytokines: therapeutic implications for inflammatory bowel diseases. World journal of gastroenterology. 2011;17(5):547-56.

123. Yamamoto-Furusho JK. Inflammatory bowel disease therapy: blockade of cytokines and cytokine signaling pathways. Curr Opin Gastroenterol. 2018;34(4):187-93.

124. Turner MD, Nedjai B, Hurst T, Pennington DJ. Cytokines and chemokines: At the crossroads of cell signalling and inflammatory disease. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research. 2014;1843(11):2563-82.

125. Tracey D, Klareskog L, Sasso EH, Salfeld JG, Tak PPJP, therapeutics. Tumor necrosis factor antagonist mechanisms of action: a comprehensive review. 2008;117(2):244-79.

126. Billmeier U, Dieterich W, Neurath MF, Atreya RJWjog. Molecular mechanism of action of anti-tumor necrosis factor antibodies in inflammatory bowel diseases. 2016;22(42):9300.

127. Kofla-Dłubacz A, Akutko K, Krzesiek E, Jamer T, Braksator J, Grębska P, et al. Selective Forms of Therapy in the Treatment of Inflammatory Bowel Diseases. 2022;11(4):994.

128. Bernstein CNJOjotACoG, ACG. Treatment of IBD: where we are and where we are going. 2015;110(1):114-26.

129. Im JP, Ye BD, Kim YS, Kim JS. Changing treatment paradigms for the management of inflammatory bowel disease. The Korean journal of internal medicine. 2018;33(1):28-35.

130. Castaño E, Dalmau M, Barragán M, Pueyo G, Bartrons R, Gil J. Aspirin induces cell death and caspase-dependent phosphatidylserine externalization in HT-29 human colon adenocarcinoma cells. British Journal of Cancer. 1999;81(2):294-9.

131. Kodela R, Chattopadhyay M, Goswami S, Gan ZY, Rao PPN, Nia KV, et al. Positional Isomers of Aspirin Are Equally Potent in Inhibiting Colon Cancer Cell Growth: Differences in Mode of Cyclooxygenase Inhibition. 2013;345(1):85-94.

132. Matos P, Kotelevets L, Gonçalves V, Henriques A, Zerbib P, Moyer MP, et al. Ibuprofen Inhibits Colitis-Induced Overexpression of TumorRelated Rac1b 1. Neoplasia (New York, NY). 2013;15:102-11.

133. Williams JL, Borgo S, Hasan I, Castillo E, Traganos F, Rigas B. Nitric Oxide-releasing Nonsteroidal Anti-inflammatory Drugs (NSAIDs) Alter the Kinetics of Human Colon Cancer Cell Lines More Effectively than Traditional NSAIDs: Implications for Colon Cancer Chemoprevention1. Cancer Research. 2001;61(8):3285-9.

134. Harris RE, Beebe-Donk J, Alshafie GA. Similar reductions in the risk of human colon cancer by selective and nonselective cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitors. BMC Cancer. 2008;8(1):237.

135. Marinov L, Georgieva A, Voynikov Y, Toshkova R, Nikolova I, Malchev M. Cytotoxic and antiproliferative effects of the nonsteroidal anti-inflammatory drug diclofenac in human tumour cell lines. Biotechnology & Biotechnological Equipment. 2021;35(1):1118-26.

136. Herfarth H, Vavricka SR. 5-Aminosalicylic Acid Chemoprevention in Inflammatory Bowel Diseases: Is It Necessary in the Age of Biologics and Small Molecules? Inflammatory Intestinal Diseases. 2022;7(1):28-35.

137. Neurath MF. Current and emerging therapeutic targets for IBD. Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology. 2017;14(5):269-78.

138. Cammà C, Giunta M, Rosselli M, Cottone M. Mesalamine in the maintenance treatment of Crohn's disease: a meta-analysis adjusted for confounding variables. Gastroenterology. 1997;113(5):1465-73.

139. Kapur S, Hanauer SBJCtoig. The evolving role of Thiopurines in inflammatory bowel disease. 2019;17(4):435-48.

140. Aberra FN, Lewis JD, Hass D, Rombeau JL, Osborne B, Lichtenstein GR. Corticosteroids and immunomodulators: postoperative infectious complication risk in inflammatory bowel disease patients. Gastroenterology. 2003;125(2):320-7.

141. Yasir M, Goyal A, Sonthalia S. Corticosteroid Adverse Effects. StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing Copyright © 2022, StatPearls Publishing LLC.; 2022.

142. Nielsen OH, Ainsworth MA. Tumor necrosis factor inhibitors for inflammatory bowel disease. N Engl J Med. 2013;369(8):754-62.

143. Klenske E, Bojarski C, Waldner M, Rath T, Neurath MF, Atreya R. Targeting mucosal healing in Crohn's disease: what the clinician needs to know. Therapeutic Advances in Gastroenterology. 2019;12.

144. Löwenberg M, D'Haens G. Novel Targets for Inflammatory Bowel Disease Therapeutics. Current Gastroenterology Reports. 2013;15(2):311.

145. van Dieren JM, Kuipers EJ, Samsom JN, Nieuwenhuis EE, van der Woude JCJIbd. Revisiting the immunomodulators tacrolimus, methotrexate, and mycophenolate mofetil: their mechanisms of action and role in the treatment of IBD. 2006;12(4):311-27.

146. Chande N, Wang Y, MacDonald JK, McDonald JWJCDoSR. Methotrexate for induction of remission in ulcerative colitis. 2014(8).

147. Lemann M, Chamiot-Prieur C, Mesnard B, Halphen M, Messing B, Rambaud J, et al. Methotrexate for the treatment of refractory Crohn's disease. 1996;10(3):309-14.

148. Tran V, Shammas RM, Sauk JS, Padua DJC, gastroenterology e. Evaluating tofacitinib citrate in the treatment of moderate-to-severe active ulcerative colitis: design, development and positioning of therapy. 2019;12:179.

149. Chaparro M, Garre A, Mesonero F, Rodríguez C, Barreiro-de Acosta M, Martínez-Cadilla J, et al. Tofacitinib in ulcerative colitis: real-world evidence from the ENEIDA registry. 2021;15(1):35-42.

150. Honap S, Pavlidis P, Ray S, Sharma E, Anderson S, Sanderson JD, et al. Tofacitinib in acute severe ulcerative colitis—a real-world tertiary center experience. 2020;26(11):e147-e9.

151. Starz E, Wzorek K, Folwarski M, Kaźmierczak-Siedlecka K, Stachowska L, Przewłócka K, et al. The Modification of the Gut Microbiota via Selected Specific Diets in Patients with Crohn's Disease. 2021;13(7):2125.

152. Parada Venegas D, De la Fuente MK, Landskron G, González MJ, Quera R, Dijkstra G, et al. Short Chain Fatty Acids (SCFAs)-Mediated Gut Epithelial and Immune Regulation and Its Relevance for Inflammatory Bowel Diseases. 2019;10.

153. Russo E, Giudici F, Fiorindi C, Ficari F, Scaringi S, Amedei A. Immunomodulating Activity and Therapeutic Effects of Short Chain Fatty Acids and Tryptophan Post-biotics in Inflammatory Bowel Disease. 2019;10.

154. Ruemmele FM. Role of Diet in Inflammatory Bowel Disease. Annals of Nutrition and Metabolism. 2016;68(suppl 1)(Suppl. 1):32-41.

155. Chen L, Wang J. Gut microbiota and inflammatory bowel disease. 2022;14(2):e1540.

156. Veeresham CJJoapt, research. Natural products derived from plants as a source of drugs. 2012;3(4):200.

157. Fridlender M, Kapulnik Y, Koltai HJFips. Plant derived substances with anti-cancer activity: from folklore to practice. 2015;6:799.

158. Molyneux RJ, Lee ST, Gardner DR, Panter KE, James LF. Phytochemicals: the good, the bad and the ugly? Phytochemistry. 2007;68(22-24):2973-85.

159. Fresco P, Borges F, Diniz C, Marques MP. New insights on the anticancer properties of dietary polyphenols. Med Res Rev. 2006;26(6):747-66.

160. Han X, Shen T, Lou H. Dietary Polyphenols and Their Biological Significance. 2007;8(9):950-88.

161. Shah BM, Palakurthi SS, Khare T, Khare S, Palakurthi S. Natural proteins and polysaccharides in the development of micro/nano delivery systems for the treatment of inflammatory bowel disease. International Journal of Biological Macromolecules. 2020;165:722-37.

162. Ramos A, Lima Cvo, Pereira-Wilson C. DNA Damage Protection and Induction of Repair by Dietary Phytochemicals and Cancer Prevention: What Do We Know? 2011.

163. Pereira DM, Valentao P, Correia-da-Silva G, Teixeira N, Andrade PB. Plant secondary metabolites in cancer chemotherapy: where are we? Curr Pharm Biotechnol. 2012;13(5):632-50.

164. Cragg GM, Kingston DG, Newman DJ. Anticancer agents from natural products: CRC press; 2005.

165. You Y. Podophyllotoxin derivatives: current synthetic approaches for new anticancer agents. Curr Pharm Des. 2005;11(13):1695-717.

166. Juyal D, Thawani V, Thaledi S, Joshi MJJot, medicine c. Ethnomedical properties of Taxus wallichiana zucc.(Himalayan yew). 2014;4(3):159-61.

167. Khan I, Nisar M, Shah MR, Shah H, Gilani SN, Gul F, et al. Anti-inflammatory activities of Taxusabietane A isolated from Taxus wallichiana Zucc. 2011;82(7):1003-7.

168. Fujita K-i, Kubota Y, Ishida H, Sasaki YJWjog. Irinotecan, a key chemotherapeutic drug for metastatic colorectal cancer. 2015;21(43):12234.

169. Liu Z, Tang L, Zhu H, Xu T, Qiu C, Zheng S, et al. Design, Synthesis, and Structure–Activity Relationship Study of Novel Indole-2-carboxamide Derivatives as Anti-inflammatory Agents for the Treatment of Sepsis. Journal of Medicinal Chemistry. 2016;59(10):4637-50.

170. Page MJ, Kell DB, Pretorius E. The Role of Lipopolysaccharide-Induced Cell Signalling in Chronic Inflammation. Chronic Stress. 2022;6:24705470221076390.

171. Hou S, Yang X, Tong Y, Yang Y, Chen Q, Wan B, et al. Structure-based discovery of 1H-indole-2-carboxamide derivatives as potent ASK1 inhibitors for potential treatment of ulcerative colitis. European Journal of Medicinal Chemistry. 2021;211:113114.

172. Mao X, Yang Q, Chen D, Yu B, He J. Benzoic Acid Used as Food and Feed Additives Can Regulate Gut Functions. BioMed Research International. 2019;2019:5721585.

173. Bai J, Zhang Y, Tang C, Hou Y, Ai X, Chen X, et al. Gallic acid: Pharmacological activities and molecular mechanisms involved in inflammation-related diseases. Biomedicine & Pharmacotherapy. 2021;133:110985.

174. Zhu L, Gu P, Shen H. Gallic acid improved inflammation via NF-κB pathway in TNBS-induced ulcerative colitis. International Immunopharmacology. 2019;67:129-37.

175. Pandurangan AK, Mohebali N, Mohd. Esa N, Looi CY, Ismail S, Saadatdoust Z. Gallic acid suppresses inflammation in dextran sodium sulfate-induced colitis in mice: Possible mechanisms. International Immunopharmacology. 2015;28(2):1034-43.

176. Esmeeta A, Adhikary S, Dharshnaa V, Swarnamughi P, Ummul Maqsummiya Z, Banerjee A, et al. Plant-derived bioactive compounds in colon cancer treatment: An updated review. Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie. 2022;153:113384.

177. Peng Y, Ao M, Dong B, Jiang Y, Yu L, Chen Z, et al. Anti-Inflammatory Effects of Curcumin in the Inflammatory Diseases: Status, Limitations and Countermeasures. Drug design, development and therapy. 2021;15:4503-25.

178. Ma Q, Gao X. Categories and biomanufacturing methods of glucosamine. Applied Microbiology and Biotechnology. 2019;103(19):7883-9.

179. Zahedipour F, Dalirfardouei R, Karimi G, Jamialahmadi K. Molecular mechanisms of anticancer effects of Glucosamine. Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie. 2017;95:1051-8.

180. Chen J-K, Shen C-R, Liu C-L. N-Acetylglucosamine: Production and Applications. 2010;8(9):2493-516.

181. Chiu H-W, Li L-H, Hsieh C-Y, Rao YK, Chen F-H, Chen A, et al. Glucosamine inhibits IL-1β expression by preserving mitochondrial integrity and disrupting assembly of the NLRP3 inflammasome. Scientific Reports. 2019;9(1):5603.

182. Roy S, Dhaneshwar S, Mahmood T, Kumar S, Saxena SK. Pre-clinical investigation of protective effect of nutraceutical D-glucosamine on TNBS-induced colitis. Immunopharmacology and immunotoxicology. 2022:1-13.

183. Zhao JM, Chen X, Cheng K, Shi Q, Peng K. Anserine and glucosamine supplementation attenuates the levels of inflammatory markers in rats with rheumatoid arthritis. AMB Express. 2020;10(1):57.

184. Wahab S, Ahmad MP, Hussain A, Qadir SFJCN. Nanomaterials for the delivery of Herbal Bioactive Compounds. 2022;18(4):425-41.

185. George BP, Chandran R, Abrahamse H. Role of Phytochemicals in Cancer Chemoprevention: Insights. 2021;10(9):1455.

186. Pasanphan W, Chirachanchai S. Conjugation of gallic acid onto chitosan: An approach for green and water-based antioxidant. Carbohydrate Polymers. 2008;72(1):169-77.

187. Piegat A, Goszczyńska A, Idzik T, Niemczyk A. The Importance of Reaction Conditions on the Chemical Structure of N,O-Acylated Chitosan Derivatives. Molecules (Basel, Switzerland). 2019;24(17).

188. Pathi S, Jutooru I, Chadalapaka G, Nair V, Lee SO, Safe S. Aspirin inhibits colon cancer cell and tumor growth and downregulates specificity protein (Sp) transcription factors. PLoS One. 2012;7(10):e48208.

189. Akrami H, Aminzadeh S, Fallahi H. Inhibitory effect of ibuprofen on tumor survival and angiogenesis in gastric cancer cell. Tumor Biology. 2015;36(5):3237-43.

190. Yilmaz Ç, Köksoy S, Çeker T, Aslan M. Diclofenac down-regulates COX-2 induced expression of CD44 and ICAM-1 in human HT29 colorectal cancer cells. Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology. 2021;394(11):2259-72.

191. van Meerloo J, Kaspers GJ, Cloos J. Cell sensitivity assays: the MTT assay. Methods Mol Biol. 2011;731:237-45.

192. Plumb JA. Cell sensitivity assays: the MTT assay. Methods Mol Med. 2004;88:165-9.

193. Qian Y, Kumar R, Chug MK, Massoumi H, Brisbois EJ. Therapeutic Delivery of Nitric Oxide Utilizing Saccharide-Based Materials. ACS Applied Materials & Interfaces. 2021;13(44):52250-73.

194. Lundberg JO, Hellstrom PM, Fagerhol MK, Weitzberg E, Roseth AG. Technology insight: calprotectin, lactoferrin and nitric oxide as novel markers of inflammatory bowel disease. Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol. 2005;2(2):96-102.

195. Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids. Anal Biochem. 1982;126(1):131-8.

196. Coeffier M, Marion R, Leplingard A, Lerebours E, Ducrotte P, Dechelotte P. Glutamine decreases interleukin-8 and interleukin-6 but not nitric oxide and prostaglandins e(2) production by human gut in-vitro. Cytokine. 2002;18(2):92-7.

197. Gan SD, Patel KR. Enzyme immunoassay and enzyme-linked immunosorbent assay. J Invest Dermatol. 2013;133(9):e12.

198. Shah K, Maghsoudlou P. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA): the basics. Br J Hosp Med (Lond). 2016;77(7):C98-101.

199. ATCC. American Type Culture Collection HTB-38
Erişim tarihi: 12 12.2022 https://www.atcc.org/products/htb-38.

200. Patel SS, Acharya A, Ray RS, Agrawal R, Raghuwanshi R, Jain P. Cellular and molecular mechanisms of curcumin in prevention and treatment of disease. Crit Rev Food Sci Nutr. 2020;60(6):887-939.

201. Luo Y, Yu X, Zhao P, Huang J, Huang X. Effects of Resveratrol on Tight Junction Proteins and the Notch1 Pathway in an HT-29 Cell Model of Inflammation Induced by Lipopolysaccharide. Inflammation. 2022;45(6):2449-64.

202. Chen Y, Zhang H, Liu R, Mats L, Zhu H, Pauls KP, et al. Antioxidant and anti-inflammatory polyphenols and peptides of common bean (Phaseolus vulga L.) milk and yogurt in Caco-2 and HT-29 cell models. Journal of Functional Foods. 2019;53:125-35.

203. Shin MJ, Lee CS, Kim SH. Screening for lactic acid bacterial strains with potential as probiotics exhibiting anti-inflammatory and antioxidative characteristics in the gut-skin axis. Research Square; 2022.

204. Yahya S, Sudhandiran G. Caffeic acid phenyl ester induces apoptosis in HT29 cells through the modulation of MAPK mediated cellular proliferation and heat shock proteins. Research Square; 2022.

205. Callaghan B, Twigg MS, Baccile N, Van Bogaert INA, Marchant R, Mitchell CA, et al. Microbial sophorolipids inhibit colorectal tumour cell growth in vitro and restore haematocrit in Apcmin+/− mice. Applied Microbiology and Biotechnology. 2022;106(18):6003-16.

206. Hundley TR, Rigas B. Nitric oxide-donating aspirin inhibits colon cancer cell growth via mitogen-activated protein kinase activation. The Journal of pharmacology and experimental therapeutics. 2006;316(1):25-34.

207. Zawidlak-Węgrzyńska B, Kawalec M, Bosek I, Łuczyk-Juzwa M, Adamus G, Rusin A, et al. Synthesis and antiproliferative properties of ibuprofen–oligo(3-hydroxybutyrate) conjugates. European Journal of Medicinal Chemistry. 2010;45(5):1833-42.

208. Cannell GR, Vesey DA, Dickinson RG. Inhibition of proliferation of HT-29 colon adenocarcinoma cells by carboxylate NSAIDs and their acyl glucuronides. Life sciences. 2001;70(1):37-48.

209. Bonaterra GA, Kelber O, Weiser D, Kinscherf R. Mechanisms of the anti-proliferative and anti-inflammatory effects of the herbal fixed combination STW 5 (Iberogast®) on colon adenocarcinoma (HT29) cells in vitro. Phytomedicine : international journal of phytotherapy and phytopharmacology. 2013;20(8-9):691-8.

210. Sayen S, Carlier A, Tarpin M, Guillon E. A novel copper(II) mononuclear complex with the non-steroidal anti-inflammatory drug diclofenac: structural characterization and biological activity. Journal of inorganic biochemistry. 2013;120:39-43.

211. Dinarello CAJC. Anti-inflammatory agents: present and future. 2010;140(6):935-50.

212. Seyedian SS, Nokhostin F, Malamir MD. A review of the diagnosis, prevention, and treatment methods of inflammatory bowel disease. Journal of medicine and life. 2019;12(2):113-22.

213. Gabriele M, Pucci L, Árvay J, Longo V. Anti-inflammatory and antioxidant effect of fermented whole wheat on TNFα-stimulated HT-29 and NF-κB signaling pathway activation. Journal of Functional Foods. 2018;45:392-400.

214. Zhong Y, Qi A, Liu L, Huang Q, Zhang J, Cai K, et al. Shikonin attenuates H₂O₂-induced oxidative injury in HT29 cells via antioxidant activities and the inhibition of mitochondrial pathway-mediated apoptosis. Exp Ther Med. 2021;22(4):1118.

215. Kim C-K, Yu J, Le D, Han S, Yu S, Lee M. Anti-inflammatory activity of caffeic acid derivatives from Ilex rotunda. International Immunopharmacology. 2023;115:109610.

216. Bari MU, Aslam B, Muhammad F, Mohsin M, Hussain A, Anwar MWJPJOAS. Phytochemical analysis and evaluation of ameliorating potential of Ricinus communis leaves extract against aspirin-induced gastric ulcer in rabbits. 2021;58(5):1635-42.

217. Arango-Varela SS, Luzardo-Ocampo I, Maldonado-Celis ME, Campos-Vega R. Andean berry (Vaccinium meridionale Swartz) juice in combination with Aspirin modulated anti-

inflammatory markers on LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages. Food Research International. 2020;137:109541.

218. Budzianowski J, Romaniuk-Drapała A, Kikowska M, Budzianowska A, Thiem B, Lisiak N, et al. Rosmarinic acid 4′-O-β-glucoside – A compound with prospective medicinal and cosmetological applications - its isolation from callus and root cultures of Eryngium species and biological activity. Industrial Crops and Products. 2023;193:116138.

219. Shi J, Shan S, Li H, Song G, Li Z. Anti-inflammatory effects of millet bran derived-bound polyphenols in LPS-induced HT-29 cell via ROS/miR-149/Akt/NF-κB signaling pathway. Oncotarget. 2017;8(43):74582-94.

220. Cicio A, Serio R, Zizzo MG. Anti-Inflammatory Potential of Brassicaceae-Derived Phytochemicals: In Vitro and In Vivo Evidence for a Putative Role in the Prevention and Treatment of IBD. 2023;15(1):31.

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekiller Sayfa No

Şekil 1. GİS'in incelenmesi …….……....5

Şekil 2. EBH'nin patogenezi için kavramsal çerçeve ……..7

Şekil 3. İnflamatuar barsak hastalığının küresel haritası: ……...…….8

Şekil 4. Sağlıklı bireyde, CH'de ve ÜK'de mukozal bariyer …….10

Şekil 5. ÜK ve CH ayırımı ……...…….11

Şekil 6. Kolonoskopi bulguları ……...……..12

Şekil 7. Düzenlenmemiş sitokin aktivasyonundan kaynaklanan immünopatolojinin şematik gösterimi……...14

Şekil 8: JAK/STAT yolu ……...……17

Şekil 9. Sitokinler ve reseptörleri……...18

Şekil 10. Bağırsak mikobiyomunun EBH patogenezindeki potansiyel rolü …….…….23

Şekil 11. Fitokimyasalların sınıflandırılması …….……...24

Şekil 12. Sübstitüe N-glikozbenzamid türevlerinin sentez reaksiyonu …….31

Şekil 13. NO tayininde kullanılacak standartların hazırlanması ……..……..37

Şekil 14. Sandviç ELISA yöntemi …… 38

Şekil 15. Standart çözelti konsantrasyonlarının hazırlanması ……..…….39

Şekil 16. SI1 bileşiğinin yapısı ……...……41

Şekil 17. Sentezlenen SI1 bileşiğinin FTIR spektrumu ……...……..42

Şekil 18. SI1 bileşiğinin ^{1}HNMR spektrumu ……...……..43

Şekil 19. SI1 bileşiğinin kütle spektrumu ……..43

Şekil 20. SI4 bileşiğinin yapısı ……..……44

Şekil 21. Sentezlenen SI4 bileşiğinin FTIR spektrumu …….……44

Şekil 22. SI4 bileşiğinin ^{1}HNMR spektrumu …….……45

Şekil 23. SI4 bileşiğinin kütle spektrumu ……..……46

Şekil 24. SI6 bileşiğinin yapısı ……..……46

Şekil 25. Sentezlenen SI6 bileşiğinin FTIR spektrumu……..… 47

Şekil 26. SI6 bileşiğinin ^{1}HNMR spektrumu ……48

Şekil 27. SI6 bileşiğinin kütle spektrumu……..…… 48

Şekil 28. SI9 bileşiğinin yapısı ……..49

Şekil 29. Sentezlenen SI9 bileşiğinin FTIR spektrumu ……49

Şekil 30. SI9 bileşiğinin ^{1}HNMR spektrumu ……50

Şekil 31. SI9 bileşiğinin kütle spektrumu…….……. 50

Şekil 32. HT-29 hücrelerinin mikroskop görüntüsü ……...……..51

Şekil 33. SI1 bileşiğinin sitotoksik etkisi ……..52

Şekil 34. SI4 bileşiğinin sitotoksik etkisi ……..53

Şekil 35. SI6 bileşiğinin sitotoksik etkisi ……..54

Şekil 36. SI9 bileşiğinin sitotoksik etkisi …….……55

Şekil 37. Kurkuminin hücre viabilitesine etkisi ……...……56

Şekil 38. 48 saatlik H_2O_2 maruziyetinin HT-29 hücre canlılığına etkisi ….…….……57

Şekil 39. Değişen sürelerde serum açlığı ve H_2O_2 uyarımının HT-29 hücrelerindeki NO üretim düzeylerine etkisi …….……..58

Şekil 40. DMSO ve H_2O_2'nin HT-29 hücrelerindeki NO üretim düzeylerine etkisi……..…. 59

Şekil 41. HT-29 hücrelerinde 12 saat serumsuz ortamı takiben yapılan SI1, SI4, SI6, SI9 ve Kurkumin uygulamasının 6. saatinde H_2O_2 tatbiki sonrası NO üretim seviyeleri…...60

Şekil 42. Aspirin uygulamasının HT-29 hücre canlılığına etkisi ……...……61

Şekil 43. İbuprofen uygulamasının HT-29 hücre canlılığına etkisi ……..….62

Şekil 44. Diklofenak uygulamasının HT-29 hücre canlılığına etkisi ……..…62

Şekil 45. HT-29 hücrelerinde 12 saat serumsuz ortamı takiben yapılan SI1, SI4 bileşiklerinin Aspirin ile kombine uygulamasının NO üretim seviyelerine etkisi ……...…63

Şekil 46. HT-29 hücrelerinde 12 saat serumsuz ortamı takiben yapılan SI1, SI4 bileşiklerinin İbuprofen ile kombine uygulamasının NO üretim seviyelerine etkisi ……..…...64

Şekil 47. HT-29 hücrelerinde 12 saat serumsuz ortamı takiben yapılan SI1, SI4 bileşiklerinin Diklofenak ile kombine uygulamasının NO üretim seviyelerine etkisi …….……....65

Şekil 48. Şekil 47. H_2O_2 ile HT-29 hücrelerinde oluşturulmuş deneysel kolit modelinde SI1, SI4 ve Kurkumin uygulaması sonrası TNF-α, IL-6, IL-1β seviyelerinin tespiti…... 66

TABLOLAR LİSTESİ

Tablolar Sayfa No

Tablo 1. ÜK ve CH için bilinen benzer ve farklı özellikler …….…..13

Tablo 2. Deneylerde kullanılan kimyasallar……..……....28

Tablo 3. Deneylerde kullanılan sarf malzemeler ve kitler……..……29

Tablo 4. Bileşiklerin sentezinde kullanılan kimyasalların özelliklerine ilişkin bilgiler…...….30

Tablo 5. Sentezlenen sübstitüe N-glikozbenzamid türevleri……32

Tablo 6. Kitlerin hassasiyet ve ölçüm aralığı değerleri……..40

ÖZGEÇMİŞ