T.C.

TRAKYA ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

İNFLAMATUAR BAĞIRSAK HASTALIĞI TEDAVİSİNDE BİYOMOLEKÜL BAZLI TERAPÖTİK UYGULAMALAR

ELİF ECEM FINDIK

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOTEKNOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

Tez Danışmanı: Dr. Öğr. Üyesi Sevil ERDOĞAN

EDİRNE- 2022

Elif Ecem FINDIK ‘ın hazırladığı “**İNFLAMATUAR BAĞIRSAK HASTALIĞI TEDAVİSİNDE BİYOMOLEKÜL BAZLI TERAPÖTİK UYGULAMALAR**” başlıklı bu tez, tarafımızca okunmuş, kapsam ve niteliği açısından Biyoteknoloji ve Genetik Anabilim Dalında bir **Yüksek Lisans Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri (Ünvan, Ad, Soyad):	İmza
Prof. Dr. Betül TAŞDELEN	……
Dr. Öğr. Üyesi Serap YILMAZ	……
Dr. Öğr. Üyesi Sevil ERDOĞAN	……

Tez Savunma Tarihi: 19/08/2022

Bu tezin Yüksek Lisans tezi olarak gerekli şartları sağladığını onaylarım.

	İmza
Dr. Öğr. Üyesi Sevil ERDOĞAN Tez Danışmanı	……
Prof. Dr. İlker DIBIRDIK İkinci Tez Danışmanı	……

Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü onayı

……

Prof. Dr. Hüseyin Rıza Ferhat KARABULUT

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

T.Ü. FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOTEKNOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

DOĞRULUK BEYANI

Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmasında, tüm verilerin bilimsel ve akademik kurallar çerçevesinde elde edildiğini, kullanılan verilerde tahrifat yapılmadığını, tezin akademik ve etik kurallara uygun olarak yazıldığını, kullanılan tüm literatür bilgilerinin bilimsel normlara uygun bir şekilde kaynak gösterilerek ilgili tezde yer aldığını ve bu tezin tamamı ya da herhangi bir bölümünün daha önceden Trakya Üniversitesi ya da farklı bir üniversitede tez çalışması olarak sunulmadığını beyan ederim.

.... / .... / ....

Elif Ecem FINDIK

Yüksek Lisans Tezi
İnflamatuar Bağırsak Hastalığı Tedavisinde Biyomolekül Bazlı Terapötik Uygulamalar
T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoteknoloji ve Genetik Anabilim Dalı

ÖZET

İnflamatuar bağırsak hastalığı (İBH) dünya nüfusunun çoğunluğunu etkileyen ve kronik inflamasyon sebebiyle insanların yaşam kalitesini oldukça düşüren bir hastalıklar grubudur. Bu nedenle bu hastalığı güvenli ve etkili bir şekilde tedavi edecek ilaçların geliştirilmesi hala önemli bir ihtiyaçtır. Bu çalışmada, benzoik asit türevlerinin bir oligosakkarit monomeri olan glukozamin üniteleri ile modifiye edilerek yeni bileşikler sentezlenmesi ve bu bileşiklerin anti-inflamatuar etkilerinin hidrojen peroksit (H_2O_2) ile indüklenmiş HT-29 (ATCC® HTB-38TM) kolon hücrelerinde in vitro kolit modelinde değerlendirilmesi amaçlandı. Çalışma kapsamında sentezlenen oligosakkarit monomeri ile modifiye bileşikler amidifikasyon yöntemi kullanılarak sentezlendi. Sentezlenen bileşiklerin saflıkları ince tabaka kromatografisi ile kontrol edildi ve yapı tayini Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR), Proton Nükleer Manyetik Rezonans Spektroskopisi (^{1}H-NMR) ve Kütle Spektroskopisi (LC/MS) yöntemleri ile gerçekleştirildi. Sentezlenen bileşiklerin HT-29 insan kolon adenokarsinoma hücrelerine sitotoksik etkileri MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide) kullanılarak belirlendi. Anti-inflamatuar etkileri belirlemek için H_2O_2 ile uyarılan HT-29 hücrelerindeki nitrik oksit (NO), interleukin-6 (IL-6), interleukin-1β (IL-1β) ve tümör nekroz faktörü-α (TNF-α) gibi sitokinlerin üretim düzeyleri ölçülerek bileşiklerin inhibisyon aktiviteleri belirlendi. FTIR, ^{1}H-NMR ve LC/MS analiz sonuçları bileşiklerin başarıyla sentezlendiğini ortaya koydu ve elde edilen yeni bileşiklerin önerilen yapılarla uyumlu olduğunu gösterdi. MTT analiz sonuçları yeni sentezlenen bileşiklerden SI2'nin 10 µM doza kadar, SI5, SI7 ve SI8'in ise 500 µM doza kadar kolon hücreleri üzerinde sitotoksik etki göstermediklerini ortaya koydu. Sentezlenen

bileşiklerden SI2, SI5 ve SI8'in 12 saat serum açlığı ve ardından 6 saat H_2O_2 uygulaması sonrasında kolon hücrelerinde üretilen NO düzeylerini önemli ölçüde baskıladığı görüldü. Bileşiklerden SI5 ve SI8'in etkisi doz bağımlı olarak gözlendi. Elisa analiz sonuçları SI2, SI5 ve SI8 bileşiklerinin H_2O_2 ile uyarılmış HT-29 hücrelerinin TNF-α, IL-6, IL-1β üretimini istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalttığını ortaya koydu. Sonuç olarak, sentezlenen bileşiklerden SI2, SI5 ve SI8, inflamasyon patogenezinde anahtar rol oynayan NO'yu ve pro-inflamatuar sitokinler IL-1β, IL-6 ve TNF-α üretimini baskılayarak anti-inflamatuar etki sergilemişlerdir.

Yıl : 2022

Sayfa Sayısı : 111

Anahtar Kelimeler : İlaç keşfi, inflamasyon, anti-inflamatuar, HT-29 kolon hücresi, H_2O_2, nitrik oksit, IL-1β, IL-6 ve TNF-α

Master Thesis

Biomolecule Based Therapeutic Applications in the Treatment of Inflammatory Bowel Disease

Trakya University Institute of Natural Sciences

Department of Biotechnology and Genetics

ABSTRACT

Inflammatory bowel disease (IBD) is a group of diseases that affects the majority of the world's population and reduces the quality of life of people due to chronic inflammation. Therefore, there is still a need to develop drugs to treat this disease safely and effectively. In this study, it was aimed to synthesize new compounds by modifying benzoic acid derivatives with glucosamine, an oligosaccharide monomer, and to evaluate the anti-inflammatory effects of these compounds in an in vitro colitis model in HT-29 (ATCC® HTB-38TM) colon cells induced by hydrogen peroxide (H_2O_2). Compounds modified with oligosaccharide monomer were synthesized using amidification method. The purity of the synthesized compounds was checked by thin layer chromatography and structure identification was performed by Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR), Proton Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy (1H-NMR), and Mass Spectroscopy (LC/MS). The cytotoxic effects of the synthesized compounds on HT-29 human colon adenocarcinoma cells were determined using MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide). In order to determine the anti-inflammatory effects, the inhibition activities of the compounds were determined by measuring the nitric oxide (NO), interleukin-6 (IL-6), interleukin-1β (IL-1β), and tumor necrosis factor-α (TNF-α) levels that are produced by the HT-29 cells inducted by H_2O_2. FTIR, 1H-NMR and LC/MS analysis results revealed that the compounds were synthesized successfully and showed that the new compounds obtained were compatible with the proposed structures. MTT analysis results revealed that SI2 of newly synthesized compounds did not show cytotoxic effects on the HT-29 colon cells up to 10 μM doses,

and SI5, SI7, and SI8 up to 500 μM doses. It was observed that the synthesized compounds SI2, SI5, and SI8 significantly suppressed the NO levels produced in the colon cells after 12 hours of serum starvation and then 6 hours of H_2O_2 administration. The effect of compounds SI5 and SI8 was observed as dose dependent. Elisa analysis results revealed that SI2, SI5, and SI8 compounds statistically significantly reduced the production of TNF-α, IL-6, and IL-1β in HT-29 cells stimulated with H_2O_2. As a result, the synthesized compounds SI2, SI5, and SI8 exhibited anti-inflammatory effects by suppressing NO, which plays a key role in the pathogenesis of inflammation, and the production of proinflammatory cytokines IL-1β, IL-6, and TNF-α.

Year : 2022

Number of Pages : 111

Keywords : Drug discovery, inflammation, anti-inflammatory, HT-29 colon cell, H_2O_2, nitric oxide, IL-1β, IL-6 and TNF-α

TEŞEKKÜR

Beni bu çalışmada eğiten, yönlendiren, çalışmamı yürüten danışman hocalarım Sayın Dr. Öğr. Üyesi Sevil ERDOĞAN'a ve Sayın Prof. Dr. İlker DIBIRDIK'a, ayrıca bu tez çalışması sürecinde bilgilerini asla esirgemeyen, sonsuz desteğinden dolayı Sayın Dr. Öğr. Üyesi Serap YILMAZ'a çok teşekkür ederim.

Ayrıca iki yıllık yüksek lisans eğitimimde dersime giren girmeyen tüm Biyoteknoloji ve Genetik Anabilim Dalındaki hocalarıma ve anabilim dalı başkanımız Sayın Prof. Dr. Zeynep ERDOĞAN, Makine Mühendisliği Anabilim Dalında dersini alma fırsatı bulduğum Sayın Dr. Öğr. Üyesi Ertuğrul Selçuk ERDOĞAN'a teşekkürü bir borç bilirim.

Tez yazımı süresince hem bilgisinden hem manevi desteğinden dolayı Öğretmen Ahmet TİTİZ'e, deneylerimde bilgisini esirgemeyen arkadaşım Bayram Oğuz ÖZER'e ve Arş. Gör. Tuğçe KARABAŞ' a teşekkür ederim.

Son olarak beni bu aşamalara kadar getiren, eğitim hayatım boyunca manevi ve maddi desteklerinin yanında bilgileriyle de yanımda olan aileme, bu çalışmamda yardımlarını esirgemeyen annem Nurdan FINDIK'a, babam Nail FINDIK'a ve sevgili ağabeyim Burak FINDIK'a ayrıca teşekkür ederim.

Bu tez çalışması TÜBAP 2021/59 numaralı "İnflamatuar Bağırsak Hastalığı Tedavisinde Biyomolekül Bazlı Terapötik Uygulamalar" başlıklı proje kapsamında finansal olarak desteklenmiştir.

Elif Ecem FINDIK

2022

İÇİNDEKİLER

ÖZET iv
ABSTRACT vi
TEŞEKKÜR viii
İÇİNDEKİLER ix
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ xii
ŞEKİLLER DİZİNİ xiv
ÇİZELGELER DİZİNİ xvi
BÖLÜM 1 1
1. GİRİŞ 1
1.1. Amaçlar: 5
BÖLÜM 2 6
2. GENEL BİLGİLER 6
2.1. Bağırsak İnflamasyonu 6
2.2. Bağırsak İnflamasyonunun Moleküler Yolakları 7
2.3. Tedavi Yöntemleri ve Yolaklarla İlişkileri 9
2.4. İn vitro İnflamasyon Modelleri 11
2.4.1. Bağırsak İltihabının Modellenmesinde Kullanılan İn vitro Hücre Kültürü Modelleri 11
2.4.2. Caco-2 Hücre Hattı 11
2.4.3. HT-29 Hücre Hattı 12
2.4.4. T84 İnsan Kolon Adenokarsinom Hücre Hattı 14
2.4.4. Lipopolisakkarit (LPS) Modeli 15
2.4.5. Hidrojen Peroksit Modeli 17
2.5. İn vivo İnflamasyon Modelleri 18
2.6. Nitrik Oksit (NO) 18
2.7. Modifiye Sakkaritler ve Farmasötik Kullanımları 21
2.8. Sakkaritlerin Farmasötik Kullanımına İlişkin Literatür Taraması 28
2.9. Glukozamin 31
2.10. Hidroksibenzoik Asitler 32
BÖLÜM 3 34

3. MATERYAL VE METOT 34
3.1. Kimyasallar 34
3.2. Oligosakkarit Monomer Üniteleri ile Modifiye Edilmiş Benzoik Asit Türevlerinin Sentezi 36
3.3. Sentezlenen Bileşiklerin Yapı Tayini 37
3.3.1. Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR) 37
3.3.2. Proton Nükleer Manyetik Rezonans Spektroskopisi (^{1}H-NMR) 37
3.3.3. Kütle Spektroskopisi (LC/MS) 38
3.3.4. İnce Tabaka Kromatografisi 38
3.4. Sentezlenen Oligosakkarit Monomer Üniteleri ile Modifiye Bileşiklerin Fonksiyonelite Testleri 38
3.4.1. Hücre Kültürü 38
3.4.1.1. Hücrelerin Çözdürülmesi 39
3.4.1.2. Hücrelerin Pasajlanması 40
3.4.1.3. Hücrelerin Dondurulması 43
3.4.1.4. Hücre Sayımı 43
3.4.2. Hücre Canlılığı Testi (MTT testi) 44
3.4.3. Nitrik Oksit (NO) Tarama Testi 45
3.4.4. HT-29 İnsan Kolon Hücrelerinde H_2O_2 ile İn vitro Deneysel Kolit Modeli Oluşturulması ve TNF-α, IL-6 ve IL-1β Üretiminin Belirlenmesi 47
3.5. İstatistiksel Analiz 49
BÖLÜM 4 49
4. SONUÇLAR 50
4.1. Sentezlenen Oligosakkarit Monomer Üniteleri ile Modifiye Bileşiklerin Yapı Tayini 50
4.1.1. FTIR Analiz Sonuçları 50
4.1.2. ^{1}H-NMR Analiz Sonuçları 52
4.1.3. LC/MS Analiz Sonuçları 56
4.2. Sentezlenen Oligosakkarit Monomer Üniteleri ile Modifiye Bileşiklerin Fonksiyonelite Test Sonuçları 58
4.2.1. MTT Testi Sonuçları 59
4.2.2. NO Tarama Testi Sonuçları 67
4.2.3. H_2O_2 ile Deneysel Kolit Oluşturulmuş HT-29 İnsan Kolon Hücre Modelinde TNF-α, IL-6 ve IL-1β Üretim Sonuçları 70
BÖLÜM 5 73
5. SONUÇ VE ÖNERİLER 73
KAYNAKLAR 81

ÖZGEÇMİŞ 94

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

BSA	Sığır Serum Albümini
CH	Crohn Hastalığı
CH_3COOH	Asetik asit
DMSO-d6	Hexadeuterodimethyl sulfoxide
DNA	Deoksiribonükleik asit
EDTA	Etilendiamin Tetra Asetik Asit
FBS	Fetal Sığır Serumu
FTIR	Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopi
^{1}H-NMR	Proton Nükleer Manyetik Rezonans Spektroskopisi
H_2O_2	Hidrojen peroksit
İBH	İnflamatuar Bağırsak Hastalığı
İL-1β	İnterlökin 1-β
İL-6	İnterlökin 6 (altı)
iNOS	İndüklenebilir nitrik oksit sentaz
JAK	JanusKinaz
JAK1	JanusKinaz 1 (bir)
JAK2	JanusKinaz 2 (iki)
JAK3	JanusKinaz 3 (üç)
LC/MS	Sıvı Kromatografi Kütle spektroskopisi
LPS	Lipopolisakkarit
Lt	Litre
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
Mw	Moleküler ağırlık
mL	Mililitre
mM	Milimolar
mm	Mili metre
µL	Mikrolitre
µM	Mikromolar
µm	Mikro metre
µg/mL	Mikrogram/mililitre

NF-κB	Nükleer faktör kappa B
NO	Nitrik Oksit
PBS	Tuz Fosfat Tamponu
ROS	Reaktif Oksijen Türleri
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
STAT	Sinyal dönüştürücü ve transkripsiyon aktivatörü
TH	Yardımcı T hücresi
TNBS	Trinitrobenzenosülfonik Asit
TNF-α	Tümör Nekroz Faktör α (alfa)
TYK2	TirozinKinaz 2 (iki)
ÜK	Ülseratif Kolit
cm^{-1}	1/santimetre (frekans)
rpm	Dakikadaki devir sayısı
°C	Santigrat derece
%	Yüzde
%T	Yüzde geçirgenlik
S	Saniye
dk.	Dakika

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. JAK/STAT sinyal yolunun sitokinlerle aktive edilmesi 8
Şekil 2.2. İnflamatuar bağırsak hastalığında JAK/STAT sinyal yollarının şematik gösterimi 9
Şekil 2.3. Nitrik oksit sentazın inhibisyonu, inflamatuar bağırsak hastalığını baskılar.. 20
Şekil 2.4. Aşılanabilir polisakaritin hazırlanışını gösteren şema. 24
Şekil 2.5. Polisakkarit bazlı ilaç taşıyıcı sistemler 26
Şekil 3.1. Oligosakkarit monomeri olan glukozaminin çeşitli benzoik asitlerle amidifikasyon reaksiyonu 37
Şekil 3.2. HT-29 insan kolon adenokarsinoma hücrelerinin mikroskop görüntüsü 40
Şekil 3.3. HT-29 hücre kültürünün pasajlanma aşamaları 42
Şekil 3.4. HT-29 Hücre hattı için Thoma lamında sayım örneği 44
Şekil 3.5. Eliza standartlarını seyreltme oranları 48
Şekil 4.1. Sentezlenen SI2 bileşiğinin IR spektrumu 51
Şekil 4.2. Sentezlenen SI5 bileşiğinin IR spektrumu 51
Şekil 4.3. Sentezlenen SI7 bileşiğinin IR spektrumu 52
Şekil 4.4. Sentezlenen SI8 bileşiğinin IR spektrumu 52
Şekil 4.5. Sentezlenen SI2 bileşiğinin ^{1}H-NMR spektrumu 53
Şekil 4.6. Sentezlenen SI5 bileşiğinin ^{1}H-NMR spektrumu 54
Şekil 4.7. Sentezlenen SI7 bileşiğinin ^{1}H-NMR spektrumu 55
Şekil 4.8. Sentezlenen SI8 bileşiğinin ^{1}H-NMR spektrumu 56
Şekil 4.9. Sentezlenen SI2 bileşiğinin kütle spektrumu 57
Şekil 4.10. Sentezlenen SI5 bileşiğinin kütle spektrumu 57
Şekil 4.11. Sentezlenen SI7 bileşiğinin kütle spektrumu 58
Şekil 4.12. Sentezlenen SI8 bileşiğinin kütle spektrumu 58
Şekil 4.13. SI2 bileşiğinin 10 ve 50 µM dozlarına 24, 48 ve 72 saat süreyle maruz kalan HT-29 hücrelerinin canlığındaki değişimi gösteren MTT grafiği 62
Şekil 4.14. SI5 bileşiğinin artan dozlarına 24, 48 ve 72 saat süreyle maruz kalan HT-29 hücrelerinin canlığındaki değişimi gösteren MTT grafiği 63
Şekil 4.15. SI7 bileşiğinin artan dozlarına 24, 48 ve 72 saat süreyle maruz kalan HT-29 hücrelerinin canlığındaki değişimi gösteren MTT grafiği 64

Şekil 4.16. SI8 bileşiğinin artan dozlarına 24, 48 ve 72 saat süreyle maruz kalan HT-29 hücrelerinin canlığındaki değişimi gösteren MTT grafiği 65
Şekil 4.17. Kurkuminin artan dozlarına 24, 48 ve 72 saat süreyle maruz kalan HT-29 hücrelerinin canlığındaki değişimi gösteren MTT grafiği. 66
Şekil 4.18. Sentezlenen bileşiklerin 12 saat serum açlığı ve 6 saat H_2O_2 (800 μM) uyarımından sonra HT-29 hücrelerinin NO üretim seviyeleri üzerine etkisi.....69
Şekil 4.19. Kurkumin ve SI2, SI5 ve SI8 bileşiklerinin HT-29 hücrelerinin 12 saat serum açlığı ve 6 saat H_2O_2 uyarımından sonra IL-1β, IL-6 ve TNF-α üretimi üzerine etkisi .72

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizege 3.1. Deneylerde kullanılan kimyasalların özelliklerine ilişkin bilgiler.....34

BÖLÜM 1

1. GİRİŞ

Gastrointestinal (GI) sistemin kronik veya tekrarlayan inflamasyonu ile karakterize edilen inflamatuar bağırsak hastalığı (İBH), Crohn hastalığı (CH) ve ülseratif kolit (ÜK) olmak üzere 2 ana patolojik durumu içermektedir (Creff, Malaquin ve Besson, 2021). Ülseratif kolit, sadece kolonun mukozal tabakasını etkileyen ve rektal kanamaya yol açabilen kronik inflamasyon ile karakterize iken, Chron hastalığı sindirim kanalının ağızdan anüse kadar herhangi bir alanında görülen inflamasyon ile karakterizedir (Kamalian vd., 2020; Cordes, Foell, Ding, Varga ve Bettenworth, 2020). İBH, her iki cinsiyette de yaşamın erken dönemlerinde ortaya çıkan ve yaşam boyu süren bir hastalık olmasının yanısıra bağırsak mukozasının iltihabı, karın ağrısı, ishal, kanlı dışkı, kilo kaybı gibi hastaların yaşam kalitesini düşüren karakteristik özelliklere sahiptir (Guan ve Zhang, 2017). Ciddi komplikasyonlara yol açabilen kontrolsüz hastalık aktivitesi riski taşımaktadır (Cordes vd., 2020). İBH, inflamatuar sitokinlerin üretiminde artış, bağırsak epitel hücrelerinde apoptoz ve bağırsak epitel yapısını bozan immün hücre infiltrasyonu gibi patolojilere yol açmaktadır (Altınel vd., 2020). İBH'ın patojenezinde genetik faktörler, çevresel faktörler, enfektif ve immünolojik faktörler gibi çok çeşitli faktörlerin rol oynadığı bilinmekle birlikte tam nedeni henüz anlaşılamamıştır (Avdagić vd., 2013; Yamamoto-Furusho, 2018). Genetik yatkınlığa sahip bireylerde, mikrobiyal, immünolojik ve çevresel uyaranlara karşı kontrolsüz bir immün yanıttan kaynaklandığı düşünülmektedir (Creff vd., 2021). İBH, halihazırda dünya çapında 6.8 milyondan fazla insanı etkilemektedir ve bu sayının sürekli artması nedeniyle dünya çapında ciddi bir mali yük oluşturan önemli bir halk sağlığı sorununa dönüşmüştür (Collaborators GBDIBD, 2020; Jairath ve Feagan, 2020). Bunun yanısıra, bağırsaklarındaki kronik iltihaptan dolayı

İBH hastalarında kolorektal kanser gelişme olasılığı diğer bireylere oranla 2 ila 6 kat daha yüksektir (Creff vd., 2021).

İBH tedavisinde bugüne kadar çok çeşitli yaklaşımlar denenmiştir. İBH tedavisine yönelik şu anki stratejiler, doğal veya sentetik anti-inflamatuar, immünsupresif ve immün modüle edici moleküllerin kullanılması esasına dayanmaktadır (Creff vd., 2021). Bunlar arasında, bağırsaklarda tahrişi en aza indirmeyi amaçlayan aminosalisilat türevi ilaçlar, steroid olmayan anti-inflamatuar ilaçlar (NSAID), iltihaplanmaya neden olan sinyalleri kesmeyi amaçlayan küçük moleküllü biyolojik ajanlar, bağırsak aktivitesini yavaşlatmayı amaçlayan immünomodülatörler ve probiyotikler gibi gıda takviyeleri çeşitli tedavi araçları olarak yer almaktadır (Pérez-Jeldres vd., 2019). Bunların yanında, İBH'ın hem kronik hem de tekrarlayan fazlarında önemli bir rol oynayan sitokinleri hedef alan tedavi yaklaşımları (Moon, Kim, Yoo, Lee ve Hwangbo, 2021a) ve janus kinaz ve tirosin kinaz inhibitörleri, anti-interleukin antikorları, anti-trafick terapilerinin geliştirilmesi gibi yeni stratejiler de bulunmaktadır (Cohen ve Rubin, 2021). Bununla birlikte, bu terapötik ajanlara karşı gelişen yanıt kaybı nedeniyle mevcut tedavilerin başarısı hala oldukça düşüktür ve mevcut ilaçlar ciddi yan etkilere ve immünojenisiteye yol açmaktadır (Cordes vd., 2020; Niu vd., 2021). Bu nedenle, inflamatuar bağırsak hastalığını güvenli ve etkili bir şekilde tedavi edecek ilaçların geliştirilmesi hala bir ihtiyaçtır.

Anormal bağışıklık tepkisi sergileyen İBH'ın patojenezinde çok sayıda sitokin patolojik süreçlerin anahtar aracıları olarak bağırsak iltihabının sürdürülmesinde kritik rol oynamaktadır (Yamamoto-Furusho, 2018; Moon vd., 2021a). İBH hastalarının plazmasında pro-inflamatuar sitokinlerin (TNF-α, IL-6, IL-17, IL-12 ve IFN-γ) miktarında artış gözlenmektedir (Soufli, Toumi, Rafa ve Touil-Boukoffa, 2016). Mazloom, Edalatmanesh ve Hosseini (2019), tümör nekroz faktör-α (TNF-α), interlökin-1β (IL-1β) ve interlökin-6 (IL-6) gibi inflamatuar sitokinlerin artmasının vücutta sistemik veya lokal bir inflamasyona işaret ettiğini belirtmektedir. Bu nedenle, inflamatuar bağırsak hastalıklarını karakterize eden sitokinler inflamasyonun başlamasını, gelişimini ve nihayetinde çözülmesini yöneten anahtar unsurlar olarak kabul edilmektedir (Strober ve Fuss, 2011). İBH'da görev alan sitokinlerin çoğu, Janus kinaz-sinyal dönüştürücüleri ve transkripsiyon (JAK/STAT) yolaklarını aktive ederek kronik inflamatuar yanıtların oluşturulmasında önemli rol oynamaktadırlar (Moon vd., 2021a). İnflamatuar sitokinler reseptörlerine bağlandığında o reseptörle ilişkili olan Janus kinaz enzimleri aktive olurlar

ve spesifik reseptör tirozin kalıntılarının ve STAT'ların fosforilasyonuna neden olurlar. Böylece aktive olmuş STAT'lar, dimerize olur, çekirdeğe hareket ederek sitokine duyarlı genlerin expresyonunu arttırırlar. Bechman vd. (2019), JAK/STAT yolunun, 50'den fazla sitokin ve büyüme faktörünün hücre içi sinyalleşmesine aracılık ettiğini ve bağışıklık sistemi için merkezi bir iletişim düğümü olarak kabul edildiğini belirtmiştir. Bu nedenle, JAK'ların inhibisyonu ile JAK/STAT yollarının hedeflenmesi ve sitokin sinyallemesinin düzenlenmesi İBH hastalığının tedavisi için yeni bir strateji olarak ilgi çekmektedir (Pérez-Jeldres vd., 2019; Cordes vd., 2020; Moon vd., 2021a).

İBH'ın gelişmesine yol açan faktörler inflamatuar sitokinlerin yanısıra nitrik oksit (NO) salımını da arttırmaktadır. Serbest radikal haberci molekül olan NO, birçok hücrede hem hücre içi hem de hücre dışı düzenleyici fonksiyonlara sahiptir (Cross ve Wilson, 2003). İBH'lı hastaların değişen inflamatuar mukozasında NO konsantrasyonlarında bir artış ve kolon ve bağırsak dokularında yukarı regüle olan indüklenebilir nitrik oksit sentaz'ın (iNOS) aşırı ekspresyonu rapor edilmiştir (Avdagić vd., 2013). Bu da, iNOS enzimi tarafından sentezlenen NO'nun mukozal inflamasyonun önemli bir aracısı olduğunu ve özellikle ülseratif kolitte, İBH'da inflamasyonun önemli belirteçleri olduğunu göstermektedir (Cross ve Wilson, 2003; Kamalian vd., 2020). Önceki çalışmalarda NO'nun aşırı üretiminin gastrointestinal inflamasyonu şiddetlendirdiği ve akut ve kronik inflamasyonlarla ilişkili doku hasarını indüklediği rapor edilmiştir (Joo vd., 2014). NO üretimi ve iNOS ifadesinin bazı polifenoller ve flavonoidler tarafından nükleer faktör κB (NF-κB) ve JAK/STAT sinyal yolları aracılığıyla belirgin şekilde azaltılabildiği bildirilmektedir (Kamalian vd., 2020).

Son yıllarda İBH'yı tedavi edecek güvenli ve etkili tedaviler geliştirebilmek için üzerinde durulan alternatif tedaviler özgün fitokimyasalların ve doğal polisakkaritlerin kullanımını içermektedir. Bitkilerin ürettiği alkaloid, flavonoid ve fenolik yapıdaki sekonder metabolitlerin anti-inflamatuar özelliklere sahip oldukları kanıtlanmış olup, bu fitokimyasal bileşiklerin kronik İBH tedavisindeki etkinlikleri çeşitli in vivo ve in vitro modellerle araştırılmaktadır (Yeshi vd., 2020). Moon vd. (2021a), anti-inflamatuar özelliğe sahip fitokimyasalların, inflamatuar sitokinlerin üretimini modüle ederek İBH hastalığını iyileştirici etki gösterdiklerini rapor etmiştir. Yazarlar, anti-inflamatuar fitokimyasalların JAK/STAT yolunun aktivasyonunu engellediğini ve yan etkilerinin çok daha az olduğunu, bu nedenle fitokimyasalların İBH tedavisi için çoklu pro-inflamatuar

sitokin sinyal yolaklarını önleyen JAK ve STAT inhibitörlerinin geliştirilmesinde yeni ilaçlar olarak büyük bir potansiyele sahip olabileceklerini öne sürmüşlerdir. Bu nedenle bu çalışmada bitkisel kökenli kimyasal bileşikler olan benzoik asit türevleri modifiye edilerek İBH hastalığının tedavisine yönelik anti-inflamatuar özellikli bileşikler geliştirmeye yönelik çaba gösterilmiştir.

Niu vd. (2021) polisakaritlerin, bağışıklık hücrelerinin seviyelerini düzenleme, sinyal yolu transdüksiyonuna müdahale, inflamatuar sitokinlerin salgılanması ve bağırsak florasının bolluğunu düzenleme ve bağırsak mukozasının bağışıklık bariyerini koruma gibi mekanizmalarla ülseratif koliti hafifletebildiklerini rapor etmişlerdir. Yazarlar, güvenli, etkinliği yüksek ve yan etkileri az olan polisakaritlerin İBH tedavisinde tek başına ya da diğer ilaçlarla birlikte potansiyel ilaç olarak kullanılabileceğine dikkat çekmişlerdir. Doğal bir amino şeker olan glukozamin monosakkarit yapıda bir bileşik olup, vücutta doğal olarak glukozdan sentezlenebilmekte, proteoglikanların ve glikozaminoglikanların biyosentezinde kullanılmaktadır (Lim, Monira, Flavia, Cicuttini, ve Wang, 2019). Glukozamin, ayrıca potansiyel bir anti-inflamatuar ajan olarak kabul edilmektedir (Wu vd., 2010). Glukozamin gıda takviyesi olarak bağırsak sağlığının iyileştirilmesi için ve kondroitin sülfatla birlikte osteoartrit tedavisinde hiçbir yan etkiye yol açmaksızın başarılı bir şekilde kullanılmaktadır (Al-Saadi, Pang, Ima-Nirwana ve Chin, 2019). Aghazadeh-Habashi, Kohan, Asghar ve Jamali (2014), sıçanlarda 6 günlük glukozamin takviyesinin pro-inflamatuar sitokinler olan IL-1, IL-6 ve TNF düzeylerini azalttığını gözlemlemiştir. Ayrıca, glukozamin sülfat tedavisinin, IL-1β ile uyarılan NO üretimini ortadan kaldırabildiği ve glukozaminin, kondrositlerde süperoksitdismutaz (SOD), katalaz ve glutatyon peroksidaz gibi çeşitli anti-oksidan enzimleri yukarı regüle ettiği rapor edilmiştir (Al saadi vd., 2019). Moon vd. (2021b), ise glukozamin uygulamasının hayvan ve insan modellerinde, inflamatuar bağırsak hastalığını iyileştirici etki gösterdiğini belirtmiştir. Glukozaminin hem anti-inflamatuar ve anti-oksidant etkilerinin olması hem de herhangi bir yan etki oluşturmaması onu inflamatuar bağırsak hastalığı gibi inflamatuar hastalıkların tedavisi için ilgi çekici bir terapötik ajan yapmaktadır.

Bu çalışmada, İBH hastalığının tedavisi için anti-inflamatuar özellikte bileşikler sentezlenerek, bu bileşiklerin HT-29 hücrelerinde H_2O_2 ile indüklenen oksidatif stres

modelinde anti-inflamatuar etkilerinin değerlendirilmesi ve biyoaktivite gösteren bileşiklerin karakterizasyonunun yapılması amaçlanmıştır.

1.1. Amaçlar:

1. Bu çalışmayla, dünya nüfusunun büyük bir çoğunluğunu etkileyen ve yaşam kalitesini düşüren inflamatuar bağırsak hastalığının tedavisi için bir oligosakkarit monomeri olan glukozamin üniteleri ile modifiye benzoik asit bileşiklerinin sentezlenmesi,

2. Sentezlenen bileşiklerin inflamatuar bağırsak hastalığı üzerindeki anti-inflamatuar etkilerinin HT-29 kolon adenokarsinom hücre modelinde in vitro olarak incelenmesi,

3. Biyolojik etkinliği tespit edilen bileşiklerin yapısal karakterizasyonunun FTIR, ^{1}H-NMR ve LC/MS analizleriyle belirlenmesi,

4. İnflamasyonun önlenmesinde aktif olarak rol alan bileşiklerin işlevsel olduğu hücresel sinyal yolaklarının incelenmesine yönelik çalışmalar için ön bilgi sağlanması,

5. Böylece, inflamatuar bağırsak hastalığının tedavisi için ilaç adayı olabilme özelliği in vitro olarak incelenmiş fonksiyonel bir kimyasal yapı geliştirilmesi amaçlanmaktadır.

BÖLÜM 2

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Bağırsak İnflamasyonu

Bağırsak epiteli, fiziksel bir bariyer gibi davranmasının yanı sıra, konak savunma sisteminde de önemli bir rol oynar. Lamina propriada bulunan bağışıklık hücreleri, bağırsağı insan vücudunun ana bağışıklık organı yapar. Lamina propriada bulunan makrofajlar ve dendritik hücreler lümen antijenlerini algılamakla görevliyken, düzenleyici T lenfositleri (Treg) mikrobiyota veya diyet antijenlerine karşı anormal bağışıklık tepkisini baskılayarak dengeyi korumakla görevlidir (Geremia, Biancheri, Allan, Corazza ve Di Sabatino, 2014). Sağlıklı koşullarda dengeli olan bağırsak bariyerinin dengesi akut ve kronik süreçler tarafından bozulabilir. Bağırsak sağlığının korunmasında önemli bir rol oynayan bağırsak mikrobiyotasındaki bir bozulmanın enfeksiyon gelişimine yol açarak bağırsak bağışıklık sisteminin tepkisini ve İBH gelişimini tetiklediği ve epitel bariyer fonksiyonunu değiştirebildiği rapor edilmektedir (Ramos ve Papadakis, 2019). Bu etkilerden biri patojenik mikroorganizmaların (*Salmonella spp., Escherichia spp., Clostridium spp.* veya *Giardia spp.* vs.) sebep olduğu bağırsak enfeksiyonları sırasında, konakçı hücrelerin sıkı bağlantılarında dengesizliğe yol açmalarıdır (Shawki ve McCole, 2017). Sıkı bağlantılardaki değişikliklerin ise özellikle İBH'da bağırsak epitelinin geçirgenliğini değiştirmesinden dolayı, bağışıklık hücreleri tarafından üretilen pro-inflamatuar ve anti-inflamatuar sitokinler arasındaki dengesizliğin bir sonucu olarak inflamatuar süreci şiddetlendirdiği ileri sürülmektedir (De León-Rodríguez, Guyot ve Laurent-Babot, 2019). Ayrıca, yazarlar TNF-α, INF-γ, IL-1β ve IL-13 gibi sitokinlerin de bağırsak epitelyal bariyer disfonksiyonunu indüklediğini öne sürmektedirler. Böylece, bağışıklıkta önemli rol oynayan bağırsak epitelinin bağırsaktaki mikrobiyotanın bozulmasına bağlı olarak değişen bağışıklık tepkisi, bağırsak bariyer

fonksiyonunun bozulmasına ve bağırsak iltihabına yol açarak inflamatuar bağırsak hastalığının patofizyolojisinde çok önemli bir rol oynar.

İnflamasyon, patojenler, hasarlı hücreler ve toksik bileşikler dahil olmak üzere çeşitli faktörler tarafından tetiklenebilen bağışıklık sisteminin biyolojik bir tepkisidir (Chen vd., 2018). İBH, gastrointestinal sistem inflamasyonu ile karakterize kronik bir hastalıktır. İBH'daki kronik inflamasyon doğal ve adaptif bağışıklık sistemlerinin anormal inflamatuar yanıtları tarafından tetiklenmektedir.

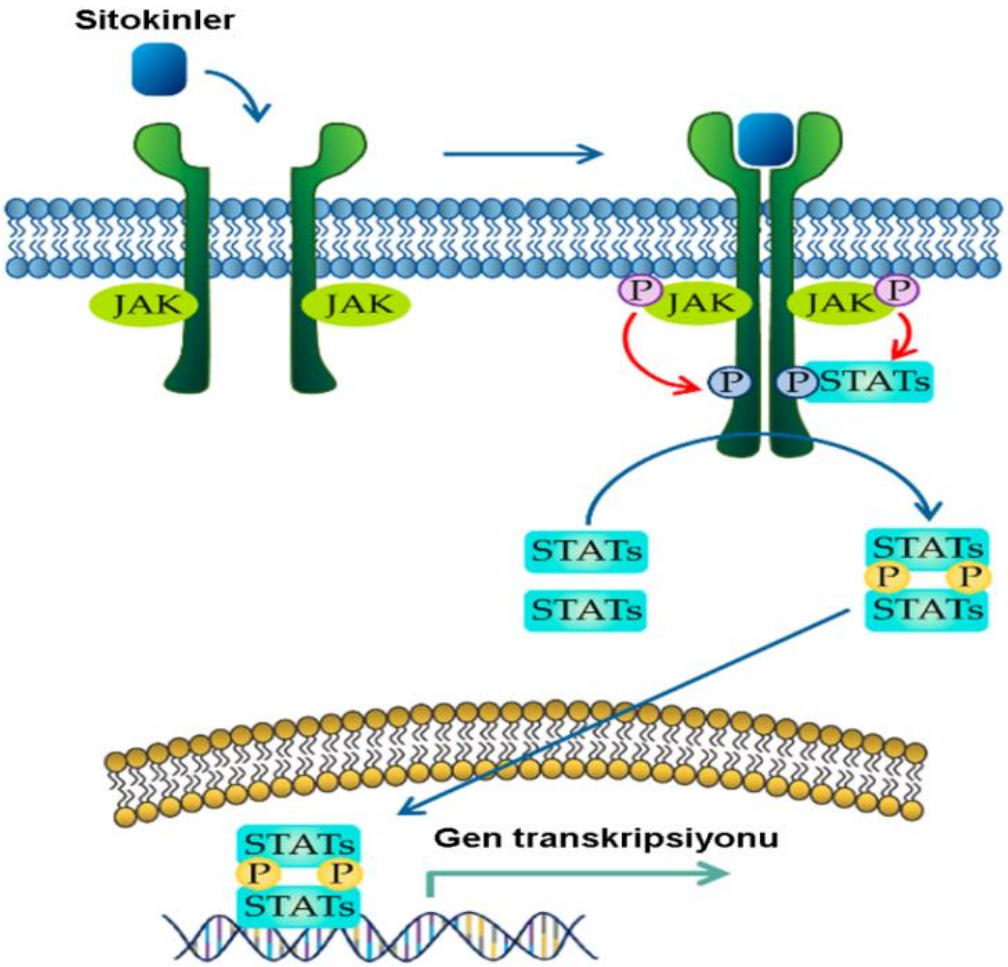
İBH'da, T hücreleri tarafından üretilen sitokinlerin çoğu JAK reseptörleri aracılığıyla sinyal verdiğinden, JAK proteinleri bağırsak inflamasyonunun sinyallenmesinde anahtar role sahiptir (Bechman, Yates, ve Galloway, 2019). İBH patogenezindeki anahtar sitokinler (IL-6, IL-5, IL-9, IL-10, IL-13, IL-12/23, IL-22, granülosit –makrofaj koloni uyarıcı faktör (GM-CSF), IFN-g) Tip I ve Tip II sitokin reseptörlerine ait olup bu sitokinlerin tümü JAK/STAT yolu aracılığıyla sinyal vermektedir (Pérez-Jeldres vd., 2019).

2.2. Bağırsak İnflamasyonunun Moleküler Yolakları

Bağırsak inflamasyonunun moleküler mekanizmasında yer alan JAK'lar, tirozin kinaz enzimleri ailesinden olup içinde bulundukları proteinin işlevini değiştirerek tirozin kalıntılarını fosforile etme yetenekleriyle tanınırlar (Bechman vd., 2019). Janus kinaz enzimleri JAK1, JAK2, JAK3 ve tirozin kinaz 2 (TYK2) olarak dört üyeden oluşur. JAK'lar hücre yüzeyi reseptörlerine ulaşan hücre dışı sinyalleri alarak çekirdeğe taşıyabilirler. JAK/STAT aktivatörleri, düzinelerce sitokine ve büyüme faktörüne verilen hücresel tepkilere aracılık ederek, hematopoez, bağışıklık hücresi gelişimi, kök hücre bakımı, organizma büyümesi ve meme bezi gelişimi dahil birçok önemli süreçte görev alırlar (Harrison, 2012). Bağışıklık sisteminin önemli merkezi iletişim kavşağı kabul edilen JAK/STAT 50' den fazla sitokin ve büyüme faktörünün aşağı akışını düzenlemektedir (Bechman vd., 2019). JAK/STAT sinyal yolağı, metazoanlardaki sinyal yollarının en basitlerinden biri olup evrimsel süreçte korunmuştur (Bousoik ve Montazeri Aliabadi, 2018).

JAK/STAT sinyal yolu sitokinlerin reseptörlere bağlanmasıyla aktive edilir. Hücre dışına bir ligandın bağlanması, reseptörlerde değişikliğe yol açarak, bu

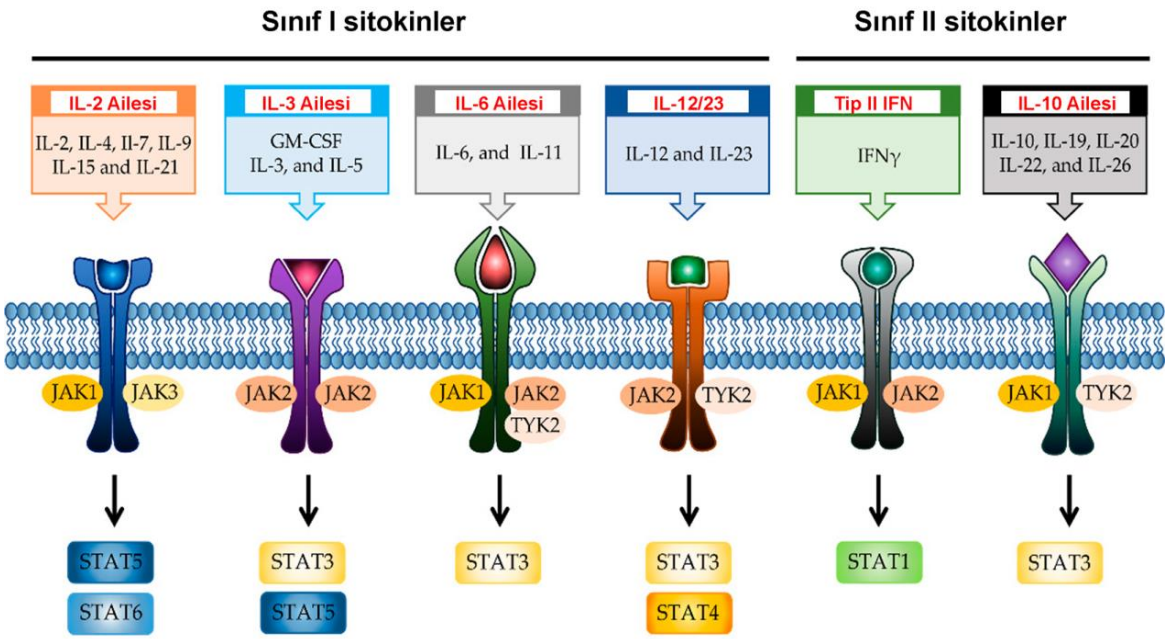
reseptörlerle bağlantılı hücre içi JAK'ların birbirini fosforile etmesine neden olur. JAK proteinleri ve onların reseptörlerinin fosforilasyonu ile birlikte STAT proteinleri aktive edilir. Böylece JAK/STAT sinyal yolu aktive olur. Bir araya gelen STAT'lar fosforile edilir ve homodimer veya heterodimerler oluşturarak çekirdeğe girerler. Çekirdekteki hedef genlerdeki spesifik güçlendirici sekanslara bağlanarak onların transkripsiyonunu düzenlerler (Harrison, 2012; Moon vd., 2021a) (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. JAK/STAT sinyal yolunun sitokinlerle aktive edilmesi (Moon vd., 2021a)

Sitokinler, bağırsak iltihabının ve İBH'ın başlamasında, gelişmesinde ve kontrolünde çok önemli bir rol oynamaktadırlar. İBH'da iltihaplı bağırsak mukozasındaki hücrelerden TNF-α, interferon gama (IFN-γ), interlökin (IL) gibi sitokinler salınmaktadır (Pérez-Jeldres vd., 2019). JAK/STAT yolu, İBH'da artan çeşitli inflamatuar sitokinler tarafından kullanılan önemli bir hücre içi aşağı akış sinyal aracıdır (Yeshi vd., 2020).

İBH'daki bu hücre dışı sitokinler, JAK/STAT yolunu aktive ederek inflamatuar yanıtları düzenlerler (Şekil 2.2). İBH patogenezinde IL-2 ailesi, IL-3 ailesi, IL-6 ailesi ve IL12/23'ten oluşan Tip I sitokinler, interferon ve IL-10 ailesinden oluşan Tip II sitokinler anahtar rol oynamaktadırlar (Moon vd., 2021a). JAK proteinleri ve STAT proteinlerinin oluşturduğu kombinasyonlar, sitokinler ve sitokin reseptörleri tarafından belirlenmektedir. Bu nedenle İBH tedavisinde sitokinlerin hedeflenmesi bir başka alternatif seçenek oluşturur (Yeshi vd., 2020).



Şekil 2.2. İnflamatuar bağırsak hastalığında JAK/STAT sinyal yollarının şematik gösterimi. (JAK, janus kinaz; STAT, sinyal dönüştürücü aktivatörü ve transkripsiyonun aktivasyonu; IL, interlökin; GM-CSF, granülosit-makrofaj koloni uyarıcı faktör; IFN, interferon) (Moon vd., 2021a)

2.3. Tedavi Yöntemleri ve Yolaklarla İlişkileri

İBH tedavisine yönelik stratejiler, anti-inflamatuar veya immün baskılayıcı moleküllerin kullanımını içermektedir (Creff vd., 2021). Bu bileşikler doğal kökenli flavonoid, alkoloid ya da fenolik bitkisel bileşikler olabildiği gibi sentetik moleküller de olabilmektedir. İBH tedavisindeki yaklaşımlar ya inflamatuar sitokinlerin baskılanması ya da JAK/STAT yolağını hedef alarak Janus kinaz enzimlerinin inhibisyonu gibi stratejileri içermektedir.

JAK/STAT inhibitörleri çeşitli mekanizmalarla JAK/STAT yolunu düzenleyerek pro-inflamatuar sitokin sinyal yollarını önleyebildikleri ve inflamasyonun azaltılmasını sağlayabildiklerinden İBH hastalığının tedavisine yönelik yaklaşımlar JAK/STAT yolunu hedeflemektedir (De Vries, Wildenberg, De Jonge ve D'Haens, 2017).

İnflamatuar bağırsak hastalığının patogenezinde yer alan birçok sitokinin JAK/STAT yolunu kullanması nedeniyle bu hastalığın tedavisine yönelik çalışmalarda JAK/STAT yolunun hedef alınarak JAK proteinlerinin inhibe edilmesi önemli stratejik adımlardan biridir. JAK inhibitörleri sitokin sinyalleşmesini bloke eder, ATP-bağlanma bölgesinde JAK'ın kinaz alanına bağlanır, bunların fosforilasyonundan ve JAK aktivasyonundan kaçınır, STAT fosforilasyonunu ve diğer substratları önler, bu nedenle hücre içi sinyaller dönüştürülemez (Lin, Cooles ve Isaacs, 2020).

İnflamatuar bağırsak hastalığının tedavisine yönelik JAK/STAT yolağını hedef alan JAK inhibitörleri olarak çeşitli terapötik moleküller sentezlenmiştir. Bunlar; JAK1 ve JAK3'ün inhibisyonunu sağlayan ve bir pan-JAK inhibitörü olan Tofacitinib (Pfizer), JAK1, JAK2 ve JAK3 inhibitörü olup JAK1 için seçiciliği olan oral JAK1 inhibitörü Filgotinib (GLPG0634, Gilead Sciences), JAK1 ve JAK3 inhibitörü olan Peficitinib (Janssen), seçici JAK1 inhibitörü olan Upadacitinib (UPA) (Abbvie), yeni bir oral pan-JAK inhibitörü olan TD-1473 (Biopharma), diğer yeni geliştirilen JAK3 inhibitörü Pf-06651600 (Pfizer) ve TYK2/JAK1 inhibitörü Pf-06700841 (Pfizer)'nü içeren moleküllerdir (Pérez-Jeldres vd., 2019). Bu moleküllerden tofacitinib tedavi için onaylanmış olup, Peficitinib faz II, Upadacitinib faz III ve Filgotinib ve TD-1473 faz II ve faz III çalışmaları aşamasındadır (Harris ve Cummings, 2021). Bunların dışında STAT inhibitörü olarak STAT3'ü hedef alan C188-9 molekülü İBH sıçan modelde test edilmiştir (Kasembeli, Bharadwaj, Robinson ve Tweardy, 2018).

Bitkilerin sekonder metabolitleri olarak üretilen fenolik bileşikler hücre içi sinyal yolaklarını düzenleyerek anti-inflamatuar, anti-oksidan ve anti-bakteriyel aktiviteler gibi çeşitli biyolojik aktiviteler sergilemektedirler. Bu bileşikler anti-inflamatuar etkilerinden dolayı İBH tedavisinde de başarılı terapötik etkileri nedeniyle ön plana çıkmaktadır.

Çeşitli fitokimyasalların inflamatuar bağırsak hastalığı modellerinde JAK/STAT yolağını hedeflemedeki etkinliği daha önceki çalışmalarda rapor edilmiştir. Moon vd. (2021a), fenolik bileşiklerden kurkuminin JAK2, STAT1, 3 ve 6'yı, epigallocatechin-3-

gallate (ECGG), elajik asit, gallik asit, piketanol ve shikon'in STAT3 ü ve paeonol'ün STAT1'i hedef aldığını belirtmiştir.

2.4. İn vitro İnflamasyon Modelleri

İltihaplı bağırsak epitelinin fonksiyonunu ve metabolizmasını incelemek için in vitro ve in vivo olarak çeşitli hücre ve hayvan modelleri geliştirilmiştir. İnsan kaynaklı hücrelerden geliştirilen in vitro modeller iltihaplı bağırsaktaki moleküler mekanizmaların basit ve tekrarlanabilir bir şekilde incelenmesine olanak verdiklerinden avantajlıdırlar. İn vivo modeller ise bağırsak bariyerinin karmaşık yapısının tüm bileşenlerini içermekle birlikte, hayvan modellerinin kullanımının etik sorunlara neden olabilmesi, oldukça pahalı olması, incelenen türler arasındaki farklılıklardan kaynaklanan tepkilerdeki çeşitlilik ve elde edilen sonuçların insanlara uyarlanmasındaki zorluklar gibi dezavantajlara sahiptir (Fitzgerald, Malhotra, Curtin, O' Brien ve O' Driscoll, 2015). İn vitro kültürlerde kullanılan ana bağırsak hücre dizilerini Caco-2, HT-29 ve T84 hücre hatları oluşturmaktadır. Bağırsak bariyerinin karmaşık bileşimini daha iyi taklit etmek için hem 2B hem de 3B modellerde bağışıklık hücreleri (PBMC, THP1 ve RAW 264.7 hücre hatları) ile bağlantılı olarak bağırsak iltihabının farklı ortak kültür modelleri geliştirilmiştir (De León-Rodríguez vd., 2019).

2.4.1. Bağırsak İltihabının Modellenmesinde Kullanılan İn vitro Hücre Kültürü Modelleri

2.4.2. Caco-2 Hücre Hattı

İnsan epitel hücre dizisi Caco-2, insan kolorektal adenokarsinomundan izole edilerek, 1974 yılında Fogh ve Trempe (1975) tarafından oluşturulmuştur. Farklılaşmadan sonra ortaya çıkan morfolojik ve fonksiyonel özellikleri sayesinde iyi bir enterosit modeli olarak kabul edilirler. Caco-2 hücre hattı, absorpsiyon, taşıma ve biyoyararlanım çalışmaları için bir bağırsak modeli olarak en yaygın şekilde kullanılmaktadır (Cheng, Li ve Uss, 2008).

Bu hücrelerin yaklaşık beş günde birleşip 30 günlük kültür sırasında kendiliğinden farklılaşmaya başladığı bilinmektedir. Farklılaştıklarında, apikal ve bazolateral membranlara sahip polarize bir hücre tek tabakası, bir bağlantı kompleksi ve insan

enterositlerine özgü apikal tarafta bir mikrovillili fırça sınırı oluştururlar (De León-Rodríguez vd., 2019). Farklılaşan Caco-2 hücreleri oluşturdukları fırça kenarlı mikrovillus yapısından dolayı ince bağırsak enterositleriyle aynı özellikleri gösterir ve peptidazlar, sukraz-izomaltaz gibi karakteristik sindirim enzimlerini üretebilirler (Lozoya-Agullo vd. 2017). Caco-2 hücrelerinin mikroorganizmaların hücre zarında bulunan lipopolisakkaritler gibi dış uyaranlara yanıt verebilmelerinin yanı sıra IL-1β, TNF-α ve/veya IFNγ gibi sitokinlere yanıt olarak da inflamatuar sitokinler üretebildiği görülmüştür (Rodríguez-Ramiro vd., 2013; Barrera ve Sánchez, 2015). Ayrıca, Caco-2 hücreleri IL-6, IL-8, IL-15, TNF-α ve timik stromal lenfopoietin (TSLP) gibi inflamatuar sitokinleri üretme becerisi de gösterdiğinden, İBH gibi inflamasyon durumlarının incelenmesinde in vitro model olarak kullanılmaktadırlar (Borgonetti vd., 2020; Joshi, Soni ve Acharya, 2022).

Bununla birlikte, Caco-2 ebeveyn hücre hattı, kültür zamanı ve geçiş sayısıyla bağlantılı heterojen bir tek tabakanın oluşumu ve çok tabakalı bölgelerin varlığı gibi sınırlamalara sahiptir (Joshi vd., 2022). Ek olarak, bu hücre dizisi goblet hücrelerine farklılaşamadığı için mukus üretemezler.

Heterojenliği azaltmak için Caco-2/TC7, Caco-2/15, Caco-2/AQ gibi çeşitli Caco-2 klonları oluşturulmuştur (Sambuy vd., 2005). Bunlardan, TC7 klonunun, tekrarlanabilirlik ve performans özellikleri açısından ince bağırsak bariyerini taklit edebilen uygun bir model olduğu görülmüştür (Zucco vd., 2005). TC7 klonunun morfolojik ve fonksiyonel özelliklerini koruyarak ana hattan (20'ye karşı 30 gün) daha hızlı farklılaştığı ve tek tabakalı homojen ve kararlı bir yapıya ulaştığı rapor edilmiştir (Turco vd., 2011).

2.4.3. HT-29 Hücre Hattı

HT-29, Fogh ve Trempe (1975) tarafından kurulan ve kolon adenokarsinomundan türetilen bir bağırsak hücre hattıdır. HT-29 hücreleri enterositler veya mukus üreten hücrelere benzer şekilde olgun bağırsak hücresinin özelliklerini sergilemektedirler (Martínez-Maqueda, Miralles ve Recio, 2015). İn vitro ortamda morfolojik ve fonksiyonel olarak farklılaşmanın ifade edilebilmesine olanak sağladığından ve olgun bağırsak hücrelerinin karakteristik özelliklerini sergilediğinden insan bağırsak fonksiyonunu ve bağırsak hücre farklılaşmasının moleküler mekanizmalarını incelemek

için yaygın olarak kullanılmaktadır (Zhao, Meng, Zhang, Kang ve Lu, 2017). Bu hücre hattı bir enterosit modeli olarak biyoyararlanım ve hücre mekanizması çalışmalarında kullanılmıştır (Yi vd., 2016). Dolayısıyla bu hücreler in vivo sistemi taklit etmek için elverişli bir ortam yaratmaktadır.

HT-29 hücre hattı, kültür ortamındaki değişikliklere bağlı olarak çok çeşitli farklılaşmalar gösterdiğinden pluripotent bir bağırsak hücre çizgisi olarak kabul edilmektedir. Glikoz içermeyen bir ortamda, Caco-2 hücre hattına benzer şekilde, HT-29 hücreleri, izomaltaz gibi hidrolazları eksprese eden enterosit tipi hücrelere farklılaşırken, glikoz varlığında büyüdüğünde, farklılaşmadan kalırlar (De León-Rodríguez vd., 2019). Kültür ortamının ortamın galaktoz ile değiştirilmesinin enterositik farklılaşmayı tetiklediği gözlenmiştir (Joshi vd., 2022).

HT-29 hücre dizilerinin de Caco-2 hücrelerine benzer sitokinler salgıladığı rapor edilmekle birlikte, HT-29 hücreleri oldukça yüksek bir seviyede müsin üretebilmeleri nedeniyle caco-2 hücrelerinden farklılık gösterirler (Adamczak, Hagesaether, Smistad ve Hiorth, 2016; Zhou vd. 2021). Caco-2 ve HT-29 hatları arasındaki diğer farklılıklar, daha uzun bir farklılaşma periyodu ve HT-29 hattında laktaz ekspresyonunun olmamasıdır. Bununla birlikte, HT-29 ve Caco-2 hücre dizileri arasındaki temel fark, belirli kültür koşulları altında HT-29'un kadeh benzeri hücrelere farklılaşabilmesi ve dolayısıyla mukus üretme kabiliyetine sahip olmasıdır (Zweibaum, Laburthe, Grasset ve Louvard, 2011). Sodyum-bütirat ile muamele edildiğinde, HT-29 hücreleri farklı fenotiplere farklılaşır ve bu klonların bazıları morfolojik olarak bağırsak kadeh hücrelerine benzerlik gösterirler ve mukus salgılarlar (De León-Rodríguez vd., 2019). HT-29 hücreleri metabolik stres koşullarına maruz kaldığında, HT29-FU, HT29-18N2 ve HT29-MTX gibi çeşitli mukus salgılayan hücre popülasyonlarına dönüştükleri rapor edilmiştir (Lesuffleur vd., 1993). Stabil klon HT29-MTX, HT-29 hücre hattının anti-kanser ilacı Metatreksat'a (MTX) kademeli adaptasyonu sonucunda elde edilmiş olup, laktik asit bakterilerinin bağırsak hücrelerine yapışmasını incelemek için bir model olarak kullanılmıştır (Lesuffleur, Barbat, Dussaulx ve Zweibaum, 1990). HT29-MTX absorpsiyon ve geçirgenlik çalışmalarında insan bağırsak bariyerini taklit etmek için Caco-2 hücre hattı ile birlikte ortak kültür sistemlerinde yaygın olarak kullanılmaktadır (De León-Rodríguez vd., 2019).

HT-29 hücre hattının mukus salgılayan fenotipi, bağırsağın mukus salgılama özelliklerini etkileyebilecek gıda bileşiklerini veya bakterileri taramak için gerçekleştirilen çalışmalarda kullanılmaktadır (Gagnon, Zihler Berner, Chervet, Chassard ve Lacroix, 2013). Ayrıca, HT-29 hücre hattının karyotiplerinin 100'den fazla pasaj boyunca karşılaştıtılabilir olması bu hücre hattının evriminin değerlendirilmesi açısından önemli veriler sağlamaktadır (Martínez-Maqueda vd., 2015.

HT-29'un bağırsak hücrelerinin in vitro modeli olarak kullanımının bazı sınırlamaları bulunmaktadır (Zweibaum vd., 2011; Martínez-Maqueda vd., 2015; Joshi vd., 2022). Bunlar; HT-29 hücrelerinin yüksek oranda glikoz tüketmeleri ve glikoz metabolizmasında bozulma olan kötü huylu hücreler olmaları, fırça sınırıyla ilişkili hidrolazların bazılarını eksprese edebildikleri için normal kolon enterositleriyle karşılaştırılmalarının yapılamaması ve iyon taşıma özelliklerinin farklı olması gibi sınırlamalardır.

Çoğalabilirliklerinin yüksek olması ve ucuz olmaları nedeniyle HT-29, Caco-2 ve T84 gibi tümörlerden türetilen hücre hatları bağırsak fizyolojisi ve hastalığını incelemek için in vitro hücre modelleri olarak kullanılmıştır. Bununla birlikte, bağırsak epitelinin, dinamik ve multiparametrik bir mikro-ortama sahip, birden fazla hücre tipini barındıran karmaşık bir doku olması ve ayrıca, insanda en hızlı yenilenen doku olması onun in vitro olarak yeniden oluşturulmasını oldukça zorlaştırmaktadır (Creff vd., 2021). Bu nedenle, bu hücrelerin yerini alabilecek, bağırsak epitelinin modellenmesi, bağırsak patolojilerinin temel meksanizmalarının incelenebilmesi ve in vitro ilaç taramalarında kullanılabilecek yeni mikrofabrike 2D ve 3D in vitro modeller geliştirilmektedir.

2.4.4. T84 İnsan Kolon Adenokarsinom Hücre Hattı

T84 hücre hattı, bağırsak hücrelerinin farklılaşmasını in vitro incelemek ve farklılaşmış fenotipleri ifade eden klonal hücre hatları oluşturmak için kullanılan model hücrelerden biridir. Kolorektal adenokarsinomdan türetilen insan bağırsak epitel hücre dizisidir (Devriese vd., 2017). T84 hücre hattı, 1980 yılında Murakami ve Masui (1980) tarafından insan kolon karsinomu hücre büyümesinin hormonal kontrolünü incelemek için kurulmuştur (De León-Rodríguez vd., 2019). T84 hücreleri yüzeylerinde mikrovillus taşırlar (Joshi vd., 2022). T84 hücrelerinin farklılaşmış fenotipi, sütunlu, polarize hücre morfolojisi sergilemekte, apikal ve bazolateral membran kompartmanlarını birbirinden

ayıran sıkı bağlantıların varlığı ve mikrovilli çivili apikal fırça sınırı görünümü ile karakterizedir (Sambuy vd., 2005). McCool, Marcon, Forstner ve Forstner (1990), T84 hücre kültürlerinin müsin içeren büyük granüllere sahip kadeh benzeri hücreler içerdiğini, müsinin büyük moleküler kütleye sahip olduğunu ve kolonik müsinlerine benzer bir amino asit bileşimine sahip olduğunu rapor etmişlerdir.

T84 hücreleri, insan rekombinant dönüştürücü büyüme faktörü (TGFb1) veya mezenkimal hücrelerden salgılanan diğer faktörler ile indüklendikten sonra kript benzeri hücrelere farklılaşmaktadır (De León-Rodríguez vd., 2019). Devriese vd. (2017), T84 hücrelerinin Caco-2 hücrelerinden farklı morfolojik, biyokimyasal ve fonksiyonel özelliklere sahip olduğunu ve T84 hücrelerinin farklılaşma boyunca orijinal kolonik özelliklerinin çoğunu koruduğunu öne sürmektedirler. T84 hücre hattının, sıkı bağlantılara sahip bir tek tabaka olarak büyütüldüğünde, vazoaktif bağırsak polipeptidi, karbakol ve kalsiyum iyonofor A23187 gibi uyaranlara yanıt olarak apikal kanallardan klorür salgıladığı rapor edilmiştir (McCool vd., 1990).

T84 hücre hatları kolon ortamını etkili bir şekilde taklit eder (Joshi vd., 2022). Bu nedenle, T84 insan kolon adenokarsinom hücre hattı İBH çalışmalarında Caco-2 ve HT-29 hücreleri gibi yaygın olarak kullanılmaktadır. Farklılaşmış T84 hücre hattı absorpsiyon, metabolizma, ilaçların biyoyararlanımının incelenmesi, epitelyal elektrolit taşınması ve bunun çeşitli hormonlar ve nörotransmiterler tarafından düzenlenmesinin incelenmesi, bağırsak geçirgenliğinin incelenmesi, bağırsakların inflamatuar yanıtında rol oynayan sinyal yollarının incelenmesi, bileşiklerin epitel bariyer bütünlüğü üzerindeki etkisinin incenlemesi ve bakteri-enterosit etkileşiminin incelenmesinde bir model sistem olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (McCool vd., 1990; Devriese vd., 2017; De León-Rodríguez vd., 2019; Joshi vd., 2022). Bununla birlikte, Caco-2 ve HT-29 hücre hatları gibi T84 hücre hattı da malign kökene sahip olması ve in vivo epitele özgü aktivite eksikliği nedeniyle bazı dezavantajlara sahiptir (Joshi vd., 2022).

2.4.4. Lipopolisakkarit (LPS) Modeli

Lipopolisakkarit (LPS), gram negatif bakterilerin hücre duvarlarının özel yapısal bileşeni olan ve endotoksin özellik gösteren bir glikolipittir (Ruemmele vd., 2002). LPS, lipid A, çekirdek oligosakkarit ve O antijeni olmak üzere üç bölgeden oluşmaktadır (Shimada vd., 2012). LPS, bağırsak mikrobiyotası tarafından üretilmekle birlikte aynı

zamanda eksojen kaynaklardan da gelebilir (Candelli vd., 2021). LPS, güçlü bir inflamatuar yanıtın oluşumunu ve gelişimini başlattığı için gram negatif bakterilerin ana virülans faktörü olarak tanınır (Che vd., 2019). LPS, nötrofilleri, lenfositleri, monositleri ve özellikle makrofajları aktive edebilen bağışıklık sisteminin güçlü bir uyarıcısıdır (Ruemmele vd., 2002). Bakteriyel bir endotoksin olan LPS'nin, mikrogliayı uyarabildiği ve inflamatuar ve oksidatif yolları aktive edebildiği belirtilmektedir (Yan, Dua, Qin ve Gao, 2020). Bu özelliğinden dolayı hem in vitro hem de in vivo inflamasyon modellerinde yaygın olarak çalışılan bir inflamatuar moleküldür. Deneysel olarak indüklenen enfeksiyon, inflamasyon, doku hasarı ve inflamatuar yanıtların biyokimyasını incelemek için başvurulan bir bakteriyel endotoksindir (Zhong vd., 2012).

Normal koşullarda bağırsak mikrobiyotası tarafından üretilen LPS bağırsak bariyerini geçmezken, Crohn hastalığı ve ülseratif kolit durumlarında bağırsak epitel bariyerindeki değişiklikler nedeniyle kan dolaşımına girebilmekte ve metabolik endotoksemiye neden olabilmektedir (Vanuytsel, Tack ve Farre, 2021; Candelli vd., 2021). LPS hem adaptif hem de doğuştan gelen bağışıklık sistemine etki ederek, özellikle ülseratif kolit ve Crohn hastalığının patogenezinde yer alan farklı bağışıklık yollarını aktive etmekte ve bağırsak epitel hücre fonksiyonlarını da doğrudan etkilemektedir (Ruemmele vd., 2002). Genellikle bağırsak mikrobiyotası ve gıdada bulunan LPS'nin endojen üretimindeki artışın kronik inflamasyonu tetiklediği ve sistemik LPS'nin, IL-6 ve Crohn hastalığı ve ülseratif koliti teşvik edebilen diğer inflamatuar sitokinlerin ekspresyonunu indüklediği belirtilmektedir (Candelli vd., 2021). Ruemmele vd. (2002), LPS gibi bakteriyel ürünlerle temasın, enterositlerin IL6 veya IL8,12-14 gibi pro-inflamatuar sitokin ve kemokinleri salmasına yol açarak bağışıklık hücrelerininin artan miktarda bağırsak mukozasına alınmasına neden olduğunu ve inflamatuar kaskadı arttırdığını rapor etmiştir.

İBH ile ilişkili mikrobiyal dengenin bozulması, artan LPS üretimine yol açarken, kronik LPS maruziyeti İBH'da çok önemli bir durum olan bağırsak iltihabını teşvik eder (Stephens ve Von der Weid, 2020). LPS, bağırsak epitel hücre büyümesinin düzenlenmesine müdahale edebilen pro-inflamatuar sitokinlerin ve kemokinlerin güçlü bir indükleyicisidir (Ruemmele vd., 2002). LPS, NF-κB, siklikAMP'ye yanıt veren element bağlayıcı protein (CREB) ve mitojenle aktive olan protein kinaz (MAPK) ailesini (hücre dışı sinyal regüle kinazlar 1/2 (ERK 1/2), c-Jun N-terminal kinaz (JNK) ve p38

MAPK) aktive eder ve bunlar iNOS, siklooksijenaz-2 (COX-2) ve pro-inflamatuar sitokinler gibi bağışıklıkla ilgili sitotoksik faktörlerin salınımında rol oynarlar (Zhong vd., 2012). LPS tarafından indüklenen değişiklikler nedeniyle gastrointestinal mikrobiyota çeşitliliğini kaybeder, Th17 ve Th1 lenfositlerinde bir artış olur, toll benzeri reseptör (TLR)-4'ün aktivasyonu yoluyla doğuştan gelen bağışıklık tetiklenir, IL-8 gibi inflamatuar IL ekspresyonu indüklenir ve epitelyal bariyere doğrudan zarar verir (Stephens ve Von der Weid, 2020). Candelli vd. (2021), ayrıca LPS'nin, NF-κB, STAT1, STAT5, IRF3 ve IRF5 yolları tarafından düzenlenen M1 makrofajlarının polarizasyonunu teşvik ederek, makrofajlardan TNF-α, IL-1α, IL-1β, IL-6, IL-12, CXCL9 ve CXCL10 gibi inflamatuar sitokinlerin üretilmesini uyardığını rapor etmektedir. Yazarlar, M1 polarizasyonunun, TLR4/NF-κB ve JAK/STAT3 sinyal yollarının aktivasyonu vasıtasıyla bağırsak epitel geçirgenlik değişikliklerini teşvik ederek sızıntılı bir bağırsak senaryosuna yol açtığını belirtmiştir. Böylece bağırsak epitelinin hasar görmesiyle iltihaplanma daha da tetiklenir.

2.4.5. Hidrojen Peroksit Modeli

Vücudun her hücresi tarafından üretilen hidrojen peroksit (H_2O_2) membran sinyal iletimi, hücre farklılaşması, hücre şeklinin belirlenmesi ve büyüme faktörünün neden olduğu sinyal kaskadları, gen ekspresyonu ve insülin metabolizması gibi hücresel süreçlerde rol oynayan bir moleküldür (Di Marzo, Chisci ve Giovannoni, 2018; Pravda, 2020). H_2O_2 hücre zarlarına nüfuz ederek, hem hücre dışı hem de hücreler arası haberciler olarak görev yapar ve en kararlı reaktif oksijen türü (ROS) olarak bilinmektedir (Darendelioglu, 2020). Bir çalışmada, H_2O_2'nin hücre zarlarından hücre dışı boşluğa geçtiği ve hücre dışı boşlukta ilerleyerek bitişik hücrelere girip onları aktive ettiği rapor edilmektedir (Gunawardena, Raju ve Münch, 2019). Bu nedenle, yazarlar H_2O_2'nin NO ve TNF-α gibi hücreden hücreye pro-inflamatuar sinyalleri iletebilen, her yerde bulunan bir ilk haberci molekül olduğunu öne sürmektedirler.

H_2O_2 oksidatif stresten evrimleştiği için yüksek stabilite göstermektedir ve hücre zarından kolayca geçebildiği için oksidatif stres mekanizmasını in vitro modelde incelemek için yaygın olarak kullanılmaktadır (Salla, Sunkara, Ogutu, Walker ve Verghese, 2016).

Hidrojen peroksitin bir kolitik ajan olduğu ve ülseratif kolitin patogeneziyle ilişkili olduğuna dair bulgular mevcuttur. Ülseratif kolitli bireylerde kolonik inflamasyonun ortaya çıkmasından önce H_2O_2 seviyesinin kolon epitelinde yüksek oranda arttığı gözlenmiştir ve bu nedenle kolonik inflamasyon gelişiminde bir rolü olduğu düşünülmektedir (Santhanam, Venkatraman ve Ramakrishna, 2007). H_2O_2 üretimi oksidatif strese neden olan çevresel faktörlerin kümülatif etkisine bağlı olarak artış gösterir ve nihayetinde ülseratif kolit oluşumuna yol açabilir (Pravda, 2020). H_2O_2'nin ülseratif kolit gelişimine katkıda bulunan mekanizması şu şekilde açıklanmaktadır. Çevresel oksidatif stres H_2O_2'nin hücresel artışını tetikler. Kolonik epitel hücreleri tarafından üretilen fazla H_2O_2, hücre zarından hücre dışı boşluğa kolayca yayılır. H_2O_2'nin hücre zarı geçirgenliği, uzun ömür, güçlü oksitleme potansiyeli ve nötrofilik kemotaktik yeteneği gibi özellikleri, onun kolonik epitelyal sıkı bağlantı proteinlerinin oksidatif parçalanmasını teşvik eder ve diğer taraftan da beyaz kan hücrelerini kolonik epitelyuma çeker ve her ikisi de kolonik inflamasyona ve bunun sonucunda ülseratif kolite yol açarlar (Pravda, 2019). Artan H_2O_2 biyomembran geçirgenliğini etkiler, oksidan kaynaklı bağırsak bariyeri bozulmasına yol açar ve hastalık gelişimini tetikler (Pravda, 2020). Bu nedenle, inflamasyonun gelişimine katkı sağladığı bilinen kolonik epitelyal hidrojen peroksidin azaltılarak kolonik homeostazının iyileştirilmesine yönelik tedaviler önem kazanmaktadır.

2.5. İn vivo İnflamasyon Modelleri

Randhawa, Singh, Singh ve Jaggi (2014), inflamatuar bağırsak hastalığını incelemek kimyasal kaynaklı kolit modeli, adaptif transfer modeli, spontan kolit modeli, genetiği değiştirilmiş/transgenik hayvan modeli gibi çeşitli hayvan modellerinin geliştirildiğini belirtmişler ve bunlar arasında en tercih edilen modelin tekrarlanabilirlik ve geliştirme kolaylığı sunan kimyasal kolit modeli olduğunu rapor etmişlerdir.

2.6. Nitrik Oksit (NO)

NO, biyolojik sistemlerde son derece kısa ömürlü ve inflamatuar fonksiyonlara yanıt olarak çeşitli epitel hücreleri tarafından üretilen iki atomlu bir serbest radikaldir (Alamdary, Bakhshi ve Soudi, 2018). NO, çeşitli fizyolojik ve patolojik etkileri olan bir serbest radikal haberci moleküldür (Cross ve Wilson, 2003). NO, birçok hücrede hem

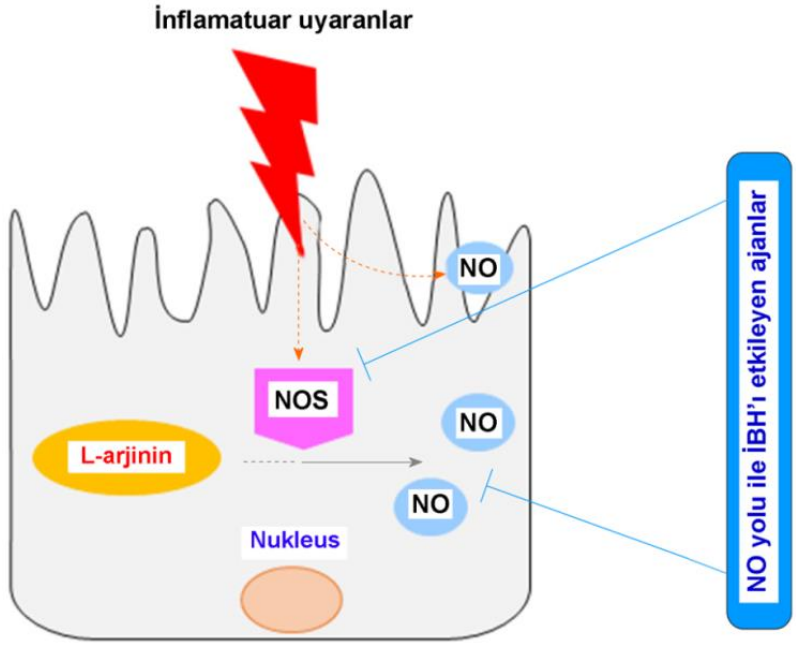
hücre içi hem de hücre dışı düzenleyici fonksiyonlara sahiptir (Avdagić vd., 2013). Nitrik oksit sentaz (NOS) enzim grubu tarafından katalize edilen bir reaksiyonda amino asit L-arginin'den sentezlenir (Kamalian vd., 2020). NOS'un endotel NO sentaz (eNOS), nöral NO sentaz (nNOS) ve iNOS olmak üzere üç fonksiyonel formu bulunur (Joo vd., 2014). Gastrointestinal sistemde endotel hücrelerindeki eNOS damarların ve bağırsağın kas gevşemesini teşvik ederek kan akışını düzenlerken, kolonu innerve eden belirli sinir terminallerinde bulunan nNOS bağırsak hareketliliğini düzenler (Avdagić vd., 2013). iNOS indüklenebilir formunun ise, çeşitli mukozal inflamasyonlarda yukarı doğru regüle olmakla birlikte, makrofajlar ve epitel hücrelerinin yanısıra birçok hücre tipinde mikroorganizmalara, sitokinlere ve diğer aktive edici uyaranlara yanıt olarak üretildiği bilinmektedir (Cross ve Wilson, 2003). iNOS, JAK/STAT sinyal yolakları yoluyla hareket eden pro-inflamatuar sitokinler ve immünojenik uyaranlar tarafından ön olarak aktive edilir (Kamalian vd., 2020). iNOS endotoksin ve/veya sitokinler tarafından indüklendikten sonra, yüksek seviyede NO üretir (Avdagić vd., 2013). iNOS'un aşırı ekspresyonu ile artan NO konsantrasyonu ve hastalıkların şiddeti arasında bir korelasyon bulunduğu rapor edilmiştir (Soufli vd., 2016).

NO, zararlı etkilerini süperoksit anyonu ile birleşerek peroksinitrit ($OONO^-$) oluşturmakla gösterir (Soufli vd., 2016). NO'nun inflamasyon sırasında oluşan reaktif oksijen türleri ile etkileşime girmesi sonucu oluşan $OONO^-$ anyonu, nitroksil anyonu (NO^-) ve dioksit nitrojen (NO_2) gibi reaktif nitrik oksijen türlerinin (RNOS) oluşturulması yoluyla kolitte doku hasarına yol açtığı düşünülmektedir (Cross ve Wilson, 2003; Soufli vd., 2016). $OONO^-$, aktive edebilir poli ADP-riboz sentetaz (PARS) enzimi, adenozin trifosfat (ATP) ve nikotinamid adenin dinükleotid (NAD) gibi bazı biyolojik moleküller için bir oksidan olduğundan bu moleküllerin hücresel kaynağının tükenmesine yol açarak bağırsağın epitel geçirgenliğini arttırmaktadır (Kamalian vd., 2020). Böylece, yüksek oksidatif etkiye sahip olan peroksinitrit, lipid peroksidasyonuna, doku hasarına ve inflamasyona yol açan sitotoksik süreçleri tetikleyebilir (Soufli vd., 2016).

Mevcut veriler, NO'nun mukozal inflamasyonun önemli bir aracısı olduğunu göstermekte ve lümen ve mukozal NO ve mukozal iNOS ekspresyonunun ve aktivitesinin, İBH'da özellikle ülseratif kolitte, inflamasyonun önemli belirteçleri olduğunu göstermektedir (Cross ve Wilson, 2003; Kamalian vd., 2020). İBH'lı hastaların değişen inflamatuar mukozasında NO konsantrasyonlarında artış ve kolon ve bağırsak

dokularında yukarı doğru-regüle olan iNOS'un aşırı ekspresyonu kaydedildi (Cross ve Wilson, 2003; Avdagić vd., 2013). iNOS enzimi tarafından sentezlenen NO'nun serum ve etkilenen dokulardaki yüksek seviyelerinin gastrik inflamasyonunu şiddetlendirdiği ve bu nedenle gastrik inflamasyonunun başlıca biyobelirteçlerinden biri olduğu rapor edilmektedir (Şekil 2.3) (Kamalian vd., 2020).

Aşırı NO üretimi akut ve kronik inflamasyonlarla ilişkili doku hasarını indüklediğinden kronik inflamatuar hastalıkların tedavisi ile ilgili olarak NO üretimini güçlü bir şekilde inhibe edebilecek yeni ilaçların geliştirilmesinin gerekliliği vurgulanmaktadır (Joo vd., 2014). Son zamanlarda yapılan çalışmalar, doğal bileşikler olan polifenollerin ve flavonoidlerin NO üretimini ve iNOS ifadesini NF-κB ve JAK/STAT sinyal yolları aracılığıyla belirgin şekilde azaltabildiğini göstermiştir (Kamalian vd., 2020). Joo vd. (2014), gram negatif bakterilerin hücre duvarı bileşeni olan LPS'nin, makrofajları güçlü bir şekilde uyararak pro-inflamatuar sitokinlerin üretimini teşvik ettiğini ve bu nedenle LPS ile uyarılan hücrelerde NO üretiminin inhibe edilmesinin, çeşitli anti-inflamatuar ilaçları taramanın olası yollarından biri olduğunu belirtmiştir.



Şekil 2.3. Nitrik oksit sentazın inhibisyonu, inflamatuar bağırsak hastalığını baskılar (İBH: inflamatuar bağırsak hastalığı; NOS: nitrik oksit sentaz; NO: nitrik oksit) (Kamalian vd., 2020)

2.7. Modifiye Sakkaritler ve Farmasötik Kullanımları

Sakkarit kelimesi Yunanca kökenli bir kelime olan ve şeker anlamına gelen "sakkaron" kelimesinden türemiştir. Polihidroksil grubu içeren aldehit veya keton yapısındaki karbonhidratlardır. Monosakkaritler, disakkaritler ve polisakkaritler olmak üzere 3 sınıfta incelenirler. Hidroliz yolu ile daha küçük birimlere parçalanamayan, karbonhidratların en küçük yapı birimini oluşturan monosakkaritler, bir veya daha fazla hidroksil grubu içeren veya aldehit ya da keton yapısında olan en basit karbonhidratlardır. Disakkaritler ise monosakkaritlerin hidroksil grupları arasında oluşan bir O-glikozidik bağ vasıtasıyla birbirine bağlanmış karbonhidrat bileşikleridir. Üç ile 20 arası şeker ünitesinin birbirine bağlanması sonucu ise oligosakkaritler oluşmaktadır. Polisakkaritlerin alt birimleri kabul edilen oligosakkaritler, polisakkaritlerin hidrolizi yoluyla elde edilebilirler. Biyomedikal alanda en yaygın olarak kullanım bulan olisakkaritler kitosanın bir türevi olan kitooligosakkaritlerdir (COS). COS güvenli oluşu ve toksik olmaması nedeniyle son zamanlarda terapotik bileşiklerin geliştirilmesinde en dikkat çeken karbonhidrat türevleridir.

Monosakkaritler, nötr hidroksil grupları, negatif yüklü karboksilik asit/sülfat grupları veya pozitif yüklü amin grupları gibi aktif fonksiyonel gruplara sahiptirler (Sun vd., 2020). Mono ve oligosakaritler, hidrojen bağları, hidrofobik ve metal-ligand etkileşimleri gibi kovalent olmayan etkileşimler vasıtasıyla modifiye edilerek, ısı, ışık ve ultrason gibi dış uyaranlara duyarlı ilaç dağıtım sistemlerinin tasarlanmasında kullanılmışlardır (Gim, Zhu, Seeberger, ve Delbianco, 2019). Monosakkarit birimleri arasındaki değişken bağlantılar (doğrusal zincir yapısı ve dallı zincir yapısı gibi) ve moleküler ağırlıktaki farklılıklar çeşitli kimyasal özelliklere sahip polisakkaritlerin oluşturulmasına yol açmıştır (Sun vd., 2020). Mono ve oligosakkaritlerin önemli bir rolü hücre tanımadır (Chevolot vd., 2009).

Mono ve disakkaritler ile konjuge edilerek türetilen supramoleküler yapılar, ilaç çözünürlüğünü artırmak, hidrofobik ilaçları kapsüllemek ve çeşitli moleküler yapılar için iskele görevi görmek gibi fonksiyonlara sahiptir (Gim vd., 2019). Chen, Okafor, Garcia ve Wang (2018), modifiye edilmiş monosakkaritler ve disakkaritlerin alifatik zincirler veya aromatik gruplar gibi hidrofobik kısımlara konjuge edilerek düşük moleküler ağırlıklı şeker jelatörleri olarak kullanıldığını ifade etmektedir. Monosakkaritlere

uygulanan kimyasal modifikasyonlar, bu sakkaritlerin uygulama yelpazesini daha da genişletmiştir. Bununla birlikte, doğal sakkaritler doğal kaynaklardan, genellikle düşük saflıkta ve yüksek polidispersitede elde edilmektedir ve ayrıca ikame derecesi ve polimerizasyon kontrolü doğal sakkaritlerin ciddiyetle üzerinde durulması gereken zoruklarıdır (Gim vd., 2019).

Polisakkaritler, çok sayıda monosakkaritin glikozidik bağlarla birleştirilmesi sonucu oluşan polimerik karbonhidratlardır. Polisakkaritler, aynı ünitelerin birleşmesiyle oluşan homopolisakkaritler veya farklı ünitelerin birleşmesiyle oluşan heteropolisakkaritler olarak ikiye ayrılabilir. Polisakkaritler, sadece 1,4-β-glikozit bağları içererek lineer formda olabildikleri gibi 1,4-β-glikozit bağları ve 1,6-α-glikozit bağları gibi bağların karışımını içeren dallanmış formda olabilir. Polisakaritler ayrıca kimyasal modifikasyonlara izin veren, amin ve sülfat/sülfonat gruplarını taşıyan deoksi şekerler, amino şekerler ve sülfat/sülfonat şekerler formlarında olabilir (Garner ve Park, 2015).

Polisakkaritler, D-glukoz, D-galaktoz, D-fruktoz, D-mannoz, D-ksiloz, L-galaktoz ve L-arabinoz gibi yapısal monomerlerin glikozidik bağlarla bileştirilmesi sonucu oluşmaktadırlar (Navarro, Abelilla ve Stein, 2019). Bunun yanı sıra diğer doğal bileşiklerden kitosan; β-(1,4)-N-asetil-D-glukozamin ve D-glukozamin ünitelerinin birleşiminden, hyaluronik asit; β-(1,4)-D-glukuronik asit ve β-(1,3)-N-asetil-D-glukozamin ünitelerinin birleşiminden, aljinat; β-(1,4)-D-mannuronik asit ve α-(1,4)-L-guluronik asit ünitelerinin birleşiminden, kondroitin sülfat; β-(1,3)-N-asetil-D-galaktozamin ve β-(1,4)-glukuronik asit ünitelerinin birleşiminden, heparin; α veya β-(1,4) bağlı üronik asit ve α-D-glukozamin birimlerinden oluşmaktadır (Mizrahy ve Peer, 2012).

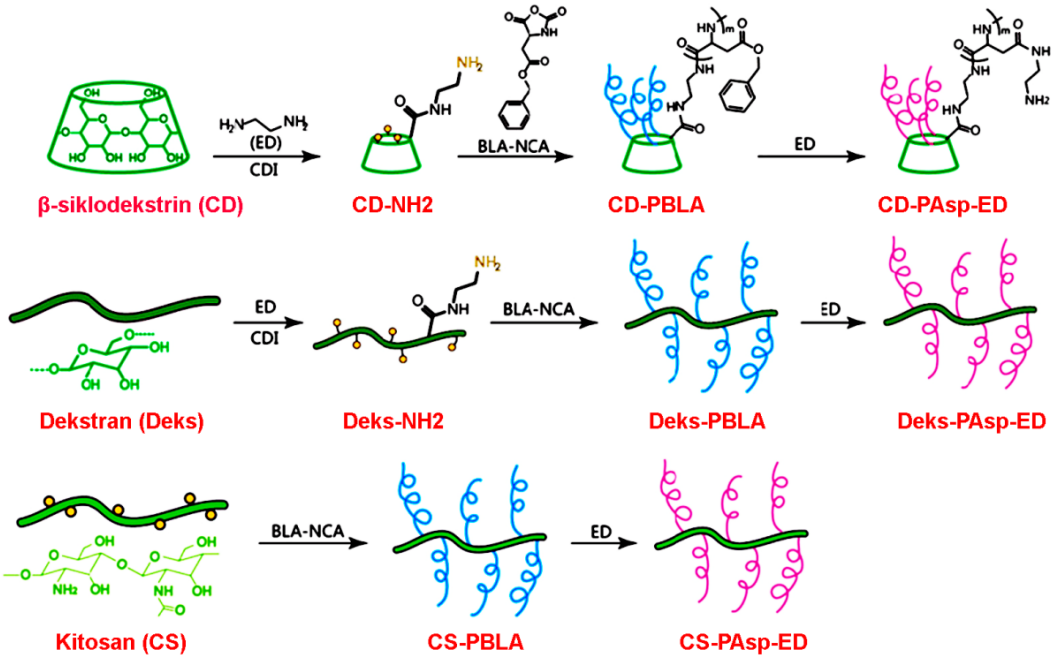
Polisakkaritlerin, moleküler omurgaları üzerinde hidroksil (-OH), amino (-NH_2) veya karboksil (-COOH) gibi birçok fonksiyonel grubu barındırmaları onların kimyasal olarak modifikasyonlarını kolaylaştırmaktadır (Garcia-Valdez, Champagne ve Cunningham, 2018). Polisakkarit molekülleri üzerindeki -OH, -COOH ve -NH_2, polisakkarit bazlı ilaç dağıtım sistemlerini oluşturmak için kullanılan aktif bölgelerdir (Sun vd., 2020).

Efthimiadou, Metaxa ve Kordas (2014), ilaç dağıtım sistemlerinde kullanılan, polisakkaritlerden amiloz, amilopektin, glikojen ve selüloz gibi glikoz bazlı olanlarının

yapılarında bulundurdukları bol miktarda serbest reaktif hidroksil grubundan dolayı, diğer polisakkaritlerin ise hem hidroksil hem de karboksilik asit gruplarını taşımalarından dolayı kolaylıkla modifiye edilebildiklerini belirtmektedir. Yazarlar, iskeleti boyunca dağılmış serbest -OH ve -COOH grupları taşıyan aljinatların bu fonksiyonel grupları üzerinden modifiye edilerek işlevsellik kazandırılabileceği ve çözünürlüğü, hidrofobikliği, fizikokimyasal ve biyolojik özellikleri iyileştirilmiş alginat türevleri elde edilebileceğini rapor etmişlerdir. Aljinatların kimyasal modifikasyonları oksidasyon, sülfatlama, esterifikasyon, amidasyon veya aşılama gibi yöntemlerle gerçekleştirilmektedir (Yang, Xie ve He, 2011). Aljinatın hidroksilik grupların oksidasyonu onların biyolojik olarak parçalanabilirliğini arttırırken, sülfonasyon, artan kan akışı ile heparin benzeri bir polisakkarit üretir (Efthimiadou vd., 2014). Aljinat, ilaç taşıyıcıları için hidrojeller oluşturmak üzere çok değerlikli metal iyonlarını şelatlayabilir (Iskandar, Rojo, Di Silvio ve Deb, 2019).

Debele, Mekuria ve Tsai (2020), polisakkaritlerin ilaç molekülleri ile kovalent veya kovalent olmayan etkileşimler yoluyla polisakkarit-ilaç taşıyıcıları oluşturabildiğini ve bu yöntemler arasında; i) hidroksil gruplarının asilasyon ajanları ile esterleştirilmesi, hidroksil gruplarının alkilasyon ajanları ile eterleştirilmesi, birincil alkollerin karboksil gruplarına oksidasyonu ve komşu ikincil hidroksil gruplarının aldehitlere oksidasyonu; (ii) karboksil gruplarına bağlı hidroksil gruplarından oluşan ester bağları, amino gruplarına bağlı karboksil gruplarından oluşan amid bağları ve -COOH ve -NH_2'nin reaksiyonuyla oluşturulan hidrazon bağı; (iii) amino grupları ile hidroksil veya karboksil

grupları arasındaki etkileşimlerin olduğunu rapor etmiştir (Şekil 2.5).



Şekil 2.4. Aşılanabilir polisakaritin hazırlanışını gösteren şema (Sun vd., 2020).

Doğal polisakkaritler kimyasal yapıları, fizyokimyasal özellikleri, bileşimleri, moleküler ağırlıkları ve iyonik özellikleri açısından oldukça çeşitlilik göstermektedirler (Mizrahy ve Peer, 2012). Bunun yanısıra, doğal polisakaritler, düşük toksisite, biyouyumluluk, biyobozunurluk, stabilite, hidrofilik yapı ve kimyasal modifikasyona uygun reaktif bölgeler taşımaları açısından çeşitli modifikasyonlara uygun, çeşitli biyolojik aktivitelere sahip ve farmasötik uygulamalar için elverişli birer kaynak haline gelmektedir (Efthimiadou vd., 2014; Pawar, Kamat ve Choudhary, 2015). Biyolojik aktivitesi bilinen ve farmasötik etkileri açısından incelenen doğal sakkaritler arasında aljinat, karagenan, selüloz, pektin, guar zamkı, dekstran, ksantan zamkı, kitosan, hyaluronan, kondroitin, heparin en dikkat çekenlerdir.

Bu doğal polisakaritler güvenli, toksik olmayan, biyobozunur, biyouyumlu, kimyasal olarak modifiye edilebilir olduklarından, sudaki çözünürlüklerinin yüksek olmasından ve bunların yanısıra anti-tümör, anti-viral, anti-oksidasyon ve anti-inflamatuar aktiviteler gibi biyolojik fonksiyonlara sahip olmalarından dolayı biyomedikal uygulamalar açısından çok faydalı olmaktadırlar (Mohammed, Naveed ve Jost, 2021).

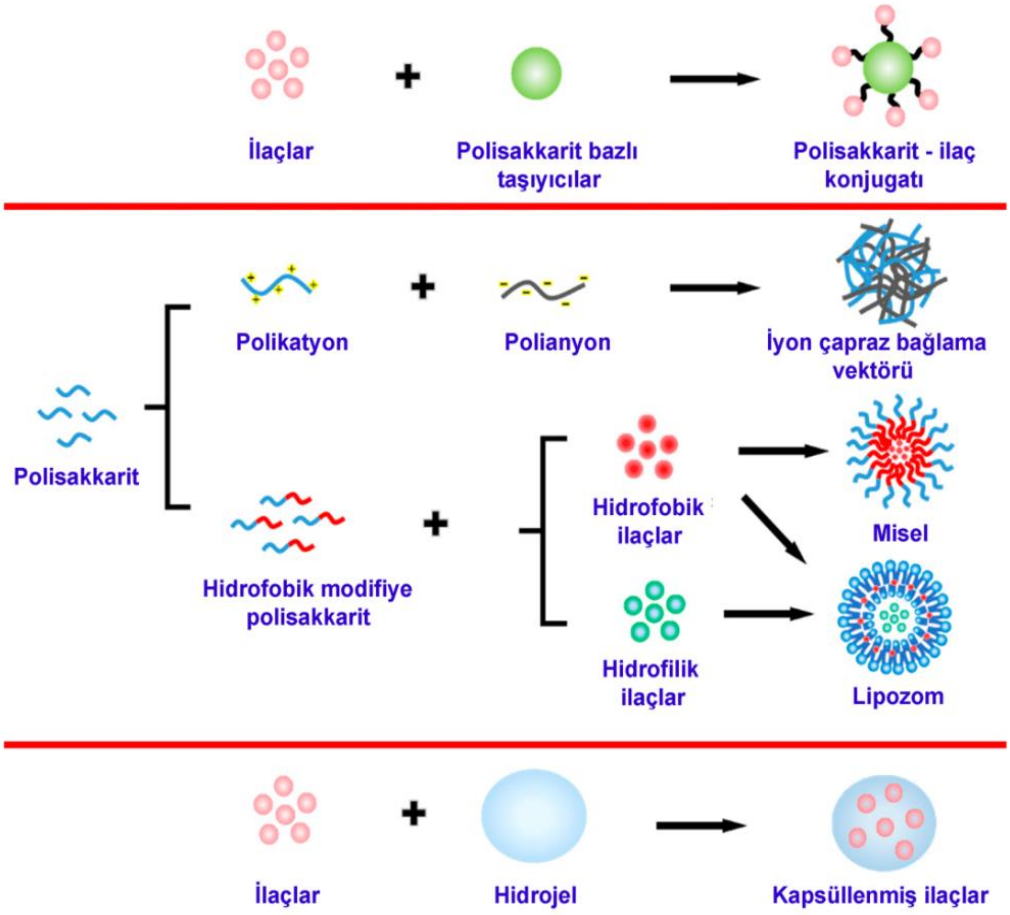
Polisakkaritler, işlevsellik kazandırmak ve türevler oluşturmak için sakkarit iskeletinde bulunan serbest karboksil ve hidroksil grupları üzerinden kimyasal modifikasyona tabi tutulurlar (Yang vd., 2011). Modifikasyonlar sonrasında bileşiğe hidrofobik, asidik, bazik veya diğer işlevlerin eklenmesi, çözünürlüğünün arttırılması, kimyasal ya da biyolojik işlev kazandırılması, bu maddelere dayalı malzemelerin özelliklerini değiştirebilir (Mizrahy ve Peer, 2012; Cumpstey, 2013). Bu işlemler oksidasyon, sülfatlama, esterifikasyon, amidasyon veya aşılama yöntemleri gibi teknikler kullanılarak gerçekleştirilmektedir (Yang vd., 2011). Bunların yanısıra, sakkaritlere uygulanan modifikasyonlar arasında, sakkarit oksijen nükleofilleri kullanılarak ester ve eter oluşumu; polisakkarit zincirlerine heteroatomik nükleofillerin eklenmesi; oksidatif glikol bölünmesi, birincil alkollerin karboksilik asitlere kimyasal oksidasyonu ve birincil alkollerin aldehitlere enzimatik oksidasyonu dahil polisakkaritlerin oksidasyonu; üronik asit bazlı polisakkaritlerin reaksiyonları; kitosan aminlerinin nükleofilik reaksiyonları; ve doymamış polisakarit türevlerinin oluşumu gibi uygulamalar yer almaktadır (Cumpstey, 2013).

Polisakkaritler ayarlanabilir mekanik özellikler, biyouyumluluk ve biyobozunurlukları sayesinde biyomedikal ve farmasötik alanlarda hücre proliferasyonu ve farklılaşması, doku mühendisliği ve rejeneratif ilaçlar ve yara sargısında kullanılmak üzere hidrojellerin bünyesine dahil edilerek ilaç salımında kullanılabilirler (Iglesias vd., 2020). Mukozal yüzeyler için, spesifik organları veya hücreleri hedeflemek ve ilacın kalma süresini uzatmak için kullanılan biyoadezyon yetenekleri, ilaç dağıtım sistemlerinde polisakkaritlerin kullanımının artmasına yol açmıştır (Mizrahy ve Peer, 2012).

Polisakkaritler proteinlerin, peptitlerin, antibiyotiklerin ve nükleik asitlerin teslimi için nanotaşıyıcıların hazırlanmasında kullanılmaktadır (Prasher vd., 2021). Siklodekstrinler, hidrofobik farmasötik maddelerin çözünürlüğünü ve biyoyararlanımını arttırmak için ilaç katkı maddesi olarak kullanılmaktadır (Onishi vd., 2015).

Polisakkaritlerin fiziksel ve kimyasal özellikleri değiştirilerek vezikül, misel, hidrojel gibi sistemler tasarlanmakta ve bu modifiye sistemler, ilaç dağıtımı, gen dağıtımı ve yara pansumanları gibi uygulamalarda kullanılmaktadır (Şekil 2.4.). Polisakkaritler ile modifiye edilen lipozomlar, miseller ve hidrojeller, mükemmel anti-tümör ilaç salım

sistemi, yara örtüleri, enjekte edilebilir hidrojeller ve sürekli salımlı ilaç taşıyıcı sistemler olarak görev yapmaktadır (Sun vd., 2020). Polisakkarit bazlı ilaç dağıtım sistemleri; polisakkarit ve ilaçları parçalanabilir kimyasal bağlar aracılığıyla birleştirerek polisakkarit-ilaç konjugatları oluşturmak, (ii) polisakkarit bazlı ilaç yüklü partiküller oluşturmak ve ilaç moleküllerini polisakkarit bazlı hidrojeller içine depolamak gibi uygulamalar dahil olmak üzere üç tipte olabilir (Şekil 2.4).



Şekil 2.5. Polisakkarit bazlı ilaç taşıyıcı sistemler (Sun vd., 2020)

Polisakkaritlerin ilaç taşımada sentetik polimerlere göre çeşitli avantajları vardır. İlgili spesifik enzimlerce biyolojik bozunmaya uğradıkları için belirli bir moleküler ağırlığın üzerinde birikim göstermezler ve böbreklerden atılmaları daha kolaydır (Kean ve Thanou, 2010). Polisakkaritler ilaçların çözünürlüklerini arttırabilir, biyolojik membranlardan geçişini kolaylaştırabilir ve ilaçların vücutta dolaşım süresini arttırabilirler (Khan, Minhas, Ahmad ve Sohail, 2018). Spesifik hedefleme sağlamak için modifiye edilebilirler. Kitosan ve β-siklodekstrin gibi polimerler, negatif yüklü nükleik asitlerle elektrostatik etkileşimlere girebilirler. Mizrahy ve Peer (2012), polisakkaritlerin

ilaç dağıtımı için spesifik hedeflemede kullanılabileceğini önermektedir. Yazarlar, kolon iletimi için dekstran, amiloz ve pektin gibi polisakkaritlerin kullanılabileceğini bu moleküllerin midenin sert ortamında stabil kalıp kolona ulaştığında kolondaki spesifik enzimler tarafından parçalanabilir özellikte olduklarını belirtmişlerdir. Bunların yanısıra, hepatositleri hedeflemek için pullulan, vajinal, rektal ve akciğerler gibi mukozal yüzeyleri hedeflemek için mukoadezif özellikte olan aljinat ve kitosan, makrofajları hedeflemek için mannan, kanser hücreleri, kök hücre ve lenfositleri hedeflemek için CD44 ve CD168 için birincil ligand olan hyaluronik asitin kullanılabileceğini önermektedirler.

Hyaluronik asit konjugasyonu ile paklitaksel ve kurkumin gibi hidrofobik yapıdaki ilaçların sudaki çözünürlüklerinin arttırılması ve hedefli ilaç dağıtım sistemleri geliştirilmesi sağlanmıştır (Jian vd., 2017). Hyaluronik asit, çeşitli kanser hücrelerinde aşırı eksprese edilen CD44 reseptörleri reseptörünü tanıyabilen ve ona bağlanabilen hyaluronik asit ve kondroitin sülfat, hedefli ilaç salım sistemlerinin tasarımı için yaygın olarak kullanılmaktadır (Zhao vd., 2014; Sun vd. 2020). Ayrıca, hyaluronik asit, hidrofilikliği, biyouyumluluğu, toksik ve tahriş edici olmayışı gibi mükemmel özellikleri nedeniyle kozmetik, hücre tedavisi, doku mühendisliği ve ilaç dağıtımı gibi biyomedikal uygulamalarda kullanılmaktadır (Jian vd., 2017).

Hidroksil grupları bakımından zengin olan dekstran, miseller ve hidrojeller gibi ilaç salım sistemlerinin tasarlanması için kimyasal modifikasyona uygun bir doğal sakkarittir (Sun vd., 2020). Amfifilik siklodekstrinler, kimyasal modifikasyonlar sayesinde hidrofobik ilaçlarla daha güçlü etkileşimlere girerek hidrofobik ilaçların hücresel alımını arttırır (Gim vd., 2019). Kitosanın birincil amino grubunun çeşitli alkil grupları ile modifikasyonu sonucunda bu polisakkaridin çözünürlüğü arttırılabilir ve biyoaktivitesi iyileştirilebilir (Efthimiadou vd., 2014).

Kitosanın özelliklerini değiştirmek veya geliştirmek yada biyomedikal kullanımı için istenen özellikleri kazandırmak adına kitosan polisakkaridi amino ve hidroksil grupları üzerinden çapraz bağlama, karboksimetilasyon, eterleşme, aşı kopolimerizasyonu ve esterleşme gibi kimyasal reaksiyonlar ile modifiye edilmektedir (Joseph, Krishnamoorthy, Paranthaman, Moses ve Anandharamakrishnan, 2021). Kitosanın yağ asidi klorürleri ile N-açilasyonu, onun hidrofobik karakterini arttırır ve kitosana vücutta daha uzun süre kalma şansı, lizozim ve kitinaz gibi sindirim enzimlerine

direnç gösterme yeteneği ve daha yüksek biyouyumluluk kazandırır. Greft kopolimerizasyonuyla aşılanmış kitosan süper emici reçinelerin üretimi, suda çözünür ilaç taşıyıcı kitosan türevlerinin geliştirilmesi ve anti-mikrobiyal aktivitesinin geliştirilmesi amacıyla kullanılmaktadır. Kitosanın amino grubunun aldehit glioksilik asidin karbonil grubu ile reaksiyona girmesi ve sonra sodyum borhidrür (NaBH4) veya sodyum siyanoborohidrit (NaCNBH3) ile reaksiyona sokularak hidrojenlenmesi yoluyla indirgeyici alkilasyon ile sentezlenen karboksimetil kitosanlar, kitosandan daha gelişmiş biyolojik ve fizikokimyasal özelliklere sahiptir. Alkil zincirleri ile modifiye edilerek ve aşılanarak sentezlenen, N-metilen fosfonik kitosanlar, kozmetik uygulamalar için amfifilik özellikler kazanır. İndirgeyici alkilasyon yoluyla modifiye edilmiş karbonhidrat dallı kitosan, ilaç hedeflemesi için kullanılabilmektedir (Chawla, Kanatt ve Sharma, 2015).

2.8. Sakkaritlerin Farmasötik Kullanımına İlişkin Literatür Taraması

Salvatore vd. (2000), tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada, N-asetil glukozamin (GlcNAc) kronik inflamasyonun tedavisi için inflamatuar bağırsak hastalığı olan 12 çocuğa (10 Crohn hastalığı, 2 ülseratif kolit) ek tedavi olarak uygulanmış ve oral yoldan GlcNAc verilen çocukların sekizinde belirgin iyileşme gözlenirken, biyopsi yapılan tüm vakalarda histolojik iyileşme gözlenmiştir. Çalışmanın sonuçları, GlcNAc'in kronik iltihaplı bağırsak hastalığında ucuz ve toksik olmayan bir tedavi olarak umut vaat ettiğini ortaya koymuştur.

Özer vd. (2011), glukozamin kondroitin sülfatın (glcN-CS) sıçan aşil tendonları üzerindeki inflamasyon ve onarım üzerine etkisini bir deneysel çalışmada değerlendirmişlerdir. Yazarlar, oral yolla verilen glcN-CS'ın sıçanlarda aşil tendonunu iyileştirdiğini ve bunun muhtemelen glcN-CS'ın inflamasyonu azaltması ve kollajen sentezini uyarması ile ilişkili olduğunu rapor etmişlerdir. Böylece, glcN-CS preparatlarının tenositler üzerindeki uyarıcı etkisinden ve anti-inflamatuar etkisinden yararlanılarak tendon yaralanmalarının cerrahi tedavisi sonrasında iyileşmesine yarar sağlamak amacı ile kullanılabileceğini önermişlerdir.

Zhao vd. (2014), 80 nm boyutuna sahip, tiyol-fonksiyonelleştirilmiş kolloidal mezogözenekli silika (CMS-SH) nanoparçacıklarını ilaç nanotaşıyıcıları olarak sentezlemişler ve daha sonra, tümör hücrelerini seçici olarak hedeflemek ve silikanın

biyouyumluluğunu ve dağılabilirliğini arttırmak için hyaluronik asit oligosakkaritlerini (oHA) disülfid bağları ile kolloidal mezogözenekli silika (CMS)'nin dış tabakasına aşılamışlardır. Araştırmacılar, hyaluronik asit oligosakkaritlerinin fizyolojik koşullar altında CMS'nin stabilitesini ve biyouyumluluğunu artırdığını ve CMS-SS-oHA'nın yüksek oranda redoks duyarlı salım sergilediğini gözlemlemişlerdir.

Onishi vd. (2015), hidroksipropil-β-siklodekstrin'i (HP-β-CD) bir aşı adjuvanı olarak yeniden profillendirmişler ve HP-β-CD ile adjuvanlanmış influenza hemaglutinin split aşısını sinomolgus makaklarına uygulamışlardır. Aşının, klinik olarak izole edilmiş bir pandemik H1N1 influenza virüsü ile ölümcül bir tehdite karşı koruyucu etki gösterdiğini ve HP-β-CD'in enjeksiyon bölgesinde doğuştan gelen bağışıklık tepkisini tetiklediğini rapor etmişlerdir. Yazarlar, HP-β-CD'in güçlü bir MyD88- ve TBK1'e bağlı T foliküler yardımcı hücre adjuvanı olarak fonksiyon sergilediğini belirterek ve bu sakkaridin çeşitli aşılara kolaylıkla uygulanabileceğini öne sürmektedirler.

Grisin, Bories, Loiseau ve Bouchemal (2017), oleoil kitosan ve α-siklodekstrinin suda kendi kendine birleşmesiyle elde ettikleri mikro-plateletleri pluronik1 F127 (ağırlıkça %20) aracılığıyla amfoterisin bdeoksikolat (Fungizone1, AmB-DOC) ile jelleştirmişlerdir. Daha sonra sentezledikleri bu bileşiğin maya *Candida glabrata*'ya karşı anti-fungal aktivitesini immünokompetan fare modelinde in vitro ve in vivo olarak test etmişler ve sentezlenen bu yeni bileşiğin amfoterisin bdeoksikolat (Fungizone1, AmB-DOC)'ın anti-fungal aktivitesini arttırarak *C. glabrata* vajinal enfeksiyonunu tamamen iyileştirdiğini görmüşlerdir.

Yuan vd. (2013), tripolifosfat (TPP)'ı çapraz bağlayıcı olarak kullanarak iyonik jelasyon yöntemiyle β-siklodekstrin aşılanmış kitosan nanopartikülleri hazırlamışlar ve bu sentezlenen ilaç taşıyıcısının hidrofobik ilaçların iletilmesi için kullanılabilirliğini model ilaç ketoprofen ile test etmişlerdir.

Bak, Lampe ve Sung (2014), kolorektal kanser öncesi bir durum olan koliti azaltmak için dekstran sodyum sülfat (DSS) ile indüklenmiş in vivo fare kolit modelinde glukozaminin etkinliğini araştırmışlardır. C57BL/6 farelerinin diyetinin %0,10' unu oluşturan glukozamin sülfatın, muhtemelen NF-κB aracılı TNF-α ve IL-1β üretimini ve kolitik farelerde bağırsak bariyeri bozulmasına katkıda bulunan nötrofil aktivasyonunu baskılayarak DSS'nin neden olduğu kolit semptomlarını azalttığını, böylece

glukozaminin NF-κB aktivasyonu ve buna bağlı inflamatuar yanıtları baskılayarak kolit hastalığı aktivitesini azalttığını gözlemlemişlerdir.

Jian vd. (2017), anti-kanser ilacı nimesulidin suda çözünürlüğünü ve tümör hedefleme kabiliyetini geliştirmek için hyaluronik asit ile konjuge etmişler ve iki farklı moleküler ağırlığa sahip hyaluronik asit -nimesulid konjugatının anti-tümör etkinliğini in vitro ve in vivo olarak incelemişlerdir. Çalışma sonuçları nimesulid'in hidrofilikliğinin başarıyla arttırıldığını, hyaluronik asit-nimesulid konjugatının, CD44'ü aşırı eksprese eden HT-29 tümörlerine karşı yüksek seçicilik gösterek biriktiğini ve bu hücrelerde ölüme neden olduğunu göstermiştir. İn vivo çalışmalar da konjugatın tümör birikimi sergilediğini ve HT-29 ksenograflı farelerde karaciğer veya böbrekte gözle görülür morfolojik farklılıklar olmaksızın apoptotik mekanizmalarla 3 gün içinde hızlı tümör küçülmesine neden olarak dikkate değer bir anti-tümör aktivite sergilediğini ortaya koymuştur. HA/CD44 reseptör etkileşimleri yoluyla gelişmiş seçiciliğe sahip HA-nimesulid'in kanser tedavisi için nimesulidin terapötik etkinliğini ve güvenliğini artırma potansiyeline sahip olduğu öne sürülmektedir.

Hassani, Mahdi, Azarian, Ibrahim ve Hussain (2020), terapötik etkileri bilinen ve doğal bir fenolik bileşik olan gallik asitin (GA) biyoyararlanımını arttırmak ve GA'nın kanser hücrelerine karşı terapötik etkisini geliştirmek için onu doğal polisakkarit olan arap zamkı kullanarak nanopartiküller halinde kapsüllemişlerdir. İçerisine GA kapsüllenmiş arap zamkı nanopartiküllerinin anti-oksidan etkisi ve ayrıca meme adenokarsinomu (MCF-7, MDA-MB231), HepG2 hepatoselüler kanser, HT-29 kolorektal adenokarsinom ve MCF-10A dahil dört tip insan kanser hücre hattında in vitro sitotoksisite, hücre alımı ve hücre göçü çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Çalışmanın sonuçları, arap zamkının GA'nın kanser hücrelerine karşı seçiciliği ve anti-oksidan özelliklerini artırarak sinerjik etki gösterdiğini ortaya koymuştur. Arap zamkı ile kapsüllemiş GA nanopartiküllerinin hepatik hücrelerde seçici alımı arttırdığı, meme kanserinde sitotoksisiteyi arttırdığı ve proapoptotik etkiler sergilediği görülmüştür. Araştırmacılar bu nanopartiküllerin karaciğer ve meme kanserlerinin önlenmesi ve tedavisi için potansiyel bir aday olabileceğini bildirmişlerdir.

2.9. Glukozamin

Glukozamin doğal olarak oluşan bir şeker olup bir amino sakkarit olan glikozaminoglikan türüdür ve glikolize proteinlerin sentezinde bir öncüdür (Al-Saadi vd., 2019). Glukozamin, kıkırdakta ve eklemlerin etrafındaki sıvıda doğal olarak bulunur ve ayrıca kabukluların dış iskeletlerinde ve bazı mantarlarda kitin yapısının içerisinde bulunur (Moon vd., 2021b). Glukozamin, genellikle çeşitli inflamatuar durumların semptomlarını tedavi etmek için bir ek olarak kullanılır (Rahimian, Lalancette-Hebert, Weng, Sato ve Kriz, 2020). Bir çalışmada, aşırı kilolu bireylerin diyetlerine yapılan glukozamin ve kondroitin takviyesinin sitokin aktivitesini ve inflamasyonla ilgili diğer yolları önemli ölçüde azaltarak sistemik inflamasyonu azaltabildiği rapor edilmiştir (Navarro vd., 2015). Hayvan ve insan modelleri ile yapılan çalışmalar glukozamin uygulamasının inflamatuar bağırsak hastalığında iyileşme sağladığını göstermektedir (Moon vd., 2021b). Glukozamin hazır bir ilaçtır ve diyet takviyesi olarak osteoartrit ve diğer inflamatuar durumların tedavisinde yaygın olarak kullanılır (Rahimian vd., 2020). Özellikle eklem kıkırdağı ve kemik üzerindeki potansiyel anti-inflamatuar ve antiapoptotik etkileri glukozaminin yetişkinler tarafından gıda takviyesi olarak kullanımını teşvik etmektedir (Moon vd., 2021b). Glukozamin ile tedavi edilen hayvanlarda ve insanlarda hiçbir yan etki saptanmadan osteoartritin başarılı bir şekilde önlendiği rapor edilmiştir (Al-Saadi vd., 2019).

Azuma vd. (2015), glukozamin oligomerlerinin (COS) anti-inflamatuar etkilerini deneysel bir İBH modelinde incelemişlerdir. Çalışmanın sonuçları, COS'un inflamatuar hücrelerde miyeloperoksidaz aktivasyonunun baskılanması, NF-κB, COX-2 ve iNOS sentazın aktivasyonunun baskılanması yoluyla kolonik inflamasyonu inhibe ettiğini ortaya koydu. Buna ilaveten, COS'un, TNF-α ve IL-6 gibi pro-inflamatuar sitokinlerin serum seviyelerini baskılayarak ve doku hasarını azaltarak, farelerin hayatta kalma süresini uzattığı rapor edilmiştir. Yazarlar, COS'un anti-inflamatuar etkilere sahip olduğunu ve İBH hastaları için yeni fonksiyonel gıdalar olarak kullanılabileceğini önermektedirler.

Yao vd. (2018), O-GlcN asilasyonun, sıçan karotid arter balon yaralanmasından sonra glukozamin kaynaklı vasküler koruma için baskın efektör mekanizma olan NF-κB sinyalleme kaskadının negatif düzenlenmesinde rol oynayan A20 TNF-α-indüklenmiş

protein 3 (TNFAIP3) aktivitesini düzenlediğini ve böylece inflamasyonun neden olduğu vasküler yaralanmaya karşı koruma sağladığını bildirmişlerdir.

Rahimian vd. (2020), glukozaminin galektin-3 (Gal-3) ligandlarının sentezini ve mevcudiyetini artırarak ve/veya ekspresyon seviyelerini düzenleyerek, Gal-3 sinyalini önemli ölçüde modüle edebileceği hipotezinden yola çıkarak fareler üzerinde bir çalışma gerçekleştirmişlerdir. Çalışma sonucunda, glukozaminin inme sonrası doğuştan gelen bağışıklık tepkisini (makrofaj/mikrogliadaki NF-κB gibi inflamatuar kanonik yollar dahil) cinsiyete özgü bir şekilde düzenlediğini ve erkek farelerde, Gal-3 aracılı mikroglia/makrofajların alternatif aktivasyonunu güçlendirerek nöroproteksiyon sağladığını ortaya koymuşlardır.

Mattiuzzo vd. (2021), bitki kaynaklı bir seskiterpen olan β-kariofilen (BCP)'ni askorbik asit (AA) ve D-glukozamin (GlcN) ile kombine ederek bu malzemelerin makrofaj aracılı inflamasyona karşı etkilerini primer insan kondrositleri üzerinde in vitro olarak incelemişlerdir. Yazarlar, insan kondrosit kültürleri üzerine eklenen BCP, AA ve GlcN'nin düşük dozlarda sinerjik anti-inflamatuar ve anti-oksidatif etkiler gösterdiklerini ve bu üç molekülün kombinasyonunun kolajen tip II ve agrekan ekspresyonunu desteklediğini belirtmişlerdir. Bunların yanısıra, BCP ve AA ile birlikte uygulanan GlcN'nin kondro koruyucu bir etki gösterdiğini ve ayrıca, hücre dışı matris bileşenlerinin üretimini arttırdığını rapor etmişlerdir. Çalışma sonuçları, BCP, AA ve GlcN'nin birlikte kullanımının osteoartritte kıkırdak bozulmasını önlemek için bir potansiyel tedavi olabileceğini ortaya koymuştur.

2.10. Hidroksibenzoik Asitler

Hidroksibenzoik asitler, bitkilerin sekonder metabolizmasının ürünleri olan fenolik asitlerin bir alt grubunu oluşturmaktadır. Fenol halkasına karboksilik asit fonksiyonel grubunun doğrudan bağlı olması ve fenol halkasının bir hidroksil grubu ile ikame edilmiş olması nedeniyle hidroksibenzoik asit olarak adlandırılırlar (Al Mamari, 2021). Hidroksibenzoik asitler arasında en bilinenleri gallik asit, vanilik asit, protokateşik asit, p-hidroksibenzoik asit, salisilik asit, siringik asit, ellajik asit, β-resorsilik asit ve gentisik asittir (Sarker ve Oba, 2020). Barındırdıkları hidroksil (OH) ve metoksi (OCH_3) fonksiyonel gruplarının sayısına bağlı olarak farklı biyolojik aktivite gösterirler (Sanchez-Maldonado, Schieber ve Ganzle, 2011). Hidroksibenzoik asitler, eterifikasyon,

esterifikasyon, amidifikasyon ve oksidasyon reaksiyonlarına girebilirler (Brel, Lisina, Popov, Budaeva ve Yu, 2016; Albarran, Esparza ve Mendoza, 2015; Zhu vd., 2018; Al Mamari, 2021). Parabenler olarak bilinen 4-hidroksibenzoik asit esterleri çeşitli gıda, kozmetik ve farmasötik ürünlerinde anti-mikrobiyal ajanlar olarak yaygın olarak kullanılmaktadır (Valkova vd., 2001). Gallik asit anti-inflamatuar ve anti-oksidatif aktivitelerin yanısıra, anti-bakteriyel, anti-fungal, anti-viral, anti-tümör, anti-diyabet, anti-obezite ve anti-miyokardiyal iskemi gibi biyolojik aktiveleriyle bilinmektedir (Mazloom vd., 2019; Moon vd., 2021a; Bai vd., 2021). Siringik asit anti-oksidan, anti-bakteriyel ve anti-kanser dahil olmak üzere birçok biyolojik aktiviteye sahiptir (Fang, Zhu, Niu ve Yin, 2019). Ellajik asit ise güçlü anti-oksidan ve anti-inflamatuar özelliklere sahiptir (Allam, Abuelsaad, Alblihed ve Alsulaimani, 2016).

Pandurangan vd. (2015), gallik asidin DSS ile indüklenen farelerin kolonunda C-reaktif protein (CRP), TNF-α ve IL-6'nın serum konsantrasyonlarını, STAT3 fosforilasyonunu ve p65-NF-κB ekspresyonunu azalttığını rapor etmiş ve gallik asidin kolit fare modelinde inflamasyonu inhibe ederek ülseratif kolit tedavisinde klinik semptomları iyileştirdiğini bildirmiştir. Bir başka hidroksibenzoik asit türevi olan vanilik asidin, IL-6'nın plazma seviyelerini azaltarak ve kolon dokularında COX-2 ekspresyonunu ve transkripsiyon NF-κB p65'in aktivasyonunu baskılayarak DSS'nin neden olduğu kolitin şiddetini azalttığı rapor edilmiştir (Kim, Kim, Um ve Hong, 2010). Çalışmada, vanilik asidin, COX-2 ve IL-6 seviyelerinin düzenlenmesi yoluyla ülseratif kolitte bir anti-inflamatuar etki gösterdiği belirtilmiştir. Protokateşik asidin (PCA) erkek Balb/c farelerinde 2,4,6-trinitrobenzensülfonik asit (TNBS) ile indüklenen kolonik hasar üzerinde koruyucu bir etki gösterdiği ve PCA'nın anti-inflamatuar etkisinin ilgili NF-κB ve STAT3 sinyal yollarının iptali ile ilişkili olduğu ortaya konmuştur (Crespo vd., 2017). Siringik asitin anti-inflamatuar ve anti-apoptotik aktiviteleri sayesinde Caco-2 hücrelerini oksijen-glukoz yoksunluğu/reoksijenasyon hasarından potansiyel olarak koruyabildiği ve Caco-2 hücrelerinin sergilediği bağırsak bariyeri bozulmasını hafiflettiği ortaya konmuştur (Xiang ve Xiao, 2022). Farelerde DSS ile indüklenen kolit modelinde ise siringik asitin doza bağımlı olarak TNF-α, IL-1β ve IL-6 sitokinlerini inhibe ettiği ve p65-NF-κB ve STAT3 sinyalini inhibe ederek inflamasyonu sınırlama potansiyeline sahip olduğu rapor edilmiştir (Fang vd., 2019). Bir çalışmada, 5-amino salisilik asit sıçan deneysel kolitinde kitosan ile birlikte anti-inflamatuar kombinasyon tedavisi olarak

uygulanmış ve bu kombinasyonun kolitte MPO, ALP, TNF-α, IL-6, IL-1β ve NF-κB'de önemli bir azalmaya yol açtığı görülmüştür (Jhundoo vd., 2020). Ellajik asit, dişi Balb/C farelerinde geliştirilen kronik ülseratif kolit modelinde COX-2 ve iNOS gibi aracıları aşağı regüle ederek ve p38 MAPK, NF-κB ve STAT3 sinyal yollarını bloke ederek hastalığın ilerlemesini önemli ölçüde inhibe etmiş ve bağırsak iltihabını azaltmıştır (Marín, Giner, Ríos ve Recio, 2013).

BÖLÜM 3

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Kimyasallar

Bu çalışmada kullanılan kimyasallardan, n-Hekzan Merck firmasından, D-(+)-Glukozamine hidroklorit kristalin, Fosfat tampon solüsyonu, N-(1-Naftil) etilendiamin dihidroklorit, N-Hidroksisüksinimid ve N-(3-Dimetilaminopropil)-N'-etilkarbodiimid hidroklorit Sigma Aldrich firmasından ve Diklorometan, Sodyum nitrit, Orto fosforik asit, Etilasetat, Sülfanilamid ve Hidrojen peroksit Isolab firmasından temin edilmiştir. Analitik reaktif sınıfından olan tüm kimyasallar herhangi bir arındırma veya saflaştırılma yapılmadan kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan Eliza kitleri, İnsan tümörü nekroz faktörü α (TNF-α) ELISAKit, İnsan İnterlökin 6 (IL-6) ELISAKit ve İnsan İnterlökin 1β (IL-1β) ELISAKit AFG Bioscience firmasından temin edilmiştir. Deneyde kullanılan kitler ve kimyasalların özelliklerine ilişkin bilgiler Çizelge 3.1'de sunulmaktadır.

Çizelge 3.1. Deneylerde kullanılan kimyasalların özelliklerine ilişkin bilgiler

Ürün Adı	Ürün özellikleri	Menşei

n-Hekzan	Mw: 86.18 g/mol, Yoğunluk: 0.66 g/cm³, Ürün kodu: 104368	Almanya
D-(+)-Glukozamine hidroklorit kristalin	Saflık: ≥99.0%, Mw: 215,63 g/mol	İngiltere
Fosfat tampon solüsyonu	pH: 7,5; 0,1 M,	ABD
N-(1-Naftil)etilendiamin dihidroklorit	Saflık: >%98, ACS reajan	ABD
N-Hidroksisüksinimid	Saflık: ≥%97.0 (T), Mw: 115,09 g/mol	Çin
N-(3-Dimetilaminopropil)-N'-etilkarbodiimid hidroklorit	Mw: 191,70 g/mol, Çözünürlük: ≤100 mg/mL	Japonya
Diklorometan	Saflık: ≥%99, Mw: 84,93 g/mol, Yoğunluk: 1,33 g/cm^3	Almanya
Sodyum nitrit	Saflık: ≥%99.0, Mw: 69,00 g/mol, Yoğunluk: 2,17 g/cm^3	Almanya
Orto fosforik asit	Saflık: %85, Mw: 98 g/mol, Yoğunluk: 1,71 g/cm^3	Almanya
Etilasetat	Saflık: ≥%99,5, Mw: 88,11 g/mol, Yoğunluk: 0,90 g/cm^3	Almanya
Sülfanilamid	Saflık: ≥%99.0, Mw: 172,2 g/mol, Yoğunluk: 1,08 g/cm^3	Almanya
Hidrojen peroksit (H_2O_2)	Saflık: %35, Yoğunluk: 1,125 g/cm^3, Ürün kodu: 932.122	Almanya
İnsan Tümörü nekroz faktörü α (TNF-α) ELISAKit	Katalog no: EK710127, 96 test, Algılama aralığı: 7ng/L-400ng/L Hassasiyet: 2ng/L	USA
İnsan İnterlökin 6 (IL-6) ELISAKit	Katalog no: EK710267, 96 test, Algılama aralığı: 0.2ng/L-8ng/L Hassasiyet: 0.05ng/L	USA
İnsan İnterlökin 1β (IL-1β) ELISAKit	Katalog no: EK710260, 96 test, Algılama aralığı: 1ng/L-20ng/L Hassasiyet: 0.2ng/L	USA

3.2. Oligosakkarit Monomer Üniteleri ile Modifiye Edilmiş Benzoik Asit Türevlerinin Sentezi

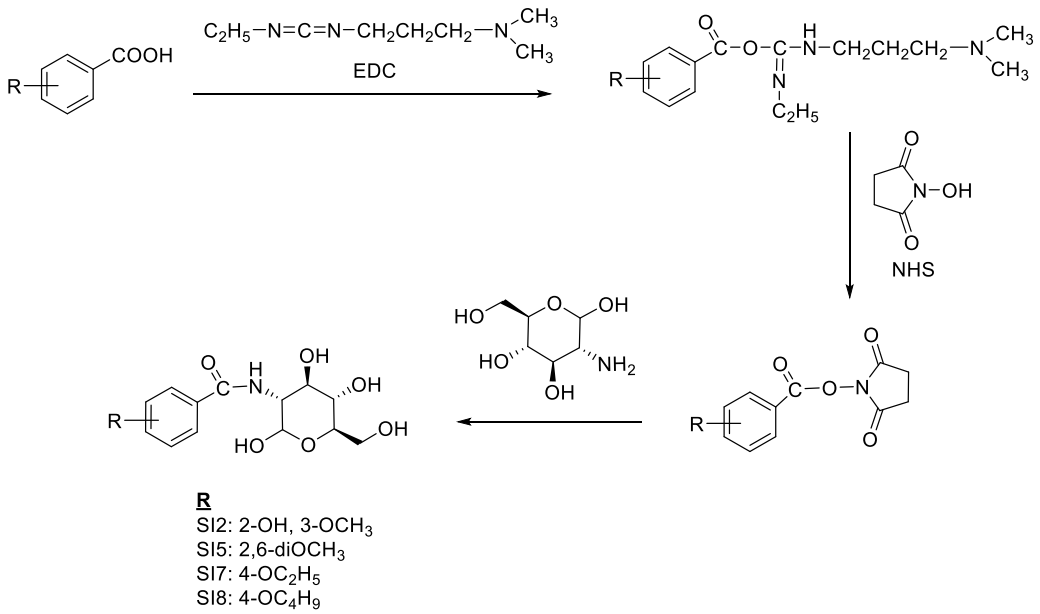
Oligosakkarit monomeri olarak seçilen glikozaminin çeşitli benzoik asitlerle amidifikasyonu gerçekleştirilerek sonuç ürünleri olan sübstitüe N-((3R,4R,5S,6R)-2,4,5-trihidroksi-6-(hidroksimetil)tetrahidro-2H-piran-3-il)benzamid türevleri sentezlenmiştir. Bu türevlerin sentezi için sübstitüe benzoik asit (10 mmol) 20 ml etanol içerisinde çözülmüş ve ardından karışıma 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)karbodiimid (EDC) (10 mmol) eklenmiş ve 20 dakika boyunca buz banyosu içerisinde manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır. Karışıma 10 mmol *N*-hidroksisüksinimid eklenerek 10 dakika boyunca buz banyosunda karıştırmaya devam edilmiştir. Ardından ekivalan miktarda glukozamin (10 mmol) eklenerek 30 dakika buz banyosunda sonrasında 24 saat boyunca oda ısısında manyetik karıştırıcı kullanılarak reaksiyona devam edilmiştir. Reaksiyon takibi 1:1 hekzan:etilasetat çözücü çifti kullanılarak ince tabaka kromatografisiyle takip edilmiştir. Reaksiyon sonunda çözücü rotari evaporatörde uçurulmuş ve kalan kısım etanolden kristallendirilerek sonuç ürünler (SI2, SI5, SI7 ve SI8) elde edilmiştir (Pasanphan ve Chirachanchai, 2008; Piegat, Goszczyńska, Idzik ve Niemczyk, 2019).

SI2: 4-hidroksi-3-metoksi-N-((3R,4R,5S,6R)-2,4,5-trihidroksi-6-(hidroksimetil) tetrahidro-2*H*-piran-3-il)benzamid

SI5: 2,6-dimetoksi-N-((3R,4R,5S,6R)-2,4,5-trihidroksi-6-(hidroksimetil) tetrahidro-2*H*-piran-3-il)benzamid

SI7: 4-etoksi-N-((3R,4R,5S,6R)-2,4,5-trihidroksi-6-(hidroksimetil)tetrahidro-2*H*-piran-3-il)benzamid

SI8: 4-butoksi-N-((3R,4R,5S,6R)-2,4,5-trihidroksi-6-(hidroksimetil)tetrahidro-2*H*-piran-3-il)benzamid



Şekil 3.1. Oligosakkarit monomeri olan glukozaminin çeşitli benzoik asitlerle amidifikasyon reaksiyonu

3.3. Sentezlenen Bileşiklerin Yapı Tayini

Tez çalışması kapsamında yeni sentezlenen bileşiklerin yapı karakterizasyonu Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR), Proton Nükleer Manyetik Rezonans Spektroskopisi (^{1}H-NMR) ve Kütle spektroskopisi (LC/MS) analizleriyle gerçekleştirildi.

3.3.1. Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR)

Sentezlenen bileşiklerin bağ yapısındaki değişiklikler ve fonksiyonel gruplarında meydana gelen titreşimlerden kaynaklanan yapısal, kompozisyonel bilgiler Perkin Elmer Spectrum IR 10.6.2, ATR FTIR cihazı (Seri no: 116312) ile kaydedildi. FTIR spektrumları 450-4000 cm^{-1} aralığında 4 cm^{-1} spektral çözünürlükte kaydedildi ve bileşikleri oluşturan hammaddeler arasındaki bağlar teyit edildi.

3.3.2. Proton Nükleer Manyetik Rezonans Spektroskopisi (^{1}H-NMR)

Sentezlenen bileşiklerin yapı tayini için ^{1}H-NMR spektrumları, Avance Neo 500 OneBay 500 MHz NMR Spektrometresi (Bruker) ile çözücücü olarak hekzadötorodimetil sülfoksit (DMSO-d6) kullanılarak oda sıcaklığında kaydedildi. İç standart olarak

tetrametilsilan (TMS) kullanıldı ve kimyasal kaymalar TMS'ye göre ppm (δ) olarak rapor edildi.

3.3.3. Kütle Spektroskopisi (LC/MS)

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

3.3.4. İnce Tabaka Kromatografisi

Oligosakkarit monomer üniteleriyle modifiye benzoik asit bileşiklerinin sentez reaksiyonları ince tabaka kromatografisi (İTK) ile hazır İTK Silica Gel 60 F254 Aluminyum plakaları (Merck) üzerinden takip edildi ve sentezlenen bileşiklerin saflıkları belirlendi. Oligosakkarit monomeri ile modifiye benzoik asit bileşiklerini içeren çözelti ve karşılaştırmada kullanılacak standartlara ait çözeltiler İTK plakasına kapiler ile damlatıldıktan sonra İTK plakası, 1:1 hekzan:etilasetat çözücü çifti kullanılarak yürütüldü. Sentezlenen bileşikteki lekeler ile standartların lekeleri karşılaştırılarak örnekte bulunan standartların türü tespit edildi.

3.4. Sentezlenen Oligosakkarit Monomer Üniteleri ile Modifiye Bileşiklerin Fonksiyonelite Testleri

Oligosakkarit monomeri ile modifiye benzoik asit bileşiklerinin biyolojik aktivite testleri in vitro ortamda HT-29 (ATCC® HTB-38TM) insan kolon adenokarsinoma hücre hattı üzerinde gerçekleştirildi. Bileşiklerin sitotoksisitesi MTT analiziyle, anti-inflamatuar aktiviteleri de NO inhibisyon aktivite testleri ve İnsan tümörü nekroz faktörü α (TNF-α) ELISAKit, İnsan İnterlökin 6 (IL-6) ELISAKit ve İnsan İnterlökin 1β (IL-1β) ELISAKitleri kullanılarak ELİZA testi ile belirlendi.

3.4.1. Hücre Kültürü

Bu çalışmada HT-29 (ATCC® HTB-38™) insan kolon adenokarsinoma hücre serisinin kültürü kullanıldı. Bu hücre hattı Amerikan Tipi Kültür Koleksiyonu'nun önerdiği protokole göre çoğaltıldı. Deneylerde besiyeri olarak McCoy's 5A + %10 FBS + %1 Penisilin-streptomisin'den oluşan karışım kullanıldı.

Bu çalışmada:

1- Hücrelerin çözdürülmesi,
2- Çoğaltılması,
3- Pasajlanması ve
4- Dondurulması (daha sonra yeniden kullanılmak amacıyla) temel hücre kültürü yöntemleri ile gerçekleştirildi.

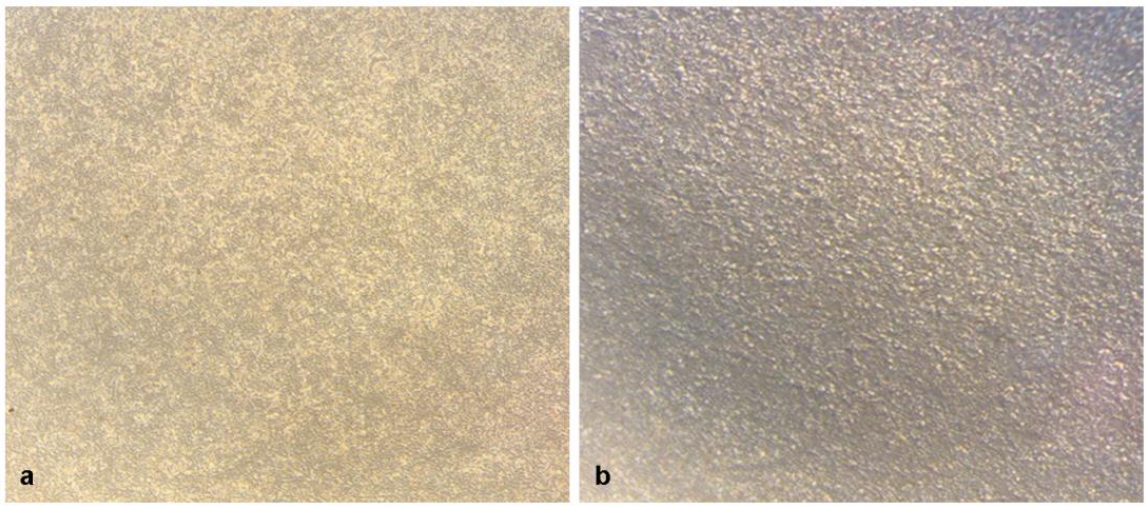
3.4.1.1. Hücrelerin Çözdürülmesi

1. Sıvı azotta dondurulmuş olarak saklanan HT-29 hücrelerini içeren cryo tüpün dış yüzeyi, %70' lik etil alkolle silinerek steril ortam sağlayan laminar flow hava akışlı biyogüvenlik kabinine alındı.
2. Cryo tüp içerisinde donmuş halde bulunan hücreler 37°C' deki su banyosuna transfer edilip burada çözülene kadar kirlenme olasılığını azaltmak amacıyla pens yardımıyla cryo tüpün kapağını sudan uzak tutarak donmuş hücrelerin inkübasyonu sağlandı.
3. Çözdürülen hücreler, 15 mL' lik falkon tüpe aktarıldı ve önceden 37°C' de inkübasyonu sağlanan 5 mL besiyeri çözünmüş hücrelerin üzerine ilave edildi.
4. Ardından, 150 g hücre + besiyeri içeren falcon tüp 1500 rpm devirde 5 dakika santrifüj edildi ve santrifüj sonunda oluşan süpernatant direkt dökülmek suretiyle uzaklaştırıldı.
5. Tüpün altına yapışan hücre pelleti, 5 mL besiyeri ile resüspanse edildi.
6. Takibinde bu süspansiyon, 75 cm^2' lik flask' a aktarıldı (yaşayan hücre oranına göre hücrelerin kolay büyümesi amacıyla 25 cm^2' lik flask' a da ekim yapılabilmektedir) ve 37° C' de %5 CO_2' li inkübatörde büyümeye bırakıldı.
7. Büyümeye bırakılan HT-29 hücrelerinin besiyeri, haftada iki kez olmak üzere yenilendi.
8. Hücrelerin ihtiyacı olan besiyeri değişimi yapılırken flask' ın içindeki eski besiyerinin tamamı steril serolojik pipet kullanılarak elektrikli pipet pompası ile çekilip uzaklaştırıldı.
9. Flask' ın hücre bulunan yüzeyi 3 mL fosfat tamponu (PBS) ile yıkandı ve 3 mL PBS uzaklaştırıldı.

10. Ardından flask' a 10 mL besiyeri eklendi ve hücreler tekrar 37°C' de %5 CO_2' li inkübatörde büyümeye bırakıldı.

3.4.1.2. Hücrelerin Pasajlanması

Ekimi gerçekleştirilen hücreler, 75 cm^2' lik flask' ın yüzeyini kapladıktan sonra pasajlandı.



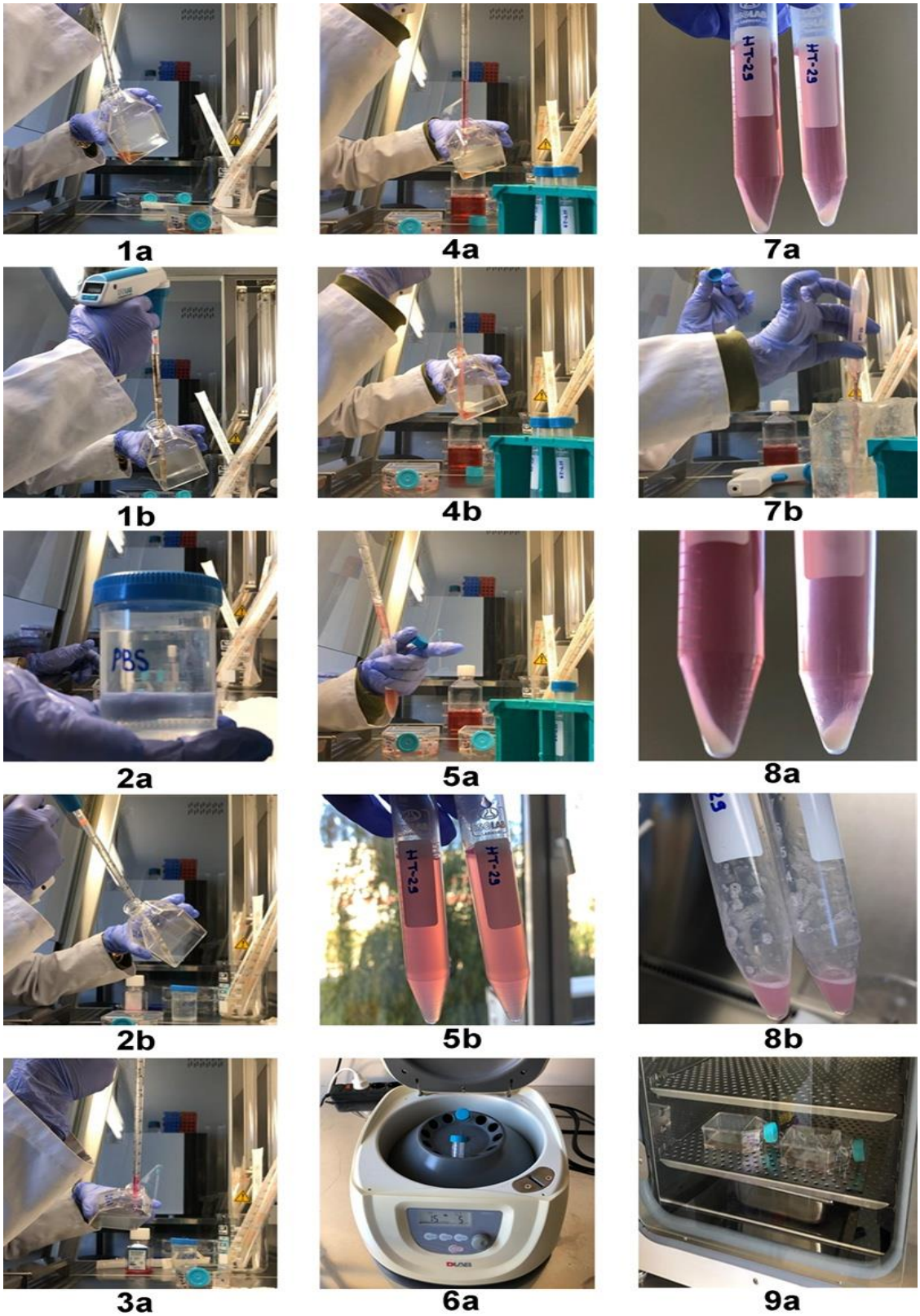
Şekil 3.2. HT-29 insan kolon adenokarsinoma hücrelerinin mikroskop görüntüsü

Pasajlama işlemi için;

1. Flask içindeki HT-29 kültüründen eski besiyeri uzaklaştırıldı (Şekil 3.3.1a ve 1b).
2. Flask' ın HT-29 hücresi bulunan yüzeyi 3 mL PBS ile yıkandı ve hücreler bir miktar PBS ile muamele edildikten sonra PBS ortamdan uzaklaştırıldı (Şekil 3.3.2a ve 2b).
3. Ardından, 75 cm^2' lik flask' a 3 mL Tripsin-EDTA ilave edildi ve hücreler 5-10 dakika inkübasyona bırakıldı (Şekil 3.3.3a).
4. İnkübasyon sonunda flask' ın yüzeyinden ayrılan hücrelerin üzerine 6 mL' lik besiyeri eklendi (Şekil 3.3.4a ve 4b).
5. Tripsin EDTA ve besiyeri ile muamele edilen hücreler flasktan 15 mL'lik falkon tüpe alındı (Şekil 3.3.5a ve 5b).
6. Takibinde falkon tüplere aktarılan hücreler 1500 rpm devirde 5 dakika santrifüj edildi (Şekil 3.3.6a).
7. Santrifüj işleminin ardından oluşan süpernatant falkon tüpten dökülmek suretiyle uzaklaştırıldı (Şekil 3.3.7a ve 7b).

8. Süpernatantın uzaklaştırılmasıyla tüpün dibine yapışan hücre pelleti el vorteksi ile homojen bir hale getirildi ve hücreler üzerlerine 10 mL besiyeri eklenerek resüspanse edildi (Şekil 3.3.8a ve 8b).

9. Ardından 75 cm^2' lik flasklara 10' ar mL besiyeri eklendi ve falkonda süspanse edilmiş hücre hattından 1.5-2 mL alınarak flask' a hücre ekimi yapıldı. Ardından hücreler, 37° C' de %5 CO_2' li inkübatörde büyümeye bırakıldı (Şekil 3.3.9a).



Şekil 3.3. HT-29 hücre kültürünün pasajlanma aşamaları

3.4.1.3. Hücrelerin Dondurulması

Hücrelerin bir kısmı çalışmanın devamında kullanılmak amacıyla stok olarak muhafaza edildi. Bu sebeple:

1. 75 cm^2' lik flaskın yüzeyini kaplayan hücreler Tripsin-EDTA çözeltisi ile tripisinize edildi ve falkon tüpe aktarılarak santrifüjlendi. Ardından hücre sayımı yapıldı.

2. Hücre peletinin üzerine +2 - +8 de soğutulmuş %5' lik DMSO içeren medyumdan vial başına 1.5 mL eklendi ve süspanse edildi.
3. Hücre süspansiyonu 'cryovial' adı verilen önceden etiketlenmiş tüplere konuldu. (Hücre süspansiyonunda 2-4 x 1000000 hücre/mL olması, yeniden çözüldüğünde hücre canlılığının iyi olması açısından önemlidir).
4. Cryo tüpler bir gece -20ºC' de bekletildikten sonra -80ºC' de muhafaza edildi. Bazıları soğuk azot tankına alındı.

3.4.1.4. Hücre Sayımı

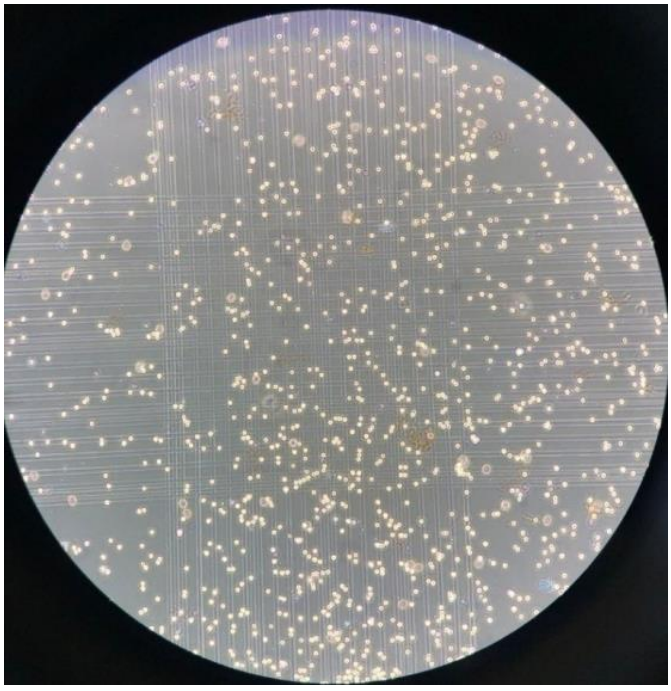
Hücre sayımı, hemositometre yöntemiyle yapıldı. Hemositometre ile hücre sayımının prensibi, 0.1 mm^3 hacimde sayım yapılmasına dayanmaktadır. Hemositometredeki sayım odacıklarında: 9 adet büyük kare mevcuttur. Her büyük karenin içerisinde 16 adet küçük kare vardır ve her bir büyük karenin yüzey alanı 1mm^2, kamaranın derinliği ise 0.1 mm' dir. Bir küçük karenin kenar uzunluğu 1/20 mm ve derinliği 1/10 mm' dir. Dolayısıyla, bir sayım alanının hacmi 0.1 mm^3' tür. Hücre sayımı, hemositometrenin kenar kısımda bulunan karelerdeki hücreler sayılarak yapıldı. Sayım sonucu elde edilen verilen, cm^3 (mL) cinsinden verildiği için sayım sonucu 10.000 ile çarpıldı (10x1000). Dolayısıyla toplam hücre sayısını hesaplamak amacıyla eşitlik 3.1 kullanıldı.

1 ml' deki hücre sayısı = Ortalama canlı hücre sayısı x seyreltme faktörü x 10.000 (Eşitlik 3.1)

Hücre sayımı için:

1. 75 cm^2' lik flask içindeki ortam aspire edildi ve 3 mL PBS ile yıkandı. PBS, aspire edildikten sonra 3 mL %0.25' lik Tripsin-EDTA eklendi ve hücreler 37ºC' de 5-10 dakika inkübe edildi.

2. İnkübasyon sonrasında flask' ın yüzeyinden ayrılan hücrelerin üzerine 6 mL besiyeri eklendi ve flask' tan 15 mL' lik falkon tüpe aktarıldı.
3. Ardından 1500 rpm devirde 5 dakika santrifüj edilerek süpernatant uzaklaştırıldı. Hücre pelleti, 5 mL besiyeri ile resüspanse edildi.
4. Ardından, steril deney tüpüne hücre çözeltisinden 10 µL alındı, üzerine 10 µL tripan mavisi ilave edildi ve pipetaj yapıldı.
5. Sonrasında, hücre-tripan mavisi çözeltisinden 10 µL alınarak örnek uygulama noktasından mikropipet yardımıyla hemositometre üzerine yüklenerek çözeltinin sayım odacığının içerisine girmesi sağlandı.
6. Takibinde hücre sayımı iki tekrarlı olacak şekilde yapıldı, ortalama canlı hücre sayısı belirlendi.
7. Hücre sayımı, her MTT hücre proliferasyon analizi ve tüm hücre kültürü çalışmaları için yapıldı.



Şekil 3.4. HT-29 hücre hattı için Thoma lamında sayım örneği

3.4.2. Hücre Canlılığı Testi (MTT testi)

Sentezlenen bileşiklerin HT-29 kolon kanseri hücrelerinin çoğalma aktivitesi üzerine etkileri MTT analizi ile belirlendi. MTT tahlili, tetrazolyum tuzu 3-(4,5-dimetiltiazol-z-il)-2, 5-difeniltetrazolyum bromürün indirgenmesine dayanmaktadır.

MTT ayıracı, canlı hücrelerde mor renkli formazon tuzu oluşturduğu için, hücre canlılığına kolorimetrik yöntemle bakıldı. Yöntem aşağıda belirtildiği şekilde uygulandı.

Daha önceden yukarıda belirtilen prosedüre göre çoğaltılmış HT-29 kolon kanseri hücreleri tripsinize edildi ve santrifüj edildi. Ardından yeni besiyeri (McCoy 5A, 100 µL) eklenerek hücre sayımı yapıldı. Sonrasında HT-29 hücreleri 96 kuyucuklu plakanın her kuyucuğuna 10000 hücre olacak şekilde ekildi ve hücrelerin plate yüzeyine yapışması için 24 saat boyunca inkübe edildi. Ertesi gün kuyucukların içindeki medium uzaklaştırıldı. Yeni sentezlenen bileşikler (5, 10, 50 ve 100 µM) ve kurkumin (2,5, 5 ve 10 µM) %1' lik DMSO' da çözülerek farklı konsantrasyonlarda hücrelere uygulandı. Kuyucukların total hacmi 200 µL olacak şekilde ayarlandı. Daha sonra, 24, 48 ve 72 saat süreyle 37°C' de, %5 CO_2 ve %95 nem ortamında inkübe edildi. Hidrojen peroksit (H_2O_2) kimyasalı 24 ve 48 saat boyunca hücre hattına uygulandı. İnkübasyon sonrası medium uzaklaştırıldı. Kimyasal uygulamasının ardından, 1 mg/mL PBS içinde çözülmüş MTT çözeltisinden kuyucuklara 100 µL besiyeri + 50 µL MTT olacak şekilde kondu ve 37°C' de, %5 CO_2 ve %95 nem ortamında 4 saat süreyle etüvde inkübe edildi. Bu süre sonunda MTT sıvısı besiyeriyle birlikte uzaklaştırıldı. Boş kuyucuklara 200 µL saf %100' lük DMSO yüklendi. Sonrasında, mikroplaka okuyucusunda (Thermo Scientific Multiscan GO) 570 nm' de absorbans değerleri ölçüldü ve hücre canlılığı hesaplandı. İnflamasyon deneylerinde kullanılacak optimum H_2O_2 dozu 800 µM olarak belirlendi. Deneyler 3 tekrar olarak gerçekleştirildi.

Hücre canlılığı/çoğalma hızı % MTT absorpsiyonu olarak aşağıdaki şekilde hesaplandı.

% Hücre canlılığı= (Ortalama deneysel absorbans/ortalama kontrol absorbans) x100 (Eşitlik 3.2)

Veriler ortalama ± SE olarak verildi. * $P<0.05$, Tek yönlü ANOVA testi ve Dunnet testi uygulandı.

3.4.3. Nitrik Oksit (NO) Tarama Testi

Sentezlenen bileşiklerin anti-inflamatuar aktivitesi NO üretimini baskılama yetenekleri ölçülerek belirlendi. NO üretim seviyeleri kültür süpernatantlarında Gries

reaksiyonu aracılığıyla belirlendi. On iki kuyucuklu bir plakaya kuyucuk başına 150.000 hücre olacak şekilde hücre ekimi yapıldı ve hücrelerin plakaya yapışmaları için 36 saat inkübe edildi. Ardından mevcut besiyeri serumsuz besiyeri ile değiştirildi. On iki saat inkübasyondan sonra HT-29 kolon hücreleri üzerine yeni sentezlenen bileşikler 5, 10, 50, 100 ve 500 µM konsantrasyonlarda ve toplam kuyucuk hacmi 1 mL olacak şekilde uygulandı. Yeni sentezlenen bileşiklerin uygulanmasından 6 saat sonra H_2O_2 (800 µM) uygulandı. Hücre kontrol ve yeni sentezlenen bileşiklerin kontrol kuyucuklarına bu basamakta H_2O_2 eklenmedi. Her bir grup için H_2O_2, sentezlenen bileşikler, H_2O_2+sentezlenen bileşikler ve kontrol kombinasyonları oluşturuldu. H_2O_2 uygulama saati dikkate alınarak hücreler 48 saat boyunca serumsuz besiyerinde inkübe edildi. Bu sürenin sonunda hücreler 12000 rpm' de 5 dk santrifüj edildi ve elde edilen süpernatant NO tespiti için kullanıldı. NO deneyinde kullanılan Griess reaktifi, karanlıkta hazırlandı ve karanlıkta 2-8ºC' de saklandı. NO analizi için, 50 µL Griess reaktifi (%2.5 fosforik asit içinde %1 sülfanilamid ve %0.1 N-(1-naftil)etilendiamin dihidroklorür), 50 µL kültür ortamı ile karıştırıldı. Her numuneden 50 µL kültür süpernatantı Griess reaktifinin 50 µL' si ile karıştırılarak, 96 kuyucuklu bir plakada 10 dk boyunca karanlıkta (37°C' de) inkübe edildi. Sonra mikroplaka okuyucusu kullanılarak absorbans 540 nm' de okundu. Standart sodyum nitrit çözeltisi kullanımdan hemen önce taze hazırlandı ve oda sıcaklığında karanlıkta muhafaza edildi. Sonra süpernatantın NO konsantrasyonu taze hazırlanmış sodyum nitrit ($NaNO_2$: 0 ila 100 uM; veya Standartlarımız: 0-100 veya 200 µM) kullanılarak hazırlanan standart eğriye göre belirlendi. Tüm deneyler birbirinden bağımsız olarak üç kez tekrarlandı ve veriler ortalama µM NO ± SE konsantrasyonu olarak elde edildi.

Yüzde inhibisyon aşağıdaki formüle göre % olarak hesaplandı.

$$\%\ \text{İnhibisyon} = (NO_{\text{kontrol}} - NO_{\text{örnek}}) / (NO_{\text{kontrol}} - NO_{\text{kör}}) \times 100 \qquad \text{(Eşitlik 3.3)}$$

3.4.4. HT-29 İnsan Kolon Hücrelerinde H_2O_2 ile İn vitro Deneysel Kolit Modeli Oluşturulması ve TNF-α, IL-6 ve IL-1β Üretiminin Belirlenmesi

Sentezlenen bileşiklerin anti-inflamatuar etkilerini değerlendirmek için H_2O_2 ile indüklenmiş HT-29 hücrelerinde inflamatuar sitokinlerin seviyeleri belirlendi. Deneysel kolit modeli oluşturmak için HT-29 hücreleri 12 kuyucuklu bir plakaya kuyucuk başına 150.000 hucre olacak şekilde ekildi ve hucrelerin plakaya yapışmalarını sağlamak icin 36 saat boyunca inkube edildi. Sonra, ortamdaki besiyeri serumsuz besiyeri ile değiştirilerek hücreler 12 saat boyunca serumsuz besiyeri ortamında inkübe edildi. Bu sürenin ardından yeni sentezlenen bileşikler çeşitli konsantrasyonlarda (5, 10, 50, 100 ve 500 μM) HT-29 kolon hücreleri üzerine eklendi ve toplam kuyucuk hacmi 1 mL' ye tamamlandı. Yeni sentezlenen bileşiklerin eklenmesinden 6 saat sonra H_2O_2 (800 μM) ilavesi yapılarak kolon hücreleri inflamasyon oluşturmak için uyarıldı. Deney grupları aşağıda belirtildiği gibi Grup1-Grup4 olmak üzere 4 grup olarak planlandı. Pozitif kontrol olarak kurkumin kullanıldı. Hücreler H_2O_2 uyarımından sonra 48 saat boyunca serumsuz besiyerinde inkübe edildi. Bu sürenin sonunda hücrelerin 12000 rpm' de 5 dk santrifüj edilmesiyle elde edilen süpernatant sitokin tespiti için kullanıldı.

Kolit uyarılmış kolon hücrelerinden salgılanan TNF-α, IL-6 ve IL-1β seviyeleri, üretici firmanın talimatları doğrultusunda enzime bağlı bir immüno-sorbent analizi (ELISA) ile belirlendi.

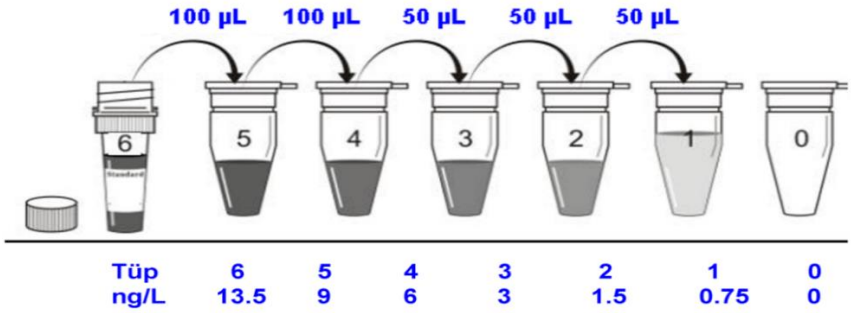
Deney grupları aşağıdaki şekilde tasarlandı:

Grup 1: Kontrol grubu
Grup 2: H_2O_2 eklenmiş grup
Grup 3: OS' in ünitesi ile modifiye edilmiş benzoik asit bileşikleri eklenmiş grup
Grup 4: H_2O_2 ile indüklenmiş HT-29 hücrelerine OS' in ünitesi ile modifiye edilmiş benzoik asit bileşikleri eklenmiş grup

1. Yıkama tamponunun hazırlanması: Yıkama tamponu oda sıcaklığına ısıtıldı ve kristaller tamamen eriyene kadar hafifçe karıştırıldı. 600 mL yıkama tamponu hazırlamak için 20 mL yıkama tamponu konsantresi deiyonize veya damıtılmış su ile 30 kat seyreltildi.

2: Standart hazırlanması:

Standart seyreltme: Her tüpe 50 µL standart seyreltici pipetlendi. Beşinci tüpe 100 µL standart (13,5 ng/L) pipetlendi. Beşinci tüpten 100µl dördüncü tüpe aktarıldı. Dördüncü tüpten üçüncü tüpe 50 µL pipetlendi ve Şekil 3.5.' teki gibi seyreltme serileri oluşturuldu. Seyreltilmemiş standart, yüksek standart olarak değerlendirildi (13,5 ng/L). Sıfır standart-boş kuyu olarak değerlendirildi (0 ng/L).



Şekil 3.5. Eliza standartlarını seyreltme oranları

Deneyde kullanılacak tüm reaktifler ve çalışma standartları üretici firmanın talimatında belirtildiği gibi hazırlandıktan sonra, 96 kuyucuklu plakada kullanılacak kuyu sayısı ve yerleşim düzeni belirlendi. Standart kuyuyu test etmek için standart 50 µL pipetlendi. Test numune kuyusuna 40 µL pipet numune seyrelticisi, ardından 10 µL test numunesi (numune son seyreltme 5 kattır) eklendi. Kuyulara numune pipetlendi, kuyu duvarına mümkün olduğunca dokunmadan hafifçe karıştırıldı. Sonra, plaka test kitinden çıkan yapışkan şerit ile örtülerek, 37°C' de 30 dakika inkübe edildi. Ardından, yıkama solüsyonu distile su ile 30 kat seyreltilerek yıkama işlemine geçildi. Yıkama işlemi için yapışkan şerit açılarak, kuyucuklardaki sıvı uzaklaştırıldı, yıkama tamponu her kuyuya pipetlendi, 30 saniye sonra boşaltıldı ve bu işlem 5 kez tekrarlandı. Sonrasında, enzim ekleme aşamasına geçildi. Boş kuyu hariç her kuyucuğa HRP-Konjugat reaktifi 50 µl pipetlendi. Ardından plaka test kitinden çıkan yapışkan şerit ile örtülerek, tekrar 37°C' de 30 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonrası tekrar yıkama işlemi uygulandı. Sonraki adımda, test kitinden çıkan Kromojen Solüsyonu A 50 µL ve Kromojen Solüsyonu B 50 µL her kuyuya pipetlendi, renk oluşumu gözlenene kadar ışıktan koruyarak 37°C' de 15 dakika beklendi. Ardından her kuyucuğa 50 µL durdurma solüsyonunu pipetlenerek, reaksiyon durduruldu (mavi renk sarıya dönüşür). Boş kuyu sıfır olarak alındı. Durdurma çözeltisi pipetlendikten sonra 15 dakika içinde 450 nm' de absorbansı okundu.

Sonuç hesaplanması: Standart konsantrasyonu yatay olarak, OD değeri dikey olarak alınarak, standart eğri çizildi. Numune OD değerine göre karşılık gelen konsantrasyonu numune eğrisi ile seyreltme çarpanı çarpılarak hesaplandı. Standart eğrinin standart konsantrasyon ve OD değeri ile regresyon denklemi, denklemdeki numune OD değeri ile, numune konsantrasyonunu seyreltme faktörü ile çarparak hesaplandı, sonuç numunenin gerçek konsantrasyonudur.

3.5. İstatistiksel Analiz

Analizler sonucunda elde edilen verilerin test edilmesinde JMP (JMP 10 with SAS 9.4 versiyon) yazılımı kullanıldı. Üç bağımsız deneyin ortalaması ± standart hata (SE) olarak sunuldu. P değeri <0.05 olan veriler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Her grubun ortalamaları arasındaki farklar tek yönlü varyans analizi (One-way ANOVA) ile test edilirken, kontrol grubuyla yapılan karşılaştırmalar Dunnet' s test ile yapıldı.

BÖLÜM 4

4. SONUÇLAR

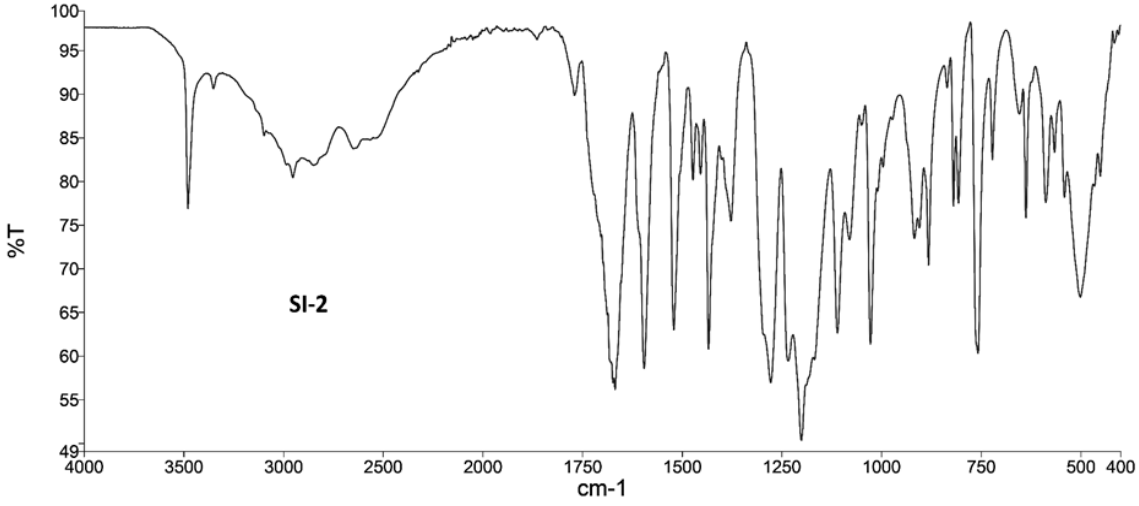
4.1. Sentezlenen Oligosakkarit Monomer Üniteleri ile Modifiye Bileşiklerin Yapı Tayini

Sentezlenen oligosakkarit monomeri ile modifiye benzoik asit bileşiklerinin yapıları, bağlanması ve moleküler ağırlık gibi özellikleri FTIR, LC/MS ve ^{1}H-NMR analizleri ile belirlendi.

4.1.1. FTIR Analiz Sonuçları

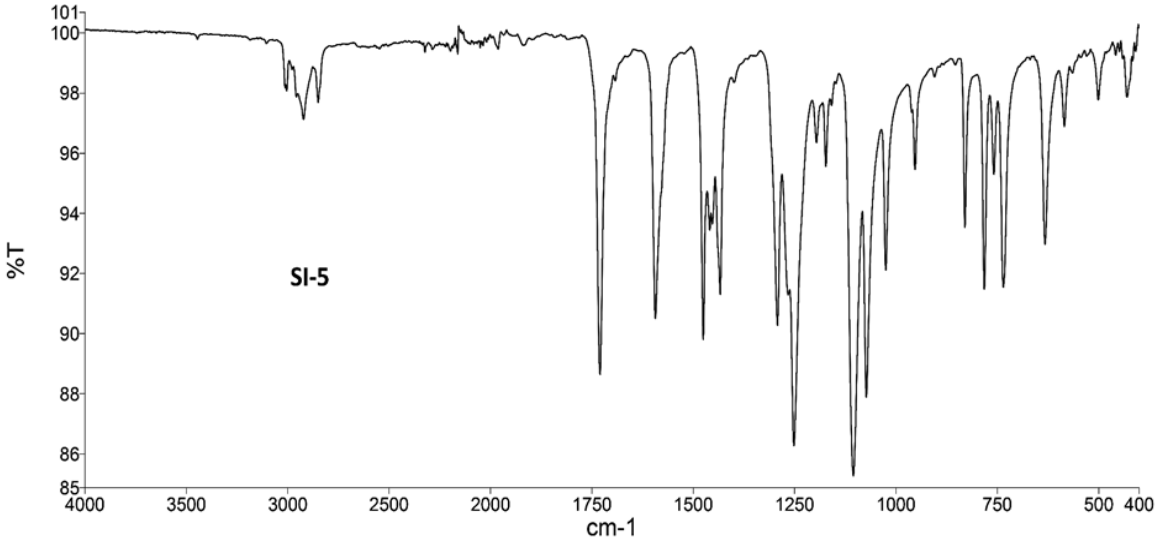
Benzoik asit türevlerinin oligosakkarit monomeri olan glukozamin üniteleriyle modifiye edilmesi sonucu sentezlenen bileşiklerinin ATR-FTIR cihazıyla alınan kızılötesi spektrumları Şekil 4.1-Şekil 4.4' te sunulmaktadır.

SI2 bileşiğinin FTIR spektrumu incelendiğinde 3482 cm^{-1} -OH grubuna ait gerilim piki, 3354 cm^{-1} -NH grubuna ait gerilim piki, 3099-2851 cm^{-1} -CH gruplarına ait gerilim pikleri, 1704 cm^{-1} -CONH yapısındaki karbonil gerilim piki, 1472-1433 cm^{-1} C-H eğilim pikleri, 1277-1200 cm^{-1} C-O gerilim pikleri ve 757 cm^{-1} trisübstitüe benzene ait C-H eğilim piki gözlenmiştir (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. Sentezlenen SI2 bileşiğinin IR spektrumu

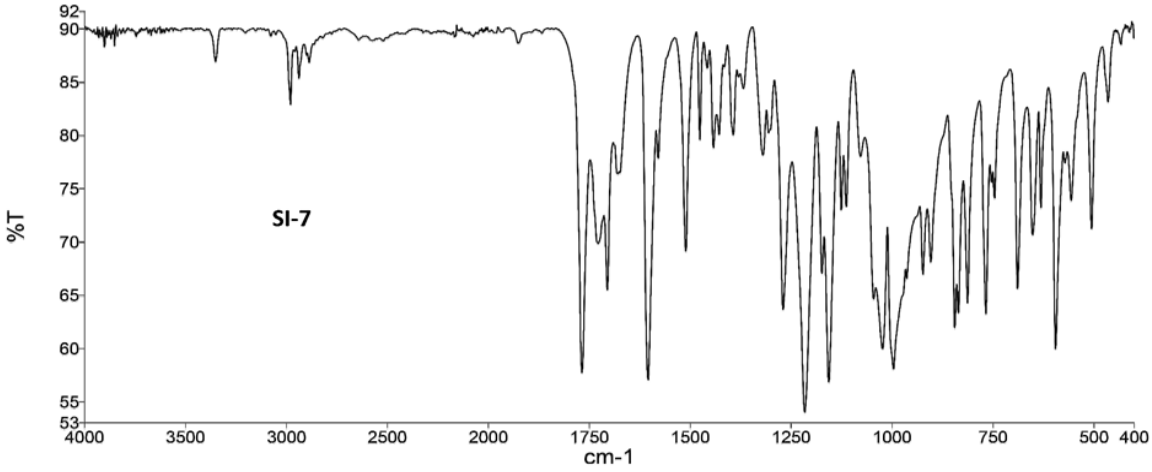
SI5 bileşiğinin FTIR spektrumu incelendiğinde 3006-2851 cm^{-1} -CH gruplarına ait gerilim pikleri, 1730cm^{-1} -CONH yapısındaki karbonil gerilim piki, 1474-1433 cm^{-1} C-H eğilim pikleri, 1291-1195 cm^{-1} C-O gerilim pikleri ve 757 cm^{-1} trisübstitüe benzene ait C-H eğilim piki gözlenmiştir (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. Sentezlenen SI5 bileşiğinin IR spektrumu

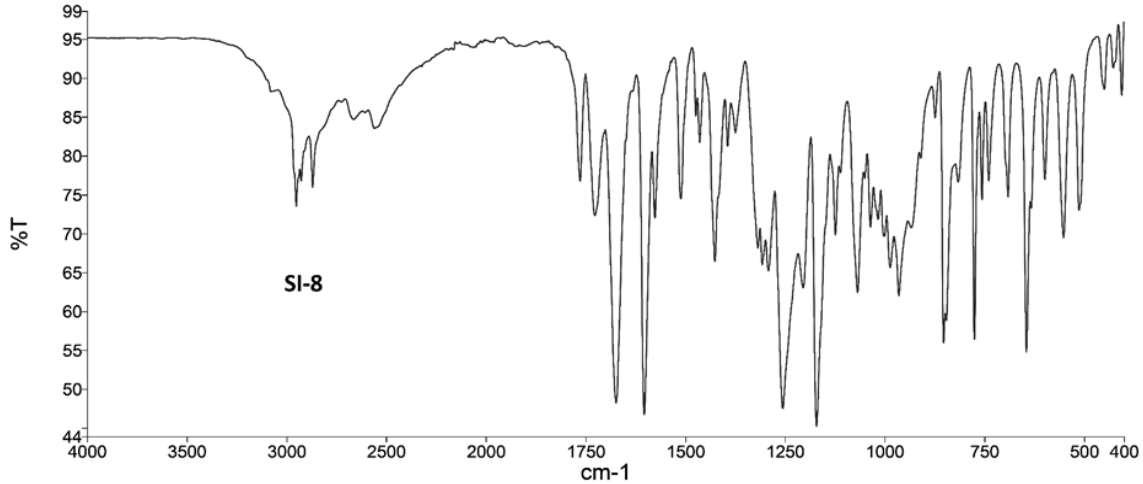
SI7 bileşiğinin FTIR spektrumu incelendiğinde 3353 cm^{-1} -NH grubuna ait gerilim piki, 3079-2889 cm^{-1} -CH gruplarına ait gerilim pikleri, 1768 cm^{-1} -CONH yapısındaki karbonil gerilim piki, 1475-1428 cm^{-1} C-H eğilim pikleri, 1269-1215 cm^{-1} C-O gerilim pikleri ve 843 cm^{-1} disübstitüe benzene ait C-H eğilim piki gözlenmiştir (Şekil

4.3).



Şekil 4.3. Sentezlenen SI7 bileşiğinin IR spektrumu

SI8 bileşiğinin FTIR spektrumu incelendiğinde 3081-2872 cm^{-1} -CH gruplarına ait gerilim pikleri, 1674 cm^{-1} -CONH yapısındaki karbonil gerilim piki, 1474-1394 cm^{-1} C-H eğilim pikleri, 1255-1171 cm^{-1} C-O gerilim pikleri ve 852 cm^{-1} disübstitüe benzene ait C-H eğilim piki gözlenmiştir (Şekil 4.4).



Şekil 4.4. Sentezlenen SI8 bileşiğinin IR spektrumu

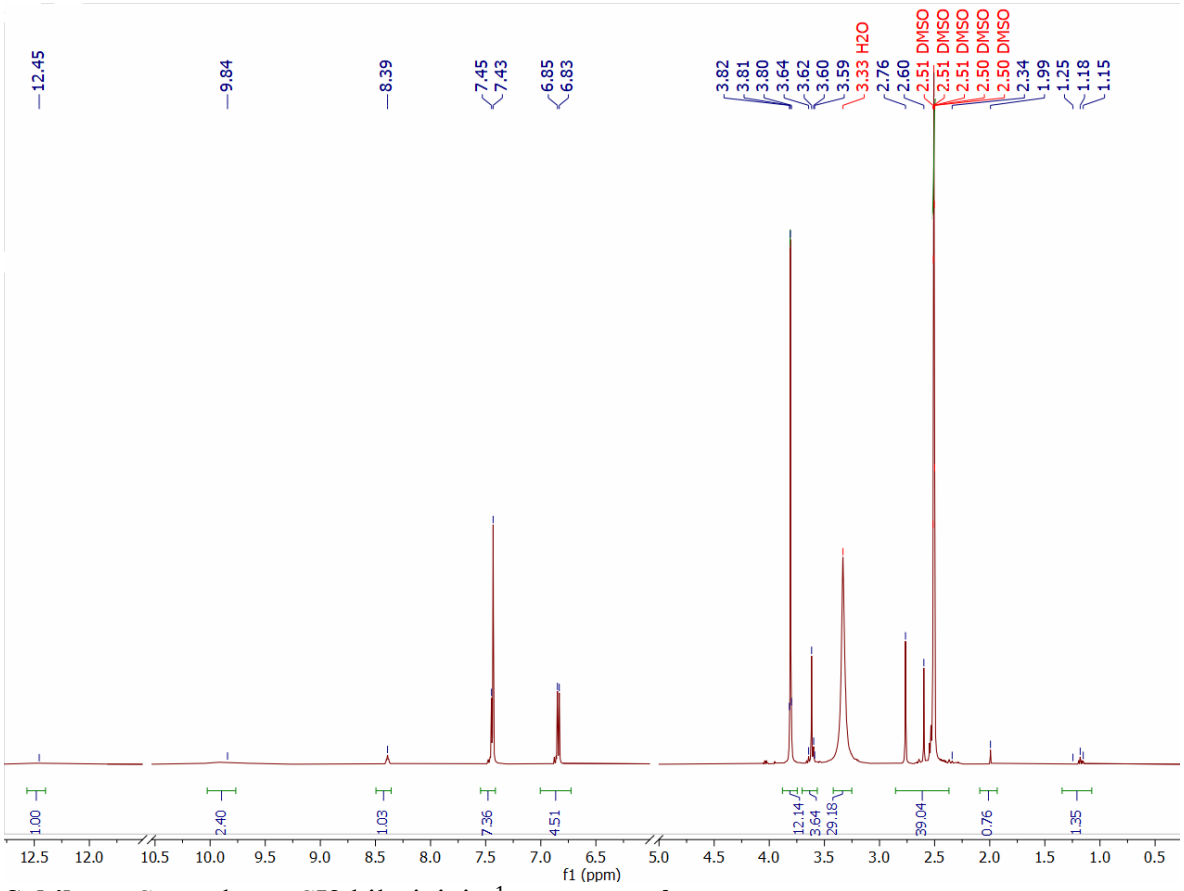
4.1.2. ^{1}H-NMR Analiz Sonuçları

Benzoik asit türevlerinin oligosakkarit monomeri olan glukozamin üniteleriyle modifiye edilmesiyle sentezlenen bileşiklerin yapı aydınlatılmasında ^{1}H-NMR analizine başvurulmuştur. Tüm ^{1}H-NMR spektrumları, çözücü olarak hekzadötorodimetil sülfoksit

(DMSO-d6) ve dahili standart olarak tetrametilsilan (TMS) kullanılarak elde edildi (Şekil 4.5-Şekil 4.8).

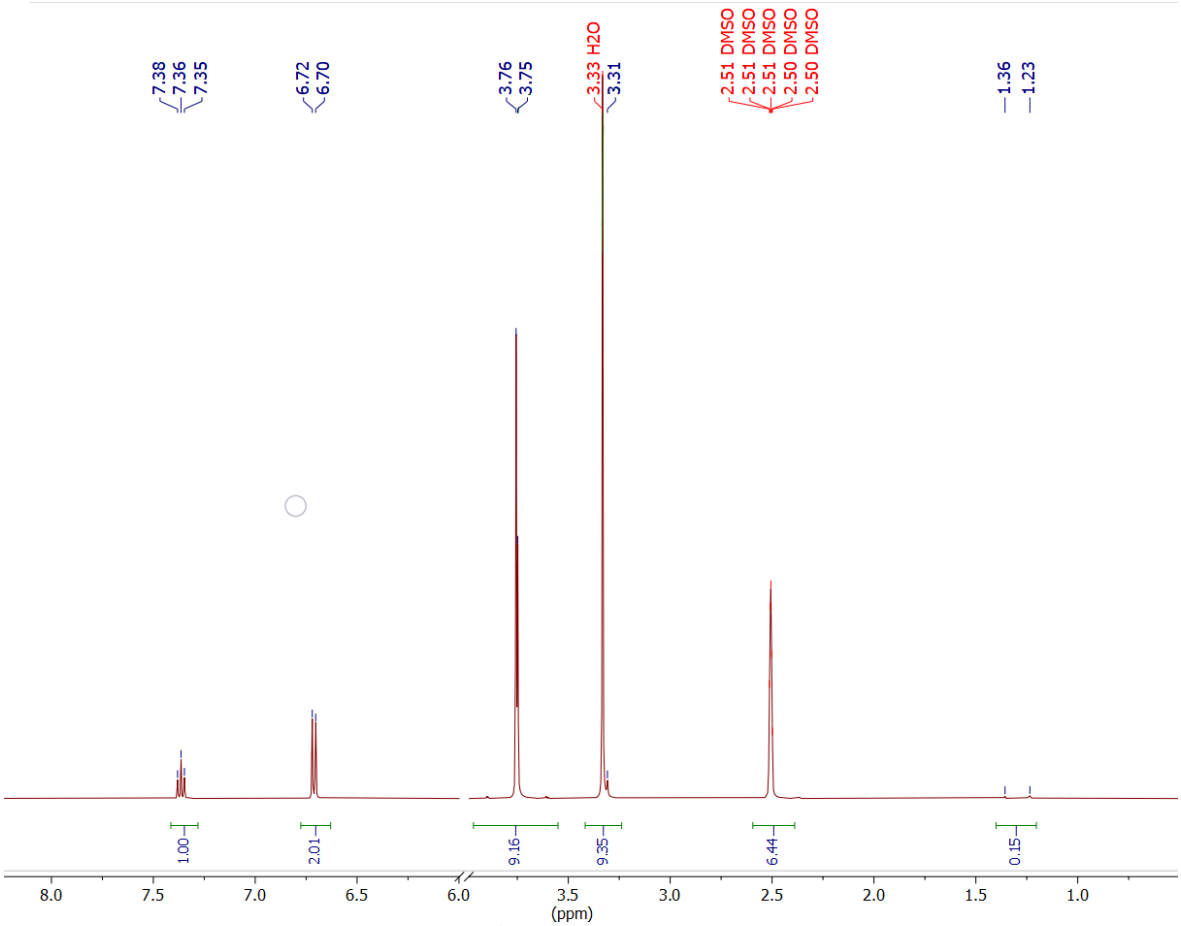
SI2, SI5, SI7 ve SI8 bileşiklerinin DMSO-d6 ortamında alınan ^{1}H-NMR spektrumlarında çözücüye ait kimyasal kaymalar 2.50 ppm civarında gözlenirken, su piki 3.33 ppm' de gözlenmiştir.

SI2 bileşiğinin NMR spektrumu incelendiğinde, 2.60-2.76 ppm' de singlet şeklindeki pikler piran halkasındaki C-H' lere, 3.59-3.64 ppm' de dublet şeklideki pikler -CH_2 grubuna, 3.81 ppm' de singlet şeklindeki pik -OCH_3 grubuna, 6.84 ve 7.44 ppm' lerde dublet ve singlet şeklindeki pikler benzendeki C-H' lere, 12.45 ppm' de yayvan singlet şeklindeki pik -NH grubuna karşılık olarak gözlenmiştir (Şekil 4.5).



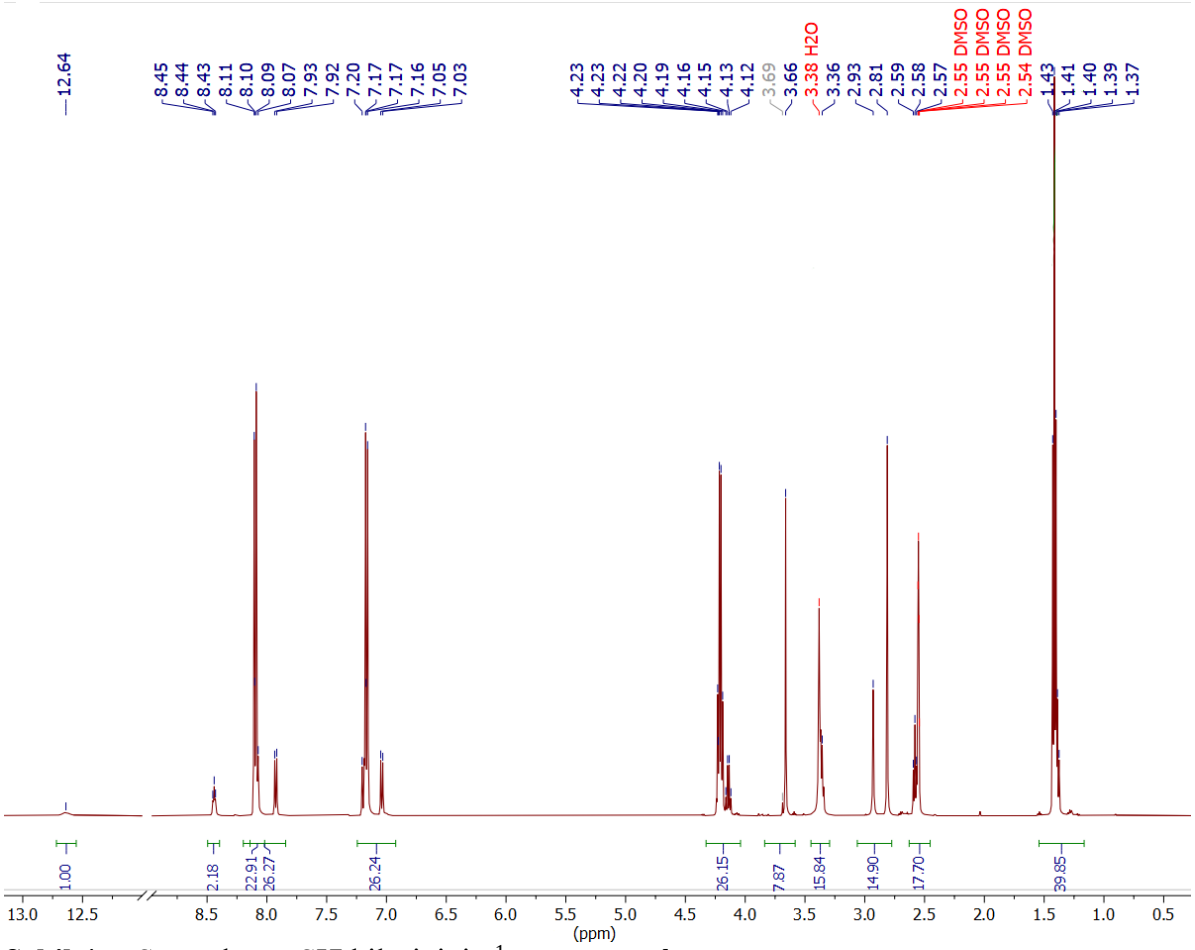
Şekil 4.5. Sentezlenen SI2 bileşiğinin ^{1}H-NMR spektrumu

SI5 bileşiğinin NMR spektrumu incelendiğinde, 3.33 ppm' de singlet şeklindeki pik piran halkasındaki C-H' lere, 3.75 ppm' de singlet şeklideki pik -OCH_3 gruplarına, 6.71 ve 7.36 ppm' lerde dublet ve triplet şeklindeki pikler benzendeki C-H' lere karşılık olarak gözlenmiştir (Şekil 4.6).



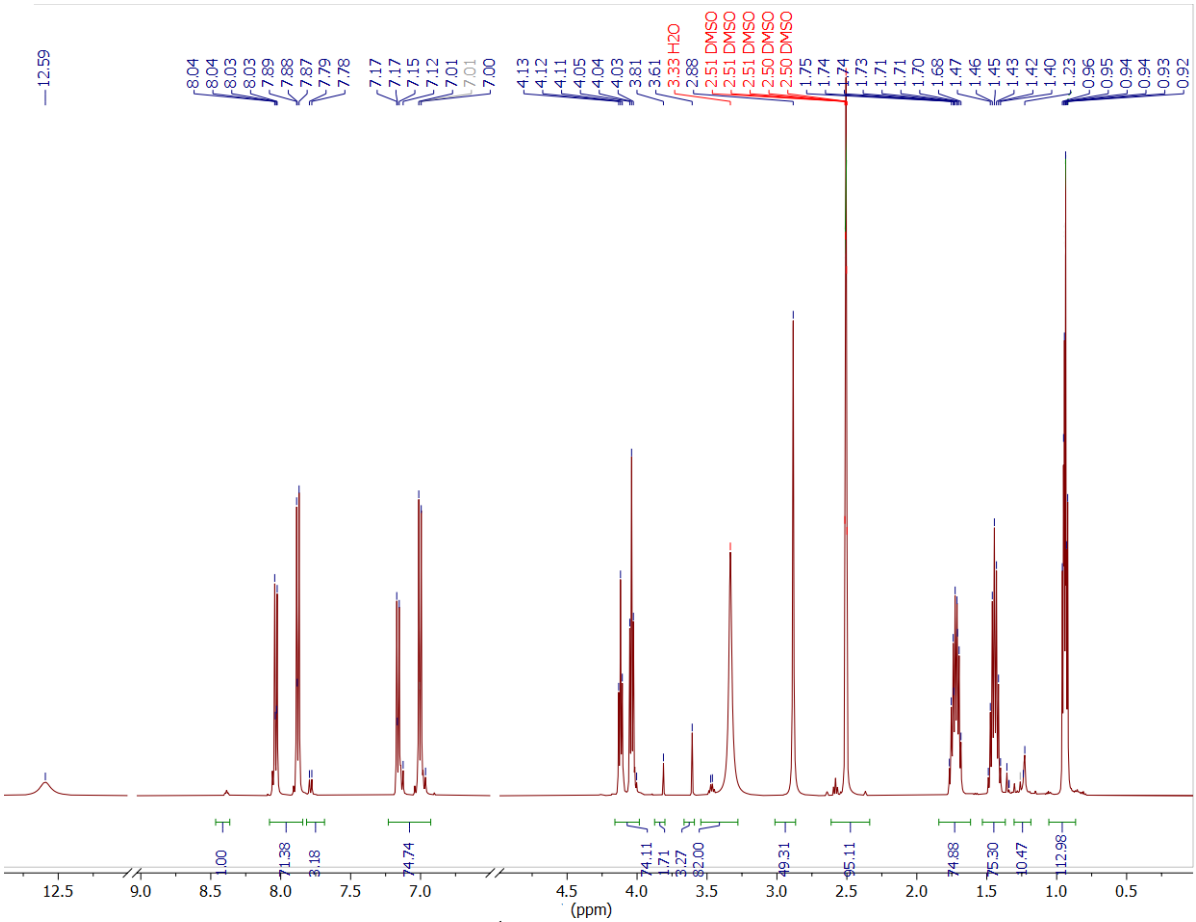
Şekil 4.6. Sentezlenen SI5 bileşiğinin ^{1}H-NMR spektrumu

SI7 bileşiğinin NMR spektrumu incelendiğinde, 1.37-1.43 ppm' de multiplet şeklindeki pikler -OCH_2CH_3 grubundaki -CH_3 yapısına, 2.57-2.93 ppm' de singlet şeklindeki pikler piran halkasındaki C-H' lere, 3.36-3.66 ppm' de dublet şeklindeki pikler -CH_2 grubuna, 4.12-4.23 ppm' de multiplet şeklindeki pikler -OCH_2CH_3 grubundaki -CH_2 yapısına, 7.03-7.20 ve 7.92-8.45 ppm' lerde dublet-dublet şeklindeki pikler benzendeki C-H' lere, 12.64 ppm' de yayvan singlet şeklindeki pik -NH grubuna karşılık olarak gözlenmiştir (Şekil 4.7).



Şekil 4.7. Sentezlenen SI7 bileşiğinin ^{1}H-NMR spektrumu

SI8 bileşiğinin NMR spektrumu incelendiğinde, 0.92-0.96 ppm' de multiplet şeklindeki pikler -$OCH_2CH_2CH_2\underline{CH_3}$ grubundaki -CH_3 yapısına, 1.40-1.47 ppm' de multiplet şeklindeki pikler -$OCH_2CH_2\underline{CH_2}CH_3$ grubundaki -CH_2 yapısına, 1.68-1.73 ppm' de multiplet şeklindeki pikler -$OCH_2\underline{CH_2}CH_2CH_3$ grubundaki -CH_2 yapısına, 2.88 ppm' de singlet şeklindeki pik piran halkasındaki C-H' lere, 3.61-3.81 ppm' de dublet şeklideki pikler -CH_2 grubuna, 4.03-4.13 ppm' de multiplet şeklindeki pikler -$O\underline{CH_2}CH_2CH_2CH_3$ grubundaki -CH_2 yapısına, 7.03-7.20 ve 7.92-8.45 ppm' lerde dublet-dublet şeklindeki pikler benzendeki C-H' lere, 12.59 ppm' de yayvan singlet şeklindeki pik -NH grubuna karşılık olarak gözlenmiştir (Şekil 4.8).

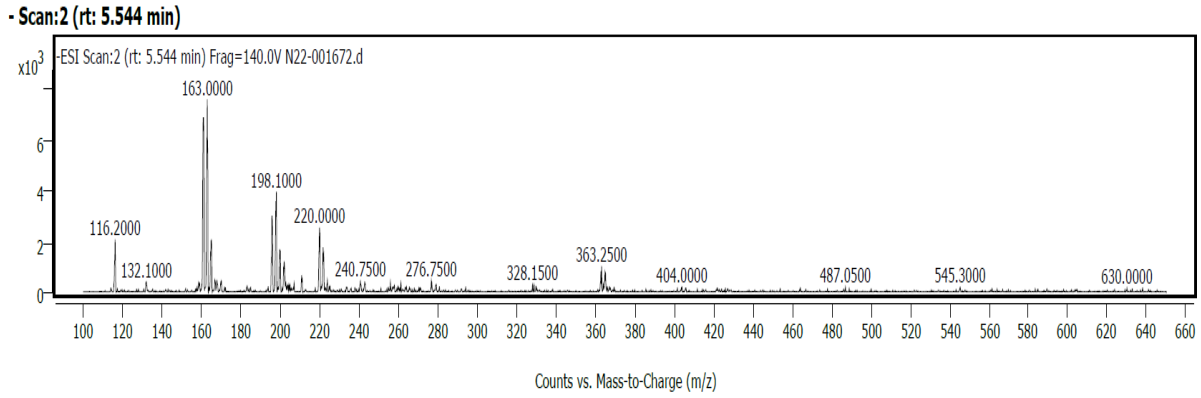


Şekil 4.8. Sentezlenen SI8 bileşiğinin ^{1}H-NMR spektrumu

4.1.3. LC/MS Analiz Sonuçları

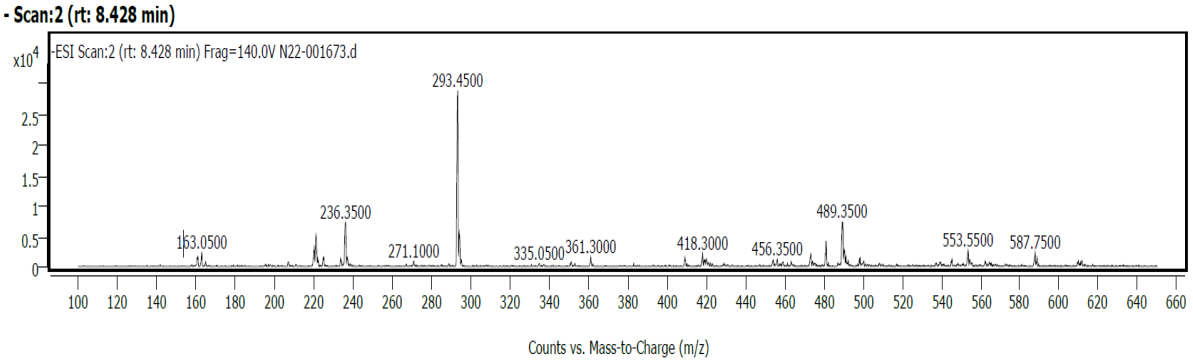
Benzoik asit türevlerinin oligosakkarit monomeri olan glukozamin üniteleriyle modifiye edilmesi sonucu sentezlenen bileşiklerin LC/MS cihazıyla alınan kütle spektrumları Şekil 4.9-Şekil 4.12' de sunulmaktadır.

SI2 bileşiğinin (MA: 329,31) kütle spektrumu incelendiğinde 328 m/z M^{+}-1 piki moleküler iyon pikini göstermektedir. 163 m/z piki M^{+}-166 glikoz fragmanını, 198m/z M^{+}-163+18 vanilik asidin amidine ait fragmanı bünyesinde su molekülü taşıyarak göstermektedir (Şekil 4.9).



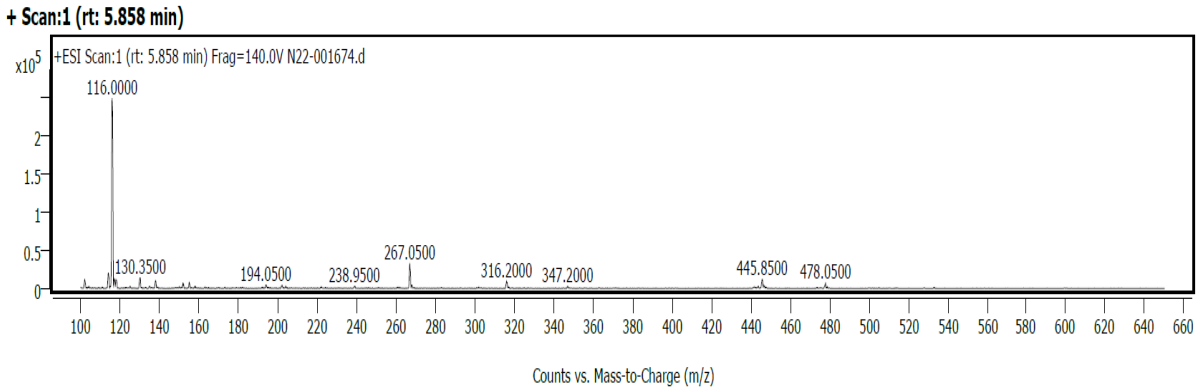
Şekil 4.9. Sentezlenen SI2 bileşiğinin kütle spektrumu

SI5 bileşiğinin (MA: 343,33) kütle spektrumu incelendiğinde 361 m/z M^+-1+18 piki moleküler iyon pikini bünyesinde su molekülü taşıyarak göstermektedir. 163 m/z piki M^+-166 glikoz fragmanını göstermektedir (Şekil 4.10).



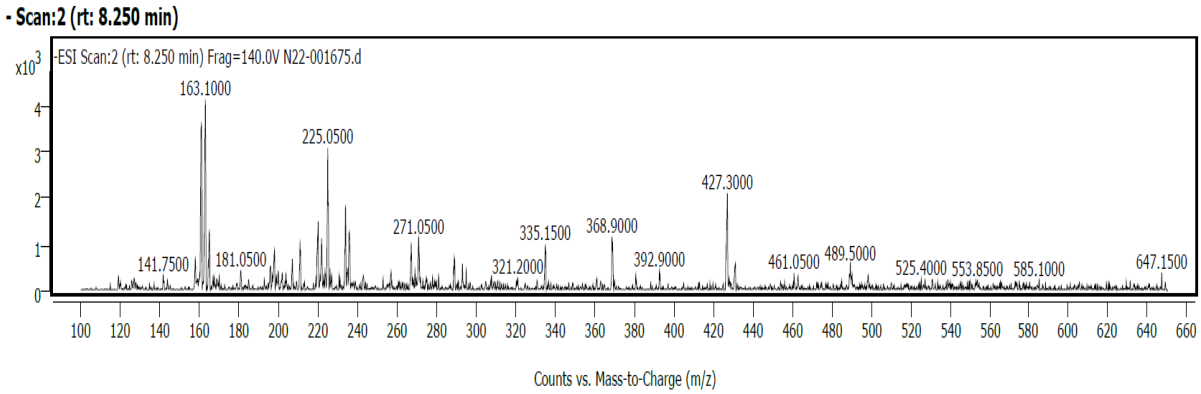
Şekil 4.10. Sentezlenen SI5 bileşiğinin kütle spektrumu

SI7 bileşiğinin (MA: 327,33) kütle spektrumu incelendiğinde 347 m/z M^++1+18 piki moleküler iyon pikini bünyesinde su molekülü taşıyarak göstermektedir. 116 m/z piki M^+-211 dihidrokspiran fragmanını, 267 m/z M^+-60 ($-C_2H_4O_2$) molekülden hidroksi ve etoksi gruplarının ayrılmasıyla oluşan fragmanı göstermektedir (Şekil 4.11).



Şekil 4.11. Sentezlenen SI7 bileşiğinin kütle spektrumu

SI8 bileşiğinin (MA: 355,39) kütle spektrumu incelendiğinde 335 m/z M^{+1}-1-18 piki moleküler iyon pikini göstermektedir. 163 m/z piki M^{+}-166 glikoz fragmanını, 271 m/z M^{+}-84 ($-CH_3O_4H_4$) molekülden dört hidroksi ve metil grubunun ayrılmasıyla oluşan fragmanı göstermektedir (Şekil 4.12).



Şekil 4.12. Sentezlenen SI8 bileşiğinin kütle spektrumu

4.2. Sentezlenen Oligosakkarit Monomer Üniteleri ile Modifiye Bileşiklerin Fonksiyonelite Test Sonuçları

Sentezlenen bileşiklerin fonksiyonel özellikleri MTT, NO ve Elisa metotlarıyla belirlendi ve sonuçları aşağıda verildi.

4.2.1. MTT Testi Sonuçları

Bu çalışma kapsamında sentezlenen SI2, SI5, SI7, SI8 bileşikleri ve kurkuminin çeşitli konsantrasyonlarının HT-29 kolon hücrelerinin canlılığı ve proliferasyonu üzerindeki etkisi MTT analizi ile 24, 48 ve 72 saatlik uygulamalarla belirlendi (Şekil 4.13-Şekil 4.17). Sonuçlar % ortalama±SE olarak verildi.

Şekil 4.13' de görüldüğü gibi 2,5 µM, 5 µM ve 10 µM dozlarda uygulanan SI2 bileşiği 24 saat sonunda HT-29 kolon hücrelerinin canlılığını 5 µM dozda uygulandığında kontrole kıyasla %91.8±8.0' e düşürürken, 10 µM dozda uygulandığında %87.7±7.0' ye düşürmüştür. Kırksekiz saat sonunda ise 5 µM doz uygulanan grupta kontrole kıyasla hücre çoğalmasında %5 oranında artış görülürken, 10 µM doz uygulanan grubun hücre canlılığında kontrole kıyasla %8 oranında bir azalma gözlenmiştir. Yetmiş iki saat sonrasında ise 2,5 µM doz uygulanan grubun hücre canlılığı %88.9±14.1 olarak tespit edilirken, 5 µM ve 10 µM doz uygulanan gruplardaki hücre canlılığı %74.3±22.7 olarak belirlenmiştir. SI2 uygulamasına bağlı gözlenen bu değişimler istatistiksel olarak anlamlı değildir. Sonuçlar HT-29 insan kolon hücrelerinin canlılık ve proliferasyonunun 24 saat, 48 saat ve 72 saat boyunca 10 µM doza kadar SI2 uygulamasından etkilenmediğini göstermiştir.

SI5 bileşiğinin HT-29 hücre canlılığı üzerine etkisi MTT testi ile artan konsantrasyonlarda (10 µM, 50 µM, 100 µM ve 500 µM) ve zamanda (24, 48 ve 72 saat) belirlendi (Şekil 4.14.). SI5 bileşiği uygulanan gruplarda 24' üncü ve 48' inci saatlerde hücre çoğalmasında çok küçük miktarda azalma gözlenmiş ve 24' üncü saatte en düşük hücre canlılığı 50 µM dozda %90.0±0.1 ve 48' inci saatte 100 µM dozda % 91.0±3.2 olmuştur. Yetmiş ikinci saatte ise 50 µM dozda hücre canlılığı en düşük %87.0±7.9 olarak belirlenirken, 100 µM dozda hücre canlılığının (%100.0±1.9) kontrol grubundan biraz daha fazla olduğu görüldü. Sonuç olarak, SI5 uygulanan HT-29 kolon hücrelerinin canlılığında kontrole kıyasla zamana ve doza bağlı önemli bir fark gözlenmemiştir. SI5 bileşiğinin 10-500 µM arasındaki dozlarının HT-29 hücreleri üzerinde sitotoksik olmadığı gözlenmiştir.

HT-29 hücrelerine 10 µM, 50 µM, 100 µM ve 500 µM dozlarda uygulanan SI7 bileşiğinin 24, 48 ve 72 saat sonunda hücre canlılığına etkisi Şekil 4.15' te gösterilmiştir. SI7 bileşiği varlığında hala çoğalmaya devam eden HT-29 kolon hücreleri üzerinde

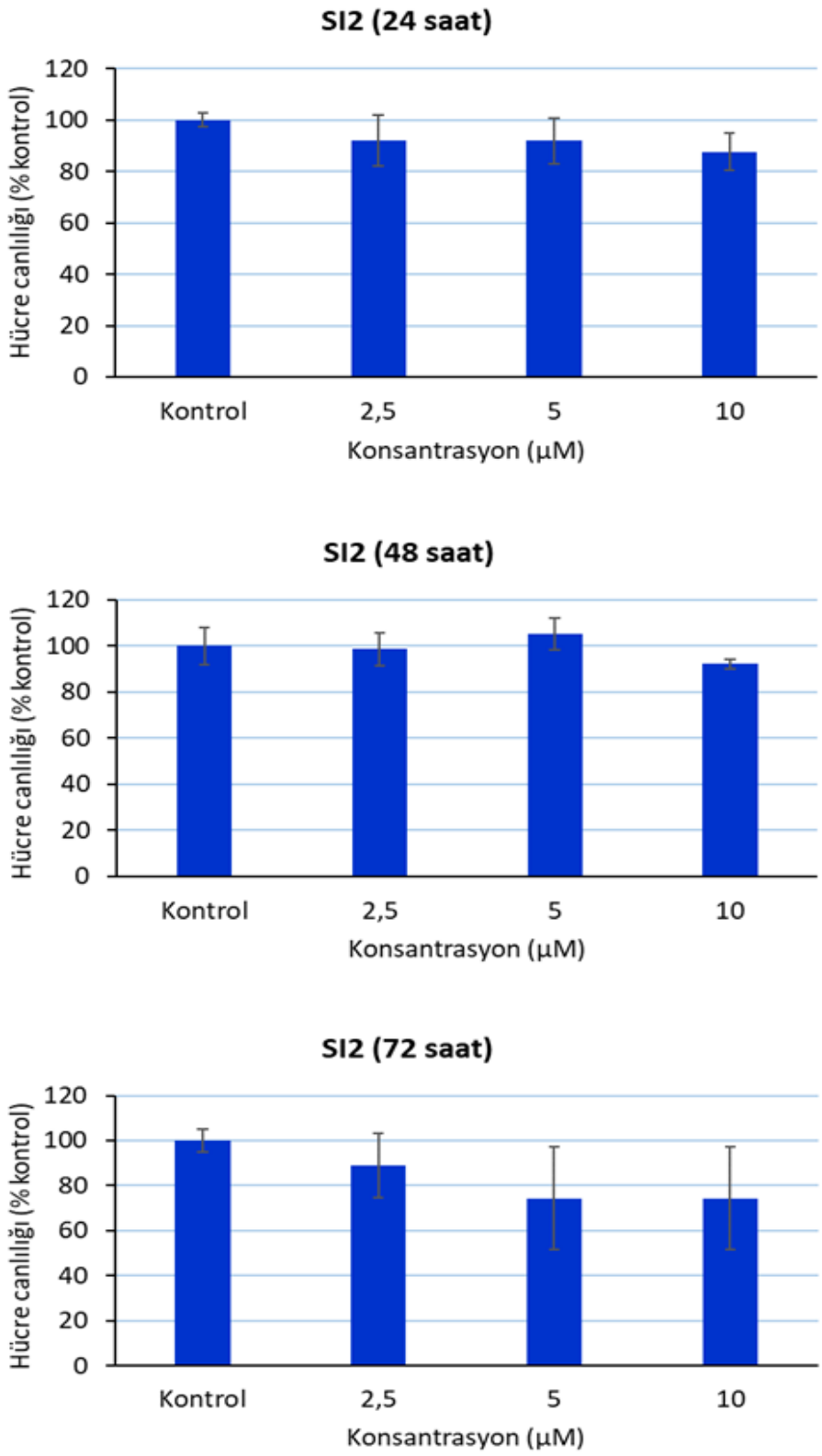
önemli bir antiproliferatif etki gözlenmemiştir. HT-29 hücreleri üzerinde 24' üncü saat ve 50 µM konsantrasyonda gözlenen en düşük hücre canlılığı (%86.5±4.4) bile kontrol grubu ile aynı seviyededir. Kırksekizinci saat sonunda 100 µM dozda gözlenen en düşük hücre canlılığı %95.6±2.5 olarak tespit edilmiştir. SI7 bileşiğinin 10-500 µM doz grupları arasında da hücre canlılığı açısından anlamlı bir fark bulunmadı. Yetmişikinci saatte ise hücre canlılığında 48' inci saate göre pek bir farklılık gözlenmedi. Yetmişikinci saatteki hücre canlılığı kontrole (%95.9±0.5) kıyasla 500 µM dozda en düşük (%91.8±6.4) iken, 100 µM dozda en yüksek (%100.0±10.8) seviyedeydi. Bu nedenle, SI7 bileşiğinin 10-500 µM arasındaki dozlarının HT-29 hücreleri üzerinde zamana ve konsantrasyona bağlı olarak bir sitotoksik etki göstermediği görüldü.

SI8 bileşiğinin HT-29 hücrelerinin çoğalması üzerine etkisi 10 µM, 50 µM, 100 µM ve 500 µM dozlarda ve 24' üncü, 48' inci ve 72' nci saatlerde incelendi (Şekil 4.16). SI8 bileşiğinin tüm doz gruplarında kontrol grubuna göre hücre canlılığında zamana ve doza bağlı olmaksızın bir artış gözlenmektedir. Yirmi dört saat sonunda en düşük hücre canlılığı kontrol grubunda gözlenirken (%96.0±4.6), en yüksek hücre canlılığı 10 µM doz uygulanan grupta (%100.0±4.1) kaydedilmiştir. Kırksekiz saat sonunda ise en düşük hücre canlılığı 10 µM doz grubunda (%91.9±5.5) gözlenirken, en yüksek hücre canlılığı 50 µM doz grubunda (%100.0±8.3) görülmüştür. Yetmiş ikinci saatte HT-29 hücre çoğalmasında 48' inci saate kıyasla dikkate değer bir azalma olmamıştır. Tüm doz grupları dikkate alındığında, hücre canlılığının %95.3±14.0 ile %100.0±3.8 arasında olduğu görülmektedir. SI8 bileşiğinin uygulanan dozlarının hiçbiri HT-29 hücrelerine karşı zamana ya da doza bağlı olarak antiproliferatif etki göstermemiştir. Sonuç olarak, SI8 bileşiğinin 10-500 µM doz aralığında HT-29 hücreleri için toksik etkisi gözlenmemiştir.

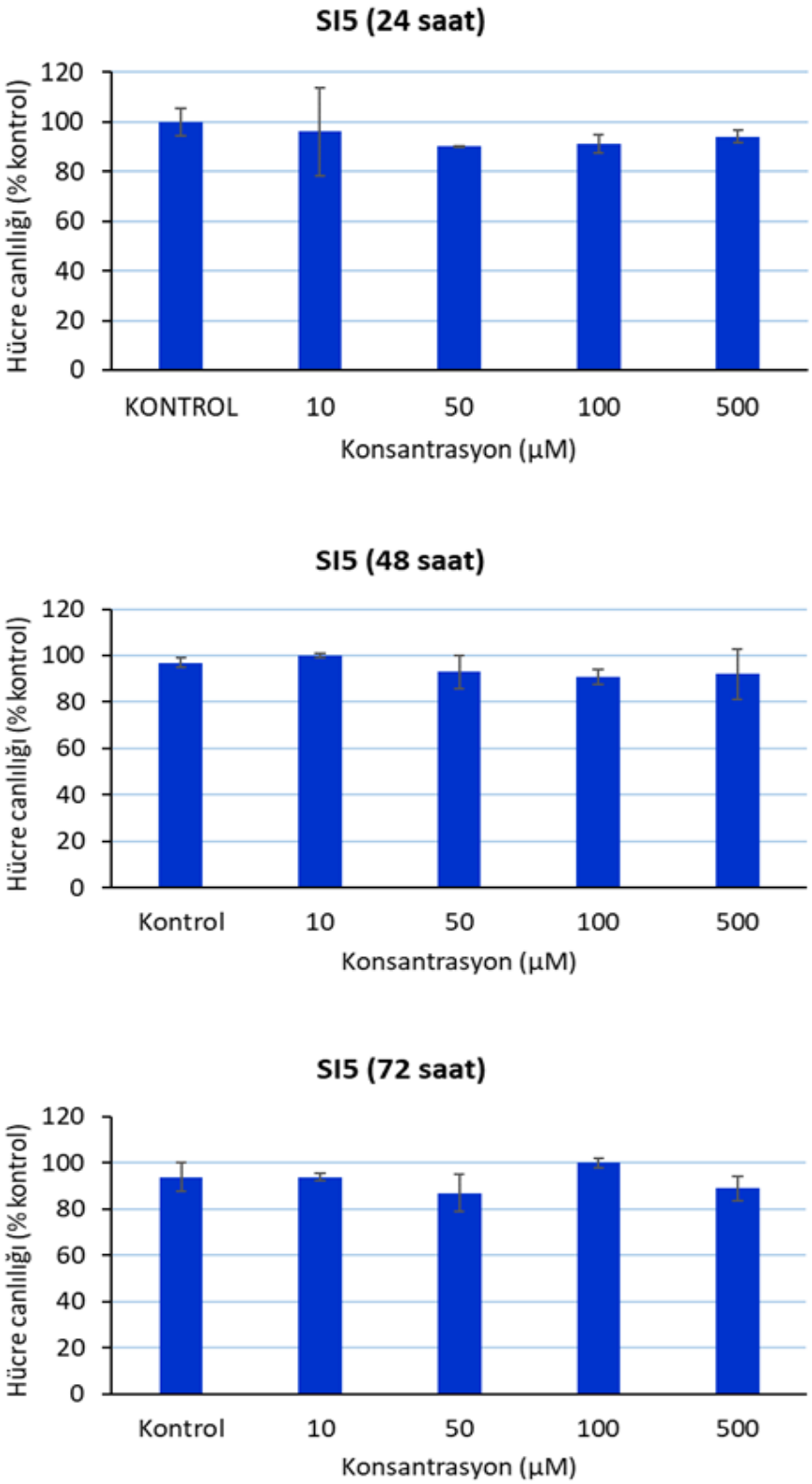
HT-29 kolon hücrelerine 2,5 µM, 5 µM ve 10 µM dozlarda uygulanan kurkuminin 24, 48 ve 72 saat sonra HT-29 hücrelerinin çoğalması üzerine etkisi Şekil 4.17' te görülmektedir. Kurkumin uygulamasından 24 saat sonra 2,5 µM ve 5 µM doz gruplarında kontrole göre hücre canlılığında bir miktar azalma gözlenirken, 10 µM doz grubunun hücre canlılığında kontrole kıyasla %1.13 oranında artış gözlenmiştir. Kırksekiz saat sonrasında ise 2,5 µM dozda kurkumin uygulanan grubun hücre canlılığı %98.7±10.2 olurken, 10 µM doz uygulanan grubun hücre canlılığı %92.7±9.4 olarak belirlenmiştir. Yetmiş ikinci saatte ise uygulanan tüm doz gruplarında kontrole kıyasla hücre

canlılığında bir miktar artış gözlenmiştir. Kurkumin ile inkübe edilen HT-29 hücrelerinin canlılığında zamana ve doza bağlı önemli bir değişim gözlenmemiştir. Kurkumin uygulanan dozlarda ve sürelerde HT-29 kolon hücreleri üzerinde sitotoksik etki göstermemiştir.

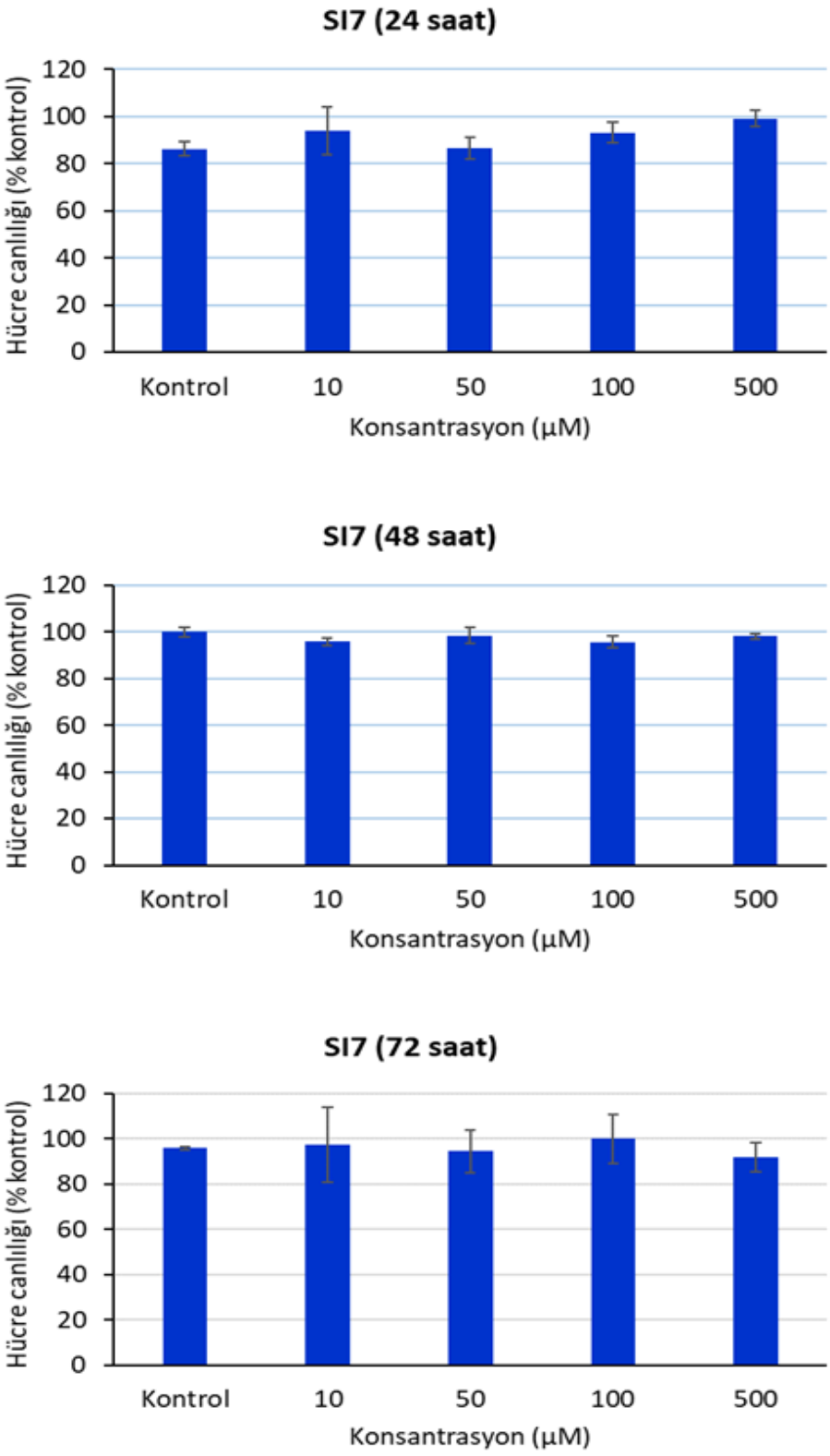
Sonuç olarak, sentezlenen bileşiklerden SI2' nin 10 μM doza kadar, SI5, SI7 ve SI8' in ise 500 μM doza kadar HT-29 kolon hücreleri üzerinde zamana ve doza sitotoksik etki göstermemeleri nedeniyle bu bileşiklerin belirlenen konsantrasyonlarının inflamasyon deneyleri için uygun olduğu kanaatine varılmıştır.



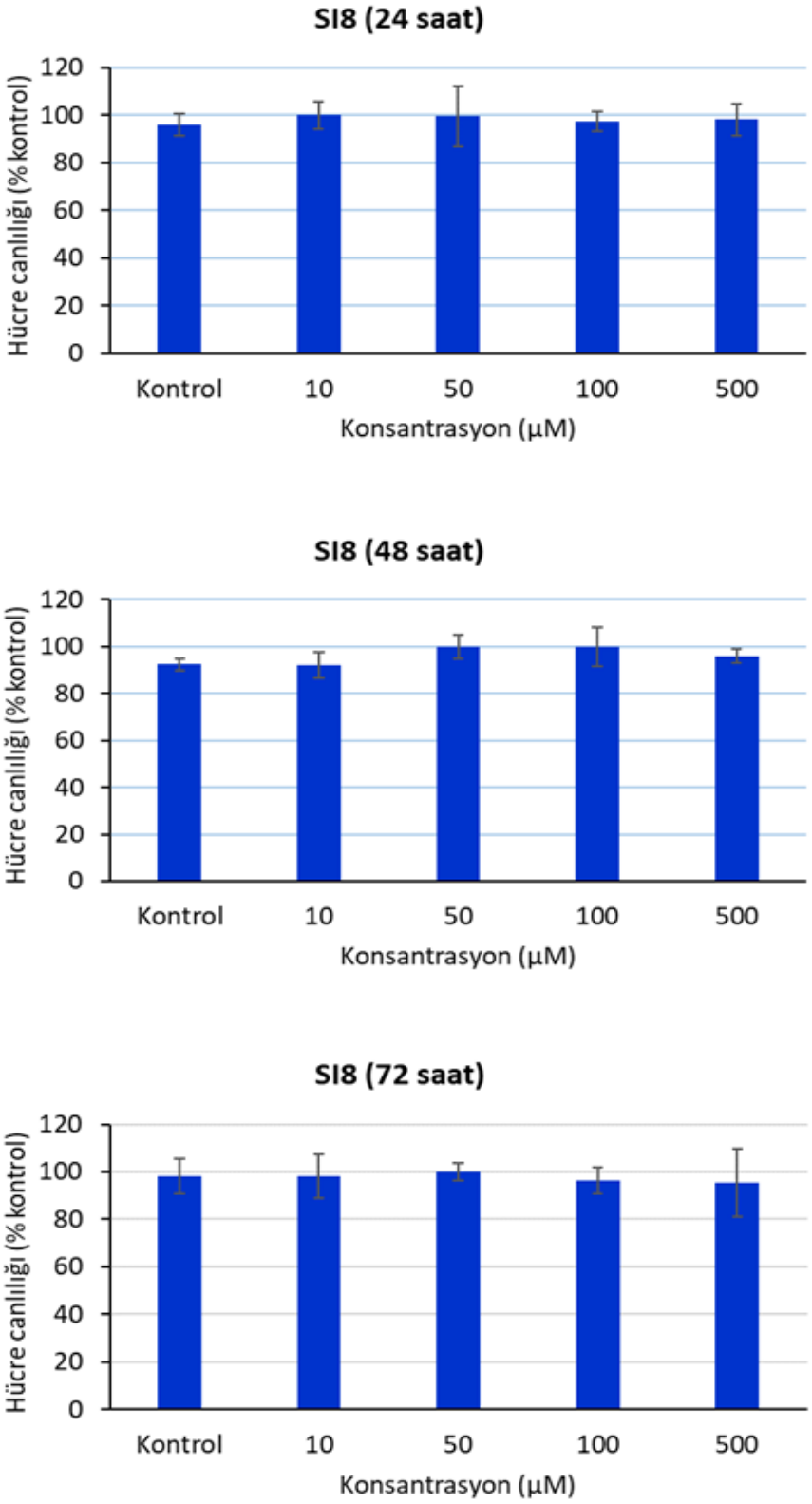
Şekil 4.13. SI2 bileşiğinin 2.5, 5 ve 10 µM dozlarına 24, 48 ve 72 saat süreyle maruz kalan HT-29 hücrelerinin canlığındaki değişimi gösteren MTT grafiği. (Deneyler 3 tekrarlı olarak gerçekleştirildi ve sonuçlar ortalama±SE olarak ifade edildi.)



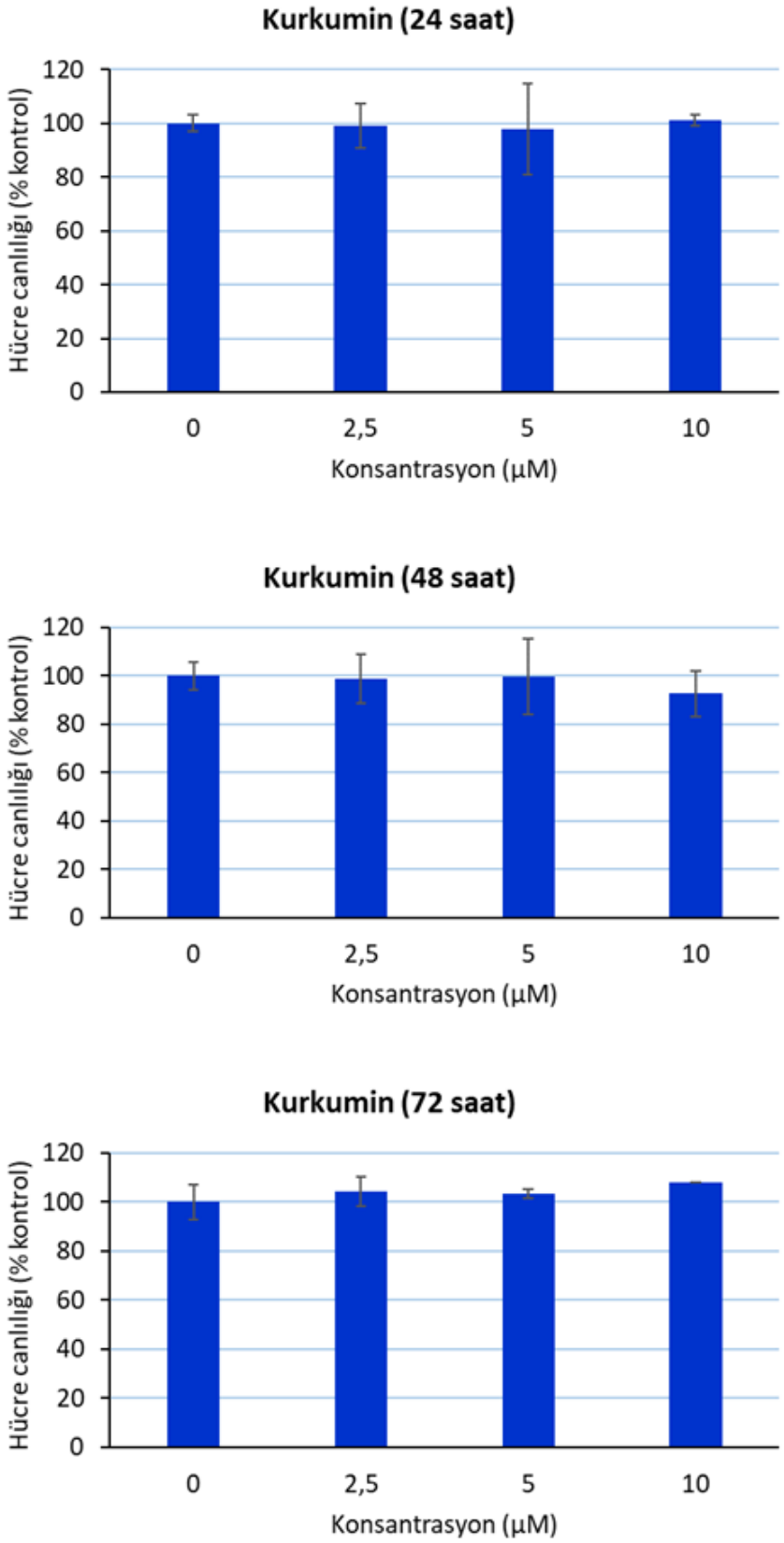
Şekil 4.14. SI5 bileşiğinin artan dozlarına 24, 48 ve 72 saat süreyle maruz kalan HT-29 hücrelerinin canlığındaki değişimi gösteren MTT grafiği. (Deneyler 3 tekrarlı olarak gerçekleştirildi ve sonuçlar ortalama±SE olarak ifade edildi.)



Şekil 4.15. SI7 bileşiğinin artan dozlarına 24, 48 ve 72 saat süreyle maruz kalan HT-29 hücrelerinin canlığındaki değişimi gösteren MTT grafiği. (Deneyler 3 tekrarlı olarak gerçekleştirildi ve sonuçlar ortalama±SE olarak ifade edildi.)



Şekil 4.16. SI8 bileşiğinin artan dozlarına 24, 48 ve 72 saat süreyle maruz kalan HT-29 hücrelerinin canlığındaki değişimi gösteren MTT grafiği. (Deneyler 3 tekrarlı olarak gerçekleştirildi ve sonuçlar ortalama±SE olarak ifade edildi.)



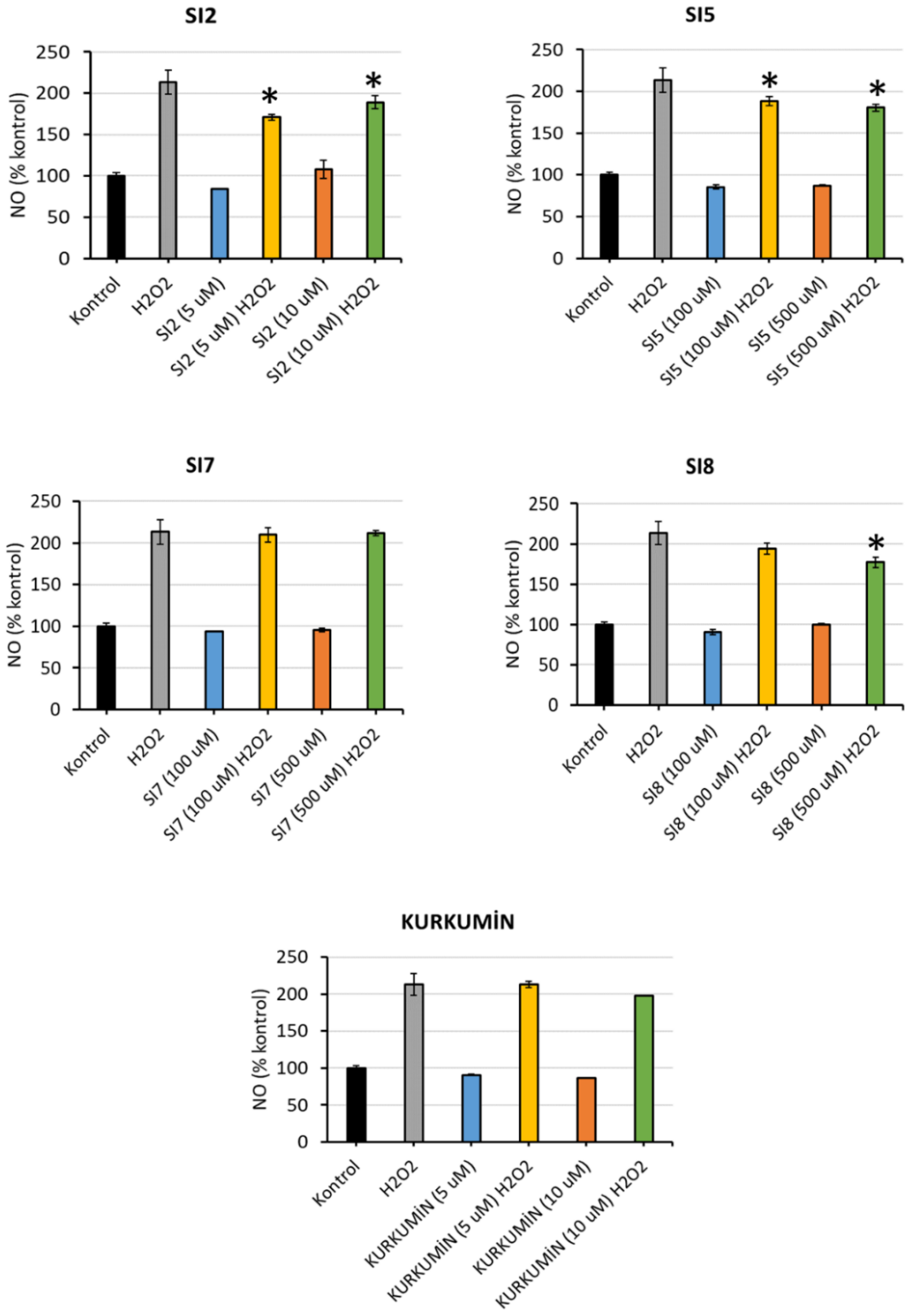
Şekil 4.17. Kurkuminin artan dozlarına 24, 48 ve 72 saat süreyle maruz kalan HT-29 hücrelerinin canlığındaki değişimi gösteren MTT grafiği. (Deneyler 3 tekrarlı olarak gerçekleştirildi ve sonuçlar ortalama±SE olarak ifade edildi).

4.2.2. NO Tarama Testi Sonuçları

Sentezlenen bileşiklerin HT-29 kolon hücrelerinin NO üretimini inhibe edici etkilerini incelemek için standart protokol olan serum açlığı sonrası 0.8 mM H_2O_2 uygulama protokolü takip edildi (Zhong vd., 2021). HT-29 hücreleri 12 saat serum açlığına maruz bırakıldıktan sonra kurkumin, SI2, SI5, SI7 ve SI8 bileşiklerinin MTT analizi sonucu belirlenen konsantrasyonları ile inkübe edildi ve bunun ardından 6 saat sonra H_2O_2 uyarımına maruz bırakıldı. H_2O_2 uyarımından 48 saat sonra hücrelerdeki NO üretim seviyeleri Gries reaksiyonu aracılığıyla belirlendi. Sonuçlar % ortalama±SE olarak verildi. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.18' de sunulmaktadır.

HT-29 kolon hücrelerinin 12 saat serum açlığı ve ardından 6 saat H_2O_2 ile uyarımı sonrasında H_2O_2 ile indüklenmiş gruptaki NO üretim seviyeleri kontrol grubuna göre 2 kattan fazla artış göstermiştir (Şekil 4.18). SI2 bileşiği 5 µM ve 10 µM dozlarda hücrelerin spontan NO üretim düzeylerinde anlamlı bir değişikliğe neden olmamıştır. Fakat H_2O_2 uyarımlı NO düzeyi ortamda 5 µM ve 10 µM SI2 bulunduğunda istatistiksel olarak baskılanmıştır (%213.3±14.6' dan sırasıyla %170.9±3.4 ve %189.1±7.7' ye, *$p<0.05$). Fakat bu azalma doza bağlı değildir. Aynı şekilde SI5 bileşiği 100 µM ve 500 µM dozlarda HT-29 hücrelerinin spontan NO üretim düzeylerinde anlamlı bir değişikliğe yol açmamıştır. Bununla birlikte, H_2O_2 uyarımlı NO düzeyi SI5 bileşiğinin 100 µM ve 500 µM dozları uygulandığında istatiksel olarak anlamlı düzeyde baskılanmıştır (%213.3±14.6' dan sırasıyla %188.2±5.2 ve %180.4±4.3, *$p<0.05$). SI7 bileşiği ise 100 µM ve 500 µM dozlarda hem HT-29 hücrelerinin spontan NO üretimini hem de H_2O_2 uyarımlı NO seviyelerini baskılamada istatistiksel olarak anlamlı bir etki göstermemiştir. SI8 bileşiği HT-29 hücrelerinin spontan NO üretim düzeylerini azaltmada anlamlı bir etki göstermezken, 500 µM dozda H_2O_2 ile uyarılmış HT-29 hücrelerinin NO üretim seviyelerinde istatistiksel açıdan anlamlı bir azalmaya neden olmuştur (%213.3±14.6' dan %177.0±6.7' ye, *$p<0.05$). Kurkumin ise 5 µM ve 10 µM dozlarda HT-29 hücrelerinin hem spontan NO üretimini hem de H_2O_2 uyarımlı NO üretimini baskılamada istatistiksel açıdan anlamlı bir etki göstermemiştir. Uygulanan bileşiklerden 3 adeti, HT-29 kolon hücrelerinin 12 saat serum açlığı ve ardından 6 saat H_2O_2 uyarımı sonucu NO üretimini baskılamada etkili olmuştur.

Sonuç olarak, 12 saat serum açlığı ve 6 saat H_2O_2 indüklemesi uygulandığında SI2, SI5 ve SI8 bileşikleri HT-29 kolon hücrelerindeki NO artışını istatistiksel olarak anlamlı düzeyde önleyerek anti-inflamatuar etki göstermişlerdir. Bunlardan SI2 NO oluşumunu önlemede doza bağımlı değilken, SI5 bileşiği doza bağımlı olarak NO oluşumunu önlemiştir. SI8 bileşiği ise sadece yüksek dozda uygulandığında etkili olmuştur.



Şekil 4.18. Sentezlenen bileşiklerin 12 saat serum açlığı ve 6 saat H_2O_2 (800 µM) uyarımından sonra HT-29 hücrelerinin NO üretim seviyeleri üzerine etkisi. (Deneyler 3 tekrarlı olarak yapılmış ve veriler ortalama±SE olarak verilmiştir. Tek yönlü ANOVA analizi ve Dunnet' s test: *$p<0.05$, H_2O_2 kontrol grubu ve sentezlenen bileşik grupları arasındaki istatistiksel olarak anlamlı farklılıkları göstermektedir.)

4.2.3. H_2O_2 ile Deneysel Kolit Oluşturulmuş HT-29 İnsan Kolon Hücre Modelinde TNF-α, IL-6 ve IL-1β Üretim Sonuçları

Sentezlenen bileşiklerinin TNF-α, IL-1β ve IL-6 dahil olmak üzere pro-inflamatuar sitokinlerin üretimi üzerindeki inhibe edici etkilerini araştırmak için HT-29 insan kolon hücreleri, 12 saat serum açlığından sonra kurkumin, SI2, SI5 ve SI8 bileşiklerinin çeşitli konsantrasyonları ile inkübe edildi ve ardından 6 saat sonra H_2O_2 ile uyarıldı. Kültür ortamına salgılanan TNF-α, IL-1β ve IL-6 seviyeleri H_2O_2 uyarımından 48 saat sonra Eliza analizi ile belirlendi. Sonuçlar ortalama±SE pg/mL olarak verildi. Şekil 4.19' da gösterildiği gibi, üç pro-inflamatuar sitokinin seviyeleri, kontrol grubuna kıyasla H_2O_2 ile uyarılan kolon hücrelerinde önemli ölçüde (*$p<0.05$) artmıştır. H_2O_2 ile uyarılan gruptaki sitokin seviyelerindeki bu artışlar kurkumin, SI2, SI5 ve SI8 bileşikleri tarafından anlamlı bir düzeyde azaltılmıştır (**$p<0.05$). Özellikle, IL-6 salgılanması, TNF-α ve IL-1β' ya kıyasla önemli ölçüde azaltılmıştır. IL-1β seviyesindeki azalma diğer sitokinlerdeki azalmaya kıyasla daha düşüktür.

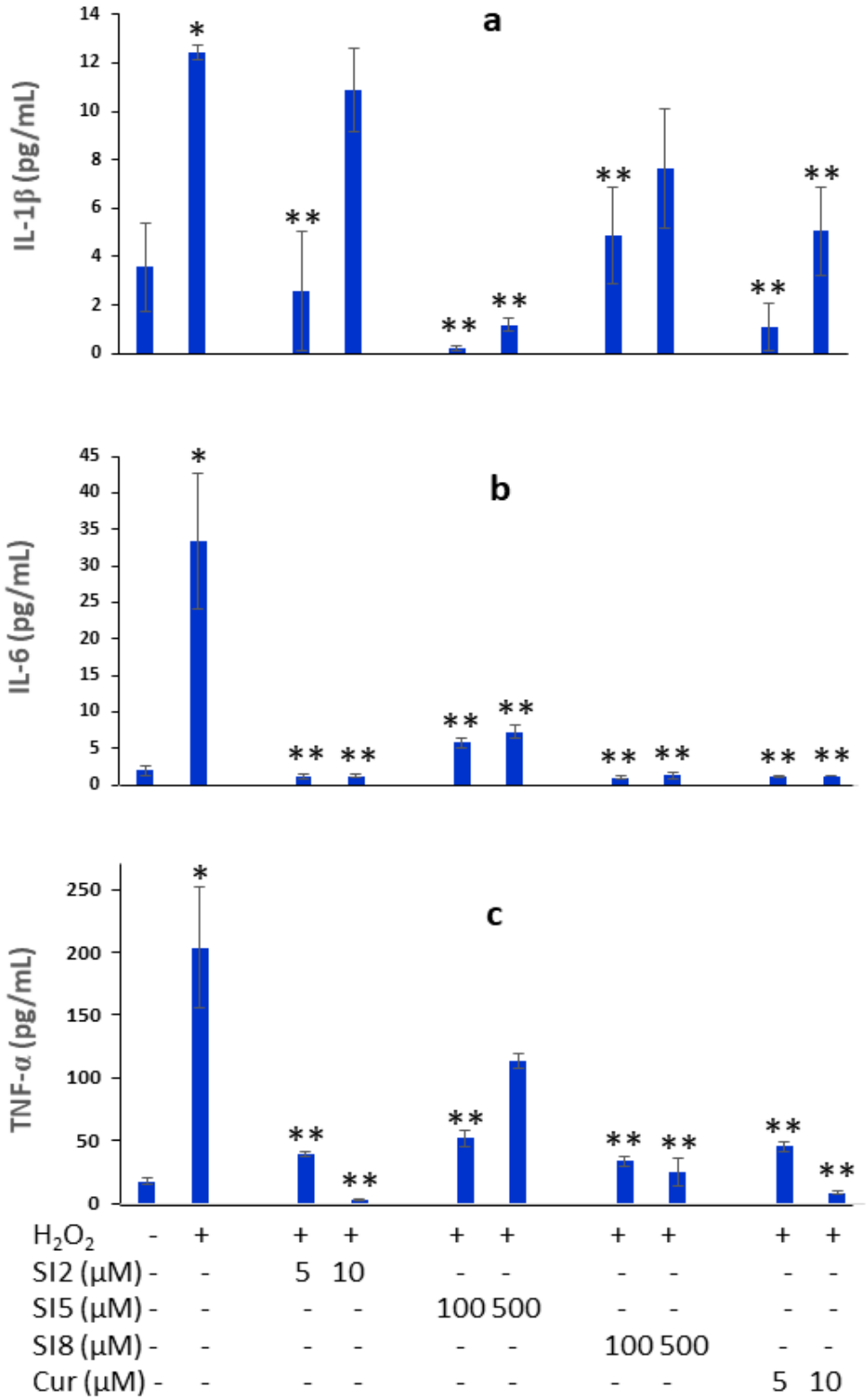
On iki saat serum açlığından sonra H_2O_2 ile 6 saat indüklenmiş HT-29 kolon hücreleri tarafından üretilen TNF-α seviyeleri (203.6±48.4 pg/mL) kontrol grubuna (17.6±3.0 pg/mL) göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek olarak saptandı (*$p<0.05$). Şekil 4.19' da gösterildiği gibi H_2O_2 ile indüklenmiş grup ile sentezlenen bileşiklerin uygulandığı gruplar karşılaştırıldığında, SI2, SI5, SI8 ve kurkumin gruplarında TNF-α seviyelerinde dikkate değer bir azalma göze çarpmaktadır (**$p<0.05$). H_2O_2 indüklenmiş gruba kıyasla TNF-α düzeylerini en fazla baskılayan bileşik 2.6±1.0 pg/mL TNF-α üretimi ile 10 µM dozda uygulanan SI2 bileşiği olurken, en az baskılayan grup ise 113.6±6.0 pg/mL TNF-α üretimi ile 500 µM dozda uygulanan SI5 bileşiği olmuştur. TNF-α seviyelerini azaltmada en etkili doz SI2 grubunda 10 µM, SI8 grubunda 500 µM ve kurkumin grubunda 10 µM olarak olarak tespit edildi. SI2, SI8 ve kurkumin gruplarında TNF-α üretim seviyelerinde doza bağlı bir azalma gözlenirken, SI5' te doza bağlı bir azalma gözlenmemiştir.

HT-29 kolon hücrelerinde H_2O_2 tarafından indüklenen IL-6 üretimi, 12 saat serum açlığı ve 6 saat H_2O_2 uyarımı sonrasında kontrole göre istatistiksel olarak önemli düzeyde artmıştır (*$p<0.05$). Kontrol grubunda üretilen IL-6 seviyesi (1.9±0.6 pg/mL) oldukça düşüktür. H_2O_2 ile uyarılmış grup (33.4±9.2 pg/mL) ile kıyaslandığında SI2, SI5, SI8 ve

kurkuminin tüm dozlarının HT-29 hücrelerinin IL-6 üretim düzeylerini istatistiksel olarak önemli düzeyde baskıladığı (0.9±0.1 pg/mL-7.2±0.9 pg/mL) görülmektedir (**$p<0.05$) (Şekil 4.19). Hatta tüm bileşikler IL-6 üretim seviyesini diğer pro-inflamatuar sitokinler TNF-α ve IL-1β' ya kıyasla daha fazla düşürmüşlerdir. Sentezlenen bileşiklerin IL-6 düzeyini baskılamalarında doza bağlı bir etki görülmemektedir. SI5 hariç diğer bileşiklerin kullanılan her iki dozu da IL-6 üretim seviyelerini aynı ölçüde ve kontrol grubundan daha düşük olacak düzeyde azaltmıştır. Sadece SI5 IL-6 üretimini SI2, SI8 ve kurkumine kıyasla daha az baskılamıştır.

On iki saat serum açlığı ve 6 saat H_2O_2 uyarımı sonrasında H_2O_2 tarafından indüklenmiş HT-29 hücrelerinde ölçülen IL-1β düzeyi kontrol grubuna kıyasla istatistiki olarak anlamlı düzeyde yüksekti (*$p<0.05$) (Şekil 4.19). H_2O_2 indüklenmiş grup ile sentezlenen bileşik gruplarının IL-1β düzeyleri arasında da istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık göze çarpmaktadır (**$p<0.05$). İlginç bir şekilde, H_2O_2 ile indüklenmiş grup ile karşılaştırıldığında SI2, SI5, SI8 ve kurkuminin düşük dozları IL-1β üretimini azaltmada yüksek dozlara kıyasla çok daha etkili olmuşlardır (**$p<0.05$). SI5 hem 100 μM dozda hem de 500 μM dozda IL-1β üretimini azaltmada en etkili olan bileşik (sırasıyla, 0.2±0.0 pg/mL ve 1.1±0.2 pg/mL) olmuştur. IL-1β düzeyini baskılamada etkisi en düşük olan 10 μM dozda kullanılan SI2 bileşiği (10.8±1.7 pg/mL) olmuştur.

Sonuç olarak, sentezlenen bileşiklerden SI2, SI5, SI8 ve kurkumin H_2O_2 ile indüklenmiş HT-29 kolon hücrelerinden salınan pro-inflamatuar sitokinler TNF-α, IL-6 ve IL-1β' nin salımını istatistiksel olarak önemli ölçüde baskılayarak anti-inflamatuar etki göstermiştirler. Bunlardan SI2, S8 bileşikleri ve kurkuminin pro-inflamatuar sitokin düzeylerini baskılaması doza bağımlıdır.



Şekil 4.19. Kurkumin ve SI2, SI5 ve SI8 bileşiklerinin HT-29 hücrelerinin 12 saat serum açlığı ve 6 saat H_2O_2 uyarımından sonra IL-1β, IL-6 ve TNF-α üretimi üzerine etkisi. (Deneyler 3 tekrarlı olarak gerçekleştirildi ve sonuçlar ortalama değerler±SE olarak ifade edildi. Tek yönlü ANOVA ve Dunnet çoklu karşılaştırma test: *P<0.05: kotrolden önemli ölçüde farklı, **P<0.05: H_2O_2 kontrolden önemli ölçüde farklı.)

BÖLÜM 5

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada, inflamatuar bağırsak hastalığının tedavisi için benzoik asit türevlerinin oligosakkarit monomer üniteleri ile amidifikasyon metoduyla modifiye edilmesiyle çeşitli fonksiyonel gruplara sahip dört yeni bileşik sentezlendi. Sentezlenen bu yeni bileşiklerin karakterizasyonları FTIR, ^{1}H-NMR ve LC/MS analizleriyle yapıldı. FTIR, ^{1}H-NMR ve LC/MS analiz sonuçları bileşiklerin başarıyla sentezlendiğini ortaya koydu ve elde edilen yeni bileşiklerin önerilen yapılarla uyumlu olduğunu gösterdi. Sentezlenen bileşiklerin orijinal olduğu ortaya kondu.

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, 3300 cm^{-1} N-H gerilimi, 3000 cm^{-1} C-H gerilimi ve 1200 cm^{-1} C-O gerilimine ait bantlar gözlenmiştir.

Bileşiklerin ^{1}H-NMR spektrumları incelendiğinde 12 ppm civarında N-H' a ait proton yayvan singlet olarak, 6.8-7.5 ppm aralığında benzene ait protonlar, 3.5-4 ppm aralığında piran halkasına ait alisiklik protonlar, 0.8-2 ppm aralığında da alifatik protonlara ait pikler gözlenmiştir.

Bileşiklerin LC/MS analiz sonuçları incelendiğinde moleküler iyon pikinin M^{+}-1 veya M^{+}-1+18 su molekülü taşıdığı saptanmıştır. Bileşiklerin parçalanması sonucunda ortaya çıkan çeşitli fragmanlar da uygun pikler şeklinde gözlenmiştir.

Sentezlenen bileşiklerin HT-29 kolon hücreleri üzerindeki sitotoksik etkileri MTT testi ile belirlendi. MTT analiz sonuçları SI2 bileşiğinin 24, 48 ve 72 saatlik uygulama sürelerinde 2,5-10 μM dozlar arasında HT-29 kolon hücreleri için sitotoksik olmadığını ve hücrelerin mediumda çoğalmalarını etkilemediğini gösterdi (Şekil 4.13). SI5 bileşiği ise HT-29 hücrelerine 10-500 μM arasındaki dozlarda uygulandı ve hücre proliferasyonu

üzerinde zamana ve doza bağlı olarak bir etki göstermedi ve ayrıca bu konsantrasyonlarda sitotoksik değildi (Şekil 4.14). HT-29 hücrelerine 10-500 µM doz aralığında 24, 48 ve 72 saatlik sürelerle uygulanan SI7 bileşiği için hücre proliferasyonu açısından doz grupları arasında kontrole ve zamana kıyasla bir fark gözlenmedi (Şekil 4.15). Böylece, SI7 bileşiğinin 10-500 µM arasındaki dozlarının HT-29 hücreleri üzerinde sitotoksik etki göstermediği görüldü. SI8 bileşiğinin uygulanan dozlarının (10-500 µM) hiçbiri HT-29 hücreleri üzerinde zamana ya da doza bağlı olarak antiproliferatif etki göstermedi (Şekil 4.16). Referans bileşik olarak kurkumin HT-29 hücrelerine 24, 48 ve 72 saat süreyle 2,5-10 µM doz aralığında uygulandı ve bu doz aralığında HT-29 hücrelerinin profilerasyonu üzerine ne zamana ne de doza bağlı bir sitotoksik etki göstermedi (Şekil 4.17).

Sonuç olarak, sentezlenen bileşiklerden SI2' nin 10 µM doza kadar, SI5, SI7 ve SI8' in ise 500 µM doza kadar HT-29 kolon hücreleri üzerinde sitotoksik etki göstermemeleri nedeniyle bu dozların inflamasyon deneyleri için uygun olduğu kanaatine varıldı. MTT analizi sonucunda belirlenen bu doz değerleri bu bileşikler kullanılarak gerçekleştirilecek daha sonraki çalışmalar için referans olacaktır.

Sentezlenen bileşiklerin inflamasyon gelişiminde katkısı olan oksidatif stresin giderilmesi üzerine etkisi, HT-29 kolon hücrelerinde üretilen NO seviyeleri ölçülerek belirlendi (Şekil 4.18). HT-29 hücre modeli, morfolojik ve fonksiyonel in vitro farklılaşmayı ifade edebilme ve olgun bağırsak hücrelerinin karakteristik özelliklerini sergileme avantajına sahip olduğundan insan bağırsak fonksiyonunu incelemek için yaygın olarak kullanılmaktadır ve in vivo sistemi taklit etmek için uygun bir hücre modelidir (Zhao vd., 2017). HT-29 hücrelerinin NO üretimini teşvik etmek için indükleyici olarak H_2O_2 kullanıldı. H_2O_2, süperoksit anyonları ve diğer reaktif oksijen türleri MAPK' leri ve JAK/STAT yollarını kapsayan çeşitli sinyal yollarını güçlü bir şekilde indüklemekte ve pro-inflamatuar sitokinlerin üretimini tetiklemek için sinyal molekülü olarak görev yapmaktadır (Faheina-Martins vd., 2017). Bu nedenle, H_2O_2 HT-29 ve Caco-2 hücrelerinde inflamasyon oluşturmak, pro-inflamatuar sitokinlerin salgısını arttırmak böylece çeşitli bileşiklerin anti-inflamasyon etkilerini belirlemek ve oksidatif stres mekanizmasını in vitro modelde incelemek için yaygın olarak kullanılan bir moleküldür (Ok Son, Satsu ve Shimizu, 2005; Salla vd., 2016). Bu çalışmada, HT-29 kolon hücrelerinin 12 saat serum açlığı ve ardından 6 saat H_2O_2 ile uyarım sonrasında NO

üretim seviyeleri kontrol grubuna göre 2 kattan fazla artış göstermiştir. Bu durum H_2O_2 nin sinyal yollarını güçlü bir şekilde uyardığı tezini desteklemektedir.

HT-29 kolon hücrelerinin 12 saat serum açlığı ve ardından 6 saat H_2O_2 ile uyarımı sonrasında SI2 bileşiğinin 5 μM ve 10 μM dozlarının HT-29 hücrelerinin H_2O_2 uyarımlı NO üretim düzeylerini sadece H_2O_2 ile indüklenmiş gruba göre istatistiksel olarak anlamlı bir seviyede baskıladığı görüldü (*$p<0.05$) (Şekil 4.18). SI5 bileşiğinin (100-500 μM) kolon hücrelerinin H_2O_2 uyarımlı NO üretim seviyelerini sadece H_2O_2 indüklenmiş gruba göre doza bağlı olarak istatistiksel olarak anlamlı bir seviyede azalttığı kaydedildi (*$p<0.05$). SI7 bileşiğinin 100 μM ve 500 μM dozlarının HT-29 hücrelerinin H_2O_2 uyarımlı NO üretim seviyelerini baskılamada etkili olmadığı görüldü. SI8 bileşiğinin 100 μM dozu NO üretim seviyelerini baskılamada anlamlı bir etki göstermezken, 500 μM dozu HT-29 hücrelerinin H_2O_2 uyarımlı NO üretim seviyelerini doza bağlı olarak istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azaltmıştır (*$p<0.05$). Kurkumin (2,5-10 μM) HT-29 hücrelerinin H_2O_2 uyarımlı NO üretiminde fonksiyonel olmakla beraber istatistiksel düzeyde anlamlı bir azalmaya yol açamamıştır. Sentezlenen bileşikler on iki saat serum açlığı ve ardından 6 saat H_2O_2 uyarımı sonucu üretilen NO düzeyini önlemede etkili olmuştur.

Sonuç olarak, 12 saat serum açlığı + 6 saat H_2O_2 indüklemesi sonrasında SI2, SI5 ve SI8 bileşikleri kolon hücrelerinde üretilen NO düzeylerini istatistiksel olarak anlamlı düzeyde engelleyerek anti-inflamatuar etki göstermişlerdir (**$p<0.05$). Bileşiklerden SI5 ve SI8' deki baskılama doza bağımlı iken, SI2' deki baskılama doza bağımlı değildi.

iNOS enzimi tarafından sentezlenen NO seviyelerindeki artış gastrointestinal inflamasyonu şiddetlendirmekte ve dolayısıyla gastrointestinal inflamasyonunun başlıca biyobelirteçlerinden biri olarak kabul edilmektedir (Kamalian vd., 2020). İBH' li hastaların değişen inflamatuar mukozasında NO konsantrasyonlarında artış ve kolon ve bağırsak dokularında yukarı-regüle olan iNOS' un aşırı ekspresyonu kaydedilmiştir (Cross ve Wilson, 2003; Avdagić vd., 2013). İBH' da, NO' nun iltihabın başlaması ve sürdürülmesi ile ilişkili olduğu bildirilmektedir (Kolios, Valatas ve Ward, 2004). Bu nedenle, H_2O_2 ile uyarılan hücrelerde NO üretiminin inhibe edilmesi, çeşitli anti-inflamatuar ilaçları taramanın olası yollarından biridir. Bu çalışmanın sonuçları SI2, SI5 ve SI8 bileşiklerinin 12 saat serum açlığı + 6 saat H_2O_2 indüklemesi sonucu üretilen NO

seviyelerini önlemede etki oldukları ve anti-inflamatuar etki gösterdiklerini ortaya koymuştur. Kurkuminin, anti-oksidan, anti-inflamatuar ve anti-tümörigenez madde olarak kabul edildiği ve İBH modellerinde inflamasyonu azaltırken NO üretimini ve iNOS ekspresyonunu baskıladığı rapor edilmiştir (Kamalian vd., 2020). Fakat bu çalışmanın sonuçları 5-10 μM dozda uygulanan kurkuminin etkili olmakla beraber HT-29 hücrelerinde H_2O_2 indüklemesi sonucu üretilen NO seviyelerini istatistiksel olarak anlamlı düzeyde baskılamada yeterli olmadığını ortaya koydu.

Sentezlenen bileşiklerden SI2, SI5, SI8 ve kurkuminin anti-inflamatuar etkileri H_2O_2 ile indüklenen in vitro kolit modelinde ELİSA analizi ile belirlendi. H_2O_2 ile indüklenen HT-29 hücrelerinin ürettiği pro-inflamatuar sitokinlerin (TNF-α, IL-6 ve IL-1β) seviyeleri ölçülerek sentezlenen bileşiklerin inhibitör özellikleri belirlendi. MTT analiz sonucuna göre HT-29 hücrelerinde sitotoksik etki göstermeyen dozlar seçilerek bu dozlardaki bileşiklerin anti-inflamatuar aktiviteleri değerlendirildi.

İBH' ın etiyolojisi ve patogenezinde TNF-α gibi pro-inflamatuar sitokinlerin önemli bir rolü olduğu daha önceki araştırmalarda ortaya konmuştur (Gabriele, Pucci, Árvay ve Longo, 2018). İBH hastalarının plazmasında pro-inflamatuar sitokinlerin (TNF-α, IL-6, IL-17 IL-12 ve IFN-γ) miktarında artış gözlendiği bilinmektedir (Soufli vd., 2016). Ayrıca, pro-inflamatuar sitokinlerin (IL-6, TNF-α vb.) İBH' ın başlaması ve ilerlemesi ile yakından ilişkili olduğu rapor edilmiştir (Yoldaş, 2016). TNF-α ve IL-1β, yaygın olarak pro-inflamatuar sitokinlerin bir temsilcisi olarak bilinir ve özellikle transkripsiyon faktörü NF-κβ ile ilişkisi nedeniyle araştırmalarda yaygın şekilde kullanılır (Tjahjono vd., 2021). Bir diğer pro-inflamatuar sitokin olan IL-6, JAK/STAT aracılığıyla sinyal vererek proliferasyon, hayatta kalma ve anjiyogenez ile ilgili genlerin ekspresyonunu modüle eder ve kanserleşme sürecinde yer alan inflamasyonla ilişkilidir (Faheina-Martins vd., 2017). Bu nedenle, pro-inflamatuar sitokin konsantrasyonları ilaçların H_2O_2, LPS veya başka indükleyici maddelerle tetiklenmiş inflamasyonu inhibe etme etkinliğinin araştırılmasında çok faydalı bir araçtır.

Bu çalışmanın sonuçlarına göre, 12 saat serum açlığından sonra H_2O_2 ile 6 saat indüklenmiş HT-29 kolon hücreleri tarafından salınan TNF-α, IL-6 ve IL-1β seviyeleri kontrol grubuna kıyasla istatistiki açıdan önemli düzeyde artış gösterdi ($*p<0.05$) (Şekil 4.19). Önceki çalışmalarda, TNF-α, IL-1β ve IL-6 gibi inflamatuar sitokinlerin artmasının

vücutta sistemik veya lokal bir inflamasyona işaret ettiğini bildirilmiştir (Mazloom vd., 2019). Bu çalışmada H_2O_2 ile uyarılan hücrelerdeki proinflatuar sitokin seviyelerinin kontrole göre oldukça artması (*$p<0.05$) H_2O_2 uyarımının HT-29 hücrelerinde inflamasyonu tetiklediğinin bir göstergesidir.

Şekil 4.19' da görüldüğü gibi SI2 bileşiği 10 µM dozda HT-29 hücrelerinin TNF-α üretim düzeylerini (2.6±1.0 pg/mL) H_2O_2 indüklenmiş gruba kıyasla önemli ölçüde önlemiştir (**$p<0.05$). SI5 bileşiği ise 100 µM dozda TNF-α üretimini istatistiksel açıdan anlamlı derecede azaltırken (**$p<0.05$), 500 µM dozda (TNF-α üretimi; 113.6±6.0 pg/mL) etki göstermemiştir. SI8 bileşiğinin hem 100 µM hemde 500 µM dozları H_2O_2 ile indüklenmiş HT-29 hücrelerinin TNF-α üretimini anlamlı derecede azalttı (**$p<0.05$). Aynı şekilde pozitif kontrol olarak kullanılan kurkuminin de 5 µM ve 10 µM dozları HT-29 hücrelerinin TNF-α salgısı üzerinde anlamlı azalma sağlamakla birlikte 10 µM doz daha yüksek bir azalma (8.6±1.0 pg/mL) sağladı (**$p<0.05$).

Ağırlıklı olarak monositler, makrofajlar ve doğal öldürücü hücreler tarafından salgılanan TNF-α bir pro-inflamatuar sitokindir ve COX-2 ve iNOS yolakları dahil olmak üzere birçok inflamatuar yolun düzenlenmesi ile ilişkilidir (Yoldaş, 2016). İnflamatuar yanıtta aracı molekül olan TNF-α' nın artan bağırsak seviyeleri, hastalık aktivitesi ve şiddetini arttırdığından İBH tedavisinde anti-TNF-α tedavisi uygulanması etkili bir yöntemdir. Anti-inflamatuar tedavide sistemik etkileri en aza indirmek ve tedavi etkinliğini en üst düzeye çıkarmak için şimdiye kadar uygulanan tedavilerden farklı yaklaşımların geliştirilmesine ihtiyaç vardır (Gareb, Otten, Frijlink, Dijkstra ve Kosterink, 2020). Bu çalışmada sentezlenen SI2, SI5 ve SI8 bileşikleri H_2O_2 ile indüklenmiş TNF-α seviyelerini baskılamada etkili olduklarından istenen etkileri sağlamada alternatif tedavi molekülleri olma potansiyeline sahiptir.

SI-2 bileşiğinin her iki dozu da (5 µM ve 10 µM) HT-29 hücrelerinde H_2O_2 tarafından indüklenen IL-6 üretimini (1.0±0.0 pg/mL ve 1.2±0.2 pg/mL) H_2O_2 ile indüklenmiş kontrole kıyasla önemli ölçüde azaltmıştır (**$p<0.05$) (Şekil 4.19). SI5 bilşiğinin 100 µM ve 500 µM dozlarda uygulandığı kolon hücrelerinin H_2O_2 uyarımlı IL-6 üretim seviyesi sırasıyla 5.7±0.6 pg/mL ve 7.2±0.9 pg/mL olarak ölçülmüştür. SI5 bileşiği diğer bileşiklere göre H_2O_2 uyarımlı IL-6 üretimini istatistiksel olarak anlamlı olmakla birlikte daha az önlemiştir (**$p<0.05$). SI8 bileşiği 100-500 µM doz aralığında

HT-29 hücrelerinin H_2O_2 uyarımlı IL-6 üretim seviyesini azaltmada (0.9±0.1 pg/mL ve 1.3±0.4 pg/mL) en etkili olan bileşiktir. Pozitif kontrol olan kurkumin de H_2O_2 ile indüklenmiş HT-29 kolon hücrelerinin IL-6 üretim seviyelerini anlamlı düzeyde azaltmıştır (**$p<0.05$).

Çok sayıda farklı hücre tipi tarafından üretilen IL-6 birden fazla pro-inflamatuar etki gösteren bir diğer sitokindir. Yamamoto-Furusho (2018), hem Crohn hastalığı hem de ülseratif kolit inflamasyonunun ilerlemesi IL-6 seviyeleri ile ilişkili olduğundan, anti-inflamatuar tedavide anti-IL-6 antikorları uygulanmasının İBH' ın tedavisi için makul bir strateji olduğunu öne sürmektedir. Bu çalışmada sentezlenen SI2, SI5 ve SI8 bileşiklerinin uygulanan tüm dozları H_2O_2 ile indüklenmiş HT-29 kolon hücrelerindeki IL-6 üretim seviyesini önemli ölçüde azalttığından İBH' ın tedavisi için anti-IL-6 ajanları olarak kullanım potansiyeline sahiptirler.

Şekil 4.19, H_2O_2 ile indüklenmiş HT-29 kolon hücreleri tarafından üretilen IL-1β seviyelerini azaltmada tüm bileşiklerin etkili (**$p<0.05$) olduğunu göstermekle birlikte, SI2 (10 µM konsantrasyonda IL-1β üretimi 10.8±1.1 pg/mL) ve S8 (500 µM konsantrasyonda IL-1β üretimi 7.6±2.4 pg/mL) bileşiklerinin yüksek dozlarının kolon hücreleri tarafından salınan IL-1β seviyelerini anlamlı derecede azaltmadığını ortaya koymaktadır. Kolon hücrelerinin IL-1β üretim düzeyini azaltmada en etkili olan bileşik SI5 (IL-1β üretimi; 100 µM konsantrasyonda 0.2±0.0 pg/mL, 500 µM kosantrasyonda 1.1±0.2 pg/mL) olmuştur (**$p<0.05$). Pozitif kontrol olan kurkuminin her iki dozu da IL-1β seviyelerini anlamlı ölçüde azaltmıştır (**$p<0.05$). H_2O_2 tarafından indüklenmiş grup ile karşılaştırıldığında SI2, SI5, SI8 ve kurkuminin düşük dozları IL-1β üretimini azaltmada yüksek dozlara kıyasla çok daha etkili olmuşlardır (**$p<0.05$).

Pro-inflamatuar sitokin olan IL-1β' nın bağırsak iltihabı hastalık patogenezinin bir aracısı olarak görev yaptığı bilinmektedir. IL-1β, makrofajlar, dendritik hücreler ve monositler dahil olmak üzere sınırlı hücre türleri tarafından üretilir ve inaktif formda olup ancak İnterlökin 1 Reseptör Tip 1 (IL1R1) reseptörüne bağlandıktan sonra tamamen aktif hale geçerek inflamasyonu tetikler (Liso vd., 2022). İBH hastalarının yanısıra kolorektal kanserli hastalarda da yüksek konsantrasyonlarda tespit edilen IL-1β seviyelerinin düşürülmesi için IL-1R' nin terapötik blokajı veya IL-1β' yi hedefleyen monoklonal antikorların kullanımı denenmiş olmasına rağmen, IL-1 reseptörünün terapötik

inhibisyonunun İBH' ın tedavisi için etkisiz olduğu görülmüştür (McEntee, Finlay ve Lavelle, 2019). Bu çalışmada sentezlenen bileşiklerden SI5, IL-1β seviyelerinin baskılanmasında oldukça etkili olduğundan, potansiyel IL-1β baskılayıcı ajan olarak değerlendirilebilir.

Elisa analiz sonuçları SI2, SI5 ve SI8 bileşiklerinin H_2O_2 ile uyarılmış HT-29 hücrelerinin TNF-α, IL-6 ve IL-1β üretimini istatistiksek olarak anlamlı düzeyde azalttığını ve SI2 ve SI8 bileşiklerinin ve kurkuminin doza bağımlı etki gösterdiğini ortaya koydu.

Sonuç olarak, benzoik asit türevlerinin glukozamin monomer üniteleriyle modifiye edilmesiyle sentezlenen özgün bileşiklerden SI2' nin 10 µM' a kadar, SI5, SI7 ve SI8' in 500 µM' a kadar HT-29 kolon hücreleri için sitotoksik olmadıkları ortaya kondu. SI2, SI5 ve SI8 bileşiklerinin pro-inflamatuar sitokinler TNF-α, IL-6, IL-1β üretimini ve NO' yu önemli ölçüde baskılama kabiliyetlerinden dolayı anti-inflamatuar etki gösterdikleri tespit edildi. Bu nedenle sentezlenen bileşikler bir anti-inflamatuar ajan ve fonksiyonel gıda bileşeni olarak potansiyel göstermektedirler. Ayrıca, farmasötik endüstrisinde, özellikle anti-inflamatuar ilaç geliştirme için aday bir kimyasal yapı olma potansiyeline sahiptirler.

Öneriler

- Sentezlenen bu oligosakkarit monomer üniteleriyle modifiye benzoik asit bileşiklerinin anti-inflamatuar etkisi nedeniyle inflamatuar bağırsak hastalığının yanı sıra diğer inflamatuar hastalıkların tedavisi için de etkili olma olasılığı bulunduğundan, gelecekte diğer inflamatuar hastalıklar açısından da biyolojik aktiviteleri test edilmelidir.

- Ayrıca sentezlenen bileşiklerin biyouyumlu ve biyobozunur özellikleri in vivo olarak ta test edilmelidir.

- Sentezlenen moleküllerin inflamatuar bağırsak hastalığı üzerindeki biyolojik etkinlikleri daha sonraki çalışmalarda in vivo olarak incelenmelidir.

- Oligosakkarit monomer ünitesi ile modifiye edilmiş bu biyomoleküllerin JAK inhibisyon aktivitelerinin belirlenmesi ve etki mekanizmalarının ve etki ettikleri yolakların belirlenmesine yönelik çalışmalar gerçekleştirilmelidir.

- Sentezlenen bileşiklerinin işlevsel olduğu hücresel sinyal yolakları incelenmelidir.

- Böylece, inflamatuar bağırsak hastalığının tedavisi için ilaç adayı olabilme özelliği çeşitlendirilmiş in vitro ve in vivo çalışmalarla değerlendirilmelidir.

KAYNAKLAR

Adamczak, M. I., Hagesaether, E., Smistad, G., & Hiorth, M. (2016). An in vitro study of mucoadhesion and biocompatibility of polymer coated liposomes on HT29-MTX mucus-producing cells. *International Journal of Pharmaceutics Netherlands, 498,* 225-233.

Aghazadeh-Habashi, A., Kohan, M. H., Asghar, W., & Jamali, F. (2014). Glucosamine dose/concentration-effect correlation in the rat with adjuvant arthritis. *Journal of Pharmaceutical Sciences, 103,* 760-767.

Alamdary, S. Z., Bakhshi, B., & Soudi, S. (2018). The anti-apoptotic and anti-inflammatory effect of *Lactobacillus acidophilus* on *Shigella sonnei* and *Vibrio cholerae* interaction with intestinal epithelial cells: A comparison between invasive and non-invasive bacteria. *PLoS ONE 13(6),* e0196941.

Albarran, G., Esparza, M., & Mendoza, E. (2015). Oxidation of hydroxybenzoic acids by · OH radical produced radiolytically. *Radiation Physics and Chemistry, 107,* 109-114.

Allam, G., Abuelsaad, A. S. A., Alblihed, M. A., & Alsulaimani, A. A. (2016). Ellagic acid reduces murine schistosomiasis mansoni immunopathology via up-regulation of IL-10 and down-modulation of pro-inflammatory cytokines production, *Immunopharmacology and Immunotoxicology, 38(4),* 286-297.

Al Mamari, H. H. (2021). Phenolic Compounds: Classification, Chemistry, and Updated Techniques of Analysis and Synthesis. In book: Phenolic Compounds: Classification, Chemistry, and Updated Techniques of Analysis and Synthesis Publisher: Intech. DOI: 10.5772/intechopen.98958.

Al-Saadi, H. M., Pang, K. L., Ima-Nirwana, S., & Chin, K. Y. (2019). Multifaceted Protective Role of Glucosamine against Osteoarthritis: Review of Its Molecular Mechanisms. *Scientia Pharmaceutica, 87,* 34.

Altınel, Y., Yalçın, Ş., Ercan, G., Yavuz, E., Erçetin, C., Gülçiçek, O.B., Çelik, A., Özkaya, G., & Uzun, H. (2020). The efficacy of curcumin on PDGF expression and NF-kappa B pathway: TNBS-induced colitis. *Ulus Travma Acil Cerrahi Dergisi, 26,* 663-670.

Avdagić, N., Zaćiragić, A., Babić, N., Hukić, M., Šeremet, M., Lepara, O., & Nakaš-Ićindić, E. (2013). Nitricoxide as a potential biomarkerin inflammatory bowel disease. *Bosnian Jornal of Basic MedicalSciences, 13(1),* 5-9.

Azuma, K.,Osaki, T., Kurozumi, S., Kiyose, M., Tsuka, T., Murahata, Y., Imagawa, T., Itoha, N., Minami, S., Sato, K., & Okamoto, Y. (2015). Anti-inflammatory effects of orally administered glucosamine oligomer in an experimental model of inflammatory bowel disease. *Carbohydrate Polymers, 115,* 448-456.

Bai, J., Zhang, Y., Tang, C., Hou, Y., Ai, X., Chen, X., Zhang, Y., Wang, X., & Meng, X. (2021). Gallic acid: Pharmacological activities and molecular mechanisms involved in inflammation-related diseases. *Biomedicine & Pharmacotherapy, 133,* 110985.

Bak, Y. K., Lampe, J. W., & Sung, M. K., (2014). Effects of dietary supplementation of glucosamine sulfate on intestinal inflammation in a mouse model of experimental colitis. *Journal of Gastroenterology and Hepatology, 29,* 957-963.

Bechman, K., Yates, M., & Galloway, J. B. (2019). The new entries in the therapeutic armamentarium: The small molecule JAK İnhibitors. *Pharmacological Research,147,* 104392.

Barrera, G. J., & Sanchez, G. (2015). Cytokine modulation (IL-6, IL-8, IL-10) by human breast milk lipids on intestinal epithelial cells (caco-2). *Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine, 0(0):1–*8. doi:10.3109/14767058.2015.1091879.

Borgonetti, V., Cocetta, V., Biagi, M., Carnevali, I., Governa, P., Montopoli, M. (2020). Anti-inflammatory activity of a fixed combination of probiotics and herbal extract in an in vitro model of intestinal inflammation by stimulating Caco-2 cells with LPS-conditioned THP-1 cells medium. *Minerva Pediatrica,* DOI: 10.23736/S0026-4946.20.05765-5.

Bousoik, E., & Montazeri Aliabadi, H. (2018). Do We Know Jack" About JAK? A Closer Look at JAK/STAT Signaling Pathway. *Frontiers in Oncology, 8,* 287. doi: 10.3389/fonc.2018.00287

Brel, A. K., Lisina, S. V., Popov, S. S., & Budaeva, Yu. N. (2016). Amidation of Hydroxybenzoic Acids with Imidazole. *Russian Journal of General Chemistry, 86(3),* 742-744.

Candelli, M., Franza, L., Pignataro, G., Ojetti, V.,Covino, M., Piccioni, A., Gasbarrini, A., & Franceschi, F. (2021). Interaction between Lipopolysaccharide and Gut Microbiota in Inflammatory Bowel Diseases. *International Journal of Molecular Sciences, 22,* 6242.

Chawla, S. P., Kanatt, S. R., & Sharma, A. K. (2015). Chitosan, chapter 8, # Springer International Publishing Switzerland 2015 K.G. Ramawat, J.-M. Me´rillon (eds.), Polysaccharides, DOI 10.1007/978-3-319-16298-0_13.

Che, L., Li, Y., Song, R., Qin, C., Hao, W., Wang, B., Yang, L., Peng, P., & Xu, F. (2019). Anti-inflammatory and anti-apoptosis activity of taraxasterol in ulcerative colitis in vitroand in vivo. *Experimental and Therapeutic Medicine,* 18, 1745-1751.

Chen, L., Deng, H., Cui, H., Fang, J., Zuo, Z., Deng, J., Li, Y., Wang, X., & Zhao, L. (2018). Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs. *Oncotarget, 9(6),* 7204-7218.

Chen, A., Okafor, I. S., Garcia, C., & Wang, G. (2018). Synthesis and self-assembling properties of 4,6- O-benzylidene acetal protected D-glucose and D-glucosamine beta-1,2,3-triazole derivatives. *Carbohydrate Research, 461*, 60-75.

Cheng, K.C., Li, C., & Uss, A. S. (2008). Prediction of oral drug absorption in humans–from cultured cell lines and experimental animals. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology 4(5),* 581-590.

Chevolot, Y., Vidal, S., Laurenceau, E., Morvan, F., Vasseur, J. J., & Souteyrand, E. (2009). Carbohydrates as Recognition Receptors in Biosensing Applications. *Recognition Receptors in Biosensors, 13,* 275-341.

Cohen, N. A. & Rubin, D. T. (2021). New targets in inflammatory bowel disease therapy: 2021. *Current Opinion Gastroenterology, 37(4),* 357-363.

Collaborators GBDIBD. (2020). 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 Gastroenterology & Hepatology, 5(1),* 17-30.

Cordes, F., Foell, D., Ding, J. N., Varga, G., & Bettenworth, D. (2020). Differential regulation of JAK/STAT-signaling in patients with ulcerative colitis and Crohn's disease. *World Journal of Gastroenterology, 26(28),* 4055-4075.

Creff, J., Malaquin, L., & Besson, A. (2021). In vitro models of intestinal epithelium: Toward bioengineered systems. *Journal of Tissue Engineering, (12),* 1-16.

Crespo, I., San-Miguel, B., Mauriz, J. L., Ortiz de Urbina, J. J., MarAlmar, Tuñón, M. J., & González-Gallego, J. (2017). Protective Effect of Protocatechuic Acid on TNBS-Induced Colitis in Mice Is Associated with Modulation of the SphK/S1P Signaling Pathway. *Nutrients, 9,* 288.

Cross, R. K, & Wilson, K. T. (2003). Nitric Oxide in Inflammatory Bowel Disease. *Inflammatory Bowel Diseases, 9(3),* 179-189.

Cumpstey, I. (2013). Chemical Modification of Polysaccharides. Hindawi Publishing Corporation, *ISRN Organic Chemistry, Article ID* 417672.

Darendelioglu, E. (2020). Caffeic acid suppresses HT-29 cell death induced by H_2O_2 via oxidative stress and apoptosis. *Bratislava Medical Journal, 121(11),* 805-811.

Debele, T. A., Mekuria, S. L., & Tsai, H. C. (2016). Polysaccharide based nanogels in the drug delivery system: Application as the carrier of pharmaceutical agents. *Material Science and Engineering C, 68,* 964-981.

De León-Rodríguez, M. C. P., Guyot, J. P. & Laurent-Babot, C. (2019). Intestinal invitro cell culture models and their potential to study the effect of food components on

intestinal inflammation, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 59(22),* 3648-3666.

De Vries, L. C. S., Wildenberg, M. E., De Jonge, W. J. & D'Haens, G. R. (2017). The Future of Janus Kinase Inhibitors in Inflammatory Bowel Disease. *Journal of Crohn's and Colitis, 11(7),* 885-893.

Devriese, S., Van den Bossche, L., Van Welden, S., Holvoet, T., Pinheiro, I., Hindryckx, P., De Vos, M., & Laukens, D. (2017). T84 monolayers are superior to Caco-2 as a model system of colonocytes. *Histochemistry and Cell Biology, 148,* 85-93.

Di Marzo, N., Chisci, E., & Giovannoni, R. (2018). The role of hydrogen peroxide in redoxdependent signaling: homeostatic and pathological responses in mammalian cells. *Cells, 7,* 156.

Efthimiadou, E. K., Metaxa, A. F., & Kordas, G. (2014). Modified Polysaccharides as Drug Delivery. Polysaccharides. Springer International Publishing, Switzerland. DOI 10.1007/978-3-319-03751-6_23-1.

Faheina-Martins, G. V., Alves Leite, J., Braga Dantas, B., Lima-Júnior, C. G., Vasconcellos, M. L. A. A., Rodrigues-Mascarenhas, S., & Araújo, D. A. M. (2017). Morita-Baylis-Hillman Adducts Display Anti-Inflammatory Effects by Modulating Inflammatory Mediator Expression in RAW264.7 Cells. *Hindawi, Mediators of Inflammation, Volume 2017,* Article ID 6898505.

Fang, W., Zhu, S., Niu, Z., & Yin, Y. (2019). The protective effect of syringic acid on dextran sulfatesodium-induced experimental colitis in BALB/c mice. *Drug Development Research, 80,* 731-740.

Fitzgerald, K. A., Malhotra, M., Curtin, C. M., O' Brien, F. J., & O' Driscoll, C. M. (2015). Life in 3D is never flat: 3D models to optimise drug delivery. *Journal of Controlled Release, 215,* 39-54.

Fogh, J., & Trempe, G. (1975). New human tumor cell lines. In Human tumor cells in vitro. ed. J. Fogh, pp. 115–159. Springer, New York.

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

Gagnon, M., Zihler Berner, A., Chervet, N., Chassard, C., Lacroix, C. (2013). Comparison of the Caco-2, HT-29 and the mucus-secreting HT29-MTX intestinal cell models to investigate Salmonella adhesion and invasion. *Journal of Microbiological Methods, 94,* 274-279.

Gareb, B., Otten, A. T., Frijlink, H. W., Dijkstra, G., & Kosterink, J. G. W. (2020). Local Tumor Necrosis Factor-α Inhibition in Inflammatory Bowel Disease. *Pharmaceutics, 12,* 539.

Garcia-Valdez, O., Champagne, P., & Cunningham, M. F. (2018). Graft modification of natural polysaccharides via reversible deactivation radical polymerization. *Progress in Polymer Science, 76,* 151-173.

Garner, J., & Park, K. (2015). Chemically Modified Natural Polysaccharides to Form Gels. Chapter 50, Springer International Publishing, Switzerland. K.G. Ramawat, J.-M. Me´rillon (eds.), Polysaccharides, DOI 10.1007/978-3-319-16298-0_31.

Geremia, A., Biancheri, P., Allan, P., Corazza, G. R., & Di Sabatino, A. (2014). Innate and adaptive immunity in inflammatory bowel disease. *Autoimmunity Reviews 13(1),* 3-10.

Gim, S., Zhu, Y., Seeberger, P. H., & Delbianco, M. (2019). Carbohydrate-based nanomaterials for biomedical applications. Wiley interdisciplinary reviews: *Nanomedicine and Nanonbiotechnology*, *11(5),* e1558.

Grisin, T., Bories, C., Loiseau, P. M., & Bouchemal, K. (2017). Cyclodextrin-mediated self-associating chitosan micro-platelets act as a drug booster against Candida glabrata mucosal infection in immunocompetent mice. *International Journal of Pharmaceutics, 519,* 381-389.

Guan, Q., & Zhang, J. (2017). Recent Advances: The Imbalance of Cytokines in the Pathogenesis of Inflammatory Bowel Disease. *Hindawi Mediators of Inflammation,* Article ID 4810258.

Gunawardena, D., Raju, R., & Münch, G. (2019). Hydrogen peroxide mediates pro-inflammatory cell-to-cell signaling: a new therapeutic target for inflammation? *Neural Regeneration Research, 14(8),* 1430-1437.

Harris, C., & Cummings, J. R. F., (2021). JAK1 inhibition and inflammatory bowel disease. *Rheumatology (Oxford). 60(Suppl 2),* ii45–ii51.

Harrison, D. A. (2012). The Jak/STAT pathway. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology, 4(3*), a011205. doi: 10.1101/cshperspect.a011205.

Hassani, A., Mahdi, M., Azarian, S., Ibrahim, W. N., & Hussain, S. A. (2020). Preparation, characterization and therapeutic properties of gum arabic-stabilized gallic acid nanoparticles. *Scientifc Reports, 10,* 17808.

Iglesias, N., Galbis, E., Díaz-Blanco, M. J., Lucas, R., Benito, E., & Violante de-Paz, M. (2019). Nanostructured Chitosan-Based Biomaterials for Sustained and Colon-Specific Resveratrol Release *International Journal of Molecular Sciences, 20,* 398.

Iskandar, L., Rojo, L., Di Silvio, L., & Deb, S. (2019). The effect of chelation of sodium alginate with osteogenic ions, calcium, zinc, and strontium. *Journal of Biomaterials Applications, 34(4),* 573-584.

Jairath, V., & Feagan, B. G. (2020). Global burden of inflammatory bowel disease. *Lancet Gastroenterology Hepatology, 5,* 2-3.

Jian, Y. S., Chen, C. W., Lin, C. A., Yu, H. P., Lin, H. Y., Liao, M. Y., Wu, S. H., Lin, Y. F., & Lai, P. S. (2017). Hyaluronic acid–nimesulide conjugates as anticancer drugs against CD44-overexpressing HT-29 colorectal cancer in vitro and in vivo. *International Journal of Nanomedicine, 12,* 2315-2333.

Joseph, S. M., Krishnamoorthy, S., Paranthaman, R., Moses, J. A., & Anandharamakrishnan, C., (2021). A review on source-specific chemistry, functionality, and applications of chitin and chitosan. *Carbohydrate Polymer Technologies and Applications, 2,* 100036.

Joshi, A., Soni, A., & Acharya, S. (2022). In vitro models and ex vivo systems used in inflammatory bowel disease. *In vitro models 1,* 213-227.

Joo, T., Sowndhararajan, K., Hong, S., Lee, J., Park, S. Y., Kim, S., & Jhoo, J. W. (2014). Inhibition of nitric oxide productionin LPS-stimulated RAW 264.7 cells by stem bark of Ulmus pumila L. *Saudi journal of Biological Sciences, 21,* 427-435.

Jhundoo, H. D., Siefen, T., Liang, A., Schmidt, C., Lokhnauth, J., Béduneau, A., Pellequer, Y., Larsen, C. C., & Lamprecht, A. (2020). Anti-Inflammatory Activity of Chitosan and 5-Amino Salicylic Acid Combinations in Experimental Colitis. *Pharmaceutics, 12,* 1038.

Kamalian, A., SohrabiAsl, M., Dolatshahi, M., Afshari, K., Shamshiri, S., Roudsari, N. M., Momtaz, S., Rahimi, R., Abdollahi, M., & Abdolghaffari, A. H. (2020). Interventions of natural and syntheticagents in inflammatory bowel disease, modulation of nitric oxide pathways. *World Journal of Gastroenterology, 26(24),* 3365-3400.

Kasembeli, M. M., Bharadwaj, U., Robinson, P., & Tweardy, D.J. (2018). Contribution of STAT3 to Inflammatory and Fibrotic Diseases and Prospects for its Targeting for Treatment. *International Journal of Molecular Science, 19(8),* 2299.

Kean, T., & Thanou, M., (2010). Biodegradation, biodistribution and toxicity of chitosan. *Advanced Drug Delivery Reviews, 62,* 3-11.

Khan, S., Minhas, M. U., Ahmad, M., & Sohail , M. (2018). Self-assembled supramolecular thermoreversible β-cyclodextrin/ ethylene glycol injectable hydrogels with difunctional Pluronic® 127 as controlled delivery depot of curcumin. Development, characterization and in vitro evaluation, *Journal of Biomaterials Science. Polymer Edition, 29 (1),* 1-34.

Kim, S. J., Kim, M. C., Um, J. Y. & Hong, S. H. (2010). The Beneficial Effect of Vanillic Acid on Ulcerative Colitis. *Molecules, 15,* 7208-7217.

Kolios G., Valatas V., & Ward, S. G. (2004). Nitric oxide in inflammatory bowel disease: a universal messengerin an unsolved puzzle. *Immunology, 113,* 427-437.

Lesuffleur, T., Barbat, A., Dussaulx, E., & Zweibaum, A. (1990). Growth adaptation to methotrexate of HT-29 human colon carcinoma cells is associated with their ability to differentiate into columnar absorptive and mucus-secreting cells. *Cancer Research 50(19),* 6334-6343.

Lesuffleur, T., Porchet, N., Aubert, J. P., Swallow, D., Gum, J. R., Kim, Y. S., Real, F. X. & Zweibaum, A. (1993). Differential expression of the human mucin genes MUC1 to MUC5 in relation to growth and differentiation of different mucus-secreting HT-29 cell subpopulations. *Journal of Cell Science 106(3),* 771-783.

Lim, Y. Z., Monira, S., Flavia, H., Cicuttini, M., & Wang, Y. Y. (2019). Chapter 6 - Nutrients and Dietary Supplements for Osteoarthritis, Bioactive Food as Dietary Interventions for Arthritis and Related Inflammatory Diseases (Second Edition), pp. 97-137. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813820-5.00006-4.

Lin, C. M. A., Cooles, F. A. H, & Isaacs, J. D. (2020). Basic Mechanisms of JAK Inhibition. *Mediterranean Journal of Rheumatology, 31(Suppl 1),* 100-104.

Liso, M., Verna, G., Cavalcanti, E., De Santis, S., Armentano, R., Tafaro, A., Lippolis, A., Campiglia, P., Gasbarrini, A., Mastronardi, M., Torres Pizarro, T., Cominelli, F., Lopetuso, L. R., & Chieppa, M. (2022). Interleukin 1b Blockade Reduces Intestinal Inflammation in a Murine Model of Tumor Necrosis Factor–Independent Ulcerative Colitis. *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology, 14 (1),* 151-171.

Lozoya-Agullo, I., Araujo, F., Gonzalez-Alvarez, I., Merino-Sanjuan, M., Gonzalez-Alvarez, M., & Bermejo, M, vd. (2017). Usefulness of Caco-2/HT29-MTX and Caco-2/HT29-MTX/Raji B coculture models to predict intestinal and colonic permeability compared to Caco-2 monoculture. *Molecular Pharmaceutics of United States, 14,* 1264-1270.

Marín, M., Giner, R. M., Ríos, J. L., & Recio, M. C. (2013). Intestinal anti-inflammatory activity of ellagic acid in the acute and chronic dextrane sulfate sodium models of mice colitis. *Journal of Ethnopharmacology, 150,* 925-934.

Martinez-Maqueda, D., Miralles, B., Recio, I. (2015). HT29 cell line. In: Verhoeckx K, Cotter P, Lopez-Exposito I, Kleiveland C, Lea T, Mackie A, et al., editors. The impact of food bioactives on health: in vitro and ex vivo models. p. 113-124, Cham (CH): Springer; 2015.

Mattiuzzo, E., Faggian, A., Venerando, R., Benetti, A., Belluzzi, E., Abatangelo, G., Ruggieri, P., & Brun, P. (2021). In Vitro Effects of Low Doses of-Caryophyllene, Ascorbic Acid and D-Glucosamine on Human Chondrocyte Viability and Inflammation. *Pharmaceuticals,14,* 286.

Mazloom, B. F., Edalatmanesh, M. A. & Hosseini, S. E. (2019). Gallic acid reduces inflammatory cytokines and markers of oxidative damage in a rat model of estradiol-induced polycystic ovary. *Comparative Clinical Pathology, 28,* 1281-1286.

McCool, D. J., Marcon, M. A., Forstner J. F., & Forstner, G. G. (1990). The T84 human colonic adenocarcinoma cell line produces mucin in culture and releases it in response to various secretagogues. *Biochemical Journal, 267,* 491-500.

Mizrahy, S., & Peer, D. (2012). Polysaccharides as building blocks for nanotherapeutics. *Chemical Society Reviews, 41,* 2623-2640.

McEntee, C. P., Finlay, C. M. & Lavelle, E. C. (2019). Divergent Roles for the IL-1 Family in Gastrointestinal Homeostasis and Inflammation. *Frontiers in Immunology, 10,* 1266. doi: 10.3389/fimmu.2019.01266

Mohammed, A. S. A., Naveed, M., & Jost, N. (2021). Polysaccharides; Classification, Chemical Properties, and Future Perspective Applications in Fields of Pharmacology and Biological Medicine (A Review of Current Applications and Upcoming Potentialities). *Journal of Polymers and the Environment, 29,* 2359-2371.

Moon, S. Y., Kim, K. D., Yoo, J., Lee, J. H., & Hwangbo, C. (2021a). Phytochemicals Targeting JAK–STAT Pathways in Inflammatory Bowel Disease: Insights from Animal Models. *Molecules, 26,* 2824.

Moon, J. M., Finnegan, P., Stecker, R. A., Lee, H., Ratliff, K. M., Jäger, R., Purpura, M., Slupsky, C. M., Marco, M. L., & Wissent, C. J., vd. (2021b). Impact of Glucosamine Supplementation on Gut Health. *Nutrients, 13,* 2180.

Navarro, S. L., White, E., Kantor, E. D., Zhang, Y., Rho, J., & Song, X., vd. (2015). Randomized Trial ofGlucosamine and Chondroitin Supplementation onInflammation and Oxidative Stress Biomarkers and Plasma Proteomics Profiles in Healthy Humans. *PLoS ONE 10(2),* e0117534.

Navarro, D. M. D. L, Abelilla, J. J., Stein, H. H. (2019). Structures and characteristics of carbohydrates in diets fed to pigs: a review. *Journal of Animal Science and Biotechnology, 10, 39.* doi: 10.1186/s40104-019-0345-6.

Niu, W., Chen, X., Xu, R., Dong, H., Yang, F., Wang, Y., Zhang, Z., & Ju, J. (2021). Polysaccharides from natural resources exhibit great potential in the treatment of ulcerative colitis: A review. *Carbohydrate Polymers, 254,* 117189.

Ok Son, D., Satsu, H., & Shimizu, M. (2005). Histidine inhibits oxidative stress- and TNF-a-induced interleukin-8 secretion in intestinal epithelial cells. *FEBS Letters, 579,* 4671-4677.

Onishi, M., Ozasa, K., Kobiyama, K., Ohata, K., Kitano, M., Taniguchi, K., Homma, T., Kobayashi, M., Sato, A., Katakai, Y., Yasutomi, Y., Wijaya, E., Igarashi, Y., Nakatsu, N., & Ise, (2015). Hydroxypropyl-b-Cyclodextrin Spikes Local Inflammation That Induces Th2 Cell and T Follicular Helper Cell Responses to the Coadministered Antigen. *The Journal of Immunology, 194,* 2673-2682.

Özer, H., Taşkesen, A., Kul, O., Selek, H. Y., Turanlı, S., & Köse, K. (2011). Glukozamin kondroitin sülfatın onarılmış tenotomize sıçan Aşil tendonları üzerine etkisi Effect of glucosamine chondroitine sulphate on repaired tenotomized rat Achilles tendons. *Eklem Hastalık Cerrahisi, 22(2),* 100-106.

Pandurangan, A. K., Mohebali, N., Esa, N. M., Looi, C. Y., Ismail, S., & Saadatdoust, Z. (2015). Gallic acid suppresses inflammation in dextran sodium sulfate-induced colitis in mice: Possible mechanisms. *International Immunopharmacology, 5(28),* 1034-1043.

Pasanphan, W., & Chirachanchai, S. (2008). Conjugation of gallic acid onto chitosan: An approach for green and water-based antioxidant. *Carbohydrate Polymers, 72(1),* 169-177.

Pawar, H. A., Kamat, S. R., & Choudhary, P. D. (2015). An Overview of Natural Polysaccharides as Biological Macromolecules: Their Chemical Modifications and Pharmaceutical Applications. *Biology and Medicine (Aligarh) 6*, 224. doi: 10.4172/0974- 8369.1000224

Pérez-Jeldres, T., Tyler, C. J., Boyer, J. D., Karuppuchamy, T., Yarur, A., Giles, D. A., Yeasmin, S., Lundborg, L., Sandborn, W. J., Patel, D. R., & Rivera-Nieves, J. (2019). Targeting Cytokine Signaling and Lymphocyte Traffic via Small Molecules in Inflammatory Bowel Disease: JAK Inhibitors and S1PR Agonists. *Frontiers in Pharmacology, 10,* 212.

Piegat, A., Goszczyńska, A., Idzik, T., & Niemczyk, A. (2019). The importance of reaction conditions on the chemical structure of N, O-acylated chitosan derivatives. *Molecules, 24(17),* 3047.

Pravda, J. (2019). Can ulcerative colitis be cured? *Discovery Medicine, 27,* 197-200.

Pravda, (2020). Hydrogen peroxide and disease: towards a unified system of pathogenesis and therapeutics. *Molecular Medicine, 26,* 41. https://doi.org/10.1186/s10020-020-00165-3.

Prasher, P., Sharma, M., Mehta, M., Satija, S., Aljabali, A. A., Tambuwala, M. M., & Anand, K., vd. (2021). Current-status and applications of polysaccharides in drug delivery systems. *Colloid and Interface Science Communications, 42,* 100418.

Rahimian, R., Lalancette-Hebert, M., Weng ,Y. C., Sato, S., & Kriz, J., (2020). Glucosamine-mediated immunomodulation after stroke is sexually dimorphic. *Brain, Behavior, & Immunity-Health, 3,* 100041i.

Ramos, G. P., & Papadakis, K. A. (2019). Mechanisms of Disease: Inflammatory Bowel Diseases. *Mayo Clinic Proceedings, 94(1),* 155-165.

Randhawa, P. K., Singh, K., Singh, N., & Jaggi, A. S. (2014). A Review on Chemical-Induced Inflammatory Bowel Disease Models in Rodents. *The Korean Journal of Physiology & Pharmacology, 18(4),* 279-288.

Rodriguez-Ramiro, I., Ramos, S., Lopez-Oliva, E., Agis-Torres, A., Bravo, L., Goya, L., & Martin, M. A. (2013). Cocoa polyphenols prevent inflammation in the Colon of azoxymethane-treated rats and in TNF-a-stimulated caco-2 cells. *British Journal of Nutrition 110(02),* 206-215.

Ruemmele, F. M., Beaulieu, J. F., Dionne, S., Levy, E., Seidman, E. G., Cerf-Bensussan, N., & Lentze, M. J. (2002). Lipopolysaccharide modulation of normal enterocyte turnover by toll-like receptors is mediated by endogenously produced tumour necrosis factor a. *Gut, 51,* 842-848.

Salla, S., Sunkara, R., Ogutu, S., Walker, L. T., & Verghese, M. (2016). Antioxidant activity of papaya seed extracts against H_2O_2 induced oxidative stress in HepG2 cells. *LWT - Food Science and Technology, 66,* 293e297294.

Salvatore, S., Heuschkel, R., Tomlin, S., Davies, S. E., Edwards, S., Walker-Smith, J. A., French, I., & Murch, S. H., (2000). A pilot study of N-acetyl glucosamine, a nutritional substrate for glycosaminoglycan synthesis, in paediatric chronic inflammatory bowel disease. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics, 14,* 1567-1579.

Sambuy, Y., De Angelis, I., Ranaldi, G., Scarino, M. L., Stammati, A., & Zucco, F. (2005). The Caco-2 cell line as a model of the intestinal barrier: influence of cell and culture-related factors on Caco-2 cell functional characteristics. *Cell Biology and Toxicology, 21(1),* 1-26.

Sanchez-Maldonado, A. F., Schieber, A., & Ganzle, M. G. (2011). Structure–function relationships of the antibacterial activity of phenolic acids and their metabolism by lactic acid bacteria. *Journal of Applied Microbiology, 111,* 1176-1184.

Santhanam, S., Venkatraman, A., & Ramakrishna, B. S. (2007). Impairment of mitochondrial acetoacetyl CoA thiolase activity in the colonic mucosa of patients with ulcerative colitis. *GUT, 56,* 1543-1549.

Sarker, U., & Oba, S. (2020). Phenolic profiles and antioxidant activities in selected drought-tolerant leafy vegetable amaranth. *Scientific Reports, 10,* 18287.

Shawki, A., & McCole, D. F. (2017). Mechanisms of Intestinal Epithelial Barrier Dysfunction by Adherent-Invasive *Escherichia coli*. *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology, 3(1),* 41-50.

Shimada, M., Kadowaki, T., Taniguchi, Y., Inagawa, H., Okazaki, K., & Soma, G. I., (2012). The involvement of O-antigen polysaccharide in lipopolysaccharide in macrophage activation. *Anticancer Research, 32(6),* 2337-2341.

Soufli, I., Toumi, R., Rafa, H., & Touil-Boukoffa, C. (2016). Cytokines and Nitric Oxide in Immunopathogenesis of IBD and Potential Therapeutic Approaches. Chapter in book: New Insights into Inflammatory Bowel Disease. http://dx.doi.org/10.5772/65001.

Stephens, M., & Von der Weid, P. Y. (2020). Lipopolysaccharides modulate intestinal epithelial permeability and inflammation in a species-specific manner. *Gut Microbes, 11(3),* 421-432.

Strober, W., & Fuss, I. J. (2011). Pro-Inflammatory Cytokines in the Pathogenesis of IBD. *Gastroenterology, 140(6),* 1756-1767.

Sun, Y., Jing, X., Ma, X., Feng, Y., & Hu, H. (2020). Versatile Types of Polysaccharide-Based Drug Delivery Systems: From Strategic Design to Cancer Therapy. *International Journal of Molecular Sciences, 21,* 9159.

Tjahjono, Y., Karnati, S., Foe, K., Anggara, E., Novandi Gunawan, Y., Wijaya, H., Steven, Suyono, H., Yesery Esar, S., Hadinugroho, W., Wihadmadyatami, H., Ergün, S., Megawati Widharna, R., & Caroline, (2021). Anti-inflammatory activity of 2-((3-(chloromethyl)benzoyl)oxy)benzoic acid in LPS-induced rat model. *Prostaglandins and Other Lipid Mediators, 154*, 106549.

Turco, L., Catone, T., Caloni, F., Consiglio, E. D., Testai, E., & Stammati, A. (2011). Caco-2/TC7 cell line characterization for intestinal absorption: How reliable is this in vitro model for the prediction of the oral dose fraction absorbed in human? *Toxicology in Vitro, 25(1),* 13-20.

Valkova, N., Lépine, F., Valeanu, L., Dupont, M., Labrie, L., Bisaillon, J. G., Beaudet, R., Shareck, F., & Villemur, R. (2001). Hydrolysis of 4-Hydroxybenzoic Acid Esters (Parabens) and Their Aerobic Transformation into Phenol by the Resistant *Enterobacter* cloacae Strain EM. *Applied and Environmental Microbiology, 67(6),* 2404-2409.

Vanuytsel, T., Tack, J., & Farre, R. (2021). The Role of Intestinal Permeability in Gastrointestinal Disorders and Current Methods of Evaluation. *Frontiers in Nutrition, 8,* 717925. doi: 10.3389/fnut.2021.717925

Wu, Y. L., Kou, Y. R., Ou, H. L., Chien, H. Y., Chuang, K. H., Liu, H. H., Lee, T. S., Tsai, C. Y., & Lu, M. L. (2010). Glucosamine regulation of LPS-mediated inflammation in human bronchialepithelial cells. *European Journal of Pharmacology, 635,* 219-226.

Xiang, S., & Xiao, J., (2022). Protective effects of syringic acid on inflammation, apoptosis and intestinal barrier function in Caco-2 cells following oxygen-glucose

deprivation/reoxygenation-induced injury. *Experimental and Therapeutic Medicine, 23*, 66.

Yamamoto-Furusho, J. K. (2018). Inflammatory bowel disease therapy: blockade of cytokines and cytokine signaling pathways. *www.co-gastroenterology.com., 34(4),* 187-193.

Yao, D., Xu, L., Xu, O., Li, R., Chen, M., Shen, H., Zhu, H., Zhang, F., Yao, D., Chen, Y. F., Oparil, S., Zhang, Z., & Gong, K. (2018). O-Linked β-N-Acetylglucosamine Modification of A20 Enhances the Inhibition of NF-κB (Nuclear Factor-κB) Activation and Elicits Vascular Protection After Acute Endoluminal Arterial Injury. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology, 38,* 1309-1320.

Yan, J., Dua, G., Qin, X., & Gao, L. (2020). Baicalein attenuate stheneuroinflammation in LPS-activated BV-2 microglial cells through suppression of pro-inflammatory cytokines, COX2/NF-κB expressions and regulation of metabolic abnormality. *International Immunopharmacology,79,* 106092.

Yang, J. S., Xie, Y. J., & He, W. (2011). Research progress on chemical modification of alginate: A review. *Carbohydrate Polymers, 84,* 33-39.

Yeshi, K., Ruscher, R., Hunter, L., Daly, N. L., Loukas, A. & Wangchuk, P. (2020). Revisiting Inflammatory Bowel Disease: Pathology, Treatments, Challenges and Emerging Therapeutics Including Drug Leads from Natural Products. *Journal of Clinical Medicine, 9,* 1273.

Yi, J., Knudsen, T. A., Nielsen, A. L., Duelund, L., Christensen, M., Hervella, P., Needham, D., & Mouritsen, O. G. (2016). Inhibition of cholesterol transport in an intestine cell model by pine-derived phytosterols. *Chemistry and Physics of Lipids, 200,* 62-73.

Yoldaş, H. (2016). Deneysel Kolit Modelinde Probiyotik Ve Omega-3 Yağ Asitlerinin İnflamatuar Yanıta Etkileri, Başkent Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Ensititüsü Beslenme Ve Diyetetik Anabilim Dalı, Doktora Tezi, Ankara, 2016.

Yuan, Z., Ye, Y., Gao, F.,Yuan, H., Lan, M., Lou, K., & Wang, W., (2013). Chitosan-graf-β-cyclodextrin nanoparticles as a carrier for controlled drug release. *International Journal of Pharmaceutics, 446,* 191-198.

Zhao Q., Geng H., Wang, Y., Gao Y., Huang J., Wang Y., Zhang J., & Wang, S. (2014). Hyaluronic Acid Oligosaccharide Modified Redox-Responsive Mesoporous Silica Nanoparticles for Targeted Drug Delivery. *ACS Applied Materials & Interfaces, 6(22),* 20290-20299.

Zhao, B. B., Meng, J., Zhang, Q. X., Kang, T. T., & Lu, R. R. (2017). Protective effect of surface layer proteins isolated from four Lactobacillus strains on hydrogen-peroxide-induced HT-29 cellsoxidative stress. *International Journal of Biological Macromolecules 102,* 76-83.

Zhong, L. M., Zong, Y., Sun, L.,Guo, J. Z., Zhang, W., He, Y., Song, R., Wang,W. M., Xiao, C. J., & Lu, D. (2012). Resveratrol Inhibits Inflammatory Responses via the Mammalian Target of Rapamycin Signaling Pathway in Cultured LPS-Stimulated Microglial Cells. *PLoS ONE, 7,(2),* e32195.

Zhong, Y., Qi, A., Liu, L., Huang, Q., Zhang, J., Cai, K., & Cai, C. (2021). Shikonin attenuates H₂O₂-induced oxidative injury in HT29 cells via antioxidant activities and the inhibition of mitochondrial pathway-mediated apoptosis. *Experimental and Therapeutic Medicine, 22,* 1118.

Zhou, G., Kong, W. S., Li, Z. C., Xie, R. F., Yu, T. Y., & Zhou, X. (2021). Effects of Qing Chang Suppository powder and its ingredients on IL-17 signal pathway in HT-29 cells and DSS-induced mice. *Phytomedicine Research in Germany, 87,* 153573.

Zhu, X., Yu, L., Zhang, M., Xu, Z., Yao, Z., Wu, Q., Du, X., Li, J., & Zhu vd. (2018). Design, synthesis and biological activity of hydroxybenzoic acid ester conjugates of phenazine-1-carboxylic acid. *Chemistry Central Journal, 12(111),* 1-10.

Zweibaum, A., Laburthe, M., Grasset, E., & Louvard, D. (2011). Use of cultured cell lines in studies of intestinal cell differentiation and function. In Comprehensive physiology, 223–255. Hoboken: John Wiley & Sons, Inc, New Jersey, USA.

Zucco, F., Batto, A. F., Bises, G., Chambaz, J., Chiusolo, A., Consalvo, R., Cross, H., & Dal Negro, G. vd. (2005). An inter-laboratory study to evaluate the effects of medium composition on the differentiation and barrier function of caco-2 cell lines. *ATLA: Alternatives to Laboratory Animals, 33(6),* 603-618.

ÖZGEÇMİŞ

Elif Ecem FINDIK, 1995 yılında Edirne/Merkez'de dünyaya geldi. İlköğrenimini 2001-2004 yılları arasında Trakya Birlik İlköğretim Okulu, 2004-2008 yılları arasında Bilecik Atatürk İlköğretim Okulu ve 2008-2009 yılları arasında Bilecik Toki İlköğretim Okulu'nda gerçekleştirdi. 2013 yılında Edirne İlhami Ertem Anadolu Lisesi'nden mezun oldu. Lisans eğitimini 2013-2018 yılları arasında Gümüşhane Üniversitesi, Mühendislik Ve Doğa Bilimleri Fakültesi, Genetik ve Biyomühendislik Bölümü'nde aldı. Temmuz 2015-Ağustos 2015 tarihleri arasında Trakya Üniversitesi Tıbbi Genetik Laboratuvarı'nda stajyer olarak çalıştı. Temmuz 2017-Ağustos 2017 tarihleri arasında Olin Yağ Fabrikası Üretim ve Laboratuvarda stajyer olarak çalıştı. 10 Nisan 2020-15 Temmuz 2020 tarihleri arasında Türkiye Sağlık Enstitüleri Başkanlığı (TÜSEB) Ümraniye Eğitim ve Araştırma Hastanesi Covid-19 Tanı Merkezi'nde Genetik ve Biyomühendis olarak gönüllü görev yaptı. 15 Temmuz 2020-1 Eylül 2020 tarihleri arasında Türkiye Sağlık Enstitüleri Başkanlığı (TÜSEB) Sabiha Gökçen Havaalanı Covid-19 Tanı Merkezi'nde Laboratuvar sorumlusu olarak görev yaptı. 20 Eylül 2020-6 Ekim 2020 tarihleri arasında SMART Laboratuvar/Tayen Health- İstanbul Teknopol ve Sabiha Gökçen Havaalanı Laboratuvar Sorumlusu olarak çalıştı. 9 Ekim 2020'den beri Techno Health Sancaktepe Prof. Dr. Feriha Öz Acil Durum Hastanesi Covid-19 Tanı Merkezi Laboratuvar Sorumlusu olarak görev yaptı. Halen, 2018 yılında Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoteknoloji ve Genetik Anabilim Dalı'nda başladığı Yüksek Lisans eğitimini sürdürmektedir.

Yayınlar

Uluslararası Kitap veya Kitapta Bölüm

1. Becenen N., Erdogan S. **Fındık E.E.:** Investigation into the functional properties of cotton, wool and denim textile materials finished with chitosan and the use of chitosan in textile-reinforced composites and medical textiles in The Hand book of Chitin and Chitosan Vol. 3, ed. Thomas, S., Gopi, S. and Pius A., Elsevier, Woodhead Publishing, 2020.

Uluslararası Hakemli Kongre ve Sempozyum Bildirileri

1. Erdoğan S., **Fındık E.E.,** Bekar B., Comparison of the structure of chitin extracted from pupa, cocoon & pupa exuviae of the Turkish mulberry silkworm Bombyx mori L. Proceeedings of II. International Agricultural, Biological & Life Science Conference, E-Agbiol, 1 – 3 September, 2020, Edirne, Turkey, ISBN #: 978-975-374-278-8, Trakya University Publisher #: 238. Pp. 653-669.