

BEZMİALEM VAKIF ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

BARSAK ENFLAMASYONU OLUŞTURULAN HÜCRE KÜLTÜR
MODELİNDE, TİMOKİNONUN BİYOLOJİK AKTİVİTELERİ İLE
METABOLOMİK PROFİLLEMESİNİN ARAŞTIRILMASI

UZMANLIK TEZİ

Öznur YAŞAR

Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı

Tıpta Uzmanlık Programı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Abdurrahim KOÇYİĞİT

EYLÜL 2023

BEZMİALEM VAKIF ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

BARSAK ENFLAMASYONU OLUŞTURULAN HÜCRE KÜLTÜR
MODELİNDE, TİMOKİNONUN BİYOLOJİK AKTİVİTELERİ İLE
METABOLOMİK PROFİLLEMESİNİN ARAŞTIRILMASI

UZMANLIK TEZİ

Öznur YAŞAR

Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı

Tıpta Uzmanlık Programı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Abdurrahim KOÇYİĞİT

Bu tez, Bezmialem Vakıf Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu
Başkanlığı tarafından 20220613 kodlu proje ile desteklenmiştir.

EYLÜL 2023

Bezmialem Vakıf Üniversitesi, Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Tıpta Uzmanlık öğrencisi, Öznur YAŞAR, ilgili yönetmeliklerin belirlediği gerekli tüm şartları yerine getirdikten sonra hazırladığı “BARSAK ENFLAMASYONU OLUŞTURULAN HÜCRE KÜLTÜR MODELİNDE, TİMOKİNONUN BİYOLOJİK AKTİVİTELERİ İLE METABOLOMİK PROFİLLEMESİNİN ARAŞTIRILMASI” başlıklı tezini, aşağıda imzaları olan jüri önünde başarı ile sunmuştur.

Tez Danışmanı : **Prof. Dr. Abdürrahim KOÇYİĞİT**
Bezmialem Vakıf Üniversitesi

Jüri Üyeleri : **Prof. Dr. Şahabettin SELEK**
Bezmialem Vakıf Üniversitesi

Doç. Dr. Ömer Faruk ÖZER
Bezmialem Vakıf Üniversitesi

Teslim Tarihi : **14 Eylül 2023**

Savunma Tarihi : **21 Eylül 2023**



Eşime,

ÖNSÖZ

Tez çalışmamın gerçekleşmesinde rehberliği ve yardımlarıyla beni cesaretlendiren danışman hocam **Prof. Dr. Abdurrahim Koçyiğit**'e, deneysel çalışmalar ve uzmanlık eğitimim süresince her zaman kapısını çalabildiğim, bilgisini ve hoşgörüsünü eksik etmeyen hocam **Prof. Dr. Şehabettin SELEK**'e;

Çalışma sürecimde yardımlarını ve bilgilerini benimle paylaşan değerli arkadaşlarım **Dr. Fatmanur KÖKTAŞOĞLU**, **Dr. Metin DEMİREL** ve **Dr. Ufuk SARIKAYA**'ya;

İlk günden beri desteklerini her zaman hissettiğim kıymetli ekip arkadaşlarım **Ebru KANIMDAN**, **Zeynep ÖZMAN**, **Ezgi DURMUŞ** ve Fatmanur **BALİBEY**'e;

Beni bugünlere kadar yetiştiren ve her adımda arkamda olan sevgili annem **Havva KARABAŞ**, babam **Mustafa KARABAŞ** ve ablam **Özlem AKKAYA**'ya;

Son olarak da hayatımı güzelleştiren, mücadelemi huzurlu kılan canım eşim **Seyfullah YAŞAR**'a en içten teşekkürlerimi sunarım. Sizlerin destekleri olmadan bu çalışma gerçekleşmezdi.

Eylül 2023

Öznur YAŞAR

Doktor

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

Öznur YAŞAR



İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ.....	v
BEYAN.....	vi
KISALTMALAR	ix
SEMBOLLER	xi
TABLO LİSTESİ	xii
ŞEKİL LİSTESİ.....	xiii
ÖZET.....	xvi
SUMMARY	xix
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Enflamasyon.....	4
2.1.1. Akut enflamasyon	4
2.1.2. Kronik Enflamasyon	5
2.1.3. Enflamasyon-ROT ve RNT.....	7
2.2. Enflamatuvar Barsak Hastalığı	9
2.2.1. Tanım	9
2.2.2. Epidemiyoloji	9
2.2.3. Etyopatogenez	10
2.2.3.1. Barsak epiteli.....	10
2.2.3.2. Genetik Faktörler	11
2.2.3.3. GIS ve mukozal immünite	11
2.2.3.4. Mikrobiyata	15
2.2.3.5. Enflamatuvar barsak hastalığı gelişiminde ROT	15
2.2.3.6. Enflamatuvar barsak hastalığı patogenenezinde NO	17
2.2.3.7. Enflamatuvar barsak hastalığı ve sıkı bağlantı (SB) proteinleri	18
2.2.4. Klinik	19
2.2.5. Tanı	20
2.2.5.1. Enflamatuvar barsak hastalığı tanısında güncel biyobelirteçler.....	20
2.2.5.2. Görüntüleme.....	24
2.2.6. Tedavi.....	24
2.2.6.1. Modern tedavi yöntemleri	24
2.2.6.2. Tamamlayıcı tedavi yöntemleri.....	26
2.2.6.3. EBH tedavisinde polifenoller	26
2.2.6.4. EBH tedavisinde timokinon (TQ) kullanımı.....	27
2.3. Enflamatuvar barsak hastalığı tanısı için yeni biyobelirteç keşfi çalışmaları	28
2.3.1. EBH için yeni biyobelirteç keşfinde metabolomik çalışmaların yeri	29
2.3.2. Metabolomik analizde hücre kültürü kullanımı	31
3. GEREÇ ve YÖNTEM.....	33
3.1. Gereç	33
3.1.1. Cihazlar	33
3.1.2. Kimyasallar	34
3.1.3. Sarf Malzemeler	36
3.2. Yöntem.....	37
3.2.1. Hücre Kültürü.....	37
3.2.1.1. Hücre hattının açılması	37

3.2.1.2.	Hücrelerin çoğaltılması	38
3.2.1.3.	Hücrelerin Pasajlanması	38
3.2.2.	Sitotoksosite tayini	38
3.2.3.	Hücre içi ROT üretimi ölçümü	39
3.2.4.	Barsak enflamasyon modeli oluşturma	39
3.2.5.	TQ ve Budesonid uygulanması	40
3.2.6.	Deney gruplarının belirlenmesi	40
3.2.7.	Nitrit Ölçümü	41
3.2.8.	Hücre Sayımı	42
3.2.9.	Western Blott Analizi	43
3.2.9.1.	Protein izolasyonu	43
3.2.9.2.	Protein miktar analizi	43
3.2.9.3.	Western blot protokolü	44
3.2.10.	Metabolomik analiz	45
3.2.10.1.	Numunelerin hazırlanması	45
3.2.10.2.	NMR analizi	46
3.2.10.3.	LC-HRMS analizi	46
3.2.10.4.	Metabolomik Profilleme	46
4.	İSTATİSTİK ANALİZ	48
5.	BULGULAR	49
5.1.	Canlılık Analizi	49
5.1.1.	TQ'nun HT-29 hücre canlılığı üzerine etkisi	49
5.1.2.	Budesonidin HT-29 hücre canlılığı üzerine etkisi	50
5.1.3.	LPS'nin HT-29 hücre canlılığı üzerine etkisi	50
5.2.	ROT analizi	51
5.3.	Nitrit ölçümü	52
5.4.	Western Blot analizi	53
5.5.	NMR analizi	55
5.5.1.	Tüm Gruplar (K- LPS - LPS+TQ2 - LPS+TQ3 - TQ2 - TQ3).....	56
5.5.2.	Kontrol-LPS gruplarının kıyaslaması	59
5.5.3.	Kontrol-TQ2 karşılaştırması	62
5.5.4.	Kontrol-TQ3 gruplarının kıyaslanması	66
5.5.5.	LPS ve LPS+TQ uygulanan grupların karşılaştırması	70
5.6.	LC-MS/MS analizi	73
5.6.1.	Kontrol-TQ2.....	73
5.6.2.	Kontrol-TQ3.....	78
5.6.3.	Kontrol-Budesonid.....	85
5.6.4.	Kontrol-LPS	93
5.6.5.	LPS+TQ - LPS	100
5.6.6.	LPS+Budesonid- LPS	107
6.	TARTIŞMA	115
6.1.	TQ'nun ROT ve RNT üzerine etkisi	115
6.2.	TQ'nun okludin ve kludin-5 üzerine etkisi	116
6.3.	Barsak enflamasyonunun metabolomik incelenmesi	116
6.4.	TQ etkisinin metabolomik değerlendirilmesi.....	120
7.	SONUÇ ve ÖNERİLER.....	125
8.	KAYNAKLAR.....	126
	ÖZGEÇMİŞ.....	142

KISALTMALAR

IL-1	: İnterlökin-1
IL-6	: İnterlökin-6
TNF-α	: Tümör nekroz faktörü alfa
ROT	: Reaktif oksijen türleri
RNT	: Reaktif nitrojen türleri
SOD	: Süperoksit dismutaz
GPX	: Glutasyon peroksidaz
CAT	: Katalaz
NO	: Nitrik oksit
O₂^{·-}	: süperoksit
HO[·]	: hidroksil radikalleri
RO₂[·]	: peroksil
RO[·]	: alkoksil
HO₂[·]	: Hidroperoksil
O₂	: Oksijen molekülü
H₂O₂	: hidrojen peroksit
HOCl	: Hipokloröz asit
O₃	: Ozon
Fe²⁺	: Ferröz demir
NF-κB	: Nükleer faktör-kappa B
PMNL	: Polimorfonükleer lökosit
mtETZ	: Mitokondriyal elektron transport zinciri
ESH	: Eritrosit sedimentasyon hızı
CRP	: C-reaktif protein
MTT	: 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromid
TQ	: Timokinon
LPS	: Lipopolisakkarit
NMR	: Nükleer manyetik rezonans
PLS-DA	: Kısmi en küçük kareler diskriminant analizi
LC-MS/MS	: Sıvı kromatografisi kütle spektrometresi
GIS	: Gastrointestinal sistem
EBH	: Enflamatuvar barsak hastalığı
ADMA	: Asimetrik dimetilarginin
NOS	: Nitrik oksit sentaz
Nrf2	: Nükleer faktör eritroid 2-ilişkili faktör 2
NDMA	: N-nitrozodimetilamin
CH	: Chron Hastalığı
ÜK	: Ülseratif Kolit
NK	: Doğal öldürücü hücreler
Th	: T helper (yardımcı) hücreleri
Treg	: Reglatuvar (düzenleyici) T hücreleri
ZO	: Zonula okludens
FK	: Fekal kalprotektin
p-ANCA	: Perinükleer antinötrofil sitoplazmik antikor
ASCA	: Anti-Saccharomyces cerevisiae antikor
BT	: Bilgisayar tomografisi
MR	: Manyetik rezonans

DSS	: dekstran sülfat sodyum
[GC]-MS	: Gaz kromatografisi-Kütle spektrometresi
PCA	: Temel bileşen analizi
FBS	: Fetal sığır serum
DMSO	: Dimetil Sülfoksit
SPSS 28	: Statistical Package for the Social Science
DZAA	: Dallanmış zincirli amino asitler
NAD⁺	: Nikotinamid adenin dinükleotid
GSH	: Redükte glutatyon
GSSG	: okside glutatyon



SEMBOLLER

°C	: Derece Santigrat
mg/L	: miligram/litre
μM	: mikromolar
μg/ml	: mikrogram/mililitre
%	: yüzde
Rpm	: dakika devir sayısı
ml	: mililitre
g/l	: gram/litre
cm²	: santimetre kare
nm	: nanometre
μl	: mikrolitre
g	: gravite
dk	: dakika



TABLO LİSTESİ

Sayfa

Tablo 3.1. Kullanılan cihazlar ve markaları.....	33
Tablo 3.2. Kullanılan kimyasallar ve markaları.....	35
Tablo 3.3. Kullanılan sarf malzemeler ve markaları.....	36
Tablo 3.4. Deney grupları	41
Tablo 5.1. TQ3 grubunda kontrole göre anlamlı bulunan yolak analizi sonuçları ..	85
Tablo 5.2. Budesonid grubunda kontrole göre anlamlı bulunan yolak analizi sonuçları	92
Tablo 5.3. LPS grubunda kontrole göre anlamlı bulunan yolak analizi sonuçları.....	99
Tablo 5.4. LPS+TQ grubunda LPS grubuna göre anlamlı bulunan yolak analizi sonuçları	106
Tablo 5.5. LPS+Budesonid grubunda LPS grubuna göre anlamlı bulunan yolak analizi sonuçları	114

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 1.1. Nigella sativa (çörek otu) bitkisi ve tohumu, Timokinonun kimyasal formülü.....	2
Şekil 3.1. Nitrit ölçüm standart grafiği.....	42
Şekil 3.2. Protein standart grafiği.....	44
Şekil 5.1. µM cinsinden TQ'nun HT-29 hücreleri canlılığı üzerine etkisinin MTT testi ile analizi	49
Şekil 5.2. HT-29 hücre canlılığı üzerine µM cinsinden budesonidin etkisi.....	50
Şekil 5.3. HT-29 hücre canlılığı üzerine µg/ml cinsinden LPS'nin etkisi	51
Şekil 5.4. Hücre içi ROT ölçümüne TQ etkisi	52
Şekil 5.5. Nitrit düzeyi ölçümü	53
Şekil 5.6. Okludin ve beta aktin proteinlerinin bant görüntüsü	54
Şekil 5.7. Okludin protein ekspresyon seviyelerini gösteren bar grafiği	54
Şekil 5.8. Klaudin-5 ve beta aktin proteinlerinin bant görüntüsü	54
Şekil 5.9. Klaudin-5 protein ekspresyon seviyelerini gösteren bar grafiği.....	55
Şekil 5.10. Hücre homojenatlarıyla yapılan NMR analizi sonucu elde edilen metabolit konsantrasyonları ile oluşturulmuş one-way ANOVA görseli.	57
Şekil 5.11. Gruplar arası Laktat(A) ve Glikolat (B) konsantrasyonlarının bar grafiği.	58
Şekil 5.12. Numunelerdeki metabolitlerin konsantrasyon değerlerinin normalleştirilmiş verileri ile oluşturulmuş bir heatmap	59
Şekil 5.13. LPS – kontrol hücre metabolit verileri ile oluşturulmuş volkan grafiği ..	60
Şekil 5.14. İstatistikel olarak anlamlı fark gösteren Ksantin metabolitinin gruplar arası konsantrasyonlarının bar grafiği.	60
Şekil 5.15. Kontrol ve LPS uygulaması yapılan hücre gruplarından elde edilen metabolitlerin PLS-DA analizi ile elde edilen 2 boyutlu görsel (A) ve değişkenlerin önem sıralamasını gösteren VIP grafiği (B).	61
Şekil 5.16. Yol zenginleştirme analizinden alınan p değerlerine ve topoloji analizinden alınan yol etki değerlerine göre eşleşen yolları gösteren yolak dağılım grafiği. LPS-kontrol karşılaştırması.....	62
Şekil 5.17. Kontrol – TQ 2. Doz uygulanan hücre metabolit verileri ile oluşturulmuş volkan grafiği	63
Şekil 5.18. Kontrol ve TQ 2. doz uygulaması yapılan hücre gruplarından elde edilen metabolitlerin PLS-DA analizi ile elde edilen 2 boyutlu görsel (A) ve değişkenlerin önem sıralamasını gösteren VIP grafiği (B).	64
Şekil 5.19. Yol zenginleştirme analizinden alınan p değerlerine ve topoloji analizinden alınan yol etki değerlerine göre eşleşen yolları gösteren yolak dağılım grafiği. Kontrol – TQ 2. Doz uygulanan hücrelerin karşılaştırması.	65
Şekil 5.20. Kontrol – TQ 3. Doz uygulanan hücre metabolit verileri ile oluşturulmuş volkan grafiği.	67
Şekil 5.21. Kontrol ve TQ 3. doz uygulaması yapılan hücre gruplarından elde edilen metabolitlerin PLS-DA analizi ile elde edilen 2 boyutlu görsel (solda) ve değişkenlerin önem sıralamasını gösteren VIP grafiği (sağda).	68
Şekil 5.22. Yol zenginleştirme analizinden alınan p değerlerine ve topoloji analizinden alınan yol etki değerlerine göre eşleşen yolları gösteren yolak dağılım grafiği. Kontrol – TQ 3. Doz uygulanan hücrelerin karşılaştırması.	69

Şekil 5.23. LPS – LPS+TQ hücre metabolit verileri ile oluşturulmuş volkan grafiği.	71
Şekil 5.24. Unsupervised analiz metodu olan PCA ile net bir sınıf ayrımı yapılamamasına rağmen supervised metot olan PLS-DA ile gruplar arası ayrım yapıldı	71
Şekil 5.25. LPS ve LPS-TQ uygulaması yapılan hücre gruplarından elde edilen metabolitlerin PLS-DA analizi ile elde edilen 2 boyutlu görsel (A) ve değişkenlerin önem sıralamasını gösteren VIP grafiği (B).	72
Şekil 5.26. LC-MS/MS ile pozitif iyonizasyonda analiz edilen Kontrol- TQ2 hücre metabolitleriyle oluşturulmuş volkan grafiği.	74
Şekil 5.27. LC-MS/MS ile pozitif iyonizasyonda analiz edilen Kontrol- TQ2 hücre metabolitlerinin PLS-DA analizi ile elde edilen 2 boyutlu görseli	74
Şekil 5.28. LC-MS/MS ile pozitif iyonizasyonda analiz edilen Kontrol- TQ2 hücre metabolitlerinin önem sıralamasını gösteren VIP grafiği	75
Şekil 5.29. LC-MS/MS ile negatif iyonizasyonda analiz edilen Kontrol- TQ2 hücre metabolitleriyle oluşturulmuş volkan grafiği.	76
Şekil 5.30. LC-MS/MS ile negatif iyonizasyonda analiz edilen Kontrol- TQ2 hücre metabolitlerinin PLS-DA analizi ile elde edilen 2 boyutlu görseli	77
Şekil 5.31. LC-MS/MS ile negatif iyonizasyonda analiz edilen Kontrol- TQ2 hücre metabolitlerinin önem sıralamasını gösteren VIP grafiği	78
Şekil 5.32. LC-MS/MS ile pozitif iyonizasyonda analiz edilen Kontrol- TQ3 hücre metabolitleriyle oluşturulmuş volkan grafiği.	79
Şekil 5.33. LC-MS/MS ile pozitif iyonizasyonda analiz edilen Kontrol- TQ3 hücre metabolitlerinin PLS-DA analizi ile elde edilen 2 boyutlu görseli	80
Şekil 5.34. LC-MS/MS ile pozitif iyonizasyonda analiz edilen Kontrol- TQ2 hücre metabolitlerinin önem sıralamasını gösteren VIP grafiği	81
Şekil 5.35. LC-MS/MS ile negatif iyonizasyonda analiz edilen Kontrol- TQ3 hücre metabolitleriyle oluşturulmuş volkan grafiği.	82
Şekil 5.36. LC-MS/MS ile negatif iyonizasyonda analiz edilen Kontrol- TQ3 hücre metabolitlerinin PLS-DA analizi ile elde edilen 2 boyutlu görseli	83
Şekil 5.37. LC-MS/MS ile negatif iyonizasyonda analiz edilen Kontrol- TQ3 hücre metabolitlerinin önem sıralamasını gösteren VIP grafiği	84
Şekil 5.38. Kontrol-TQ3 karşılaştırmasına ait LC-HRMS fonksiyonel analiz zenginleştirme testi (enrichment test) sonuç gösterimi.	85
Şekil 5.39. LC-MS/MS ile pozitif iyonizasyonda analiz edilen Kontrol-Budesonid hücre metabolitleriyle oluşturulmuş volkan grafiği	86
Şekil 5.40. LC-MS/MS ile pozitif iyonizasyonda analiz edilen Kontrol- Budesonid hücre metabolitlerinin PLS-DA analizi ile elde edilen 2 boyutlu görseli	87
Şekil 5.41. LC-MS/MS ile pozitif iyonizasyonda analiz edilen Kontrol- Budesonid hücre metabolitlerinin önem sıralamasını gösteren VIP grafiği	88
Şekil 5.42. LC-MS/MS ile negatif iyonizasyonda analiz edilen Kontrol-Budesonid hücre metabolitleriyle oluşturulmuş volkan grafiği.	89
Şekil 5.43. LC-MS/MS ile negatif iyonizasyonda analiz edilen Kontrol- Budesonid hücre metabolitlerinin PLS-DA analizi ile elde edilen 2 boyutlu görseli	90
Şekil 5.44. LC-MS/MS ile negatif iyonizasyonda analiz edilen Kontrol- Budesonid hücre metabolitlerinin önem sıralamasını gösteren VIP grafiği	91
Şekil 5.45. Yol zenginleştirme analizinden alınan p değerlerine ve topoloji analizinden alınan yol etki değerlerine göre eşleşen yolları gösteren yolak dağılım grafiği. Kontrol – budesonid uygulanan hücrelerin karşılaştırması.	92

Şekil 5.46. LC-MS/MS ile pozitif iyonizasyonda analiz edilen Kontrol-LPS hücre metabolitleriyle oluşturulmuş volkan grafiği.	93
Şekil 5.47. LC-MS/MS ile pozitif iyonizasyonda analiz edilen Kontrol- LPS hücre metabolitlerinin PLS-DA analizi ile elde edilen 2 boyutlu görseli	94
Şekil 5.48. LC-MS/MS ile pozitif iyonizasyonda analiz edilen Kontrol- LPS hücre metabolitlerinin önem sıralamasını gösteren VIP grafiği	95
Şekil 5.49. LC-MS/MS ile negatif iyonizasyonda analiz edilen Kontrol-LPS hücre metabolitleriyle oluşturulmuş volkan grafiği	96
Şekil 5.50. LC-MS/MS ile negatif iyonizasyonda analiz edilen Kontrol-LPS hücre metabolitlerinin PLS-DA analizi ile elde edilen 2 boyutlu görseli	97
Şekil 5.51. LC-MS/MS ile negatif iyonizasyonda analiz edilen Kontrol-LPS hücre metabolitlerinin önem sıralamasını gösteren VIP grafiği	98
Şekil 5.52. Yol zenginleştirme analizinden alınan p değerlerine ve topoloji analizinden alınan yol etki değerlerine göre eşleşen yolları gösteren yolak dağılım grafiği. Kontrol – LPS uygulanan hücrelerin karşılaştırması.	99
Şekil 5.53. LC-MS/MS ile pozitif iyonizasyonda analiz edilen LPS+TQ – LPS hücre metabolitleriyle oluşturulmuş volkan grafiği	100
Şekil 5.54. LC-MS/MS ile pozitif iyonizasyonda analiz edilen LPS+TQ – LPS hücre metabolitlerinin PLS-DA analizi ile elde edilen 2 boyutlu görseli	101
Şekil 5.55. LC-MS/MS ile pozitif iyonizasyonda analiz edilen LPS+TQ – LPS hücre metabolitlerinin önem sıralamasını gösteren VIP grafiği	102
Şekil 5.56. LC-MS/MS ile negatif iyonizasyonda analiz edilen LPS+TQ – LPS hücre metabolitleriyle oluşturulmuş volkan grafiği.	103
Şekil 5.57. LC-MS/MS ile negatif iyonizasyonda analiz edilen LPS+TQ – LPS hücre metabolitlerinin PLS-DA analizi ile elde edilen 2 boyutlu görseli	104
Şekil 5.58. LC-MS/MS ile negatif iyonizasyonda analiz edilen LPS+TQ – LPS hücre metabolitlerinin önem sıralamasını gösteren VIP grafiği	105
Şekil 5.59. Yol zenginleştirme analizinden alınan p değerlerine ve topoloji analizinden alınan yol etki değerlerine göre eşleşen yolları gösteren yolak dağılım grafiği. LPS+TQ – LPS gruplarının karşılaştırması.	106
Şekil 5.60. LC-MS/MS ile pozitif iyonizasyonda analiz edilen LPS+Budesonid- LPS hücre metabolitleriyle oluşturulmuş volkan grafiği.	107
Şekil 5.61. LC-MS/MS ile pozitif iyonizasyonda analiz edilen LPS+Budesonid- LPS hücre metabolitlerinin PLS-DA analizi ile elde edilen 2 boyutlu görseli	108
Şekil 5.62. LC-MS/MS ile pozitif iyonizasyonda analiz edilen LPS+Budesonid- LPS hücre metabolitlerinin önem sıralamasını gösteren VIP grafiği	109
Şekil 5.63. LC-MS/MS ile negatif iyonizasyonda analiz edilen LPS+Budesonid- LPS hücre metabolitleriyle oluşturulmuş volkan grafiği..	110
Şekil 5.64. LC-MS/MS ile negatif iyonizasyonda analiz edilen LPS+Budesonid- LPS hücre metabolitlerinin PLS-DA analizi ile elde edilen 2 boyutlu görseli	111
Şekil 5.65. LC-MS/MS ile negatif iyonizasyonda analiz edilen LPS+Budesonid- LPS hücre metabolitlerinin önem sıralamasını gösteren VIP grafiği	112
Şekil 5.66. Yol zenginleştirme analizinden alınan p değerlerine ve topoloji analizinden alınan yol etki değerlerine göre eşleşen yolları gösteren yolak dağılım grafiği. LPS+Budesonid-LPS gruplarının karşılaştırması.	113

BARSAK ENFLAMASYONU OLUŞTURULAN HÜCRE KÜLTÜR MODELİNDE, TİMOKİNONUN BİYOLOJİK AKTİVİTELERİ İLE METABOLOMİK PROFİLLEMESİNİN ARAŞTIRILMASI

ÖZET

Gastrointestinal sistem (GIS), vücutta sindirim işlemini düzenleyen ve besin maddelerinin emilimini sağlayan anatomik ve fonksiyonel bir sistemdir. GIS boyunca hücresel bariyer hattı oluşturan barsak epiteli mukozal hemostazın korunmasında oldukça önemlidir. Barsak epiteli, besin emilimini gerçekleştirmenin yanında, mukus, antimikrobiyal peptidler ve sIgA üreterek bağışıklık üzerine de etki eder. Ancak, bazı durumlarda barsakların normal işlevleri enflamasyon adı verilen, dengeli olduğu takdirde organizmayı doku hasarından koruyan bir süreçle etkilenebilir. Enflamasyon, vücudun zararlı etkenlere veya yaralanmalara karşı savunma mekanizmasıdır. Ancak, kronik enflamasyon (uzun süreli ve aşırı enflamasyon) GIS'i olumsuz etkileyebilir. Barsaklardaki kronik enflamasyon, başta enflamatuvar barsak hastalığı (EBH) olmak üzere bir dizi kronik hastalığa sebep olabilir.

EBH, gastrointestinal sistemin kronik ve tekrarlayan bir enflamasyonu olarak bilinir ve enflamasyona sebep olarak reaktif oksijen türleri/reaktif nitrojen türleri (ROT/RNT) artışı, Nf-κB yolak aktivasyonu gösterilse de patogenezi tam olarak anlaşılamayan bir durumdur. Ayrıca EBH genetik yatkınlıkla da ilişkilendirilmiş, remisyon ve alevlenme dönemleri ile giden, ekstraintestinal belirti ve bulguların mevcut olduğu ve uzun vadede malignite riski taşıyan hastalıklardır. EBH patogenezi tam olarak bilinmediği gibi, tanısında kesin bir biyobelirteç bulunamamıştır. Son dönemlerde biyobelirteç çalışmalarında, doku, biyolojik sıvı veya hücre özütünün metabolitlerini, niteliksel ve niceliksel olarak karakterize etmek için proton nükleer manyetik rezonans [1H-NMR] spektroskopisi veya kütle spektrometrisi [MS] gibi analitik kimya tekniklerinin oldukça sık kullanıldığı metabolomik çalışmalardan faydalanılmaktadır. EBH moleküler patogenezi ve biyobelirteç tayininde de birçok metabolomik çalışma yapılmış, sonuçlarda enflamatuvar biyomoleküller ön planda anlamlı yüksek bulunmuş ancak net bir biyobelirteç ya da patogenezi tayini saptanamamıştır.

EBH tedavisinde sadece enflamasyonu kontrol altına almaya yönelik kortikosteroidler gibi ilaçlar mevcut olup bu ilaçlar da ciddi yan etkilere sahiptir. Bu ilaçlardan olan ve güncel tez çalışmasında da kullanılan budesonid barsak enflamasyonunu kontrol altına alabilmenin yanında, immünbaskılama, osteoporoz gibi ciddi yan etkilere sahiptir. İlaçların bu istenmeyen etkileri yan etki profili daha düşük olan ajanların arayışına yol açmıştır. Antioksidan, anti-enflamatuvar, immunomodülatör özellikleriyle bilinen polifenoller EBH başta olmak üzere enflamatuvar hastalıkların tedavisi için bilimsel çalışmalara çokça konu olmuştur. Bu polifenolik bileşiklerden olan timokinon (TQ) *Nigella sativa* (çörek otu)nın ana bileşeni olup ciddi antioksidan ve anti-enflamatuvar özellikleri olduğu önceki çalışmalarla gösterilmiştir. Çalışma ile amacımız, hücre kültürü ile barsak enflamasyonu modeli oluşturarak TQ'nun anti-enflamatuvar terapötik etkinliğini, yüksek çözünürlüklü NMR spektroskopisi ve LC-MS/MS kullanarak hastalık metabolomik profillemesini yaparak araştırmak ve bir anti-enflamatuvar ajan olan budesonid ile karşılaştırmaktır. Bunun için öncelikle lipopolisakkarit (LPS) verilerek Raw 264.7 makrofaj hücrelerinde enflamasyon

oluşturulmuş, ardından bu enflamasyonlu besiyeri alınarak HT-29 kolon kanseri hücreleri üzerine verilmiştir. Böylece hücre kültüründe barsak enflamasyon modeli tasarlanmış, ardından bu model üzerinde TQ ve budesonidin etkileri incelenmiştir.

Enflamasyon gelişiminde ana mediyatörlerden olan ROT ile RNT enflamasyon grubunda anlamlı derecede yüksek bulunmuş, TQ uygulanmasıyla bu türlerin seviyeleri düşmüş ancak en yüksek düşüş budesonid grubunda saptanmıştır. Yine EBH patogenezinde önemli rol oynayan sıkı bağlantı proteinleri, okludin ve klaudin-5 proteinlerinin ifade seviyeleri TQ gruplarında artmış, budesonid grubunda en yüksek artış görülmüştür. Tüm bu sonuçlar TQ'nun anti-enflamatuvar ve doku iyileştirici etkisinin olduğunu bize göstermiştir. NMR ile yapılan metabolomik analizlerde enflamasyon grubunda kontrole göre ksantin metaboliti anlamlı seviyede düşüklük göstermiş, yolak zenginleştirme analiziyle daha ayrıntılı incelendiğinde pürin metabolik yolağının etkilendiği görülmüştür. Bu sonuç enflamasyon oluşumunun ksantin oksidaz enziminin, pürin metabolik yolağındaki aktivasyonuna bağlanarak superoksit radikali üretimi üzerinden olabileceğini düşündürmektedir. HRMS ile bu sonuç doğrulanarak aynı metabolik yolağın etkilendiği bulunmuştur. Yine NMR analizinde; laktat, galaktarat fumarat ve dimetilamin düzeyleri enflamasyon grubunda kontrole göre artış göstermiş (VIP skoru > 1), glikolat, 2-hidroksiizobütirat, glisin, asetat, sitrakonat ise kontrol grubunda enflamasyon grubuna göre anlamlı artış (VIP skoru > 1) göstermiştir. Laktat artışı enflamasyon sırasında Warburg etkisine bağlı aerobik glikoliz yolağına kaymayı düşündürürken asimetric dimetilarginin(ADMA) yıkım ürünü olan dimetilamin artışı, ADMA yıkım artışına bağlı NOS (nitrik oksit sentaz) inhibisyonunun ortadan kalktığını ve bunun enflamasyon oluşumuna katkıda bulunduğunu düşündürmüştür. Yine kontrol grubunda artan metabolitlerden olan glisinin glutatyon sentezinde rol alan aminoasitlerden olması, glikolatın serin ve glisin üzerinden antioksidan sistemi aktive eden metabolit olması, sitrakonatin ise güçlü Nrf2 aktivatörü olması bu metabolitlerin antioksidan ara metabolitleri olduğunu düşündürmektedir. TQ verilen enflamasyonlu gruplarla yapılan NMR analizinde genotoksik, apoptotik özellikleri bilinen N-nitrozodimetilamin (NDMA)'nın enflamasyon gurubuna göre anlamlı derecede düşük bulunduğu saptanmıştır. TQ verilen enflamasyonlu gruplarla yapılan NMR analizinde enflamasyon grubuna göre anlamlı metabolik yolak bulunamazken, HRMS ile nikotinat-nikotinamit metabolizmasının ve eter-lipid metabolizmasının anlamlı derecede etkilendiği görülmüştür. Yine bu iki yolağın budesonid verilen enflamasyonlu gruplarda, sadece enflamasyon oluşturulan gruba göre etkilenmiş olduğu bulunmuş ve bu sonuç TQ'nun anti-enflamatuvar etkisini bu yolaklar üzerinden gerçekleştirebileceğini düşündürmüştür. Sonuç olarak güncel çalışmada, barsak enflamasyonu oluşturulan hücre kültürü modelinde metabolitlerin analizinde NMR ve MS metotlarının birlikte kullanımı ile oldukça geniş metabolit spektrumu içeren metabolomik profillemeye gerçekleştirilmiştir. Bu yolla TQ'nun antienflamatuvar etkisini hangi olası metabolik yolakla gerçekleştirebileceği tartışılmış ve yine enflamasyon sırasında farklılık gösteren metabolitler belirlenerek hücre kültürü ile biyobelirteç çalışmalarına zemin hazırlanmıştır. Ayrıca daha önce EBH hastalarından elde edilen metabolomik çalışmalarla kıyaslanarak benzer metabolit profilleri bulunmuş bu da hücre kültürünün metabolomik analizlerde kullanılabilirliği tezini güçlendirmiştir. Her ne kadar benzer metabolit profilleri elde edilse de hücre kültürü ile elde edilen sonuçlar tam olarak insan metabolizmasını yansıtmadığı için ileri *in vivo* çalışmalarla desteklenmesi gerekmektedir.

Anahtar Kelimeler: enflamasyon, timokinon, metabolomik, hücre kültürü



INVESTIGATION OF THE BIOLOGICAL ACTIVITIES AND METABOLOMIC PROFILING OF THYMOQUINONE IN AN IN VITRO MODEL OF INTESTINAL INFLAMMATION

SUMMARY

Gastrointestinal System (GIS) is an anatomical and functional system that regulates the process of digestion and facilitates the absorption of nutrients in the body. The intestinal epithelium, forming a cellular barrier throughout the GIS, is crucial for maintaining mucosal hemostasis. In addition to facilitating nutrient absorption, the intestinal epithelium influences immunity by producing mucus, antimicrobial peptides, and secretory IgA. However, under certain conditions, the normal functions of the intestines can be affected by inflammation, a process that, when balanced, protects the organism from tissue damage in response to harmful agents or injuries.

Inflammation is the body's defense mechanism against harmful agents or injuries. Nevertheless, chronic inflammation (prolonged and excessive inflammation) can adversely affect the GIS. Chronic inflammation in the intestines can lead to various chronic diseases, with inflammatory bowel disease (IBD) being a prominent example.

IBD is characterized by chronic and recurrent inflammation in the gastrointestinal system. Although an increase in reactive oxygen species/reactive nitrogen species (ROS/RNS) and activation of the NF- κ B pathway have been implicated as causes of inflammation, the pathogenesis of IBD is not fully understood. Genetic predisposition is also associated with IBD, and it is a disease with periods of remission, flare-ups, extra-intestinal symptoms, and long-term malignancy risk.

The molecular pathogenesis and biomarker determination of IBD have been the focus of numerous metabolomic studies in recent years. Proton nuclear magnetic resonance ($^1\text{H-NMR}$) spectroscopy and mass spectrometry (MS), analytical chemistry techniques, are frequently used in metabolomic studies to characterize the metabolites of tissues, biological fluids, or cell extracts qualitatively and quantitatively.

The treatment of IBD currently involves drugs such as corticosteroids aimed at controlling inflammation, but these medications have serious side effects. Budesonide, a corticosteroid used in the current thesis, has been shown to control intestinal inflammation but is associated with adverse effects such as immunosuppression and osteoporosis. The search for agents with a lower side effect profile has led to the investigation of polyphenols, known for their antioxidant, anti-inflammatory, and immunomodulatory properties, as potential therapeutic options for inflammatory diseases, including IBD.

Thymoquinone (TQ), a polyphenolic compound and the main component of *Nigella sativa* (black seed), has demonstrated significant antioxidant and anti-inflammatory properties in previous studies. The aim of this study is to investigate the anti-inflammatory therapeutic efficacy of TQ and to profile the disease metabolomics using

high-resolution NMR spectroscopy and LC-MS/MS by establishing an in vitro model of intestinal inflammation through cell culture. This research also aims to compare the effects of TQ with budesonide, an anti-inflammatory agent.

To create the in vitro model of intestinal inflammation, inflammation was induced in Raw 264.7 macrophage cells by administering lipopolysaccharide (LPS). Subsequently, the inflamed medium was transferred to HT-29 colon cancer cells. The effects of TQ and budesonide on this model were then examined.

Reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS), which are key mediators in the development of inflammation, were significantly elevated in the inflammation group. Treatment with TQ resulted in a reduction in the levels of these species, with the most significant decrease observed in the budesonide group. Furthermore, the expression levels of tight junction proteins, occludin and claudin-5, which play a crucial role in the pathogenesis of IBD, increased in the TQ groups, with the highest increase observed in the budesonide group. These results indicate the anti-inflammatory and tissue-healing effects of TQ.

Metabolomic analysis using NMR revealed a significant decrease in the xanthine metabolite in the inflammation group compared to the control group, suggesting an impact on the purine metabolic pathway. High-resolution mass spectrometry (HRMS) confirmed this result, indicating the affected pathway. Additionally, several metabolites showed altered levels during inflammation, including lactate, galactarate, fumarate, and dimethylamine, which increased, and glycolate, 2-hydroxyisobutyrate, glycine, acetate, and citraconate, which decreased in the inflammation group compared to the control group. These metabolites are indicative of metabolic changes associated with inflammation.

The increase in lactate suggests a shift towards aerobic glycolysis due to the Warburg effect during inflammation. The increase in dimethylamine, a degradation product of asymmetric dimethylarginine (ADMA), implies that the inhibition of nitric oxide synthase (NOS) due to increased ADMA degradation is alleviated during inflammation, contributing to its development. The elevated levels of glycine, glycolate, and citraconate in the control group suggest their roles as antioxidant intermediates in glutathione synthesis, activators of the antioxidant system through serine and glycine, and potent Nrf2 activators, respectively.

NMR analysis of the inflammation group treated with TQ revealed a significant decrease in N-nitrosodimethylamine (NDMA), known for its genotoxic and apoptotic properties, compared to the inflammation group. However, no significant metabolic pathway was identified in the inflammation group compared to the control group using NMR analysis, while HRMS indicated a significant impact on the nicotinate-nicotinamide metabolism and ether-lipid metabolism. Budesonide treatment affected only these pathways compared to the inflammation group without inducing inflammation, suggesting that TQ may exert its anti-inflammatory effects through these pathways.

In conclusion, the current study employed a combined NMR and MS approach for the comprehensive metabolomic profiling of an in vitro model of intestinal inflammation. The analysis shed light on the potential metabolic pathways through which TQ may exert its anti-inflammatory effects. Furthermore, distinct metabolites that varied during inflammation were identified, laying the groundwork for biomarker studies using cell culture. The similarity of the metabolite profiles obtained from cell culture to those from previous metabolomic studies in IBD patients strengthens the utility of cell

culture in metabolomic analyses. However, further *in vivo* studies are necessary to validate the results obtained from cell culture, as the outcomes may not fully reflect human metabolism.

Keywords: inflammation, thymoquinone, metabolomics, cell culture



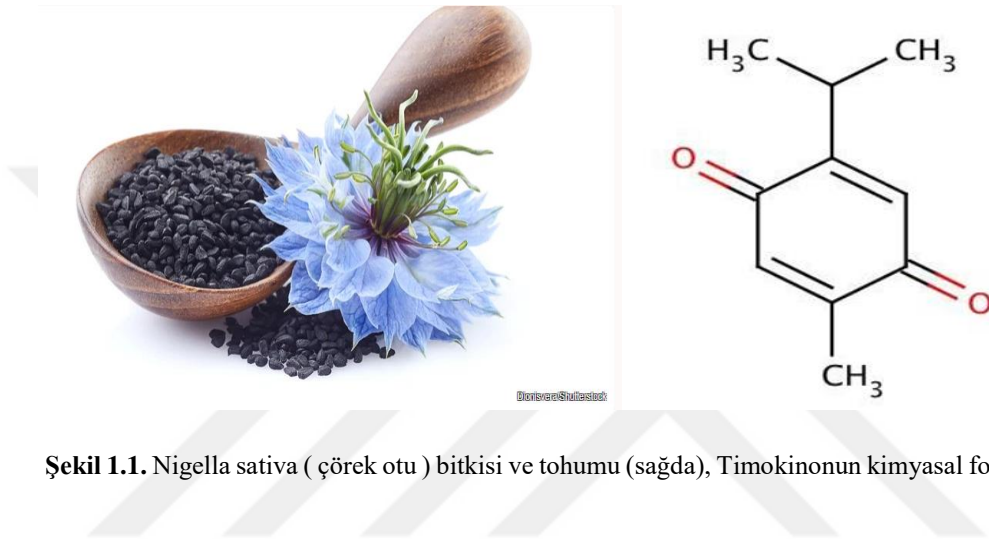
1. GİRİŞ ve AMAÇ

Gastrointestinal sistem (GİS), esas olarak barsak bariyeri yoluyla besin ve mineral alımında işlev gören vücuttaki en büyük ikinci organdır. Barsak geçirgenliği, sindirilmiş gıdalardan minerallerin ve besinlerin dolaşıma alınmasını sağlar. Yaşam ve tüm metabolik süreçler, doğrudan veya dolaylı olarak GİS'in düzgün çalışmasına bağlıdır. Barsak epitel hücreleri, üstlerindeki müköz tabakası ve aralarındaki sıkı bağlantılar (tight junction, TJ), barsak geçirgenliğini kontrol eder [1]. Bozulmuş barsak geçirgenliğinin sebep olduğu hastalıklardan en önemlisi, başlıca Chron Hastalığı (CH) ve Ülseratif Kolit (ÜK) olmak üzere iki formdan oluşan enflamatuvar barsak hastalığı (EBH)'dır. EBH' nın etiyoloji ve patogenezi tam olarak çözülememiştir. Bununla birlikte hastalıktan, genetik, çevresel ve mikrobiyal faktörlerin etkileşiminin barsak homeostazında dengesizliklere yol açması ve bunun sonucunda yetersiz bir bağışıklık tepkisi ile bu durumun barsak bariyeri bozulmasına yol açması sorumlu tutulmaktadır [2-4]. Barsak bariyerinin bozulması, EBH dışında, çölyak hastalığı ve irritabl barsak sendromu gibi çeşitli diğer hastalıklarla da ilişkilidir.

EBH' nın kesin bir tedavisi olmamakla birlikte terapötik yaklaşımlar semptomları kontrol altına almayı, yaşam kalitesini artırmayı, hastalığın ilerlemesini ve komplikasyonlarını önlemeyi amaçlar [2]. 5-aminosalisilik asit ve kortikosteroidler gibi EBH'nı tedavi etmek için şu anda birçok sentetik ilaç kullanılmaktadır [1]. Bununla birlikte, uzun süreli ilaç kullanımı birçok komplikasyona neden olduğu için hepsinin bazı dezavantajları vardır. Çalışmalar, EBH hastalarının büyük bir bölümünün terapötik bir yaklaşım olarak geleneksel ve tamamlayıcı tıbbın (GETAT) ilgi gösterdiğini ve bitkisel tıbbi ürünlerin (fitoterapötik ajanlar) en sık kullanılan seçenekler arasında olduğunu bildirmektedir [5, 6]. Fitoterapötik ajanlar, kökenlerine, kimyasal yapılarına ve işlevlerine göre polifenoller, alkaloidler, polisakkaritler, terpenler, glukozinolatlar, karotenoidler, lektinler, poliasetilenler, kapsaisinoidler, betalainler, klorofil ve allium bileşikler olarak sınıflandırılır. Bunların dışında

saponinler, kinonlar, amino asitler, hormonlar ve yağ asitleri gibi bitkilerde de bulunan ve fitokimyasal olarak kabul edilebilecek birçok bileşik vardır [7-9].

Timokinon (TQ), *Nigella sativa* L. tohumunun uçucu yağından elde edilen ana aktif fenolik bir bileşik olup, antioksidan, pro-oksidan, anti-enflamatuvar ve immunomodülatör etkileri nedeniyle, birçok hastalığın önlenmesinde ve tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır[10-12].



Şekil 1.1. Nigella sativa (çörek otu) bitkisi ve tohumu (sağda), Timokinonun kimyasal formülü (solda)

TQ'nun bu özelliklerinde çeşitli şekillerde düzenlenen birkaç farklı mekanizma etkilidir. Özellikle doza bağlı olarak TQ, hem antioksidan hem de pro-oksidan etkilere sahiptir, düşük konsantrasyonlarda antioksidan görevi görürken, yüksek konsantrasyonlarda pro-oksidan görevi görür. TQ'nun anti-enflamatuvar etkilerinden faydalanarak birçok klinik çalışma yapılmış, özellikle enflamatuvar GİS hastalıkları ile olan pre-klinik çalışmalarda umut verici sonuçlar elde edilmiştir [1]. Yine de EBH patogenezi tam olarak anlaşılamadığı için TQ'nun hangi moleküler mekanizmaları etkileyerek terapötik etki gösterdiği netleştirilememiştir. EBH tedavisinde Geleneksel ve Tamalayıcı Tıp (GETAT) ile ilgili sınırlı kanıtlar, şu anda sağlık hizmeti sağlayıcıları arasında kabulü sınırlandırmakta ve klinik uygulamaya entegrasyonunu karmaşıktırmaktadır. GETAT yaklaşımlarının bilimsel olarak daha fazla doğrulanması, EBH tedavisinde tam potansiyellerinin kullanılmasına yardımcı olabilir ve doktor ile hasta arasında iş birliği içinde bütünsel bir risk-yarar değerlendirmesine izin verebilir [13].

Şu anda EBH tanısı endoskopik, histolojik ve radyografik testler ile konulmaktadır, ancak testler uzman klinisyenler tarafından yapıldığında bile tanı belirsizliği ile sonuçlanabilmektedir [14-16]. Hastalık tanısı ve atak tayini için serum, dışkı örneklerinden çeşitli biyokimyasal parametreler çalışılsa da net bir hastalık belirteci halen bulunamamıştır. Son dönemde hem hastalık patogenezinin tayini hem de biyobelirteç keşfi için metabolomik çalışmalara eğilim artmıştır. Metabolomik, "belirli hücresel süreçlerin geride bıraktığı benzersiz kimyasal parmak izlerinin sistematik olarak incelenmesi", özellikle de küçük moleküllü metabolit profillerinin incelenmesidir. Metabolom, gen ekspresyonunun son ürünleri olan biyolojik bir organizmadaki tüm metabolitlerin toplanmasını temsil eder. Bu nedenle, mRNA gen ekspresyonu verileri ve proteomik analizler, bir hücrede neler olabileceğine dair tüm hikâyeyi anlatmasa da, metabolik profillemeye, o hücrenin fizyolojisinin anlık bir görüntüsünü verebilir [17]. Bu tür analizler, doku, biyolojik sıvı veya hücre özütünün metabolit tamamlayıcısını niteliksel ve niceliksel olarak karakterize etmek için proton ¹H-NMR spektroskopisi veya kütle spektrometrisi [MS] gibi analitik kimya tekniklerinin kullanılması yoluyla yapılmaktadır [18]. EBH moleküler patogenezi ve biyobelirteç tayininde de birçok metabolomik çalışma yapılmış, sonuçlarda enflamatuvar biyomoleküller ön planda anlamlı yüksek bulunmuş ancak net bir biyobelirteç ya da patogenezi tayini saptanamamıştır. [19].

Metabolomik çalışmalarda hücre kültürü sistemleri de sıkça kullanılmaktadır. Tüm bu bilgilerden yola çıkarak çalışma ile amacımız, hücre kültürü ile barsak enflamasyonu modeli oluşturarak TQ'nun anti-enflamatuvar terapötik etkinliğini, yüksek çözünürlüklü NMR spektroskopisi ve LC-MS/MS kullanarak hastalık metabolomik profillemesini yaparak araştırmak ve bir anti-enflamatuvar steroid olan budenosid ile karşılaştırmaktır. Böylece, hem hastalık patogenezi araştırmak, hem de tanı ve tedaviye yanıtın belirlenmesinde kullanılabilecek biyomarker çalışmalarına katkıda bulunmaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Enflamasyon

Enflamasyon, halk arasında iltihap veya yangı olarak bilinir ve zarar gören dokunun onarılmasını sağlayan koruyucu bir yanıttır. Bu yanıt, yabancı organizmaları veya maddeleri ortadan kaldırarak veya etkilerini nötralize ederek gerçekleşir ve aynı zamanda doku hasarı sonucu oluşan artıkları da yok eder [20]. İnsan sağlığı ve hayatta kalma şansı, enflamasyonun etkinliğine ve dengeli kontrolüne bağlıdır. Endojen anti-enflamatuvar mekanizmalar sayesinde enflamasyonun çözülmesi vücudu doku hasarından korur [21, 22]. Genel olarak, doğal bağışıklık sistemi akut enflamatuvar yanıtı dakikalar içinde başlatır ve her şey yolundaysa saatler içinde çözülür. Ancak kronik enflamasyon haftalar, aylar veya hatta yıllar boyunca devam edebilir [23].

Enflamasyon, akut ve kronik olmak üzere ikiye ayrılır.

2.1.1. Akut enflamasyon

Akut enflamasyon, dokuların zedelenmeye karşı oluşturduğu ilk yanıttır. Çeşitli endojen mediyatörler aracılığıyla ortaya çıkan enflamatuvar yanıt, bir dizi vasküler ve hücrel olaylarla devam eder ve üç dönemden oluşur [24, 25]. Hasarlı bölgede vazodilatasyon ve kapiller geçirgenlikte artma görülen akut dönem, daha çok lökositlerin ve fagositik hücrelerin infiltrasyonu ile belirgin hale gelen subakut dönem ve doku dejenerasyonu ve fibrozisin görüldüğü kronik proliferatif dönem olarak tanımlanır [26].

Sitokinler, düşük molekül ağırlıklı düzenleyici proteinler olup bağışıklık yanıtının tüm aşamalarında üretilirler. Hem hücrel immün yanıtın gelişiminde hem de akut ve kronik enflamasyonda görev alırlar. Erken enflamatuvar yanıtın ana sitokinleri arasında İnterlökin-1 (IL-1), İnterlökin-6 (IL-6) ve tümör nekroz faktörü alfa (TNF- α) yer alır. Bu sitokinler, karaciğerde akut faz proteinlerinin üretimini uyarmak, nötrofilleri yaralanma bölgesine yönlendirmek, hipotalamusa ateş yanıtını

yönlendirmek ve vasküler epitelde adezyon moleküllerini artırmak gibi çeşitli etkilere sahiptirler. TNF- α ; romatoid artrit, osteoartrit ve enflamatuvar barsak hastalığı gibi birçok immünolojik ve enflamatuvar hastalıkla ilişkilendirilir ve güçlü bir sitokindir. [27].

Akut enflamasyon, tam iyileşme (rezolüsyon), skar (nedbe) ile iyileşme, apse oluşumu ve kronik enflamasyona ilerleme şekillerinden biriyle sonlanabilir. Eğer hasar sınırlı ve kısa süreliyse ve dokunun yenilenme kapasitesi varsa, iltihabi süreç genellikle tam iyileşmeyle sonuçlanır. Bu sayede, iltihabi doku hem histolojik olarak hem de fonksiyonel olarak normale döner ve eski halini alır.

Akut enflamasyonun sonlanmasında, damar geçirgenliğinin normale dönmesi, lenfatik drenajla ödemin giderilmesi, damar dışına göç eden lökositlerin apoptozisi, makrofajlar tarafından hücre artıklarının temizlenmesi ve enflamatuvar süreci sonlandıran kimyasal mediyatörlerin salgılanması etkili olmaktadır [28, 29]. Sıcaklık, kızarıklık, şişlik, ağrı ve işlev kaybı gibi belirtilerle kendini gösteren akut enflamasyon, genellikle 1-3 gün içinde sonlanır. Ancak, enflamasyon 1 ay içinde çözülmezse kronik enflamasyona ilerleme riski bulunmaktadır ve bu durum aylarca sürebilir [24, 25].

2.1.2. Kronik Enflamasyon

Kronik enflamasyon doku yıkımı, aktif enflamasyon ve bunlara bağlı hasar onarımının haftalar, aylar hatta yıllar boyunca birlikte seyrettiği bir süreçtir. Kronik enflamasyon akut enflamasyonu takip edebileceği gibi enflamatuvar yanıt ilk baştan kronik de olabilir [30]. Kronik enflamasyona; persistan (dirençli, kalıcı) enfeksiyonlar, otoimmünite, toksik ajanlara uzun süre maruziyet sebep olabilirken, akut enflamasyonun uzun sürmesi de kronik enflamasyona yol açabilir [31].

Akut enflamasyon daha çok, travma veya akut enfeksiyon gibi vücutta yeni meydana gelen hasarlar sonucu görülürken kronik enflamasyon ise altta yatan bazı kronik hastalıklara sekonder olarak görülür ve altta yatan etken ortadan kaldırılmadıkça enflamasyondan doğal bir şekilde kurtulmak mümkün değildir. Enflamatuvar sürecin uzun vadede devam etmesi, vücudu diğer dış etkenlere karşı savunmasız bırakarak

kişilerin kolay hastalanmasına sebep olur. Örneğin, kronik veya aşırı enflamasyon durumlarında, enflamatuvar süreç kendi dokularına yönelebilir ve sağlıklı dokuları da etkileyebilir. Bu, çeşitli hastalıkların, romatoid artrit, enflamatuvar barsak hastalıkları ve kardiyovasküler hastalıklar gibi, temelinde yer alabilir.

Kronik enflamasyonun patogenezi, karmaşık bir süreçtir ve birden çok faktörün etkileşimini gerektirir. Bunlar arasında genetik, çevresel ve yaşam tarzı faktörleri yer alır. Bu faktörlerin etkileşimi sonucunda, immün sistemin kronik olarak uyarılması ve enflamasyonun sürdürülmesi sağlanır. Kronik enflamasyonda sitokinler, kemokinler, lökositler ve makrofajlar görev alır. Bu hücrelerin ve moleküllerin etkileşimi sonucunda, enflamasyonun kronik hale gelmesi sağlanır [32].

Oksidatif stres ve mitokondriyal disfonksiyon da kronik enflamasyon gelişiminde önemli rol oynar. Oksidatif stres, vücutta serbest radikallerin birikmesiyle oluşan bir durumdur. Bu serbest radikaller, hücre hasarına neden olabilir ve enflamasyonu artırabilir [33]. Mitokondriyal disfonksiyonda ise, hücrelerin enerji üretiminde sorun vardır ve bu da enflamasyonun sürmesine katkıda bulunur [34].

Kronik enflamasyon aynı zamanda barsak mikrobiyotası ile de ilişkilidir. Barsak mikrobiyotası, vücuttaki enflamatuvar yanıtların düzenlenmesinde önemli bir rol oynar. Bununla birlikte, barsak mikrobiyotasındaki dengesizlikler, kronik enflamasyonun oluşumuna katkıda bulunabilir [35].

Enflamatuvar hücre aktivitesi, büyüme faktörleri, aktive edilmiş stroma ve DNA hasarını teşvik eden ajanlar gibi çeşitli faktörler, değiştirilmiş hücre proliferasyonuna neden olabilir ve yapısal ve fonksiyonel anormalliklerin gelişimine katkıda bulunabilir, bunun sonucunda kanser gelişimine yol açabilirler [36]. Enflamasyon ve kanser oluşumu arasındaki bağlantı henüz net bir şekilde anlaşılamamıştır [37], ancak birçok rapor, kronik enflamasyonun kanser oluşumunda önemli bir rol oynadığını göstermektedir [38].

Sonuç olarak, kronik enflamasyon birden fazla faktörün etkileşiminin rol oynadığı çok yönlü ve karmaşık bir süreçtir. Kronik enflamasyon patogenezi hakkında daha fazla araştırma yapılması, kronik enflamasyonun önlenmesi ve tedavisi için daha iyi stratejilerin geliştirilmesine yardımcı olacaktır.

2.1.3. Enflamasyon-ROT ve RNT

Serbest radikaller, dış atomik orbitallerinde bir veya daha fazla çift oluşturmamış elektron içeren yüksek enerjili, stabil olmayan bileşiklerdir. Normalde radikal olmayan bir atom veya molekülden bir elektron çıkmasıyla ya da atom veya moleküle bir elektron ilavesiyle oluşurlar [39]. Oluşan radikaller çok reaktif ve anstabil dirler. Diğer moleküllere elektron verebildiklerinden ya da onlardan elektron alabildiklerinden dolayı vücutta indirgeyici veya yükseltgeyici olarak davranırlar.

Memeli hücrelerinin hayatta kalması için gerekli olan oksijen metabolizması reaktif oksijen türlerini (ROT) ve reaktif nitrojen türlerini (RNT) üretir. ROT, dış orbital yörüngesinde paylaşılmamış bir elektron bulunduran oksijen atomu ile karakterize serbest radikallerdir [40]. Temel olarak süperoksit ($O_2^{\cdot-}$), hidroksil radikalleri ($HO^{\cdot}$), peroksil ($RO_2^{\cdot}$), alkoksil ($RO^{\cdot}$) ve hidroperoksil ($HO_2^{\cdot}$); lipid hidroperoksitleri; ve tekli oksijen (O_2), hidrojen peroksit (H_2O_2), hipokloröz asit ($HOCl$), kloraminler ($RNHCl$) ve ozon (O_3) gibi reaktif olmayan bileşikler içerir. Normalde mukozal hücreler veya doğal bağışıklık hücreleri tarafından üretilen ROT, antimikrobiyal yanıtların ve yara iyileşme süreçlerinin de dahil olduğu sinyal yollarının düzenlenmesi için gereklidir [41]. Ancak ROT aşırı arttığında, diğer bileşikler okside eder ve onları serbest radikallere çevirerek sıklıkla birçok yeni serbest radikal oluşturan zincir reaksiyonlarını başlatabilirler [42]. Vücudun antioksidan savunma mekanizmaları aşırı ROT'un neden olduğu etkileri dengeleyebilir. Bu savunma mekanizmaları, ROT/RNT konsantrasyonlarının kontrol altında tutulmasını ve zararlı etkilerinin oluşmamasını sağlar. Endojen antioksidan sistemi, temel olarak süperoksit dismutazları (SOD'lar), glutatyon peroksidaz (GPX) ve katalaz (CAT) gibi hücresel enzimatik antioksidanlar, hücresel non-enzimatik antioksidan glutatyon ve vitaminler, mineraller, seruloplazmin ve ürik asit gibi ekstraselüler antioksidanlardan oluşur. $O_2^{\cdot-}$ radikali SOD aracılı reaksiyonla daha stabil olan H_2O_2 'ye dönüştürülebilir. Sonrasında H_2O_2 su ve oksijene parçalanabilir ya da fagositik miyeloperoksidazlar gibi peroksidazlar tarafından Cl^- iyonları varlığında, kendisinden 100 kat daha toksik olan $HOCl$ 'ye dönüşebilir. H_2O_2 ayrıca ferröz (Fe^{2+}) demirin varlığında Fenton reaksiyonu olarak adlandırılan süreçte, O_2 ile enzimatik olmayan şekilde reaksiyona girerek $HO^{\cdot}$ radikali oluşturabilir [43].

Fizyolojik koşullar altında, bir hücre kendi antioksidan kapasitesiyle, belli bir ROT seviyesini tolere edebilir ve bu durum barsak homeostazı için önemlidir. Ancak, artan ROT üretiminden veya azalan redüksiyon reaksiyonlarından kaynaklanan aşırı bir oksidan yük, zar geçirgenliğini artırabilir, enflamatuvar yanıtı değiştirebilir ve lipid ve protein değişiklikleri, DNA hasarı, apoptoz ve kansere neden olabilir [40]. Bu durum, birçok hastalıkta gözlemlenen pro-oksidanlar ile antioksidanlar arasındaki belirgin dengesizliğe neden olan oksidatif stres olarak bilinir. Bu hastalıklar arasında kanser, diyabet, kardiyovasküler hastalıklar, ateroskleroz ve kronik obstrüktif akciğer hastalığı bulunur [44].

ROT gibi RNT de stres koşullarında serbest radikal ve radikal olmayan moleküller üretmektedirler. RNT, çeşitli stres tolerans mekanizmalarında önemli bir sinyal bileşeni olarak görev yapan nitrik oksitten (NO) elde edilmekte ve bir kısmı da azot döngüsünde yer almaktadır. $O_2^{\cdot-}$ radikali, GIS fizyolojisinde önemli bir medyatör olan NO ile hızlıca reaksiyona girerek yüksek oranda reaktif olan peroksinitrit ($ONOO^{\cdot-}$) radikaline dönüşebilir. Devam eden reaksiyonlarla peroksinitrit radikalinden diğer RNT oluşturulur [45].

ROT ve RNT'nin her ikisi de karbonhidratların, proteinlerin, lipidlerin ve nükleik asitlerin hücre içi hasarlarından sorumlu baskın medyatörlerdir ve eşleşmemiş elektronlarla kararsız durumları nedeniyle oldukça reaktiftirler. ROT ve RNT'nin gastrointestinal kanaldaki doğal ve adaptif bağışıklık tepkimelerinde yer alan genlerin ekspresyonunu arttırdığı bildirilmiştir [46, 47].

Eldeki verilere göre, proenflamatuvar mediyatör olan TNF ile ROT arasında yakın bir ilişki vardır. TNF, bağlandığı TNF reseptörleri üzerinden NF- κ B, mitojen-aktive protein kinazlar (MAPK'lar), kaspazlar ve ROT/RNT gibi moleküllerin aktivasyonuna neden olur. Bu yüzden, TNF'nin hücre hayatta kalması ve ölümü üzerinde etkili olduğu görülmektedir [48].

TNF sinyali ayrıca ROT/RNT oluşumuna neden olur ve bunların önemli bir rolü, TNF reseptörleri sonrası sinyallemeyi kontrol etmektedir. Bu nedenle, ROT'un TNF ile birlikte iltihaplı hastalıkların gelişimindeki rolünü daha iyi anlamak ve özellikle NF- κ B (nükleer faktör-kappa B) aktivasyonu gibi TNF tarafından indüklenen yolların nasıl düzenlendiğini anlamak önemlidir. [48].

2.2. Enflamatuvar Barsak Hastalığı

2.2.1. Tanım

EBH, GIS'in, immün aracılı, kronik, tekrarlayan, patogenezi tam olarak bilinmeyen idiyopatik enflamasyonudur. Bu gruptaki hastalıkların başlıca ortak özellikleri genetik bir yatkınlığın olması, remisyon ve alevlenme dönemleri ile seyretme, ekstraintestinal belirti ve bulguların olması ve uzun dönemde malignite gelişme riskidir [49]. EBH'nin iki ana formu Ülseratif kolit (ÜK) ve Crohn hastalığı (CH) dır. Makroskopik ve mikroskopik olarak her iki hastalığa ait özellikleri taşıyan, "indetermine kolit" olarak bilinen sınıflandırılmayan EBH ise bu hastalık grubunun yaklaşık %5-10'unu oluşturur.

2.2.2. Epidemiyoloji

Dünya çapında EBH insidansı hızla artarken Asya'da durum Batıdan daha ciddi vaziyettedir [50, 51]. Bu yüzden EBH, majör global halk sağlığı problemidir. [52] EBH, batı ülkelerinde, özellikle kuzey avrupa ve kuzey amerikadaki ülkelerde yaygındır. 785.000'i CH ve 910.000'i ÜK hastalığı olmak üzere yaklaşık 1,6 milyon amerikalının EBH'dan etkilendiği biliniyor [53]. Dünyada CH insidansı 4-7/100000, prevalansı 100-200/100000 olarak bildirilmektedir [54]. Türkiye'de ise CH prevalansı 0.047 olarak bulunmuştur. ÜK'in insidansı dünyada 7-15/100000, prevalansı ise 150-250/100000 olarak bildirilmektedir. Türkiye'de ÜK prevalansı 0.079 olarak bulunmuştur. Ülkemizde EBH insidansı ÜK için 2,6/100000 ve CH için 1,4/10 000 olarak bildirilmiştir [55]. Türkiye, gelişmekte olan bir ülke olmasına rağmen, EBH insidansı batı toplumları kadar yüksek değildir, ancak doğudaki kadar da düşük değildir.

EBH alttıplerinde farklılık olarak herhangi bir cinsiyet yatkınlığı yoktur ve genellikle ikinci ya da dördüncü dekatta ortaya çıkarlar. Fark olarak CH genelde 15-25 arasında sık görülürken ÜK hastalığı 25-35 yaşlarında daha sıktır.[52] Önceleri bu hastalığın Askenazi yahudilerini etkilediği bilinirken zaman geçtikçe hastalık insidansı Asya ve

hispanik nüfusunda da artmıştır. Coğrafi işaretin hastalık etyolojisindeki önemi ise kişilerin düşük insidans bölgesinden yüksek insidans bölgesine göç etmesinin, yeni doğan çocuklarında hastalık riskini arttırmasından anlaşılmaktadır. Yine aynı şekilde çevresel faktörler gözönüne alındığında şehir merkezinde yaşayanlarda, kırsal ortamda yaşayanlara göre hastalık insidansı daha yüksektir. [52]

2.2.3. Etyopatogenez

EBH patogenezi üç ana bileşenden oluşmaktadır: genler (predispozisyon), immünite (doku hasar mekanizması) ve mikrobiyata (çevresel stimülüs). Bu bileşenler arasındaki moleküler mekanizmaların araştırılması, EBH'nin patogenezi hakkında önemli bilgiler sağlamıştır. EBH'nin genetik yatkınlık zemininde, çevresel değişimlere ve barsak mikrobiyatasına karşı uygun olmayan bağışıklık cevabı sebebiyle ortaya çıktığı düşünülse de altta yatan kesin sebep halen belirsizdir [56].

2.2.3.1. Barsak epiteli

Barsak epiteli, EBH patogenezinde merkezi bir öneme sahiptir. Gastrointestinal yol boyunca, konak ve çeşitli organizmalar arasında bir hücre bariyer hattı oluşturur ki bu da mukozal hemostazın korunması için önemlidir. Hücre bariyer hattı; sıkı bağlantılar (tight junction), adheren bağlantılar ve desmosomlardan oluşur. Paneth hücreleri, absorbtif hücreler, goblet hücreleri ve enteroendokrin hücreler intestinal epitel hücre grubuna dahil olan dört major sekretuar hücre grubudur [57]. Goblet hücreleri lümendeki mikropları sınırlayan mukus ve antimikrobiyal peptidleri üretir. Daha önce yapılan çalışmalarda ÜK'li hastaların barsak mukozasındaki mukus miktarının azaldığı gösterilmiştir [58]. Yine başka bir çalışmada goblet hücrelerinden salınan ve bir antiproteaz molekül olan ve barsak sıkı bağlantılarının bütünlüğünü koruyarak bakteri invazyonunu önleyen whey asidik protein dört disülfid çekirdek domain 2 (whey acidic protein four-disulfide core domain 2 - WFDC2)' nin EBH hastalarında azaldığı gösterilmiştir.[59] Bu da goblet hücrelerinin hastalık patogenezindeki önemini göstermektedir.

2.2.3.2. Genetik Faktörler

Klinik çalışmalar, EBH patogenezinde aile öyküsünün en önemli risk faktörlerinden biri olduğunu göstermiştir. EBH tanısı konulan hastaların %10-25'inde birinci derece akrabalarında da EBH saptanmıştır. Bu bulgular, EBH'nın genetik yatkınlıkla ilişkili olduğunu düşündürmektedir. Ayrıca monozigot ikizlerde de hastalık insidansında artış olduğu gösterilmiştir [60]. CH'de ÜK'ye göre genetik faktörler daha ön plandadır [61].

Genomik çalışmalarla EBH gelişimi ile ilişkili 200'den fazla genetik lokus tanımlanmıştır [62]. Bu lokuslardan bazıları, sitoplazmik mikrobiyal ürünleri tanıyan hücre içi doğuştan gelen bağışıklık yolları ile ilişkili NOD2 (CARD15) proteinini kodlayan EBH1 geni; otofaji ile ilişkili ATG16L1, IRGM ve LRRK genleri; kazanılmış bağışıklık ile ilişkili IL23R, IL12B, STAT3, JAK2, TNFSF15 ve TYK2 genleri; epitelyal fonksiyonları düzenleyen yollarla ilgili OCTN2, ECM1, CDH1, HNF4A, LAMB1, GNA12, Xbp-1, NOD2, ATG16L1 genleridir [63].

Majör histokompatibilite kompleksi çalışmalarında, HLA-DR2 ÜK ile ilişkili bulunmuştur. CH hastalarında ise HLAA2, HLA-DR1 ve DQw5 ekstraintestinal manifestasyonlar ile ilişkilendirilmiştir.[64].

Bazı genetik sendromlar da EBH ile ilişkilendirilmiştir. Örneğin Turner sendromu, glikojen depo hastalığı tip 1b ve Hermansky-Pudlak sendromu EBH ile ilişkilendirilen sendromlardandır [64].

2.2.3.3. GIS ve mukozal immünite

Ağız boşluğundan anüse kadar olan Gİ kanal epiteli, mikrobiyata olarak bilinen çok sayıda bakteriyi ve potansiyel olarak zararlı patojenleri veya maddeleri, Gİ kanal lümenine sınırlayan fiziksel bir bariyer olarak işlev görür. Gİ kanal epiteli, yaklaşık olarak her 4-5 günde bir yenilenen tek katlı hücre tabakasından oluşur ve bakterilerin

farklı türlerini, miktarını ve hücre yüzeyinden uzaklığını algılama görevine sahiptir. Toplam bakteri sayısı, Gİ kanal boyunca artar ve mide gibi yüksek asidik ortamda 10^2 - 10^3 /ml'den başlayarak, üst ince barsakta 10^5 /ml'ye ve kolon bölgesinde 10^{12} /ml'ye kadar ulaşabilir [65].

Barsak mukozası, enfeksiyöz patojenlere enflamatuvar sinyaller ve zararsız kommensal mikroorganizmalara ise immün tolerans sinyalleri ile yanıt verir. Genel savunma mekanizmaları, goblet hücreleri tarafından salgılanan polisakkaritlerin lümenine doğru bir mukus tabakası oluşturması, Paneth hücreleri tarafından antimikrobiyal peptidlerin salınması ve plazma hücreleri tarafından sekretnuar IgA'nın salınması gibi mekanizmaları içerir [66, 67]. Bariyerin bütünlüğünün korunması, barsak homeostazı için temel bir önkoşuldur. Bariyer hasarı durumunda, epitelyal tabakanın hızlı bir şekilde yeniden kapanma kapasitesi, immün hücrelerin mikrobiyata ile temasını önlemek veya minimize etmek için kritik öneme sahiptir, aksi halde iltihabi bir yanıtın başlatılmasına neden olabilir [41].

Homeostazis sırasında, epitelyal bariyer sağlamken, luminal barsak antijenlerinin tamamına karşı oluşturulan mukozal tolerans, yüzey epitelini örten payer plaklarında bulunan mikro katlantı (M) hücreleri, intestinal epitelyal hücreler (IEH), immatur lenfoid hücre alt grubu [68], $\gamma\delta$ T hücreleri [69] ve dentritlerini doğrudan barsak lümenine uzatan dentritik hücreler [70] tarafından düzenlenir. Antijenik sinyaller, lenfositleri, plazma hücrelerini, eozinofilleri, mast hücrelerini, nötrofilleri ve çok sayıda makrofajı bulunduran gevşek bir bağ doku olan lamina propriaya (LP) iletilir. Enflamasyon yokken Treg hücre baskınlığıyla makrofajlar ve dentritik hücreler anerjik bir ortamda tutulur. Treg hücreler, immünsüpresif sitokin olan IL-10 salgılayarak efektör T hücre cevabını inhibe ederken TGF- β salgılayarak CD4⁺ T lenfositlerinin Treg hücrelere dönüşümünü uyarır. İntestinal epitelyal hücreler, önceleri tamamen absorptif bir hücre tipi olarak düşünülürken şimdilerde LP'daki hücrelere benzer şekilde mukozal immünitede önemli olduğu düşünülüyor. IEH'ler hem membranda hem de sitozolde yabancı mikrobiyal ligandları tanıyan patern tanıma reseptörleri (PRR)'ne sahiptir [67]. Barsak bariyeri bozulduğunda, bakteriler ve mikrobiyal ürünler LP'ya sızar ve bu da fagositik hücreler (PMNL ve makrofajlar) aktivasyonunu, antimikrobiyal savunma için ROT üretimini ve efektör Th1, Th17 ve NK hücrelerinden proenflamatuvar sitokin salınmasını tetikler. Aynı zamanda

intestinal epitelyal hücreler ROT üreterek, barsak bariyer tamiri ve iyileşmesi için intraselüler sinyal iletimine katkıda bulunur.

Biyolojik sistemlerin, 'düşük, hoşgörülebilir' ve 'yüksek, toksik' ROT seviyeleri arasındaki dengeyi düzenleyen işlevlerindeki bozukluk, kalıcı ve çözülmemiş mukozal enflamasyona yol açabilir. Yanlış oksidant seviyeleri, çok düşük veya çok yüksek, redoks dengesini değiştirerek patolojik süreçleri tetikler. Redoks dengesinin düzensizleşmesi, antimikrobiyal savunmayı zayıflatır, immün aktivasyonu uzatır ve transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonu, inflamazom fonksiyonu veya otofaji gibi doğuştan ve adaptif immün yanıtları değiştirir. Ardından gelen eksik patojen temizleme ve/veya oksidatif stres, sadece enflamasyonu sürdürmekle kalmaz, aynı zamanda fibroz, neoplazi ve ekstra-intestinal semptomlar gibi diğer kronik komplikasyonlara da yol açabilir [71].

Gastrointestinal sistemde, doğal bağışıklık sistemi; epitelyal hücreler, nötrofiller, makrofajlar, dendritik hücreler ve doğal öldürücü (NK) hücrelerden oluşurken, adaptif bağışıklık sistemi T lenfositleri ve B hücreleri içerir. Bu hücreler aktive olunca sitokin ve antikor salgırlar. Mukozal bağışıklık sistemi, etkili bir mekanizma ile patojenik, patojenik olmayan ve normal barsak mikroorganizmalarını hassas bir şekilde ayırt edebilir. Normal koşullarda, GI mukozasında pro-enflamatuvar (TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8, IL-17 ve IL-23) ve anti-enflamatuvar (IL-5, IL-10, IL-11 ve TGF- β) sitokinler arasındaki denge sıkı bir şekilde kontrol edilir. Nötrofiller ve diğer hücre tipleri proenflamatuvar sitokinler salgılayarak iltihaplanmayı başlatırlar ve adaptif bağışıklık sistemini daha da aktive ederler [72]. EBH patogenezinin altında yatan immün mekanizma, T helper (Th) hücreleri ile düzenleyici T hücreleri (Treg) arasındaki dengenin, özellikle Treg hücrelerin intoleransının bozulmasıdır. Başta makrofajlar ve nötrofiller olmak üzere bağışıklık hücrelerinin aktivasyonu, NOX ve NOS tarafından süperoksit ve nitrik oksit oluşumuna ve oksidan peroksinitrit üretimine neden olabilir; bunların tümü EBH'nin patogenezinde ve özellikle CH'nın başlamasında ve ilerlemesinde yer alır.[73-75].

Enflamatuvar barsak hastalığı patogenezinde NF- κ B sinyal yolağı: NF- κ B sinyal yolağı, hücrelerde çeşitli fizyolojik süreçleri düzenleyen bir protein sinyal yolağıdır. Bu sinyal yolağı, hücrelerin bağışıklık yanıtını, iltihaplanma, hücre büyümesi ve apoptozis gibi çeşitli biyolojik işlevleri düzenler. Birçok patojenik süreçte etkili bir

düzenleyici olan NF- κ B, EBH' da anormal şekilde aktive olmuştur [76]. NF- κ B barsak geçirgenliğini modüle edebilir ve intestinal epitel hemostazisiyle ilgilidir [77]. Ancak NF- κ B sinyali kronikleşirse, ÜK ve CH hastalarının mukozasında gözlenen kronik barsak iltihabını daha da yoğunlaştırabilir [76]. İntestinal epitel hücreleri tarafından tanınan mikrobiyal olarak aktive olmuş TLR'ler ve TNF- α , aynı zamanda oksidatif strese duyarlı olan NF- κ B sinyal yolağını uyarır. Aynı zamanda TNF- α kolon hücrelerinde ROT oluşumunu artırır [78]. NF- κ B aktivasyonunun EBH patogenezinde önemli rol oynayan beş farklı gen tipinin transkripsiyonunu artırabileceği belirtilmektedir. İlk olarak, IL-6, IL-8, IL-16 ve TNF- α gibi proenflamatuvar sitokinlerin transkripsiyonunu artırarak iltihaplanmaya neden olabilir. İkinci olarak, hücre hayatta kalma ve çoğalma süreçlerini modüle eden genlerin transkripsiyonunu artırarak, NF- κ B apoptozisi tetikleyebilir ve ÜK gelişimine katkıda bulunabilir [79]. Üçüncü olarak, barsak bariyerinin geçirgenliğiyle ilgili genlerin transkripsiyonunu artırarak, TNF- α tarafından indüklenen NF- κ B aktivasyonu, intestinal bariyerdeki myosin proteininin yıkımına neden olan myosin hafif zincir kinazını (MYLK) artırabilir [79]. Dördüncü olarak, TNF- α tarafından uyarılan ve mukozal hücrelerin sindirilmesine neden olabilen metalloproteinazların transkripsiyonunu artırabilir ve beşinci olarak, NF- κ B tarafından aktive edilen COX-2 ve iNOS enzimlerinin transkripsiyonunu artırarak, ROT metabolizması aracılığıyla bariyer stabilitesine müdahale edebilirler [80]. Bu nedenle, NF- κ B aktivasyonu EBH patogenezinde önemli bir rol oynar ve bu genlerin transkripsiyonunu artırarak, enflamasyonu, barsak bariyerinin hasarını ve diğer EBH semptomlarını tetikleyebilir.

Enflamatuvar barsak hastalığı patogenezinde Nrf2 sinyal yolağı: Nükleer faktör-eritroid 2 ile ilişkili faktör (Nrf2), EBH'de aşırı ROT üretimini bastırarak mukoza homeostazını koruyabilen önemli bir transkripsiyon faktörüdür. Nrf2, antioksidan mekanizması aracılığıyla proenflamatuvar yanıtı ve mukozal bozulmayı baskılar. DSS ile oluşturulan bir kolit modelinde, Nrf2 geni susturulmuş fareleri, vahşi tip farelerin kript kaybı ile karşılaştırıldığında daha şiddetli semptomlar gösterdiği ve ayrıca, Nrf2-geni susturulmuş farelerde IL-1 β , IL-6, IL-8, iNOS ve COX-2 gibi proenflamatuvar genlerin artan ekspresyonları ve hem oksijenaz-1 ve GST Mu-1 gibi antioksidan enzimlerin azalan ekspresyonu gösterdiğini bulunmuştur [81, 82].

2.2.3.4. Mikrobiyata

Barsak epitel hasarından sonra EBH patogenezinde diğer önemli basamak ise mikrobiyatadır. Uzun yıllardır, EBH'nin nedeni olarak normal barsak mikrobiyatasına anormal bir immün yanıtın mı, yoksa anormal barsak mikrobiyatasına özgü bir yanıtın mı olduğu konusu araştırılmaktadır. Son hayvan çalışmaları, her iki durumun da EBH gelişimine neden olabileceğini ve hatta birbirleriyle örtüşebileceğini göstermektedir.[83]

CH, barsak duvarının tüm katmanlarını içeren derin ve yaygın ülserlerle kendini gösteren, terminal ileum dahil olmak üzere GI sistemin herhangi bir bölümünü etkileyen bir durumken, ÜK sadece kolon ve rektumu sınırlıdır ve barsak astarının en iç katmanında iltihaplanma meydana gelir. EBH hastalarında gözlenen uyumsuz kronik iltihabi yanıtlar, konakçının bağışıklık toleransını düzenleyen fizyolojik mekanizmalardaki değişikliklerle karakterizedir ve LP bağışıklık sistemi tarafından kommensal mikroorganizmaların anormal algılanmasına yol açar (34).

Bazı insanlar, doğal immün sistemdeki anormallikler nedeniyle barsak mikrobiyatasında değişikliklere sahip olabilirler ve bu da EBH riskini artırabilir. Ayrıca, hayatın erken dönemlerinde antibiyotik kullanımı gibi faktörler barsak mikrobiyatasındaki bileşenlerde erken değişikliklere neden olabilir ve bu da suboptimal bağışıklığa ve EBH'ye yatkınlığa yol açabilir.[84]

2.2.3.5. Enflamatuvar barsak hastalığı gelişiminde ROT

Barsak, kommensal mikrobiyataya veya patojenlere immün tolerans veya proenflamatuvar sinyallerle yanıt veren birçok farklı hücre tipinden oluşur. ROT üretimi, GIS'i içeren birçok enflamatuvar bozukluğun ilerleyişinde önemli bir olaydır. Barsakta, mukozal bariyerin bozulması, hızlı bir şekilde doğal bağışıklık sistemini aktive eder ve LP bölgesinde başlayan akut bir enflamatuvar yanıtı tetikler. Polimorfonükleer lökositler (PMNL'ler), enfeksiyon ya da travma bölgesine göç eder, invaze olan patojenleri fagositoz eder ve ROT, granüler enzimler, vazoaktif ve pro-enflamatuvar aracı maddeler salgılar[45]. PMNL'ler tarafından ROT üretimi, oksijen

tükenmesine bağılı olarak hipoksik bir ortam yaratabilir ve bu, iltihabın çözülmesine yardımcı olabilir [85]. Bununla birlikte, kontrolsüz ve sürekli oksidatif stres, ROT'un aşırı üretimi ve/veya antioksidan sistemler tarafından yetersiz olarak temizlenmesi, apoptozis ve doku hasarına neden olabilir [86]. EBH hastalarında, mitokondriyal elektron transport zincirindeki (mtETZ) bozulmanın, artmış mitokondriyal ROT (mtROT) seviyelerine sebep olduğu ve yine bununla ilgili olarak azalmış mtROT'un kolitteki iyileşme bulgularıyla birlikte olduğu gösterilmiştir [87]. Enterositler ve fibroblastlar gibi non-fagositik hücrelerde eksprese edilen enzimler tarafından sıkı bir şekilde kontrol edilen ROT üretimi, ROT'un hücre içi düzenleyici olarak kavramanın yolunu açmıştır [88]. Aslında, düşük fizyolojik seviyelerde ROT, gen transkriptiyonunu (genetik bilginin RNA'ya dönüştürülmesi), protein kinaz aktivasyonunu (protein moleküllerinin aktif hale getirilmesi) ve fosfataz inhibisyonunu (enzimlerin inhibe edilmesi) içeren bir dizi sinyal yolunda vazgeçilmezdir. Bu süreçler sayesinde ROT, sitokin üretimini (iltihap tepkisi) ve hücrelerin koordineli hareketliliğini düzenleyerek hücre içi işlemleri kontrol etmektedir [67].

Barsakta aşırı miktarda ROT üretildiğinde oksidatif stres artar ve bu da protein fonksiyonlarını modifiye ederek ve lipid peroksidasyonuna yol açarak hücre hasarını hızlandırır [89]. Mukozal enflamasyon sırasında, enflamatuvar sitokinler tarafından indüklenen NOX ve induklenebilir nitrik oksit sentaz (iNOS) aktivasyonu yoluyla intestinal epitel hücreler, nötrofiller ve makrofajlar gibi süperoksit ve nitrik oksit üretirler ve yine NOX ve iNOS aktivasyonu aracılığıyla daha fazla ROT / RNT üretilmiş olur. Bu ROT yüklemesi, hücre iskelet proteinlerine zarar verebilir ve epitel hücreleri arasındaki sıkı bağlantıların ve epitelyal geçirgenliğin değişimlerine neden olarak intestinal bariyer hasarına yol açabilir [90, 91].

SOD aktivitesi, EBH hastasının hastalık seyri ile ilişkilidir [92]. Genel olarak, SOD' aktivitesi, enflamasyon ve EBH'deki oksidatif stres koşullarında dokuyu oksidatif hasara karşı korumak için bir tepki olarak artmaktadır. EBH hastalarının periferik kanındaki SOD seviyeleri zaten oksidatif stres için bir biyobelirteç olarak kullanılmaktadır. Yine antioksidan enzimlerden olan GPX1 ve GPX2'nin birlikte mutasyonları farelerde, GI sistemdeki oksidatif hasar ve enflamasyondan kaynaklanan EBH'ye benzeyen semptomlara neden olduğu yapılan çalışmalarla gösterilmiştir [93].

Oksidatif stres, kolon iltihabının gelişiminde potansiyel bir etiyolojik ve/veya tetikleyici faktör olarak kabul edilir [94]. Genetik yatkınlığı olan bireylerde kronik ve tekrarlayarak ortaya çıkarlar. Ayrıca, beslenme, hijyen, stres gibi çevresel risk faktörlerine ve mikrobiyom değişikliklerine bağlı olarak da oluşabilir. CH ve ÜK, enflamatuvar barsak hastalığı (EBH) olarak tanımlanan barsak rahatsızlıklarıdır [95]. Her iki EBH formu da önemli morbidite ile ilişkilidir ve barsak iltihabı, ishal, karın ağrısı, kilo kaybı gibi belirtilerle karakterizedir ve ekstraintestinal belirtiler arasında artrit, sedef hastalığı, eritema, kolangit ve göz iltihabı bulunmaktadır [96].

Oksidatif stres, EBH'ye yol açan radyasyon, kemoterapi, sigara , barsak lümeni antiijenleri, alkol, ilaçlar ve xenobiyotikler gibi çevresel faktörler tarafından da aktive edilebilir [97]. Diyetle alınan demir (Fe) ve bakır (Cu), bazı işlenmiş gıdalardaki trans yağ asitleri ve atıştırmalık krakerlerdeki akrilamid, ROT üretimini artırarak oksidatif stresi tetikler [98-100]. Yüksek alkol konsantrasyonları, GİS mukozal bariyerini doğrudan etkileyebilir. Ayrıca, çeşitli ilaçlar ve xenobiyotikler barsakta serbest radikal üretimini arttırdığı bildirilmiştir [101].

GI sisteminde, ROT ve RNT'in başlıca kaynakları NADPH oksidaz enzimleri [NOX / dual oksidaz (DUOX)], mitokondriyal elektron taşıma zinciri (mETZ) ve NOS'lerdir. Hem deneysel modellerden hem de klinik çalışmalardan elde edilen veriler, oksidatif stres sinyalinin de EBH gelişimine katkıda bulunduğunu göstermektedir. Oksidatif stres, gastrointestinal mukozanın hasar görmesine ve bakteriyel invazyona yol açarak bağışıklık tepkisini uyarır ve bu da EBH'yi başlatır [97].

2.2.3.6. Enflamatuvar barsak hastalığı patogeneğinde NO

NO, mukoza vazodilatasyonunu, artmış intestinal epitel geçirgenliği ve motilite değişimi de dahil olmak üzere EBH'nin birkaç belirtisini doğrudan veya dolaylı olarak düzenler. Kumulatif kanıtlar, NO üretiminin EBH sırasında arttığını göstermektedir [102, 103]. Enflame barsak dokusundaki majör NO kaynakları; monosit, makrofaj ve miyofibroblastlardır.

Genel olarak, düşük ve geçici düzeydeki NO'nun barsak homeostazının önemli bir düzenleyicisi olduğu görünmektedir, çünkü NOS3 (eNOS) eksikliği olan fareler kolite karşı yüksek duyarlılık göstermektedir [104]. Öte yandan, NOS2 tarafından uzun

sürekli ve yüksek dozlarda NO üretimi, barsakta iltihabi yanıtı arttırabilir, çünkü indüklenebilir NOS (iNOS) eksikliği, DSS modelinde kolite karşı koruma sağlamıştır [105]. Bu veriler, hastalıklarda endotel NO'nun koruyucu rolünün, belli bir noktada ortadan kaybolabileceğini, muhtemelen aktive olan immün hücreler tarafından üretilen fazla miktardaki OONO• tarafından baskılanabileceğini ve sonuç olarak kronik barsak iltihabına katkıda bulunabileceğini düşündürmektedir.

2.2.3.7. Enflamatuvar barsak hastalığı ve sıkı bağlantı (SB) proteinleri

Enflamatuvar barsak hastalıkları, epitelyal bariyerin bütünlüğünün bozulduğu iltihaplanma ile karakterizedir. Apikal sıkı bağlantı proteinleri, epitelyal bariyer fonksiyonunun sürdürülmesinde ve paraselüler geçirgenliğin kontrolünde kritik öneme sahiptir [106]. Dört integral transmembran protein tanımlanmıştır: okludin [107], klaudinler [108], bağlantılı adezyon molekülü (JAM) [109], ve triyosellulin [110]. Bu transmembran proteinlerin hücre içi bölgeleri, sitozolik iskelet proteinleri olan zonula okludens (ZO) proteinleri ile etkileşime girer ve bu da transmembran proteinlerin aktin sitoskeletonuna bağlanmasını sağlar. SB proteinlerinin aktin sitoskeletonu ile etkileşimi, SB yapısının sürdürülmesi ve SB bariyer bütünlüğünün sitoskeletal düzenlemesine izin vermek için hayati önem taşır [111].

Klaudin: Klaudin moleküllerinin ekstraselüler loplari, yan yana bulunan hücrelerle hemofilik ve heterofilik etkileşimler oluşturur ve bu etkileşimler, paraselüler alanda moleküllerin geçişine karşı seçici bariyerler veya gözenekler oluşturur [112, 113]. Birçok çalışma, klaudinlerin SB'ların temel bileşeni ve omurgası olduğunu göstermiştir. Klaudinlerin farklı izoformları, farklı yük ve boyutlardaki iyonların paraselüler hareketini düzenler [114]. Barsak bariyerini oluşturan proteinlerden olan klaudinlerin düzensiz ifadesi ve yeniden dağılımı, barsak geçirgenliğinin artmasına, barsak enfeksiyonlarına duyarlılığa ve EBH hastalarının barsak semptomlarına yol açabilir [106].

Klaudin knockout farelerini kullanan son çalışmalar, klaudinlerin çeşitli dokularda bariyer oluşturma ve paraselüler geçirgen seçiciliğinde kritik bir rol oynadığını göstermiştir [115]. Öne çıkan bir örnek olarak, klaudin-1 knockout farelerinin

doğumdan sonraki 24 saat içinde, epidermal bariyerin bozukluğu nedeniyle dramatik bir şekilde sıvı ve elektrolit kaybından öldüğünü göstermektedir.

Okludin: Okludin, dört transmembran alan, iki ekstraselüler döngü ve üç sitoplazmik bölge içeren bir primer transmembran proteindir [116]. Ekstraselüler döngülerin benzersiz yük yapısı hücrelerin birbirine yapışmasını sağlayabilir [117]. Okludin, paraselüler bir bariyer olarak işlev görür, ZO-1 ile etkileşime girerek hücre yüzeyi polaritesini sürdürür ve endotel hücrelerinin geçirgenliğini düzenler [118]. Bu proteinin ekspresyonu, beyin, testis, epididim, böbrek, karaciğer, akciğer, mide, onikiparmak bağırsığı, ince barsak, kolon, deri ve kan damarları dahil olmak üzere birçok organ ve doku içinde rapor edilmiştir [119, 120].

Okludin knockout farelerde oluşturulan deneysel kolit modelinde barsak epitelyal hücrelerinde sıkı bağlantı proteini olan okludinin, CASP3 ifadesini arttırdığı bulunmuştur. Okludin kaybı, bu hücrelerin apoptoza duyarlılığını azalttığı saptanarak enflamatuvar barsak hastalığı olan hastaların barsak epitelyal hücrelerinde düşük seviyelerde okludin ve CASP3'ün, enflamatuvar koşullara yanıt olarak mukozal homeostazın restorasyonunu teşvik edebildiği söylenmiştir [121].

Sonuç olarak EBH'da artmış barsak paraselüler geçirgenliği görülür. Bariyer disfonksiyonunun hastalıktan önce gelip gelmediği veya aktif iltihaptan kaynaklanıp kaynaklanmadığı hala belirsiz olmasına rağmen, EBH hastalarında artmış barsak sıkı bağlantılarının bozulması, sıkı bağlantı bariyer bütünlüğünün düzensizliğinin EBH ilerlemesini yatkınlaştırabileceğini veya artırabileceğini göstermektedir. Bu nedenle, sıkı bağlantı bariyer bütünlüğünü geri kazanmayı hedefleyen terapötik yaklaşımlar, EBH'ye karşı etkili tedavi ve önleyici yaklaşımlar sağlayabilir [122].

2.2.4. Klinik

EBH klinik bulguları hastalık alt tipine göre farklılık göstermektedir. ÜK'li hastalar genellikle ishal veya dışkıda kan nedeniyle başvurur. Semptomlar kolik tarzında karın ağrısı, sıkışma hissi, tenesmus ve inkontinansı içerir [123]. CH' da ise semptomlar sinsili olabilir, spesifik olmayabilir ve hastalığın lokasyonuna ve şiddetine bağlı olabilir. Bazı hastalarda CH teşhisinden yıllar önce semptomlar olabilir [124].

ÜK hastalarında semptomların şiddeti, kanlı veya kansız günde dört veya daha az dışkı ile hafif hastalıktan, günde 10'dan fazla dışkı ile şiddetli kramplar ve sürekli kanama ile şiddetli hastalığa kadar değişebilir [123]. Hastalarda ateş, yorgunluk ve kilo kaybı gibi sistemik semptomlar olabilir. Hastalarda ayrıca kan kaybından kaynaklanan demir eksikliğine bağlı anemi, kronik hastalık anemisi veya otoimmün hemolitik anemi nedeniyle nefes darlığı ve çarpıntı olabilir. Sistemik semptomların varlığı ve şiddeti, barsak hastalığının klinik şiddetine bağlıdır. Fizik muayene, özellikle hafif hastalığı olan hastalarda genellikle normaldir. Orta-şiddetli ÜK'i olan hastalarda palpasyonla abdominal hassasiyet, ateş, hipotansiyon, taşikardi ve solgunluk olabilir. Rektal muayenede kan görülebilir. Uzun süreli ishal semptomları olan hastalarda kilo kaybı ve yetersiz beslenme nedeniyle kas kaybı, deri altı yağ kaybı ve periferik ödem belirtileri olabilir [123]. CH'da ise ishal ve karın ağrısı başlıca semptomlardır (128). Diğer semptomlar yorgunluk, kilo kaybı, ateş, anemi, tekrarlayan fistüller ve diğer perianal bulgulardır. Striktüran hastalığı olan hastalarda barsak tıkanıklıkları, barsak hareketlerinin eksikliğine neden olarak hiperaktif barsak seslerine, bulantı ve kusmaya neden olabilir. Fistüller veya apseler, penetran hastalığın bir belirtisi olabilir [125]. Apse mevcut olduğunda, hastalarda ateş ve titreme gibi sistemik semptomlar olabilir. Fistüllerden kaynaklanan semptomlar fistülün konumuna bağlıdır: enteroenterik fistül durumunda ishal, enteroveziküler (barsak ve mesane arasında) veya enteroüreteral fistül durumunda idrar yolu enfeksiyonları, enterovajinal fistül durumunda vajinaya dışkı geçişi ve enterokutanöz fistül durumunda ise mide veya barsak içeriğinin deriden drenajı meydana gelir.

2.2.5. Tanı

2.2.5.1. Enflamatuvar barsak hastalığı tanısında güncel biyobelirteçler

Endoskopi, enflamatuvar barsak hastalığı teşhisinde temel teşhis metodu olarak kullanılmaktadır. CH ve ÜK hastalığının barsak tutulumları farklı olduğu için bu tutulumun gözle görülmesi ve aynı zamanda biyopsi imkanının olması endoskopiye EBH teşhisinde önemli kılmaktadır. Ancak endoskopinin girişimsel bir işlem olması

ve %100 kesin tanı imkanı vermemesi sebebiyle farklı klinik -laborotuar bulgularıyla ve görüntüleme yöntemleriyle desteklenmesi gerekir.

Enflamatuvar sürecin monitörizasyonu için birçok biyomarker tanımlanmıştır. Ancak bunlar genellikle nonspesifik olduğundan dolayı hastalık teşhisinden ziyade tedaviye cevabın takibinde kullanılmaktadır. [126]

Enflamasyona yanıt olarak makrofajların sitokin kaskadını başlatmasıyla hepatositlerde sentezlenen CRP (C reaktif protein), en duyarlı enflamasyon belirteçlerinden biridir ve EBH tanı ve takibinde sıklıkla kullanılır. [127] CRP, 19 saatlik kısa yarı ömrü ve enflamasyona cevap olarak 500 veya 1000 kat artabilmesi[128] gibi özelliklerle enflamasyon için önemli bir belirteçtir ancak özgün değildir. Enflamasyon haricinde sigara içme, obezite ve ilaç kullanımı gibi durumlarda da artmaktadır. [127] CRP' nin EBH barsak hastalığı için negatif prediktif değeri yüksektir ancak aktif CH'larının %30 unda CRP normal bulunmuştur. [129] Ayrıca CRP, CH ve ÜK hastalığını ayırmada kullanılmaz.

Fekal kalprotektin (FK), barsak enflamasyonunun doğrudan bir belirtecidir. Enflamasyon sırasında nötrofil sitozolünde üretilir ve nötrofil degranülasyonu ile salınır. [130] Bu nedenle, seviyeleri divertikülit, enfeksiyöz kolit, barsak neoplazmları, siroz ve nonsteroid anti-enflamatuvar ilaçlar ve proton pompa inhibitörleri kullanımı durumunda da artabilir.[131] FK dışkı örneklerinde 7 güne kadar stabildir.

EBH tanısında yardımcı olmak için birkaç biyobelirteç de belirlenmiştir. Perinükleer antinötrofil sitoplazmik antikor (p-ANCA) pozitifliği, CH hastalarının %6 ila %39'unda, ÜK hastalarının %41 ila %73'ünde ve sağlıklı kontrol grubundaki bireylerin %0 ila %8'inde bulunur.[132] Bu bulgu, bu biyobelirteç için CH tanısında düşük özgüllük (19%) verir ve kullanışlılığı, ÜK'yi CH'den %52 duyarlılık ve %91 özgüllükle ayırt etmek için kullanılır.[133] Anti-Saccharomyces cerevisiae antikor (ASCA), CH hastalarının yaklaşık %60'ında, ancak ÜK hastalarının sadece %13'ünde ve sağlıklı kontrol grubundaki bireylerin %3'ünde bulunur ve CH tanısında duyarlılığını (%72) ve özgüllüğünü (%82) gösterir.[134] CH'li hastaların sağlıklı aile üyelerinin %20'sine kadar ANCA ifade ettiği gösterilmiştir ve farklı etnik gruplar, özellikle CH'li Asyalı popülasyonlar, ANCA testi pozitif çıkmazlar.[132]

Serum Biyobelirteçleri

Bu şiddetli barsak iltihabı, serum ve kanı izleyen akut faz cevabı ile birlikte gelir. Akut faz yanıtı, fibrinojen, plazminojen, Faktör VIII ve protrombin gibi pıhtılaşma ve fibrinolizde rol oynayan proteinlerin artan üretimi ile karakterizedir; C1 inhibitörü, C1s, C2, C3, C4, C5 ve C9 gibi kompleman sistemi bileşenleri; α -1-antitripsin, α 1 anti-kiyomotripsin gibi proteinaz inhibitörleri; haptoglobin ve seruloplazmin gibi taşıma proteinleri; ve CRP, serum amiloid A (SAA), ferritin, fibronectin ve rosomukoid gibi çeşitli diğer proteinler. Diğer serum proteinleri, albümin, transferin, α 2 makroglobulin ve Faktör XII gibi akut faz cevabında baskılanır.[135] Pro-enflamatuvar sitokinlerin serum seviyeleri de, akut faz yanıtını uyaran birçok sitokin dahil olmak üzere yükseltilmiş olabilir. Bunlar arasında TNF α , interferon b, transforming growth factor b (TGF-b), IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12, IL-17 ve IL-23 yer alabilir.[136] Diğer potansiyel serum belirteçleri arasında adenosin deaminaz[137], çözünür ST2[138] ve triptofan[139] bulunur. Kanın hücresel bileşenleri de enflamasyonu gösterebilir ve beyaz kan hücresi ve trombosit sayısındaki yükselmeler bunu yansıtır.[136] Eritrosit sedimentasyon hızı (ESH), akut faz yanıt proteinlerinin artması nedeniyle plazma viskozitesindeki artış yoluyla iltihabın dolaylı bir ölçüsüdür. Ancak, ESH, anemi ve polisitemi gibi hematokriti etkileyen diğer hastalıklar ve fizyolojik durumlar gibi diğer durumlardan da etkilenir, bu da EBH'de doğruluğunu ve özgüllüğünü azaltır.[140]

EBH hastalığının kan veya serumda enflamasyon belirteçleri olarak yaygın bir şekilde kullanılan ve ayrıntılı olarak doğrulanmış çok az sayıda belirteç bulunmaktadır. CRP ve ESH en yaygın kullanılanlarıdır. CRP, yaklaşık 19 saat olan kısa yarı ömrü nedeniyle çoğu diğer akut faz reaktanlarından daha duyarlı bir akut enflamasyon göstergesi olarak kabul edilir.[140] Hassasiyetleri ve normal kesim değerlerinin tanımları arasında farklılıklar olmakla birlikte, yüksek hassasiyetli testler için 0.8 mg/L'den standart hassasiyetli testler için 5 mg/L'ye kadar değişen kesim değerleri mevcuttur. Bununla birlikte, klinik sonuçlar 0.8 ila 200 mg/L arasında değişmektedir ve bu test için geniş bir dinamik aralık sağlamaktadır. Tipik akut faz yanıtında hepatositler pro-enflamatuvar sitokinler, özellikle IL-6, tümör nekroz faktörü a ve IL-1b'ye yanıt olarak CRP üretirler.[140] Daha yeni olarak, CH'li hastalarda CRP'nin mezenterik adipositlerde de ifade edildiği fark edilmiştir[141], bu da CH'de ÜK'den daha yüksek CRP düzeyleri gözlenmesini açıklamaktadır. Bununla birlikte, akut

şiddetli ÜK'li hastalarda yüksek CRP seviyeleri, daha yüksek kolonektomi olasılığı ile ilişkilidir[142] ve en yüksek ÜK şiddeti olanlarda normalde mukoza ile sınırlı olan enflamasyonun transmural yayılımını yansıtabilir. CRP ekspresyonunun genetik belirleyicileri de karmaşıktır[143] ve endoskopide CH aktivitesi gösteren hastaların% 25'inden fazlasında normal eşik değerlerinin üzerinde CRP seviyeleri gözlenmez.[144]

Gaita Biyobelirteçleri

Kan veya serum belirteçlerine kıyasla, dışkı belirteçleri bağırsağa lokalize olan enflamatuvar süreçler için artmış özgüllüğe sahiptir. Bazı dışkı belirteçleri, a-1-antitripsin ve okült kan gibi, mukozal bariyerin bozulmasını yansıtırken, bu belirteçler EBH'nin temel patojenik enflamatuvar süreçleriyle ilişkili olan diğer belirteçler kadar doğru değildir[145]. Lökositten kaynaklanan ürünlerin degranülasyon ürünleri, lysozym, myeloperoksidaz, eozinofilik katyonik protein, eozinofilik protein X, laktoferrin, matriks metalloproteinaz (MMP)-9, neopterin ve polimorfonükleer elastaz gibi, aktif EBH'li hastaların dışkısında daha yüksek konsantrasyonlarda sağlıklı normal bireylerin dışkısına göre bulunan nispeten stabil proteinlerdir.[145] Ayrıca, hasarla ilişkili moleküler kalıplar (DAMP) proteinleri S100A8/S100A9, birlikte kalprotektin olarak adlandırılan ve S100A12, dışkıda da kararlıdır ve aktif EBH'de artar.[145] Fekal M2-pirüvat kinaz[146] ve kitinaz 3-benzeri-1[147] düzeyleri de EBH'deki hastalık aktivitesiyle ilişkili olarak artar. Bazı dışkı belirteçlerinin sınırlamaları, hastaların dışkı toplama isteksizliği ve dışkı belirteçlerinin EBH'ye özgü olmaması, diğer enfeksiyöz veya enflamatuvar süreçlerle karşılaştırıldığında özgüllüğünün eksikliğidir.[148] Ayrıca, bazı dışkı belirteçlerinin, farklı bir günde toplanan farklı dışkı örneklerini karşılaştırmak bile olsa, intra-bireysel değişkenliğinin büyük olabileceği görünmektedir.[149] Kalprotektin ve laktoferrin, önerilen diğer dışkı belirteçlerinden daha fazla çalışılmış ve klinik laboratuvarlarda kolayca mevcuttur.

İdrar Biyobelirteçleri

İBD'deki enflamasyonun biyobelirteçleri olarak incelenen idrarda atılan az sayıda madde vardır. Bunlar arasında çeşitli prostaglandin ve lökotrien yolak ürünleri[150-153], nötrofil jelatinaz ilişkili lipokalin[154], alfa 1-asit glikoprotein ve Zn-alpha 2-glikoprotein[155] ve neopterin[156] yer alır. Hiçbiri kapsamlı bir şekilde doğrulanmamıştır ve hiçbiri klinikte yaygın olarak kullanılmamaktadır.

2.2.5.2. Görüntüleme

EBH tanısında radyolojik görüntülemenin önemi büyüktür. Gerek tanıda gerekse tedavide bilgisayar tomografisi (BT) ve manyetik rezonans (MR) sıkça kullanılmaktadır. Ancak BT ile radyasyona maruziyetin olması, MR için de uzun süre kapalı alanda bulunma gerekmesi hastanın hem sağlığı hem de konforu için sorun oluşturabilmektedir. Barsakların değerlendirilmesinde ultrasonografi, iyonlaştırıcı radyasyon kullanımını da önler. Intravenöz mikrobüle kontrast ve düşük mekanik indeksli görüntüleme modu veya güçlü Doppler'in bir kombinasyonu, tüm bağırsağın değerlendirilmesini mümkün kılar.

EBH şüphesi olan hastalar için birçok tanısal değerlendirme yapılması gerekmektedir. Tanı, öncelikle endoskopi ve çapraz kesitsel görüntüleme ile barsak iltihabının gösterilmesi ile yapılır. İdeal olarak, biyopsi alınır ve histoloji hastalık desenini CH veya ÜK olarak doğrular; ancak, bu bulgular belirsiz ise, doğru tanıyı belirlemede potansiyel olarak faydalı olan özel biyobelirteç paneli bulunmaktadır. Doğru tanı, hastaların uygun tedavi önerilerini almasını ve en iyi olası sonuçları elde etmesini sağlamak için önemlidir.[126]

2.2.6. Tedavi

2.2.6.1. Modern tedavi yöntemleri

EBH remisyon ve nükslerle seyreden kronik bir hastalıktır. Tedavi ile asıl amaç hem remisyon indüksiyon oluşturup bunun devamını sağlamak hem de komplikasyon oluşumunu engellemektir. Remisyon sadece tedaviye klinik yanıt alınması değildir, aynı zamanda mukozal iyileşme de remisyon tanımına girmektedir. [157, 158].

Enflamasyonun EBH hastalıklarının temel nedeni olduğu düşünüldüğünde, hastalığı yönetmek için öncelikle bir dizi antienflamatuvar ilaç tercih edilmiştir. Özellikle

immünsüpresif tedaviler hem remisyonun başlamasında hem de idame ettirilmesinde önemli rol oynamaktadır.

NSAID olan 5-Aminosalisilatlar COX inhibisyonu yoluyla prostoglandin sentezini azaltırlar ve proenflamatuvar sitokin üretimini baskırlar. Antienflamatuvar etki prensibiyle ÜK tedavisinde sıklıkla kullanılan 5-ASA'ların CH için etkinliği sınırlıdır [159, 160]

Kortikosteroidler, EBH'nın remisyon indüksiyonu ve idamesinde tek başına ya da diğer ilaçlarla kombine olarak kullanılabilen en eski ve erken dönemde en etkin tedavi yöntemidir. Ancak tüm hastalarda steroide yanıt eşit şekilde alınmayabilir hatta yanıtızlık da sıktır. Ayrıca hiperglisemi, osteoporoz ve enfeksiyon riskinde artış gibi yan etki profili nedeniyle uzun süreli tedavide yerleri yoktur [161, 162].

İnfliksımab, adalimumab, sertolizumab gibi TNF-alfa antikorları ve azatioprin, 6-merkaptopürin, metotreksat, siklosporin gibi immunomodülatörler kortikosteroid tedavisinde yanıt vermeyen hastalarda kullanılmaktadır [163]. Yine EBH tedavisinde kullanılan biyolojik ajanlara örnek olarak da vedolizumab gibi anti-integrin verilebilir. Ayrıca son yıllarda IL-12 ve IL-23 blokanı olan Ustekinumab da özellikle primer ve sekonder anti-TNF yanıtız hastalarda kullanılmaya başlanmıştır [164-167].

EBH barsak hastalığı ile ilgili son dönemlerde tanı, tedavi ve takip açısından bazı değişikliklere gidilmiştir. Önceden EBH'nın aralıklı alevlenen bir hastalık olduğu bilinirken şimdilerde önemli bir kısmının progresif olduğu kabul edilmiş durumdadır. Yine eskiden tüm hastalara aynı tedavi verilirken günümüzde hastalık şiddetine ve prognoza göre değişen bireyselleştirilmiş yaklaşım uygulanmaktadır. Ayrıca güncel tedavi yöntemleriyle tam yanıt ve remisyon hedeflenmek yerine artık mukozal iyileşme gibi daha objektif sonuçlar hedeflenmeye başlanmıştır [168].

Mevcut ve gelişen tedaviler ile EBH tedavisinde çok fazla ilerleme kaydedilmiş olmakla birlikte, sadece semptom kontrolüne yönelik çoğu güncel yaklaşım, bu hastalığın doğal seyrini değiştirmede başarısız olmuştur [169, 170]. Ayrıca tüm bu tedavi yöntemleri her ne kadar klinikte güvenle kullanılabilir gibi düşünülse de immün sistem baskılayıcı etkilerinden dolayı fırsatçı enfeksiyon, sekonder malignite ve daha pek çok yan etki açısından yüksek risk taşımaktadır [171].

2.2.6.2. Tamamlayıcı tedavi yöntemleri

EBH ile birlikte kolorektal kanserin insidansı ve şiddeti arttıkça, EBH için devrim niteliğinde tedavi yaklaşımlarına olan talep de artmaktadır. EBH'deki oksidatif stres patomekanizmasının birçok laboratuvar raporu ve klinik çalışma tarafından önerilmesi nedeniyle, Nrf2 sinyalizasyonunu düzenlemek ve NOX veya mitokondri hedef alarak ROT oluşumunu baskılamak, EBH için potansiyel tedavi seçenekleridir. Ayrıca, ROT oluşumunu inhibe eden, hormonlar, fonksiyonel diyet müdahaleleri ve hücre ölümünü inhibe eden ve antioksidan enzimleri aktive eden doğal veya sentetik maddeler gibi antioksidan etkileri olan bazı geleneksel olmayan tedavi yöntemleri, tamamlayıcı ve alternatif tıp (TAT) olarak giderek artan ilgi çekmektedir [172].

2.2.6.3. EBH tedavisinde polifenoller

Polifenoller; antioksidan, anti-enflamatuvar, immunomodülatör ve apoptotik özelliklere sahiptir ve bu sayede, enflamasyonda rol oynayan birçok hedef geni, örneğin NF- κ B, Nrf-2, STAT ve MAPK'ları düzenleyebilirler. Polifenoller ayrıca, IL-8, IL-1 β ve TNF- α gibi sitokinlerin üretimini engelleyebilir ve SOD ve GPX gibi hücrel antioksidanların aktivitelerini arttırabilirler. Antioksidan aktiviteleri sayesinde, polifenoller doğrudan serbest radikalleri yakalayabilir ve NF- κ B ve MAPK yolları gibi bazı redoks sinyalleme yollarını da etkisiz hale getirebilirler [173, 174]. Polifenoller ayrıca barsak geçirgenliğini azaltarak barsak mukozasını korur ve sıkı bağlantı stabilizasyonu yoluyla intestinal mukozayı korur. EBH müdahalelerine yönelik klinik çalışmalar, polifenoller bakımından zengin yarı vejetaryen bir diyeti takip eden 22 CH hastasının semptom rahatlaması bildirdiğini göstermiştir [175]. Ancak, polifenollerin şu olumsuz etkilerine dikkat edilmelidir: birinci olarak, yüksek dozlarda pro-oksidan olarak hareket edebilirler; ikinci olarak, diğer ilaçların emilimini etkileyebilirler; ve üçüncü olarak, metabolizma yollarına müdahale edebilirler.

Polifenoller, flavonoidler (isoflavonoidler ve antosiyaninler) ve flavonoid olmayanlar (fenolik asitler, kumarinler, stilbenler ve taninler) olarak sınıflandırılabilir. Flavonoidlerin, oksidatif stres karşısında hücreyi koruduğu *ve in vivo* ve *in vitro* olarak barsak epitelyal mukozası katmanını koruduğu bildirilmiştir [176].

Antioksidan tedavinin, mide veya barsak iltihabı olan hastalarda iltihabı durdurma konusunda geçerli bir yöntem olup olmadığı henüz tam olarak çözümlenmemiştir. Örneğin, kolit deneysel modellerinde SOD temelli tedavilerin olumlu etkisi [177], insan EBH'sinde SOD tedavisi ile tekrarlanmamıştır [178]. 5-ASA'nın bir antioksidan olarak kabul edilmesine rağmen [179], iki klinik çalışma, 5-ASA'nın N-asetil sistein [180] veya ksantin oksidaz inhibitörü olan allopurinol gibi diğer antioksidanlar ile birleştirildiğinde ÜK tedavisinde daha etkili olduğunu göstermiştir [181], bu da oksidatif hasarın önlenmesinin EBH tedavisinde faydalı olabileceğini düşündürmektedir.

2.2.6.4. EBH tedavisinde timokinon (TQ) kullanımı

Çok sayıda bitki ve bunların izole edilmiş bileşenleri, anti-enflamatuvar, antikanser, antimikrobiyal ve immünomodülatör etkiler dahil olmak üzere yararlı terapötik özellikler göstermiştir [182]. *Nigella sativa* (N. sativa) olarak da bilinen çörek otu, Ranunculaceae familyasına ait çiçekli bir bitkidir [183]. N. sativa'nın uçucu yağının ana bileşeni, bir monoterpen olan ve etkisi deneysel çalışmalarla kapsamlı bir şekilde araştırılan TQ dur. TQ'nun en önemli özelliklerinden biri antioksidan bir molekül olmasıdır. Çalışmalar TQ'nun oksidatif stresle mücadelede umut verici bir antioksidan olduğunu göstermektedir [184]. TQ'nun antioksidan özelliği, mitokondriyal elektron taşıma sisteminde önemli bir potansiyele sahiptir. Elektron taşıma zinciri, TQ'u düşük antioksidan aktiviteye sahip oksitlenmiş formundan, yüksek radikal temizleme özellikleri olan indirgenmiş formuna dönüştürür. Bu nedenle, sitoprotektif enzimlerin indüksiyonu yoluyla oksidatif stres tarafından kaynaklanan hücresel hasara karşı koruma sağlar [184]. Birçok çalışma, TQ'nun mRNA ekspresyonu yoluyla CAT [185], SOD ve GSH-Px [186] gibi antioksidan ve sitoprotektif enzimlerin aktivitesini indüklediğini ve lipid peroksidasyonunu önlediğini göstermiştir [187]. Daha önce yapılan çalışmalarda, ratlarda seruleinle oluşturulmuş akut pankreatit modelinde, TQ'nun anti-enflamatuvar ve antioksidan etkisi gösterilmiştir [188]. Ayrıca TQ bakımından zengin *Nigella sativa* yağının, farelerde gastrik enflamasyona ve ülserlere karşı koruma sağlamak için gastrik müsin üretimini arttırdığını kanıtlayan çalışmalar da mevcuttur [189].

MAPK'lar ve NF- κ B, enflamasyonda yer alan önemli sinyal yollarıdır. Birkaç çalışma, EBH hastalarının barsaklarında MAPK'ların artmış ekspresyonu ve fosforilasyonunu rapor etmiştir [190-192]. Benzer şekilde, intestinal epitel hücrelerinde artmış NF- κ B ekspresyonu, EBH hastalarında enflamasyonla ilişkilidir [76]. *İn vitro* ve *in vivo* çalışmalar, TQ'nun enflamasyonla ilgili MAPK yollarının aktivasyonunu bastırmak için kinaz aktivitesine hedef olabileceğini göstermektedir [193].

Önceki çalışmalar, TQ'nun farelerde DSS (dekstran sülfat sodyum) ile indüklenen kolitte kolonik miyeloperoksidaz aktivitesinde azalma, malondialdehit'in azalması ve glutatyon seviyelerinin artması ile kolonik enflamasyonu hafiflettiğini göstermiştir [194]. TQ tedavisi ayrıca, sıçanlarda asetik asitle indüklenen kolitte miyeloperoksidaz aktivitesini, platelet-aktivasyon faktörünü (PAF) ve histamini inhibe ederek, glutatyon (GSH) tükenmesinin önlenmesiyle birlikte enflamasyonu azaltmış ve oksidasyonun inhibisyonunun rol oynadığını göstermiştir [195]. Ancak, kolitte TQ'nun aracılık ettiği anti-enflamatuvar etkinin temel moleküler mekanizması hala tam olarak anlaşılamamıştır.

2.3. Enflamatuvar barsak hastalığı tanısı için yeni biyobelirteç keşfi çalışmaları

EBH hastalarının klinik semptomları hastalık aktivitesiyle sıklıkla uyumlu olmadığı için, her hasta için doğru teşhis ve farmakolojik tedaviyi belirlemek zordur [129]. Bu nedenle, klinisyenler, tanı koymak, hastalık şiddetini değerlendirmek veya farmakolojik tedaviye yanıtı değerlendirmek için "altın standart" bir test belirlemek için daha fazla araca ihtiyaç duyarlar. Bu amaçla, son on yıllarda EBH biyobelirteçlerinin araştırması yoğun bir şekilde yapılmış ve bunların birkaçı klinik uygulamaya dahil edilmiştir. Bu biyobelirteçler arasında perinükleer anti-nötrofil sitoplazmik antikorlar (pANCA), anti-sakkaromises serevisiae antikorları (ASCA), eksokrin pankreas antikorları (PAB'lar), mi-RNA'lar ve lncRNA'lar gibi dolaşımdaki kodlanmayan RNA'lar, CRP, katelisin ve Trefoil faktör 3 (TFF3) bulunmaktadır [196]. Bununla birlikte, bildirilen çoğu biyobelirtecin kullanımı hala tartışmalıdır ve ne yazık ki, EBH hastalarında klinik hastalık aktivitesini daha iyi teşhis etmelerine veya değerlendirmelerine olanak tanıyan bir biyobelirteç seti eksiktir.

2.3.1. EBH için yeni biyobelirteç keşfinde metabolomik çalışmaların yeri

Genomik, proteomik ve daha yeni olan metabolomik gibi çeşitli ‘omics’ teknolojilerle organizmaların metabolit profilleri belirlenir [197]. Metabolomik analizle, 1000 kDa’dan düşük ağırlıklı, metabolizma sırasında kimyasal olarak dönüştürülen reaksiyon reaktifleri, ara ürün ve son ürünleri gibi binlerce küçük molekül yani metabolom tespit edilebilir. Hücrelerin metabolomikleri, biyoteknoloji [198], hücre fenotip sınıflandırması [199], toksikoloji [200] ve ilaç testi çalışmaları [201], tedavi sonrası hem farmakokinetik hem de farmakodinamik profilleri izleme [202] ve biyobelirteçlerin keşfi [203] gibi birçok alanda kullanılır.

Metabolomik, belirli bir zamanda belirli bir öznede tutulan veya buradan atılan lipid, karbonhidrat, protein ve yağ asidi metabolizma yolları dahil olmak üzere birçok farklı metabolik yolun genel metabolit profilini belirlemeye çalışır. Bu nedenle birçok farklı hastalığı temsil eden biyobelirteçleri aramak için ideal bir araç sağlayabilir. [204]

Metabolomik teknikler, yüzlerce hatta binlerce küçük molekülün yani metabolitin tanımlanmasına ve nicelendirilmesine olanak tanır [18]. Metabolomik analiz ile bulunan metabolitler biyobelirteç olarak tanı amaçlı kullanılabileceği gibi tarama ve tedavi takibi amaçlı da kullanılabilir [202]. Hastalık semptomları ortaya çıkmadan metabolit profilinde değişiklikler olabilir. Bu da metabolomik analizleri iyi bir tarama aracı haline getirebilir. Ayrıca tedaviye yanıtı değerlendirmede de tedaviyle değişen metabolit profili, takip amaçlı kullanılabilir. [205]

Örnek tipi kullanılan analiz tekniğini etkileyebilir. Metabolomik analiz için en popüler platformlar sıvı kromatografisi [LC]-MS, gaz kromatografisi [GC]-MS ve nükleer manyetik rezonans (¹H-NMR) spektroskopisidir.[18] Hücre çalışmaları için de ¹H-NMR spektroskopisi ile bazı stratejiler tanımlanmıştır [206-208]. NMR, farklı tekniklerle (örneğin GCMS veya LCMS gibi) aynı örneğin daha fazla değerlendirilmesine olanak tanıyan yıkıcı olmayan (non-destrüktif-molekülleri parçalamayan) bir analiz yöntemi sağladığı için popüler bir seçimdir [209]. MS, özellikle hedefsiz metabolomik analizde, metabolit analizi platformu olarak daha popüler hale gelmektedir ve çoğu araştırma girişimi, MS’i temel profil oluşturma yöntemi olarak kullanır [210-212]. GC-MS [213] ve LC-MS [214] gibi kütle

spektrometrisi teknikleri, daha son zamanlarda yüksek çözünürlüklü kütle spektrometrisi (HRMS) ile birlikte, sadece minimal örnek miktarları ile kullanılan en yaygın ultra-hassas yöntemler haline gelmektedir. NMR ve MS, birbirini tamamlayan bilgi sağlar ve birlikte kullanımları metabolom kapsamını genişletir [215]. Uygulamalarına ilişkin olarak, GC-MS kısa zincirli yağ asitleri (SCFA'lar) ve diğer uçucu bileşiklerin analizi için sıkça kullanılırken, LC-MS lipitler ve bir dizi polar molekül dahil olmak üzere geniş bir molekül yelpazesini yakalayabilir. [216] MS [özellikle GC-MS], analiz öncesinde geniş çaplı örnek hazırlığı ve ekstraksiyon gerektirir. MS, NMR spektroskopisine göre daha yüksek hassasiyet sunabilir, ancak daha basit örnek hazırlığı, hızlı analiz ve tekrarlanabilirlik nedeniyle yüksek verimlilikli analiz için popüler bir platform olan NMR, yaygın olarak kullanılır.[217]

Metabolomik analizler hedefli ve hedefsiz olarak ikiye ayrılabilir. Hedefsiz analizde belirli bir hedef olmadan tüm metabolitler tanımlanmaya çalışılırken bu analizlerle belirlenen olası biyobelirteçler daha sonra hedefli analiz kullanılarak kesinleştirilir. Hedeflenen analizler, bilinen metabolitlerin bir alt kümesine odaklanırken, hedeflenmeyen metabolomik analizler (metabolik parmak izleme) genel tarama yaklaşımlarıdır. Hedefsiz analizle elde edilen veri kümelerinde, metabolitlerin nispeten küçük bir bölümü tamamen tanımlanırken daha büyük bir sayıda metabolit tanımlanamaz ve genellikle "metabolomik karanlık madde" olarak adlandırılır [218]. Buna karşılık, hedefli analizler önceden seçilmiş bileşiklere odaklanır, analiz aşamasında geçirilen zamanı azaltır ve daha hassas ekipman kullanımı nedeniyle doğruluğu artırır. Ancak, hedefli bir yöntem geliştirmek ve doğrulamak için önemli bir zaman gereklidir ve önceden belirlenmiş bir biyolojik hipotez gerektirir [219].

Metabolomik veri analizinde kullanılan iki temel çok değişkenli analiz yöntemi PCA ve PLS-DA'dır. PCA, çok boyutlu verilerdeki varyansın büyük bir kısmını açıklamak için değişkenlerin birbirleriyle olan ilişkilerini kullanarak veri setini daha düşük boyutlu bir alana projekte etmek için kullanılan bir tekniktir. PCA, veri setindeki karmaşıklığı azaltır ve verilerin gruplandırılması ve farklılaştırılması için kullanılabilir [220, 221]. PCA, bir dizi biyokimyasal bileşiğin konsantrasyonu gibi çok sayıda değişken içeren metabolomik verilerde kullanılabilir. PLS-DA, değişken sayısının yüksek olduğu metabolomik veri setlerinde bileşiklerin farklı gruplara ait olup olmadığını belirlemek için kullanılan bir yöntemdir. PLS-DA, özellikle küçük gruplar arasındaki farklılıkların belirlenmesi için kullanışlıdır. PLS-DA, verilerin

sınıflandırılması veya gruplandırılması için tasarlanmıştır ve PCA'nın aksine, sınıflandırma bilgisini kullanarak değişkenler arasındaki ilişkiyi değerlendirir.

Enflamatuvar barsak hastalığı (EBH), gastrointestinal sistemin tekrarlayan kronik bir bozukluğu olup, epitelyal bariyer fonksiyonunun bozulması ve barsak mikrobiyatasına aşırı immün yanıt ile karakterizedir. Erken tanı sağlayan veya patolojinin durumunu belirleyen biyobelirteçlerin yokluğu hastalığın doğru bir şekilde değerlendirilmesini zorlaştırmaktadır. EBH hastalarında gözlenen farklı metabolomik profiller göz önüne alındığında, metabolomik çalışmalar, altta yatan patolojinin anlaşılmasına ve yeni terapötik hedeflerin belirlenmesine yardımcı olabilecek, önemli biyobelirteç adayları ortaya çıkarabilir.[222]

Son zamanlarda geliştirilen tüm omik teknikleri arasında, metabolomik EBH'de atılım yapan en yeni tekniklerden biridir. Bu, metabolomik'in sadece tanı ve hastalık davranışının izlenmesi için özgül biyobelirteçler tanımlamak için potansiyeli olmasından değil, aynı zamanda bu patolojide yer alan özel moleküler mekanizmaları da aydınlatma potansiyeline sahip olmasından kaynaklanmaktadır. Aslında, bu omik teknik, kanser, diyabet, multipl skleroz, kardiyovasküler iskemi gibi birçok hastalığın araştırmasında kullanılmaktadır. Metabolomik, biyolojik örneklerdeki küçük moleküller, yani metabolitlerin büyük ölçekli çalışmasıdır ve EBH hastalarında biyopsiler, dışkı, plazma ve idrar örnekleri olabilir. Şimdiye kadar yapılan çalışmaların çoğu 1H-NMR kullanmış olsa da, metodolojideki ilerlemeler ve kütle spektroskopisi (MS) de biyolojik örneklerdeki metabolomik profillerin analizinde bu tekniği tanıtmıştır [19]. Barsak iltihabının birçok metabolik yol üzerindeki doğrudan etkisi yaygın olarak varsayılmaktadır. Bu metabolitlerin genellikle iltihabi yanıtla ilgili moleküler yollarla ilişkili olduğu göz önüne alındığında, bu metabolik değişikliğin EBH hastalarında var olan kronik ve sürekli iltihabın bir nedeni mi yoksa sonucu mu olduğu hala net değildir. Artan çalışmalar, bu metabolik bozuklukların iltihabi bir senaryonun bir sonucu olarak ortaya çıkabileceğini öne sürse de, bu hipotezi doğrulamak için daha fazla çalışma gerekmektedir.

2.3.2. Metabolomik analizde hücre kültürü kullanımı

Hücre kültürü, ilgili hedef örneklerden çıkarılan hücrelerin yapay kontrollü ortamlarda in vitro olarak büyütülmesidir. Çeşitli birincil hücre hatları mevcuttur ve

birçok tedarikçiden kolayca temin edilebilirler. Hücre kültürü, örneklem alma ihtiyacı olmadan klinik örneklemelerden daha kolay edinilebilir ve çoğaltılabilir olduğu için metabolomik analizde sık kullanılan biyolojik bir kaynaktır. Ayrıca geliştirilmiş tekrarlanabilirlik ve daha ekonomik olmak dahil olmak üzere hayvan modellerine nazaran bazı avantajları vardır [223]. Ancak, hücre kültürü analizi, klinik bir örneğe yakın bir örnek olmasına rağmen tam bir temsil olmayabilir ve bu nedenle genellikle ilave klinik doğrulamalar gereklidir. Buna rağmen, böyle örneklerin kolayca edinilebilmesi, ilk metabolomik analize büyük fayda sağlar. Metabolomik analiz için hücre çalışması metodolojileri, biyolojik sistemlerdeki hücrelerin gerçek bir temsilini ve tam metabolitlerin verimli bir şekilde çıkarılmasını sağlamak için birçok faktörü dikkate alır. Hücre metabolomiğinin gelişiminde, büyüme ortamı formülasyonlarının ve katkı maddelerinin değişkenliği, hücre hatlarının büyüme koşullarına ve kültürün yaşına (pasaj sayısı) bağlı olarak farklı proliferasyon oranları, hücre kültürünün bir 'queenching' yöntemi yoluyla metabolizmasının inaktivasyonu, hasat, ekstraksiyon prosedürleri ve sağlam analitik yöntemlerin geliştirilmesi gibi çeşitli zorluklar bulunmaktadır [224]. Bireysel hücrelerin metabolik profillerinin sağladığı veriler, tüm sistem sonuçlarına ek bilgi sağlayabilir. Hücre hatları uygulamaları, hayvan modelleri ve insan konularının analizinden daha kolay kontrol edilebilir, daha az maliyetli ve daha kolay yorumlanabilir. Ayrıca, farklı konular ve zaman noktaları arasındaki bireysel farklılıklar, popülasyon kontrolündeki zorluklar ve yaş, cinsiyet, genel sağlık, çevresel maruziyetler ve farklı dokulardan gelen katkılar gibi çeşitli karıştırıcı faktörler gibi bazı son derece zor problemler, hücre kültürü uygulamalarında sorun değildir. Ek olarak, hücre kültürlerinin analizi, hayvan ve insan konularındaki uygulamalar için gereken etik düşünce seviyesini gerektirmez. Belirli bir hücre tipine odaklanmak, değişkenliği azaltabilir ve daha ince metabolik değişikliklerin daha belirgin hale geldiği daha sabit bir arka plan sağlayabilir. Metabolitlerin hücre hattı ölçümleri genomik veya proteomik verileriyle doğrudan ilişkilendirilebilir. Ayrıca, metabolomik veriler, diğer verilerle bağımsız olarak veya bir arada biyolojik yollar ve ağların modellerinin geliştirilmesi için kullanılabilir. Aynı zamanda, metabolomik analiz, çeşitli sonuçların yorumlanmasında diğer hücre kültürü çalışmalarına büyük ölçüde yardımcı olabilir [225]

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Gereç

3.1.1. Cihazlar

Çalışmada kullanılan cihazlar Tablo 3.1. de gösterilmiştir.

Tablo 3.1. Kullanılan cihazlar ve markaları

Otomatik pipetler	CAPP, Almanya; Eppendorf, Almanya.
Distile su cihazı	Millipore Co., ABD
Ultra saf su cihazı	Sartorius Stedim Biotech, Almanya
Hassas terazi	Daihan, Kore
Santrifüj	Hermle, Almanya; Beckman Coulter, ABD
Vorteks	Stuart, İngiltere
Buzdolabı (+4°C)	Beko, Türkiye
Derin dondurucu (-20°C, -80°C)	Uğur, Türkiye; Haier, Çin
pH metre	Milwaukee, Mi 151, Rocky Mount, ABD
Manyetik ısıtıcılı karıştırıcı	Stuart, İngiltere

Otomatize klinik kimya analizörü	Siemens Atellica® CH 930 analyzer, Almanya
UV-vis spektrofotometre	Thermo Scientific, ABD; Biochrom, ABD
Homojenizatör	Retsch, Almanya
500 MHz NMR	Bruker, Almanya
Q Exactive™ Plus Hybrid Quadrupole-Orbitrap™	Thermo Fisher, Almanya
Hücre kültür inkübatörü	Nüve, Türkiye
Biyogüvenlik kabini(Sınıf-2)[HK]	Nüve, Türkiye
Varioskan multiplate reader	Thermo Fisher, Almanya
İnvert Mikroskop [HK]	Optika, XDS-2, İtalya
Su banyosu	Memmert, Almanya
Orbital Karıştırıcı	Biosan, OS-20
Isıtıcı blok	Benchmark, ABD
Trans-blot Turbo System	Biorad
kemilüminometrik ölçüm cihazı- WESTERN	

3.1.2. Kimyasallar

Çalışmada kullanılan kimyasallar Tablo 3.2. de gösterilmiştir.

Tablo 3.3. Kullanılan kimyasallar ve markaları

DMEM besiyeri	Capricorn, Almanya
Fetal Sığır Serum, FBS	Capricorn, Almanya
DMSO	ATCC, İngiltere
Penisilin streptomisin	Capricorn, Almanya
PBS	Capricorn, Almanya
Trypsin-EDTA %25	Capricorn, Almanya
Timokinon	Cayman Chemical Company, Ann Arbor, Michigan, Amerika Birleşik Devletleri
Budesonid 97%,	97%, Thermo Scientific Chemicals, İngiltere
MTT	Thermo Scientific Chemicals, İngiltere
2',7'-Dichlorodihydrofluorescein diacetate (H2DCF-DA) floresan probu	Thermo Scientific Chemicals, İngiltere
Lipopolisakkarit (LPS)	Thermo Scientific Chemicals, İngiltere
Ortho-Phosphoric Acid 85%	Merck, Amerika Birleşik Devletleri
Sülfanilamid	Merck, Amerika Birleşik Devletleri
N-(1-Naphthyl)ethylenediamine dihydrochloride	Sigma-Aldrich, ABD
100 µl RIPA lysis buffer	Thermo Scientific Chemicals, İngiltere
BSA standart	BioRad, Almanya
Commasie blue	BioRad, Almanya

Laemmlie buffer	Sigma-Aldrich, ABD
ECL reaktifi	Thermo Scientific Chemicals, İngiltere
Yağsız süt tozu	Sigma-Aldrich, ABD
Sekonder antikor	Cell signaling, ABD
Primer antikor	Cell signaling, ABD
Metanol	Merck, Amerika Birleşik Devletleri
Döteryum oksit	Sigma-Aldrich, ABD
DSS	Sigma-Aldrich, ABD

3.1.3. Sarf Malzemeler

Çalışmada kullanılan sarf malzemeler Tablo 3 te gösterilmiştir.

Tablo 3.4. Kullanılan sarf malzemeler ve markaları

Ependorf tüp 2 ml	İsolab, Almanya
Falkon tüp 15 ml	İsolab, Almanya
Pipet ucu 1000 µl	İsolab, Almanya
Pipet ucu 200 µl	İsolab, Almanya
Pipet ucu 10 µl	İsolab, Almanya
Pipet ucu 5 ml	İsolab, Almanya
Hücre kültür flaskı 75 cm ²	İsolab, Almanya
Hücre kültür flaskı 25 cm ²	İsolab, Almanya
5 ml serolojik pipet	İsolab, Almanya
10 ml serolojik pipet	İsolab, Almanya
50 ml serolojik pipet	İsolab, Almanya
Steril hücre kazıyıcı	İsolab, Almanya
96 kuyulu şeffaf plate	İsolab, Almanya

6 kuyulu şeffaf plate	İsolab, Almanya
Toma lamı	İsolab, Almanya
96 kuyulu ROS ölçüm plate	Thermo Fisher Scientific, İngiltere
PVDF membran	Sigma-Aldrich, ABD
Biorad mini page gel	BioRad, Almanya

3.2. Yöntem

3.2.1. Hücre Kültürü

3.2.1.1. Hücre hattının açılması

Proje için HT-29 insan kolon adenokarsinom (ATCC) ve Raw 264.7 (ATCC) hücre hatları kullanıldı. Her iki hücre için de DMEM besiyeri (l-glutamin, sodyum pirüvat ve 4,5 g/l glikoz içeren, Capricorn Scientific) kullanıldı.

Azot tankında -180 °C de saklanmış olan hücreler 37°C'lik su banyosunda çözünene kadar bekletildi. Kriyo tüpler içinde eriyen fetal sığır serum (FBS), DMSO (Dimetil Sülfoksit) ve hücre karışımı bulunan sıvı 2 ml'lik ependorf tüpler içerisine aktarıldı ve üzerine 2 ml'ye kadar medium konuldu. Falkon tüpler 800 rpm (dakika devir sayısı) dönüş hızında 10 dakika kadar santrifüj edilerek hücreler ependorfun dibinde pellet oluşturarak çöktürülmesi sağlandı. Bunun ardından toksik etkisi bulunan DMSO süpernatanttan pipetaj ile uzaklaştırıldı. Ardından hücreler DMEM high glukos mediumu ile resüspanse edildi ve flask içerisinde çoğalmaya bırakıldı. Hem Raw 264.7 hem de HT-29 hücre hattı için aynı prosedürler uygulandı.

3.2.1.2. Hücrelerin çoğaltılması

HT-29 ve Raw 264.7 hücreleri içerisinde %10 fetal sığır serumu ve %1 de penisilin/streptomisin içeren DMEM high glukos medium kullanılarak 25 cm²'lik ya da 75 cm²'lik flasklarda ekildi ve %5 CO₂ li ortamda 37°C'de inkübatör içerisinde çoğalmaya bırakıldı. Takip eden her 24-48 saatte bir medyumları değiştirildi. Çoğalan hücreler %80 yoğunluğa ulaştığında pasajlandı. Çalışmalar Laminar Flow Kabin içerisinde yapıldı (Nüve, Türkiye)

3.2.1.3. Hücrelerin Pasajlanması

%80 yoğunluğa ulaşan HT-29 hücrelerin üst fazları uzaklaştırılarak PBS(fosfat tamponlu salinle) ile yıkama yapıldı. Hücre flaskları üzerine flask boyutuna göre (25 cm² için 1 ml, 75 cm² için 2-3 ml olacak şekilde) tripsin eklenerek 2-3 dk inkübatörde bekletildi. Tripsin etkisiyle kalkan hücreler falkonlara toplanıp üzerlerine besiyer ilave edilerek 800 rpm de 10 dk santrifüj edildi. Oluşan pellet üzerindeki tripsin içeren süpernatant uzaklaştırılarak karışım besiyeri ile resüspanse edildi. 3x10⁵ hücre olacak şekilde tekrar flasklara ekilerek üzerlerine uygun miktarda besiyeri eklendi ve inkübatörde tekrar çoğalmaya bırakıldı. Yeterli sayıda hücreye ulaşıldığında deneysel çalışmalara başlandı.

%80 yoğunluğa ulaşan Raw 264.7 hücreleri hücre kazıyıcıyla kazılarak kaldırıldı. Flasktaki hücreler besiyeriyle birlikte toplanarak 15 ml'lik falkona alındı. 800 rpm de 10 dk santrifüj edilip üst faz uzaklaştırıldı. Elde edilen hücre pelletinin üzerine taze besiyeri eklenerek hücreler süspanse edildi ve her flaskta 3x10⁵ hücre olacak şekilde paylaştırıldı. Üzerlerine uygun miktarda besiyeri eklenerek inkübatörde tekrar çoğalmaya bırakıldı. Yeterli sayıda hücreye ulaşıldığında deneysel çalışmalara başlandı.

3.2.2. Sitotoksosite tayini

TQ, budenosidin HT-29 hücreleri üzerine ve LPS'nin Raw264.7 hücreleri üzerine sitotoksik etkisi MTT tayini ile yapıldı. Farklı dozlarda TQ, DMSO içerisinde çözülerek analize hazırlandı. Çalışmada kullanılacak tüm hücreler 96 kuyucuklu şeffaf

plakalara her bir kuyuda 7×10^4 hücre olacak şekilde ekildi. Farklı dozlarda TQ kuyulara verilerek 24 saat 37°C 'de %5 CO_2 içeren ortamda inkübasyona bırakıldı. MTT tozu, pH:7.4 PBS'te 5 mg/ml olacak şekilde çözüldü. İnkübasyon sonrası her kuyuya 5 ul hazırlanan MTT solüsyonundan eklenerek 4 saat daha 37°C 'de %5 CO_2 içeren ortamda inkübe edildi. Sonrasında plakadaki tüm besiyeri uzaklaştırılarak ve her kuyuya 100 ul DMSO eklenerek 570 nm de (Thermo, Varioskan, USA) ölçüm yapıldı. Kontrol hücresi olarak hiçbir muamele görmeyen hücreler kullanıldı ve bu hücrelerin canlılık yüzde değerleri 100 olarak hesaplanırken diğer grupların değerleri kontrole göre oranlanarak ve gruplar arası canlılık yüzdeleri karşılaştırıldı. Deneyler üçlü tekrar olacak şekilde gerçekleştirildi.

3.2.3. Hücre içi ROT üretimi ölçümü

TQ'nun hücre içi ROT üretimine olan etkileri 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein diacetate (H2DCF-DA) floresan probu kullanılarak analiz edildi. Bunun için 96'lık plakalara kuyu başına 5×10^3 hücre olacak şekilde HT-29 hücreleri uygun besiyeri ile ekilip 24 saatlik inkübasyonun ardından farklı konsantrasyonlarda TQ ile muamele edildi. Hücreler 24 saat daha inkübe edildikten sonra plakadaki besiyeri tamamen uzaklaştırıldı. Her kuyuya 100 ul PBS eklendi ve 5 dk boyunca çalkalayıcıda bekletildi. Yıkama sonrası PBS uzaklaştırıldı ve her kuyuya 100 μl 20,5 μM H2DCF-DA eklendi. 30 dk çalkalayıcıda bekletildi ve 485-528 nm de florometrik ölçüm alındı. (Thermo, Varioskan, USA) Eş zamanlı yapılan MTT analiziyle canlılık başına ROT üretimi hesaplandı ve istatistiksel analiz yapıldı.

3.2.4. Barsak enflamasyon modeli oluşturma

75 cm^2 flasklara ekilen HT-29 hücreleri tam konfluens sağlanana kadar 2-3 gün arayla besiyeri değiştirilerek inkübe edildi. Eş zamanlı olarak 75 cm^2 flasklarda çoğaltılan Raw 264.7 hücreleri de %80 hücre yoğunluğuna ulaşana kadar inkübe edildi. Enflamasyon oluşumunun sağlanması için Raw 264.7 hücreleri üzerine son LPS konsantrasyonu 1 $\mu\text{g/ml}$ olacak şekilde daha önceden hazırlanmış LPS çözeltisi eklendi. 24 saat inkübasyona bırakıldı. Enflamasyonsuz gruplar için aynı işlemler LPS

eklenmeden uygulandı. İnkübasyon sonrası Raw 264.7 üzerindeki besiyeri her iki flasktan da toplanarak ayrı ayrı santrifüj edildi. Enflamasyon oluşumunu gözlemlemek için Griess reaktifiyle nitrit ölçümü yapıldı. Tam konfluens sağlanmış HT-29 hücreleri üzerindeki besiyeri uzaklaştırılarak santrifüjlenmiş olan LPS'li ve LPS'siz Raw 264.7 hücrelerinden alınan besiyeri eklendi.

3.2.5. TQ ve Budesonid uygulanması

ROT sonuçlarına göre uygun dozlarda TQ ve budesonid hazırlanarak HT-29, enflamasyonlu ve enflamasyonsuz HT-29 hücrelerinin besiyeri eklendi. %10 DMSO ve besiyerinde çözülen TQ 20x olarak hazırlandı. Son konsantasyon 1x olacak şekilde, besiyeri eklenmesinden 4 sa sonra hücrelere uygulandı. Kontrol için LPS'li ve LPS'siz birer hücre flaskı ayrıldı. 24 saat inkübatörde bekletildi. Tüm gruplar 4 tekrar çalışıldı. Metabolomik analiz için 3 tekrar kullanılırken, son tekrar hücre sayımı ve western blot analizi için kullanıldı.

3.2.6. Deney gruplarının belirlenmesi

ROT analizine göre en fazla ROT seviyesini düşüren dozlar olan 2 μ M ve 3 μ M TQ dozları deney için kullanıldı. Ayrıca budesonid için de MTT analizine göre sitotoksik olmayan 5 μ M dozu seçildi. Deney grupları tabloda gösterildiği gibidir.

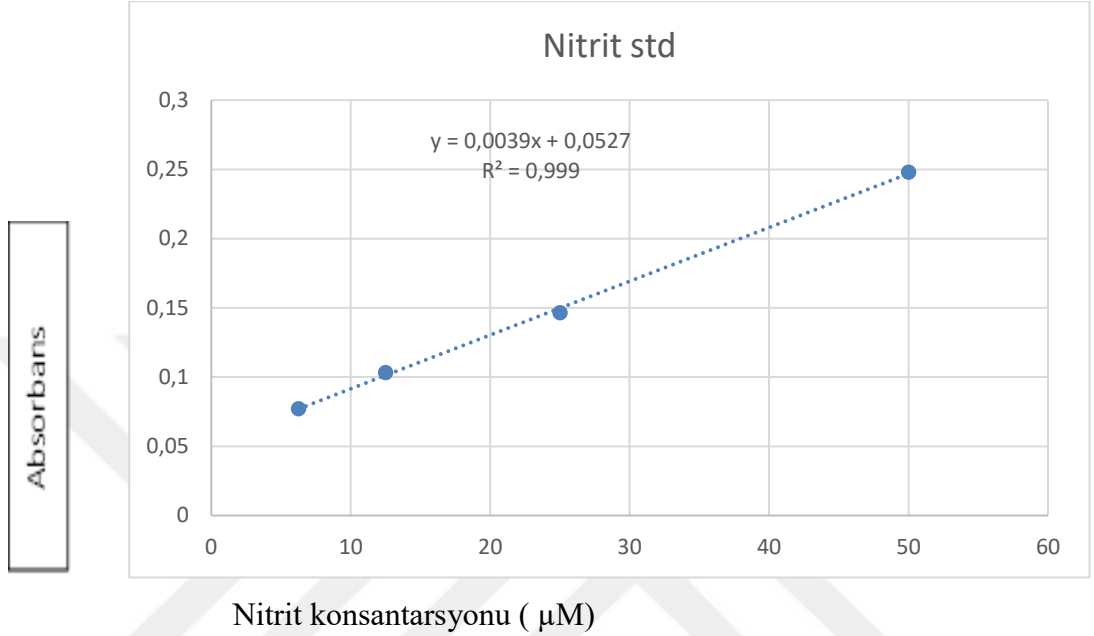
Tablo 3.5. Deney grupları

Kontrol	Herhangi bir madde uygulanmamış grup
TQ2	2µM TQ uygulanmış grup
TQ3	3µM TQ uygulanmış grup
B5	5µM Budesonid uygulanmış grup
LPS	1 µg/ml LPS uygulanan Raw makrofaj besiyeri verilmiş grup
L+TQ2	1 µg/ml LPS uygulanan Raw makrofaj besiyeri verildikten 4 sa sonra 2µM TQ uygulanmış grup
L+TQ3	1 µg/ml LPS uygulanan Raw makrofaj besiyeri verildikten 4 sa sonra 3µM TQ uygulanmış grup
L-B5	1 µg/ml LPS uygulanan Raw makrofaj besiyeri verildikten 4 sa sonra 5µM Budesonid uygulanmış grup

3.2.7. Nitrit Ölçümü

Tüm deney gruplarındaki besiyeri nitrit düzeyleri Griess metoduna göre belirlendi. Griess reaktifi, %5 fosforik asit içinde hazırlanmış %1 sülfanilamid ve 0.1 % naftiletilendiamin karıştırılarak hazırlandı. Besiyerlerinden alınan 50 µl örnek yine

50 µl Griess reaktifiyle karıştırıldı ve 10 dakika oda sıcaklığında inkübasyonun ardından oluşan rengin 550 nm’de verdiği absorbans mikropilaka okuyucuda (Thermo, Varioskan, USA) ölçüldü [226]. Besiyeri nitrit konsantrasyonları şekilde verilen standart grafiğine göre belirlendi.



Şekil 3.1. Nitrit ölçüm standart grafiği

3.2.8. Hücre Sayımı

Dördüncü tekrar grubundaki hücrelerin besiyeri uzaklaştırılarak PBS ile bir kez yıkandı. Ardından her flaska 2’şer ml tripsin eklenerek inkübatörde 2-3 dk bekletildi. Tamamen kalkan hücrelerin üzerine tripsin inaktivasyonu için 4 ml besiyeri eklendi. Hücrelerin tamamı 15 ml’lik falkonlara alınarak 800 rpm de 10 dk santrifüj edildi. Üstündeki tripsinli besiyeri uzaklaştırılarak 6 ml taze besiyeri eklendi. Hücreler pipetaj yapılarak duvarlarına zarar vermeden süspanse edildi. Süspanse edilen hücrelerden 10 µl toma lamına alınarak sayım yapıldı. Her deney grubu için hücre sayıları hesaplanarak not edildi.

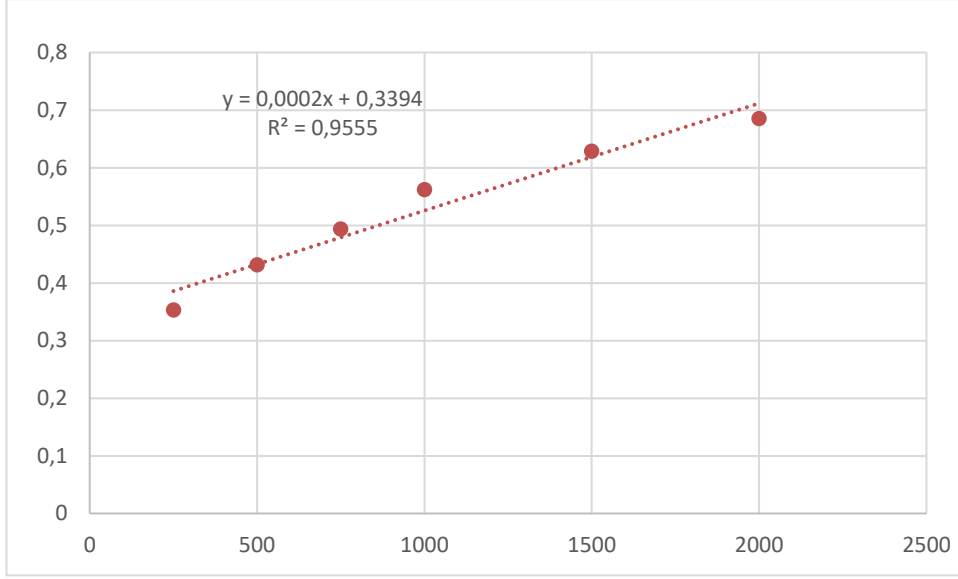
3.2.9. Western Blott Analizi

3.2.9.1. Protein izolasyonu

Sayım sonrası hücreler tekrar santrifüj edilerek supernatan uzaklaştırıldı ve PBS ile iki kez 800 rpm de 10 dk santrifüj edilerek yıkandı. Hücre sayısına göre her gruptan 2×10^6 hücre olacak şekilde ependorflara alındı. Üstteki pbs tamamen uzaklaştırıldıktan sonra 100 µl RIPA lysis buffer eklenerek 15 dk buzda inkübasyon 15 sn vorteks olacak şekilde 4 kez tekrar edildi. Son vorteks sonrası 10000 g de 30 dk santrifüj yapıldı. Üst faz toplanarak protein ölçümü için ayrıldı.

3.2.9.2. Protein miktar analizi

İzole edilen proteinlerden 5µl alınarak 96 kuyulu plakalara üç tekrarlı olacak şekilde eklendi. Yine protein standardı olarak kullanılan sığır serum albumini (0.125–2.0 mg/ml aralığında iki kat artan konsantrasyonlar şeklinde) üç tekrar olarak 5µl alınıp kuyulara koyuldu. Her kuyuya 250µl commasie mavisini eklendi. 96'lık plaka ışıktan korunarak 10 dk boyunca çalkalayıcıda oda ısısında inkübe edildi. İnkübasyon sonrası 595 nm de çoklu plaka okuyucuda (Varioskan multiplate reader, Thermo Scientific, USA) fotometrik ölçüm yapıldı. Standart ölçümleri kullanılarak oluşturulan grafiğe göre numunelerdeki protein konsantrasyonu hesaplandı.



Şekil 3.2. Protein standart grafiği. x eksenini µg/ml cinsinden protein konsantrasyonunu gösterirken y eksenini absorbans değerlerini göstermektedir.

3.2.9.3. Western blot protokolü

Miktar analizi yapılan proteinlerden her kuyu için 40 µg protein olacak şekilde kaç µl alınacağı hesaplandı. Hesaplanan miktara 30 µl'ye tamamlamak için distile su eklendi. Toplam 30 µl olan örneklerin üzerine 10 µl 4x laemmliie buffer eklendi. Hazırlanan örnekler 100°C ısıtıcı blokta 10 dk ısıtılarak +4°C'de 1-2 dk bekletildi. Örnekler inkübe edilirken yürütme tamponu hazırlanarak tanka konuldu. Ticari olarak alınmış (Biorad mini page gel) jeller tanka konularak tarakları yavaşça çıkarıldı. İlk kuyuya 4µl protein marker, diğer kuyulara ise her örnekten 26µl eklendi. Yürütme tankından 120 volt verilerek 75 dk yürütüldü. İşlem sonrası jeller tanktan çıkarılarak transfer tamponuna alındı. Blotlama işlemi için alttan üste transfer kartonu, PVDF membran, jel, transfer kartonu olacak şekilde transfer plakasına yerleştirildi (PVDF membran yerleştirilmeden önce metanol-su-transfer tamponda sırasıyla 30sn-2dk-5dk olacak şekilde bekletilerek aktive edildi.). Transfer cihazında 25 volt ile 30 dk aktarım yapıldı.

Aktarım sonrası proteinler PVDF membrana geçmiş oldu. PVDF membran 3 kez 10'ar dk TBST ile yıkandı. Yıkama sonrası %5 yağsız süt tozu ile hazırlanan TBST de oda ısısında 1 saat bekletilerek bloklama işlemi yapıldı. Bloklama sonrası PVDF membranlar yine 3 kez 10'ar dk TBST ile yıkandı. Yüzde 2,5 luk yağsız süt tozu ile

hazırlanan TBST içine 1000:1 oranında primer antikor eklendi ve PVDF membran bu karışımda 16-18 saat +4°C de inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası PVDF membranlar yine 3 kez 10'ar dk TBST ile yıkandı. Yüzde 2,5 luk yağsız süt tozu ile hazırlanan TBST içine 1000:1 oranında sekonder antikor eklendi ve PVDF membran bu karışımda 1 saat oda ısısında inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası PVDF membranlar 3 kez 10'ar dk TBST ile yıkandı. Yıkama sonrası ECL reaktifi ile kemilüminometrik ölçüm alındı (Vilber Lourmat Ste, Collegien, France). Görüntüler imagej programı ile analiz edildi .

3.2.10. Metabolomik analiz

3.2.10.1. Numunelerin hazırlanması

Hücre kültüründe üç tekrarlı şekilde 75cm² plakalarda çalışılan her bir örnek grubunun besiyeri uzaklaştırıldı ve PBS ile iki kez yıkama yapıldı. Plakaların içine 2 ml soğuk metanol eklenerek steril hücre kazıyıcıyla hücreler kaldırıldı ve 2 ml ependorflara konuldu. Ardından aynı işlem tekrar edildi ve plakada hücre metaboliti kalmaması sağlandı.

Ependorflara alınan metanollü hücreler 5 dk vortekslendi ve sonrasonda ultrasonik homojenizatörde 10 dk boyunca +4 derecede bekletildi. Tüm hücreler parçalandıktan sonra 10.000*g de 15 dk santifüj edilerek hücre kalıntıları uzaklaştırıldı ve üst faz toplanarak ayrı ependorfa alındı. Metabolit eldesi için vakum konsantratör santrifüjde 2 saat metanol uçuruldu.

Metanolü uçurulan örnekler üzerine 900 µl 20 mM pH 7.4 fosfat tamponu eklendi. Elde edilen numuneden 600µl alınarak üzerine 100µl döteryum oksit (D₂O) içerisinde hazırlanmış 1.75 mM sodium trimethylsilyl propanesulfonate (DSS) eklenerek 30 saniye vortekslendi ve 5 mm NMR tüpüne alındı. Numunedeki son konsantrasyonu 250 uM olacak şekilde eklenen DSS, numune içerisindeki metabolitlerin miktar tayininin yapılabilmesi için referans standart olarak (kalibratör) olarak kullanıldı. Yine aynı örnekler NMR sonrası LC-MS/MS analizine verildi.

3.2.10.2. NMR analizi

Ön hazırlığı yapılan hücre lizatlarının metabolomik profillemeye analizi yüksek rezolüsyonlu 500 MHz NMR cihazı (Bruker Avance, Germany) ile gerçekleştirildi. NMR’da elde edilen ham veriler Bruker’in TopSpin (Version 4.1.3, Almanya) yazılımı ile pre-processing işleminden geçirilerek piklerin ayrımı, gürültülerin ayıklanması ve spektrum hizalaması işlemleri gerçekleştirildi. NMR spektrumlarının eldesi için ilgili parametreler; acquisition time: 4 sn, spectral width: 12 ppm, time-domain: 2 sn., delay time: 5 sn., mixing time: 0.2 sn., dummy scan: 8, scan number: 128, center of the spectrum: 4.7 ppm, receiver gain: 101 olarak belirlendi. Fourier transformasyonu, su piki baskılaması, otofazlama, baseline düzeltme uygulamaları, piklerin ayrımı, gürültülerin ayıklanması ve spektrum hizalaması işlemleri yine TopSpin programında gerçekleştirildi. Her bir numune için 1D- Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy (NOESY) metodu ile bir standart spektrum ve bir Carr–Purcell–Meiboom–Gill (CPMG) spektrumu edinildi. Pre-processing işlemlerinden sonra metabolitlerin hem kantitatif tayini hem de kimliklerini tespit etmek amacıyla Chenomx NMR Suite (v.9.02, Almanya) programı kullanıldı. NOESY sekansları ile elde edilen standart spektrumların kullanıldığı bu uygulamada kütüphanelerinde (<https://www.chenomx.com/libraries/>) belirtilen metabolitlerin analizi yapıldı.

3.2.10.3. LC-HRMS analizi

NMR cihazında analiz edilen aynı numuneler LC-HRMS Q Exactive Plus Hybrid Quadrupole-Orbitrap MS (Thermo Fisher, ABD) cihazı kullanılarak analiz edildi. LC-HRMS 200 µL örnek viallere aktararak elektrospray iyonizasyon metodu ile enjekte edildi. Numuneler hem ESI (+) / (-) hem de tam tarama modunda izokratik akışla (Fortis C18 kolonu, 3 µm partikül büyüklüğü, 150 mm) analiz edildi.

3.2.10.4. Metabolomik Profillemeye

Gerçek kimlik karakterizasyonu yapılan moleküller MetaboAnalyst 5.0 (<https://www.metaboanalyst.ca/>) Programı ve GNPS gibi programlar ve SPSS (Version 27.0. Armonk, NY: IBM Corp.) paket programları kullanılarak metabolitlerin metabolik yolak analizleri, network analizleri, temel bileşenler analizi gibi analizleri gerçekleştirildi. Böylece hangi TQ’nun hücrede hangi metabolik yollar üzerinde etkisi

olduğu ortaya konuldu. Bununla birlikte mediatör ve moderatör molekül tespiti için ise SmartPLS 3 ve yine SPSS paket programlarından faydalanıldı. Kimlik karakterizasyonu yapılamayan moleküller m/z oranına göre rapor edildi.

Moleküler network analizi Feature-Based Molecular Networking (FBMN) (Nothias L F. vd., 2020) metodu ile ham, işlenmiş veya gruplandırılmış MS datalarına açık erişimi sağlayan bir kütüphane sistemi olan GNPS (<https://gnps.ucsd.edu>) (Wang M. vd., 2016) için uygun forma getirilen veriler ile yapıldı. Bu sebeple MS verileri ilk olarak MZmine2 (Pluskal T. vd., 2010) ile işlenerek GNPS uygulamasına aktarıma uygun hale getirildi. Datalar prekürsör m/z oranının +/- 17 Da aralığında olan tüm fragmanların çıkarılmasıyla elendi. MS/MS spektrumları, spektrum boyunca +/- 50 Da aralığında sadece ilk 6 fragman iyon seçilerek filtrelendi. Öncül iyon kütle toleransı ve MS/MS fragman iyon toleransı 0.05 Da değerine sabitlendi. Daha sonra, kenarların 0.70'in üzerinde bir kosinüs puanına ve 6'dan fazla eşleşen tepe noktasına sahip olacak şekilde filtrelendiği bir moleküler network planı oluşturuldu. Ayrıca, her biri bir metaboliti ifade eden 'node'lar arasındaki kenarlar, bu nodeların her biri diğerinde en benzer ilk 10 nodeları arasında olduğu takdirde network analizine dahil edildi. Son olarak bir moleküler ailenin maksimum boyutu 100'e ayarlanarak moleküler aile boyutu bu eşiğin altına düşene kadar moleküler ailelerden en düşük puanlama kenarları çıkarıldı. Ağdaki spektrumlar daha sonra GNPS spektral kütüphanelerinde arandı. Ağ spektrumları ve kütüphane spektrumları arasında tutulan tüm eşleşmelerin 0,7'nin üzerinde bir puana ve en az 6 eşleşme gösteren pik olacak şekilde veriler elendi. MS/MS spektrum datalarına bir GNPS dökümantasyon aracı olan DEREPLICATOR+ (Mohimani H. vd., 2018) programı ile dereplikasyon işlemi (Bir kimyasal karışımdan bilinen bileşenleri ortadan kaldırmak ve yenilerini bırakmak için ayırma ve saflaştırma) yapıldı.

DEREPLICATOR+ (<http://gnps.ucsd.edu/ProteoSAFe/static/gnps-theoretical.jsp>) peptidik doğal ürünleri (PNP) yanında poliketidler, terpenler, benzenoidler, alkaloidler, flavonoidler ve diğer doğal ürün sınıflarının tanımlanması için genişleten bir algoritma olarak geliştirilmiştir. Moleküler network analizleri Cytoscape yazılımı kullanılarak görselleştirildi.

4. İSTATİSTİK ANALİZ

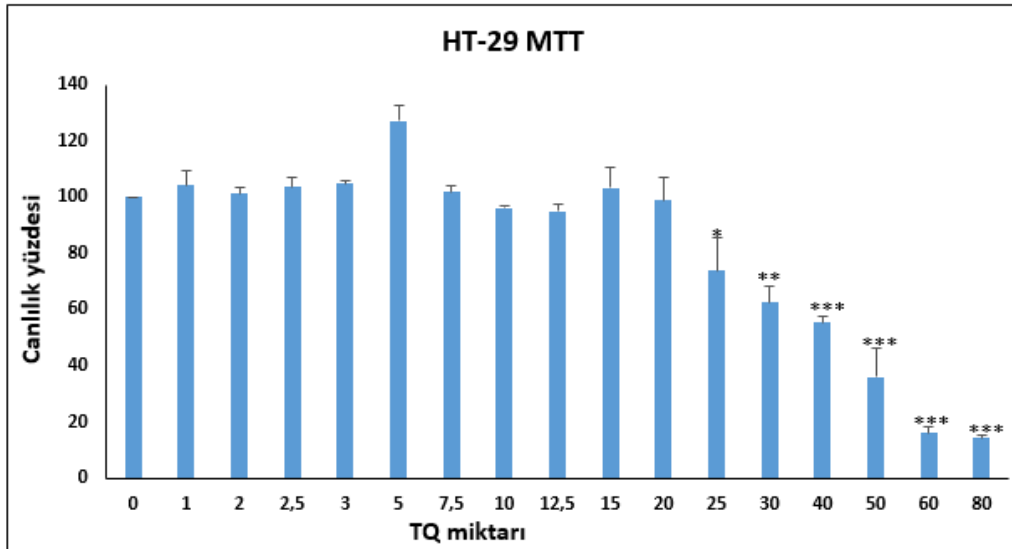
Çalışmadaki değişkenlere ait tanımlayıcı istatistikler ortalama, medyan, standart sapma, minimum ve maksimum olarak verildi. Verilerin normal dağılıma uygunlukları Shapiro Wilk testi ile incelendi. Normal dağılım gösteren grupların ortalama karşılaştırmalarında tek yönlü varyans analizi (ANOVA) kullanıldı. Farklılık çıkan grupların çoklu karşılaştırmalarında Tukey testi kullanıldı. Normal dağılım göstermeyen değişkenlerin gruplar arası ortalama karşılaştırması ise Kruskal Wallis testi ile incelendi. Farklılık çıkan grupların çoklu karşılaştırmalarında ise Dunn's testi kullanıldı. Hesaplamalarda SPSS 28 (Statistical Package for the Social Science) paket programı kullanıldı. Anlamlı farklılıklar tüm grupların kendi aralarında kıyaslanması ile belirlendi. İstatistiksel olarak anlamlı farklılıkların olduğu gruplar için grafik üzerinde anlamlılık derecelerine göre ($p<0,05$, $p<0,01$, $p<0,001$) farklı semboller (*, #, δ vb.) kullanıldı.

5. BULGULAR

5.1. Canlılık Analizi

5.1.1. TQ'nun HT-29 hücre canlılığı üzerine etkisi

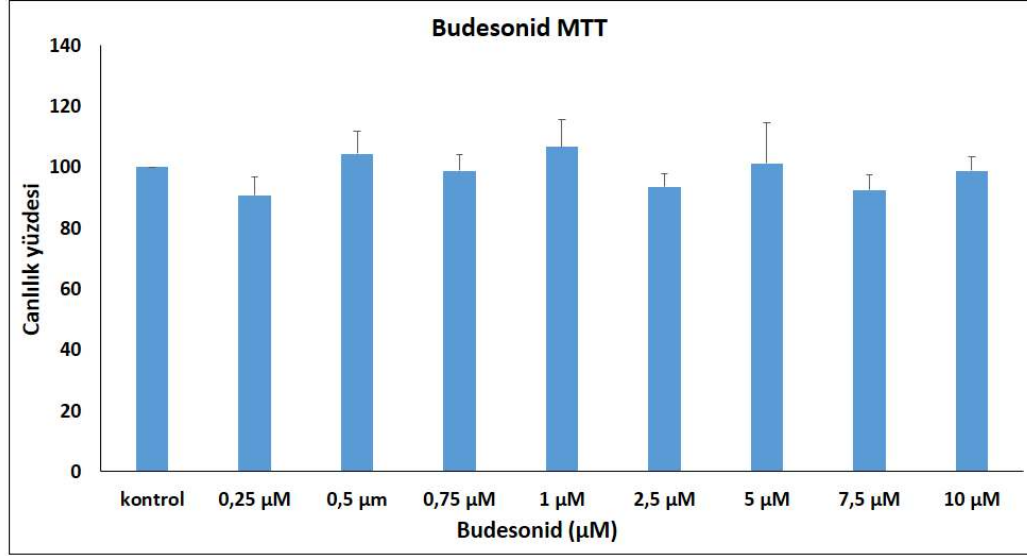
TQ'nun HT-29 hücre canlılığı üzerine etkisini bulabilmek için 0, 1, 2, 2,5, 3, 5, 7,5, 10, 12,5, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 80 μ M dozlarında TQ, 96 kuyulu hücre kültürü plakalarına ekilen HT-29 hücreleri üzerine uygulandı. 24 saat inkübasyon sonrası canlılık üzerine etki MTT ile analiz edildi. Şekil 5.1. de gösterildiği gibi 25 μ M TQ' dan itibaren doz arttıkça hücre canlılığına etkisi anlamlı olarak arttığı, artan TQ dozlarının sitotoksik etki gösterdiği saptandı. Düşük doz TQ uygulanmasında ise canlılık üzerine ya etki etmediği ya da proliferasyonu artırarak canlılığı arttırdığı görüldü.



Şekil 5.1. μ M cinsinden TQ'nun HT-29 hücreleri canlılığı üzerine etkisinin MTT testi ile analizi. x eksen: μ M cinsinden TQ miktarını, y eksen: % cinsinden canlılığı göstermektedir. * One Way ANOVA testiyle kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı; $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$ Post hoc testi: Tukey Testi.

5.1.2. Budesonidin HT-29 hücre canlılığı üzerine etkisi

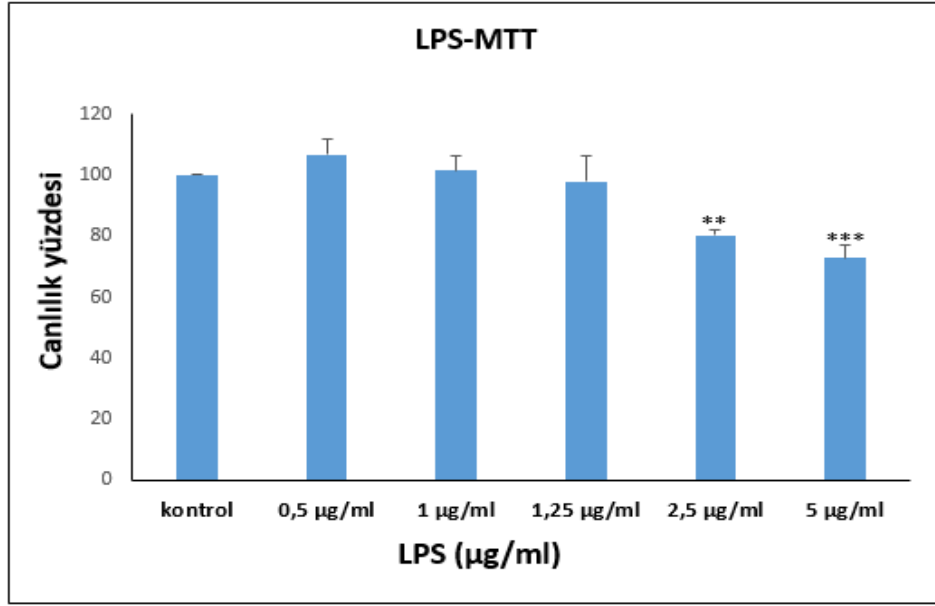
Anti-enflamatuvar etkisi bilinen budesonid, TQ ile kıyaslamak amacıyla kullanıldı. Belirtilen dozlarla yapılan MTT analizinde, şekil 5.2. de gösterildiği gibi HT-29 hücre canlılığı üzerine anlamlı bir sitotoksik etki saptanmadı.



Şekil 5.2. HT-29 hücre canlılığı üzerine µM cinsinden budesonidin etkisi. x eksenini uygulanan budesonid dozlarını gösterirken y eksenini % cinsinden canlılığı ifade etmektedir.

5.1.3. LPS'nin HT-29 hücre canlılığı üzerine etkisi

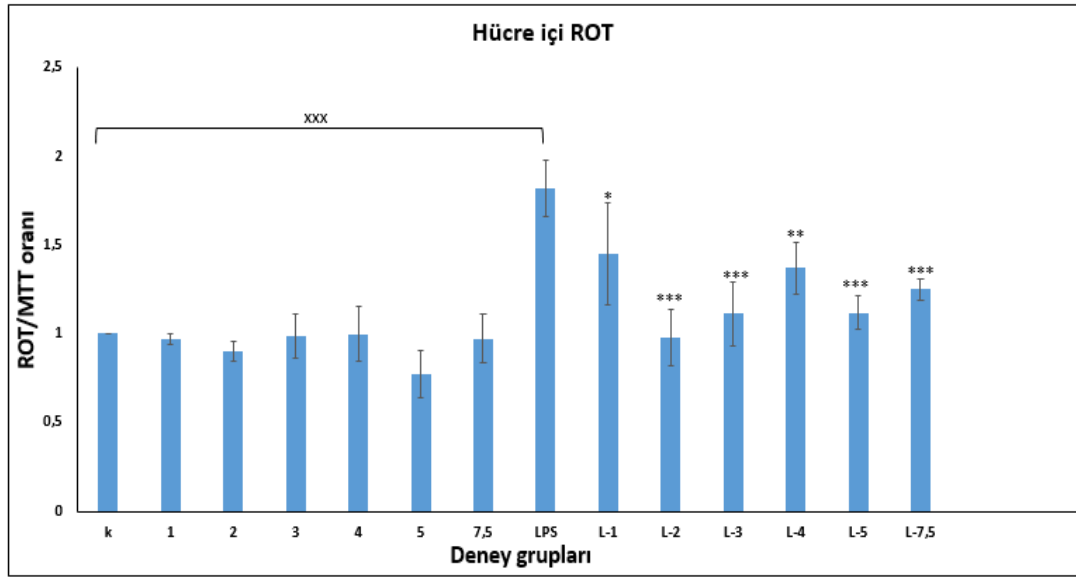
HT-29 hücreleri üzerine LPS'nin sitotoksik etkisini belirlemek için belirtilen dozlarda LPS, 96 kuyulu plakalara ekilen HT-29 hücreleri üzerine verildi. MTT ile canlılık analizi yapıldı. Şekil 5.3. te gösterildiği gibi 2,5 ve 5 µg/ml dozları anlamlı olarak sitotoksik saptanırken deneylerde kullanılan 1 µg/ml dozunda sitotoksik etki saptanmadı.



Şekil 5.3. HT-29 hücre canlılığı üzerine µg/ml cinsinden LPS'nin etkisi. x eksenini uygulanan LPS dozlarını gösterirken y eksenini % cinsinden canlılığı ifade etmektedir. ** p < 0,01 *** p < 0,001 One Way ANOVA testiyle kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı.

5.2. ROT analizi

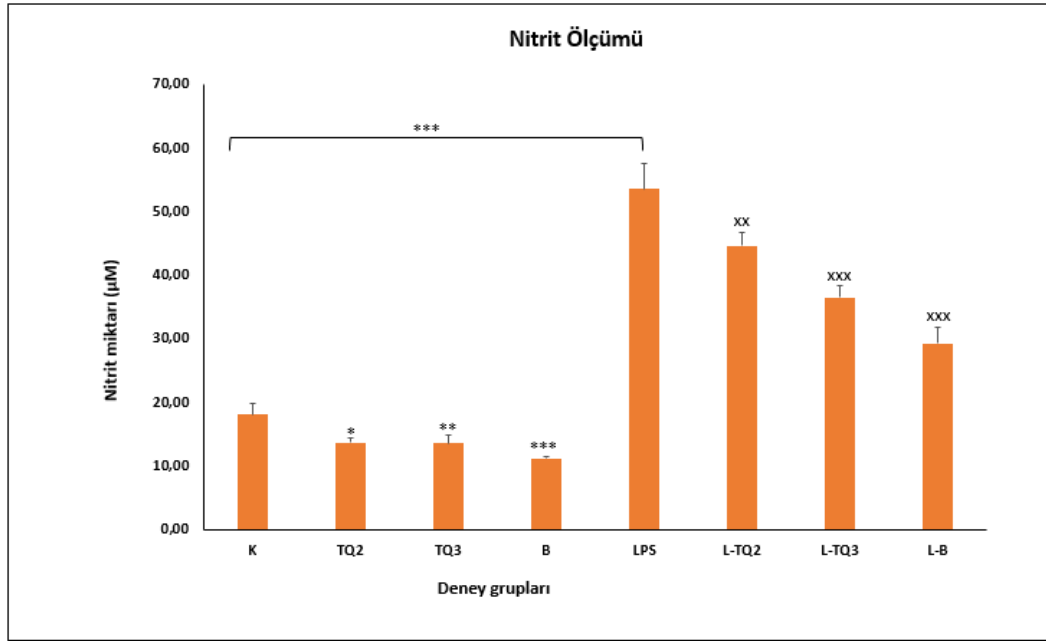
Hücre içi ROT analizi H2DCF-DA floresan probu kullanılarak yapıldı. MTT sonuçlarına göre sitotoksik olmayan düşük dozlarda TQ (1, 2, 3, 4, 5, 6 ve 7,5µM) hem inflamasyon oluşturulmamış hem de LPS ile inflamasyon oluşturulmuş gruplara uygulandı. Aynı gruplarla MTT analizi de yapılarak ROT sonuçları MTT'ye oranlandı ve canlılık başına hücre içi ROT hesaplandı. Şekil 5.4. te gösterildiği gibi inflamasyon oluşturulan LPS grubunda, kontrole göre ROT miktarı anlamlı derecede yüksek saptandı. Yine inflamasyonsuz gruplarda kontrol grubuna göre anlamlı fark görülmezken inflamasyonlu gruplarda özellikle 2 ve 3µM TQ uygulanan gruplarda ROT seviyelerinde anlamlı düşüklük saptandı.



Şekil 5.4. Hücre içi ROT ölçümüne TQ etkisi: Sonuçlar MTT sonuçlarına oranlanarak canlılık başına düşen ROT miktarı şeklinde verilmiştir. x ekseninde rakamlar μ M cinsinden TQ dozlarını L: LPS'yi ifade ederken, y eksenini ROT/MTT oranını göstermektedir. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$ One Way ANOVA testiyle LPS grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı. xxx $p < 0.001$ kontrol grubuna göre anlamlı

5.3. Nitrit ölçümü

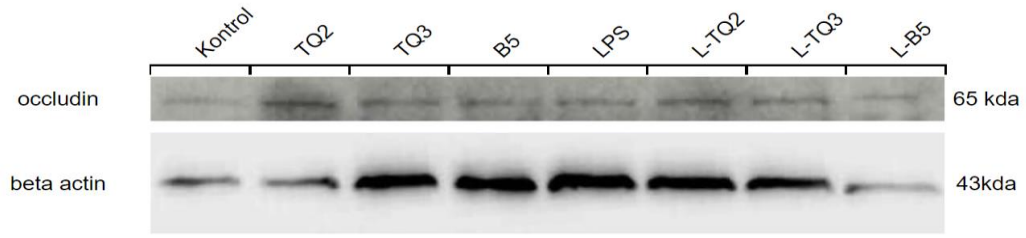
Nitrit ölçümü Griess reaktifi kullanılarak yapıldı. Şekil 5.5.' de gösterildiği gibi kontrol grubuna göre TQ2, TQ3 ve B (budesonid) gruplarında nitrit seviyeleri anlamlı olarak düşük bulundu. LPS grubunda nitrit seviyeleri kontrole göre artmışken, LPS+TQ gruplarında bu seviyenin düştüğü, en anlamlı düşüşün ise budesonid uygulanan inflamasyonlu ve inflamasyonsuz gruplarda olduğu görüldü.



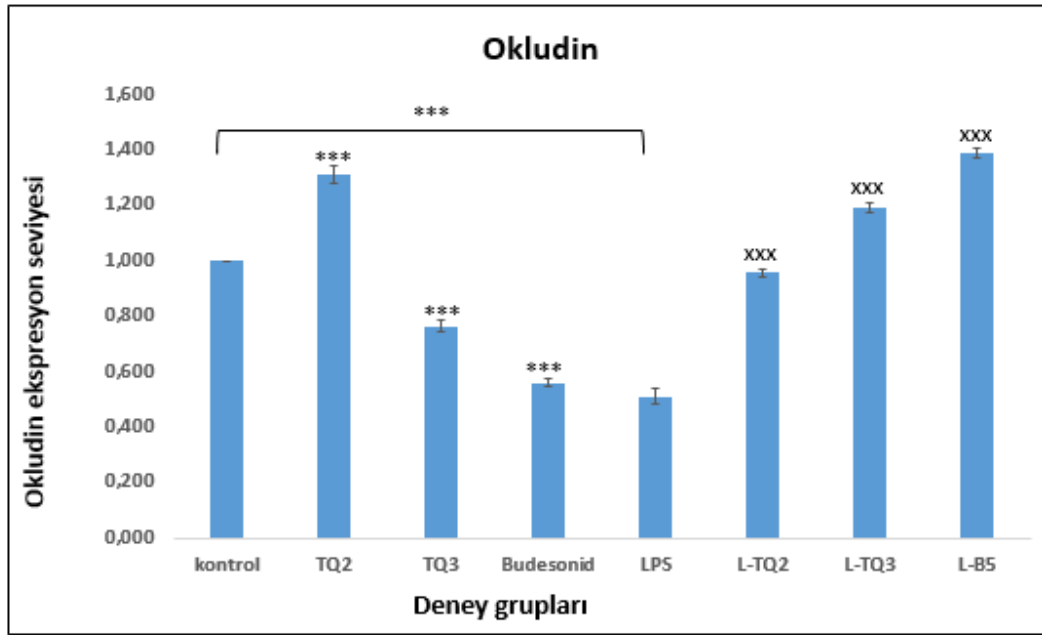
Şekil 5.5. Nitrit düzeyi ölçümü. x eksenini deney gruplarını ya da eksenini μM cinsinden nitrit miktarını ifade etmektedir. * $p<0.05$, ** $p<0.01$ *** $p<0.001$ One Way ANOVA testiyle kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı. x $p<0.05$, xx $p<0.01$, xxx $p<0.001$

5.4. Western Blot analizi

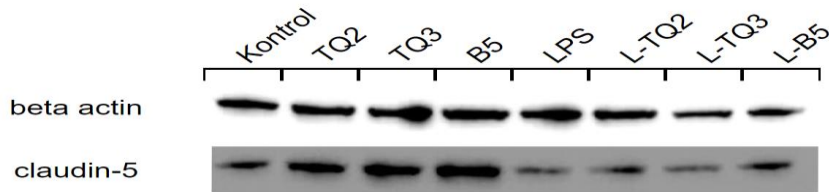
Okludin ve Claudin-5 sıkı bağlantı proteinlerinin ifade seviyeleri western blot yöntemiyle analiz edildi ve çıkan sonuçlar beta- aktin proteinlerine oranlanarak hesaplandı. Şekil 5.7 de görüldüğü gibi TQ2 grubunda kontrole göre okludin ekspresyonları artarken TQ3 ve B5 gruplarında, ekspresyon seviyeleri azalmış bulundu. Yine LPS grubunda kontrole göre okludin ekspresyonu anlamlı seviyede düşük bulunurken, L-TQ2, L-TQ3, L-B5 gruplarında sırasıyla ekspresyon seviyeleri LPS grubuna anlamlı derecede yüksek bulundu. Claudin-5 proteini için inflamasyonlu gruplarda okludine benzer sonuçlar bulundu. İnflamasyonsuz gruplarda ise TQ2, TQ3, ve B5 (budesonid) gruplarında kontrole göre claudin-5 ifadesinin arttığı görüldü.



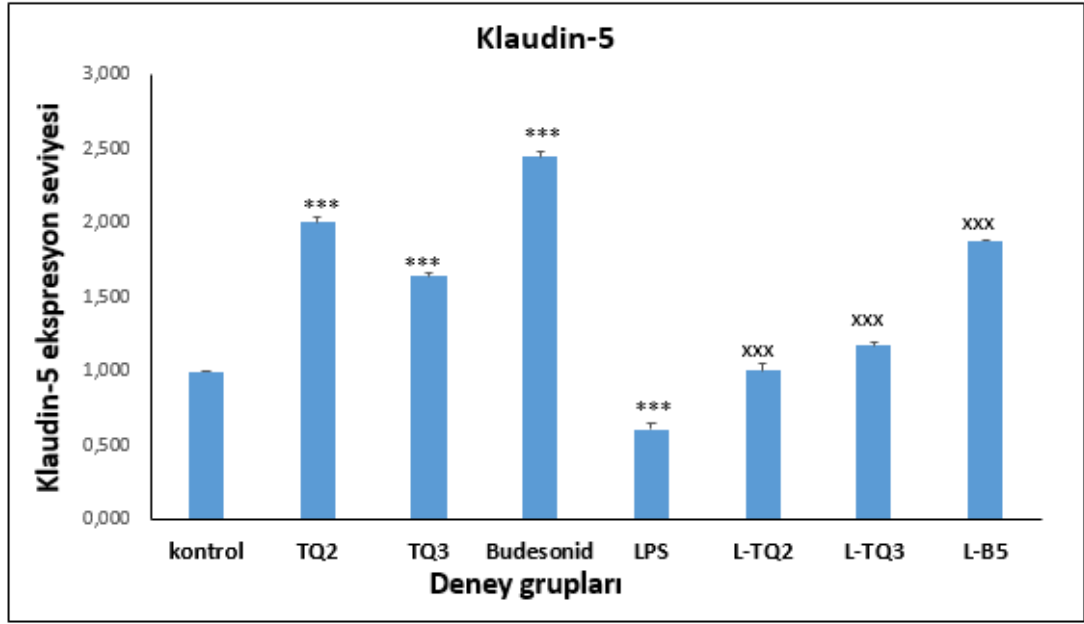
Şekil 5.6. Okludin ve beta aktin proteinlerinin bant görüntüsü



Şekil 5.7. Okludin protein ekspresyon seviyelerini gösteren bar grafiği. x eksenini deney gruplarını gösterirken y eksenini protein ekspresyon seviyesini göstermektedir. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$ One Way ANOVA testiyle kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı. x $p < 0.05$, xx $p < 0.01$, xxx $p < 0.001$ LPS grubuna göre anlamlı



Şekil 5.8. Klaudin-5 ve beta aktin proteinlerinin bant görüntüsü



Şekil 5.9. Klaudin-5 protein ekspresyon seviyelerini gösteren bar grafiği. x eksenini deney gruplarını gösterirken y eksenini protein ekspresyon seviyesini göstermektedir. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$ One Way ANOVA testiyle kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı. x $p < 0.05$, xx $p < 0.01$, xxx $p < 0.001$ LPS grubuna göre anlamlı

5.5. NMR analizi

NMR analizi ile kantitasyonu yapılan metabolitler:

2-Hidroksiizobütrat, Siringat, Dimetil sülfon, Asetoasetat, Galaktarat, Galaktitol, Glikolat, Timin, Sitrakonat, Betain, Fumarat, Suksinat, N-Nitrozodimetilamin, Alloizolösin, Malonat, Karnitin, π -Metilhistidin, Trimetilamin N-oksit, Xantin, O-Asetilkolin, Pirüvat, Dimetilamin, Oksipurinol, Riboz, Guanidoasetat, Kreatin fosfat, Pirolütamat, Glukoz, Alanin, Glisin, Myo-İnositol, Asetat, Laktat.

Metabolitlerin tanımlanması ve nicel analizi, Chenomx NMR Suite 7.1 (Chenomx, Inc., Edmonton, AB, Kanada) kullanılarak gerçekleştirildi. Nicel analiz, 1D NOESY deneylerinin sonuçlarına dayanılarak yapıldı, burada bileşiklere ve iç standardı DSS'ye karşılık gelen belirli proton sinyalleri manuel olarak entegre edildi (Chenomx Inc., Kanada). NOESY deneyi sonuçlarından elde edilen bulguların doğrulanması ve geniş sinyallerin baskılanması için bir CPMG darbe dizisi kullanıldı. Metabolitlerin göreceli konsantrasyonları, iç standardı olarak DSS'nin kullanıldığı ^1H NMR spektrum sinyal yoğunluk yöntemiyle hesaplandı. Elde edilen değerler μM cinsinden konsantrasyonlar

olup, hücre pasajlaması sırasında hesaplanan hücre sayısı ile doğru orantılı olduğu varsayılarak uygun kat sayılarla çarpılarak standardize edildi.

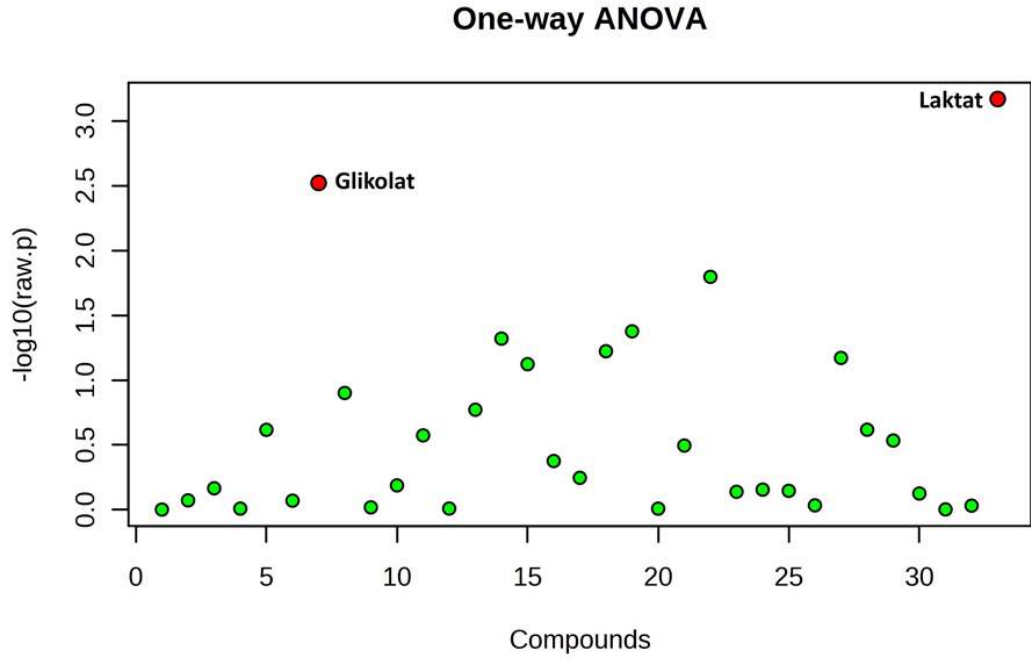
Tek değişkenli analiz ve metabolitlerin ve biyokimyasal parametrelerin ortalama ve medyan değerlerinin belirlenmesi SPSS versiyon 26 kullanılarak yapıldı. İstatistiksel anlamlılık, varyansların homojenliğine bağlı olarak Student t-testi ve Mann-Whitney U testi kullanılarak hesaplandı ve $p < 0.05$ değeri, istatistiksel anlamlılık eşiği olarak kabul edildi.

Metabolitlerin ortalama konsantrasyonları ile Spearman korelasyon analizi yapıldı. NMR analizi ve biyokimyasal analiz yoluyla elde edilen tanımlanmış metabolit listesi, veri azaltma ve görselleştirme için MetabolAnalyst 5.0 yazılımına aktarıldı. Bu çalışmada, çeşitli veri kümelerinden elde edilen p değerlerinin kullanımını içeren bir meta-analiz yöntemi kullanılmıştır. Bu p değerleri, Stouffer'ın yöntemi kullanılarak birleştirildi. Kemometrik analiz yapılmadan önce veriler, medyan, küp transformasyon ve veri ölçeklendirmeyi içeren bir ön işleme adımından geçirildi.

İstatistiksel olarak en anlamlı fark gösteren metabolitler Wilcoxon rank-sum teste tabi tutularak anlamlılık düzeyleri değerlendirildi. Çalışmada ikili karşılaştırmalarda x ekseninde kat sayısı değişim değerleri ve y ekseninde p değerinin $-\log_{10}$ değerini alan 'Volkan Grafiği' ile görseller oluşturuldu. Lineer diskriminant modeller, girdi özellikleri olarak kantitasyonu yapılan metabolit oranları kullanılarak oluşturuldu. Konsantrasyona dayalı verilerde görselleştirme Seyrek Kısmi En Küçük Kareler Ayrım Analizi (PLS-DA) unsupervised analiz yöntemi kullanılarak gerçekleştirildi: Ardından Değişken Önem Grafiği (VIP) elde edildi. Belirli yollar için biyolojik olarak anlamlı olan metabolitleri değerlendirmek üzere MetaboAnalyst 5.0 ile metabolit seti zenginleştirme analizi (MSEA) ve yolak analizleri yapıldı.

5.5.1. Tüm Gruplar (K– LPS – LPS+TQ2 – LPS+TQ3 – TQ2 – TQ3)

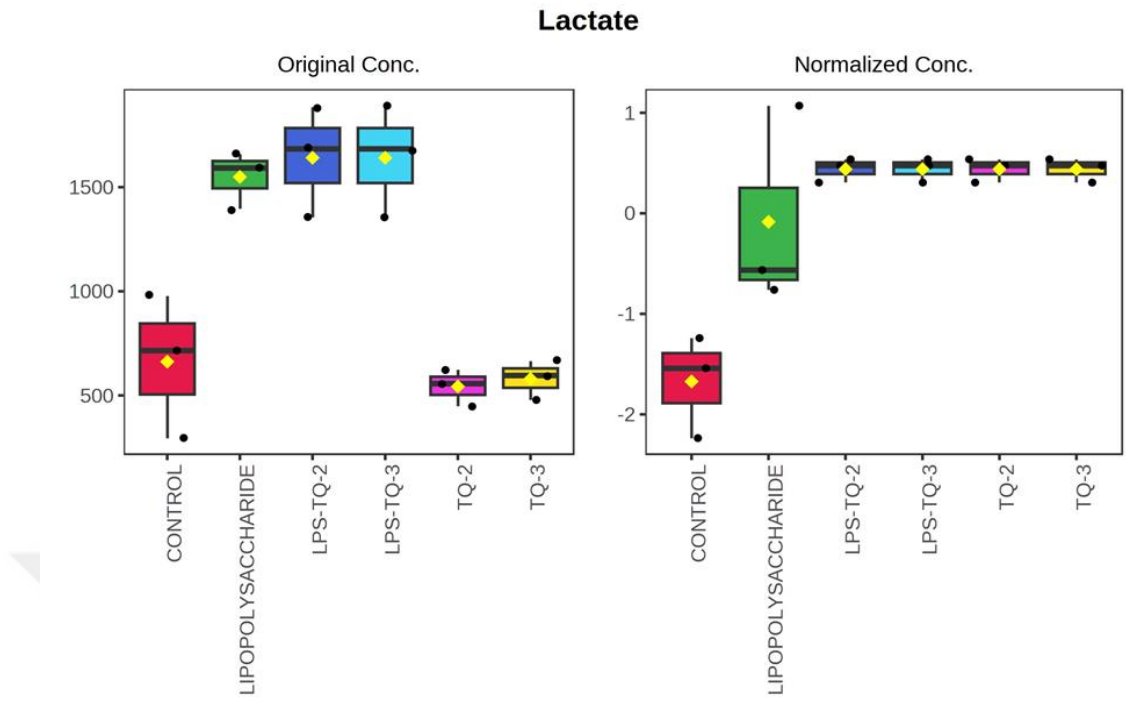
Kemometrik analizden önce her bir numune metabolit seviyesinin küp değeri alınarak toplam değere göre normalize edildi. Genel veriler ise aralık ölçeklendirme ile normal değerler elde edildi. Sonuçlara göre tüm gruplar arasında en anlamlı derecede farklılık gösteren metabolitler şekil 5.10. da gösterildiği gibi laktat ve glukolat olarak saptandı.



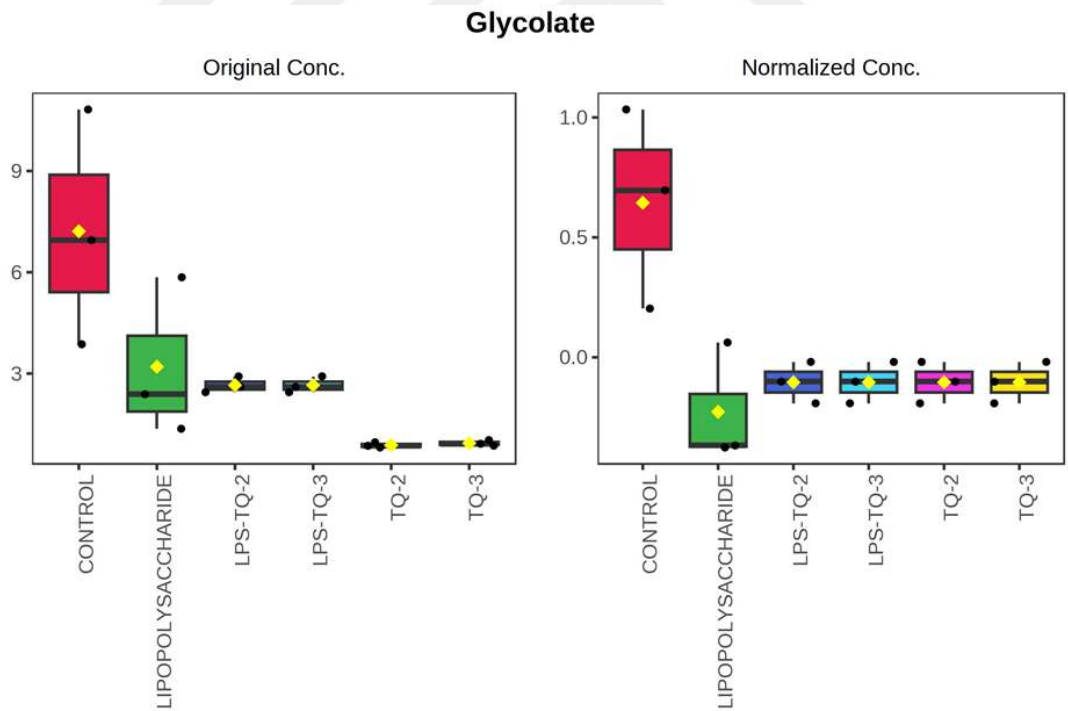
Şekil 5.10. Hücre homojenatlarıyla yapılan NMR analizi sonucu elde edilen metabolit konsantrasyonları ile oluşturulmuş one-way ANOVA görseli. Yeşil renkli metabolitler anlamlı olmayan, kırmızı renk anlamlılık gösteren metabolitleri temsil eder. Tüm gruplar arası istatistiksel olarak anlamlı fark gösteren metabolitlerin laktat ve glikolat olduğu görülmüştür.

	f.value	p.value	FDR
Lactate	9.6926	0.000678	0.022364
Glycolate	6.8845	0.003007	0.049607

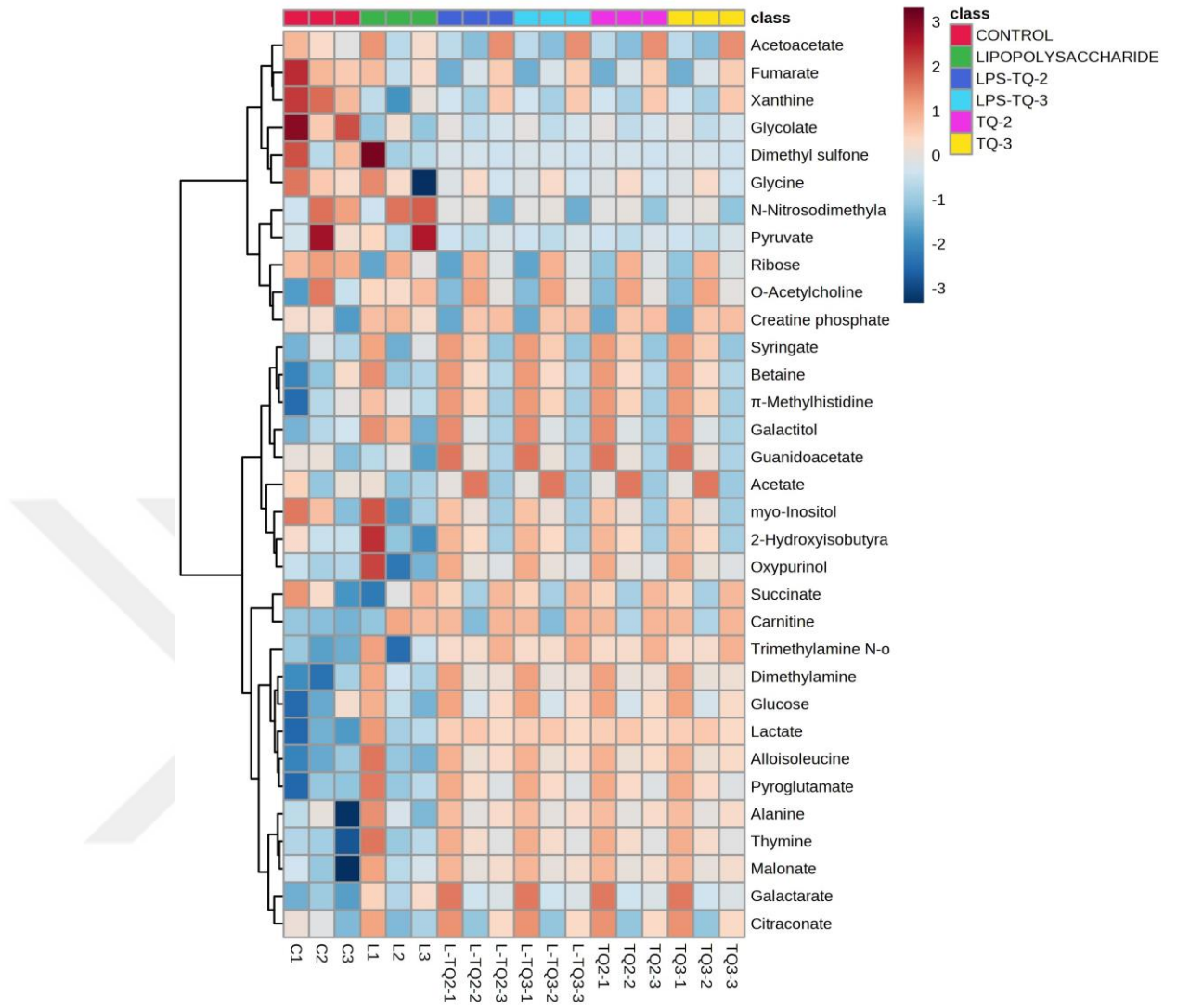
A)



B)



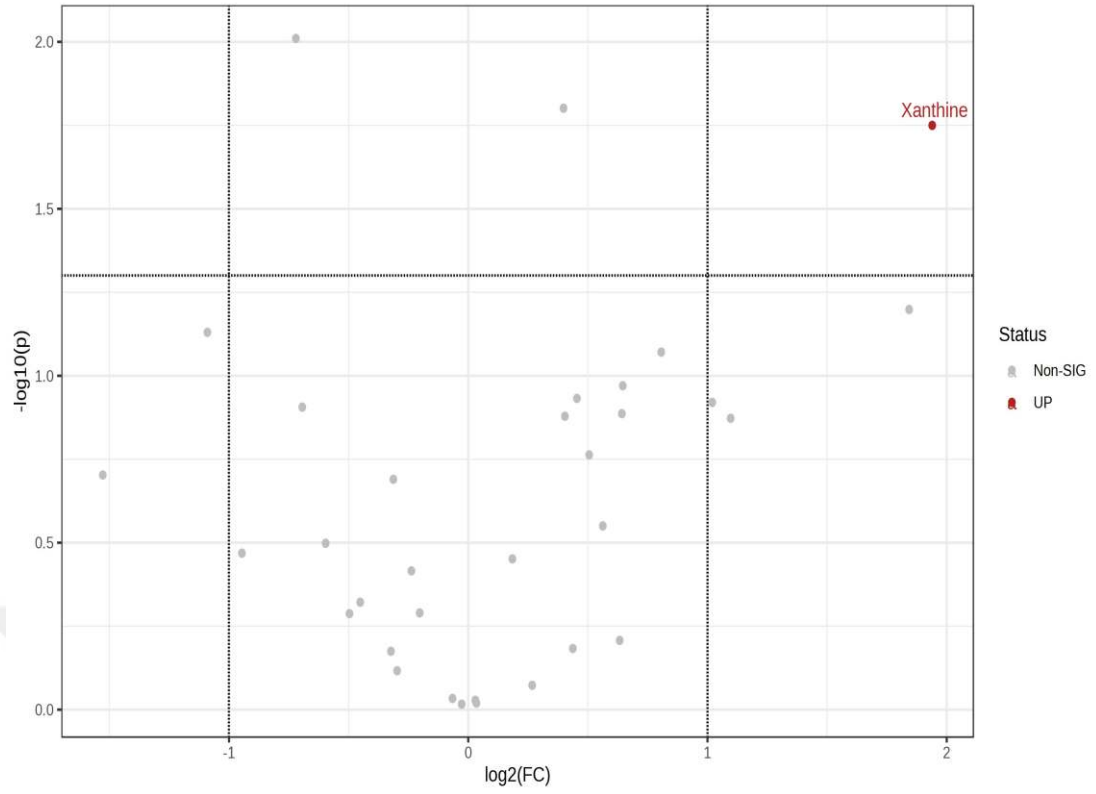
Şekil 5.11. Gruplar arası Laktat(A) ve Glikolat (B) konsantrasyonlarının bar grafiği. Siyah noktalar, tüm numunelerden seçilen metabolitin konsantrasyonlarını temsil eder. Çentik, $\pm 1,58 \text{ IQR} \sqrt{n}$ olarak tanımlanan her bir grubun medyanı civarında %95 güven aralığını göstermektedir. Gruplar arasındaki farkları değerlendirmek için çentik kullanılabilir, çentiklerin üstüste gelmemesi medyan değerlerin farklı olduğunu gösterir. Her grubun ortalama konsantrasyonu barların orta kısımlarında yer alan sarı bir elmasla temsil edilir.



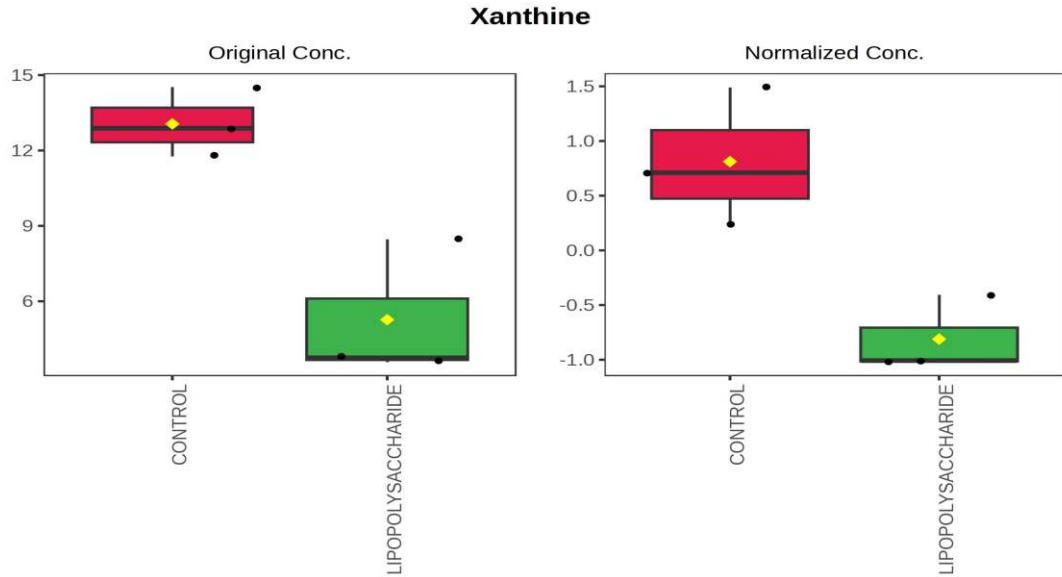
Şekil 5.12. Numunelerdeki metabolitlerin konsantrasyon değerlerinin normalleştirilmiş verileri ile oluşturulmuş bir heatmap. Haritadaki her bir renkli hücre, veri tablonuzdaki bir konsantrasyon değerine karşılık gelir; örnekler satırlarda ve metabolitler sütunlardadır. Timokinon içeren grupların (açık mavi, pembe, sarı, mor) benzer patern sergilediği gösterilmiştir.

5.5.2. Kontrol-LPS gruplarının kıyaslaması

Numuneler toplam değere göre normalize edildi. Genel veriler oto ölçeklendirme ile normalleştirildi. Sonuçta her iki grup arasındaki en anlamlı farklılık gösteren metabolit ksantin olarak bulundu. Yol zenginleştirme analizinden elde edilen verilerde ise Şekil 5.16’da gösterildiği gibi pürin metabolik yolağının anlamlı derecede etkilendiği saptandı.

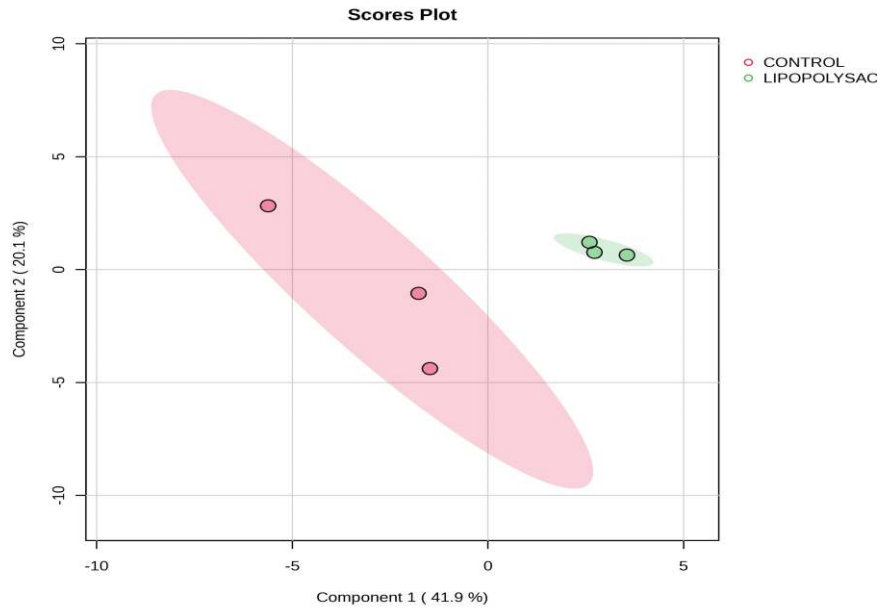


Şekil 5.13. LPS – kontrol hücre metabolit verileri ile oluşturulmuş volkan grafiği. $p \leq 0.05$ ve kat sayı (FC) eşik değeri 2.0 olarak alınmıştır. İki farklı grup arasındaki metabolitlerin istatistiksel farkları ve önemli metabolitleri görselleştirir. Grafiğin x eksenı metabolitlerin log2 tabanında katlanma sayısını, y eksenı ise $-\log_{10} p$ değerini temsil eder. Grafikte kırmızı renkli noktalar azalmış değerleri gösterir.

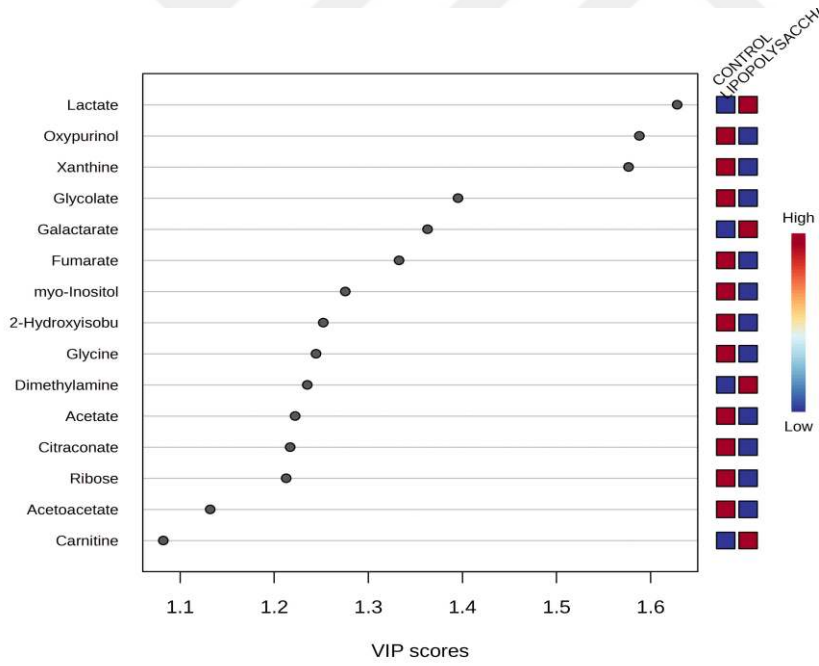


Şekil 5.14. İstatistiksel olarak anlamlı fark gösteren Ksantin metabolitinin gruplar arası konsantrasyonlarının bar grafiği. Siyah noktalar, tüm numunelerden seçilen metabolitin konsantrasyonlarını temsil eder. Çentik, $\pm 1,58 \text{ IQR} \sqrt{n}$ olarak tanımlanan her bir grubun medyanı civarında %95 güven aralığını göstermektedir. Gruplar arasındaki farkları değerlendirmek için çentik kullanılabilir, çentiklerin üstüste gelmemesi medyan değerlerin farklı olduğunu gösterir. Her grubun ortalama konsantrasyonu barların orta kısımlarında yer alan sarı bir elmasla temsil edilir.

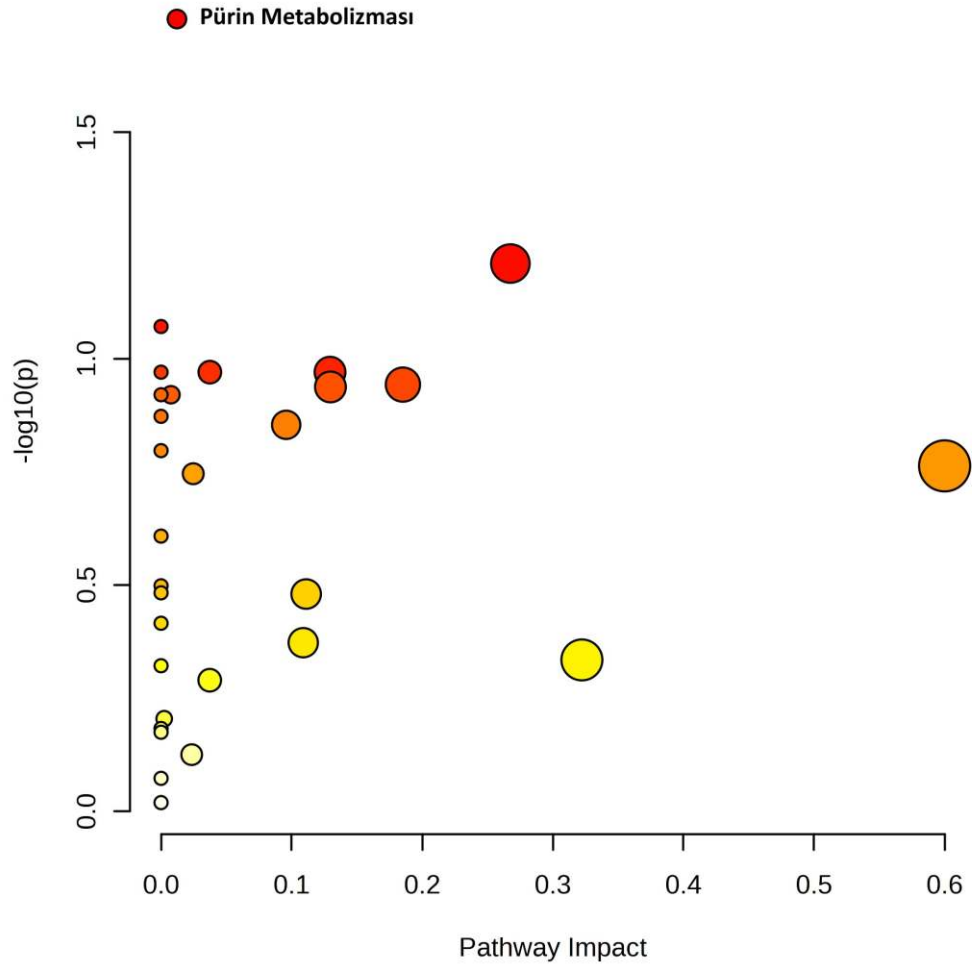
A)



B)



Şekil 5.15. Kontrol ve LPS uygulaması yapılan hücre gruplarından elde edilen metabolitlerin PLS-DA analizi ile elde edilen 2 boyutlu görsel (A) ve değişkenlerin önem sıralamasını gösteren VIP grafiği (B).



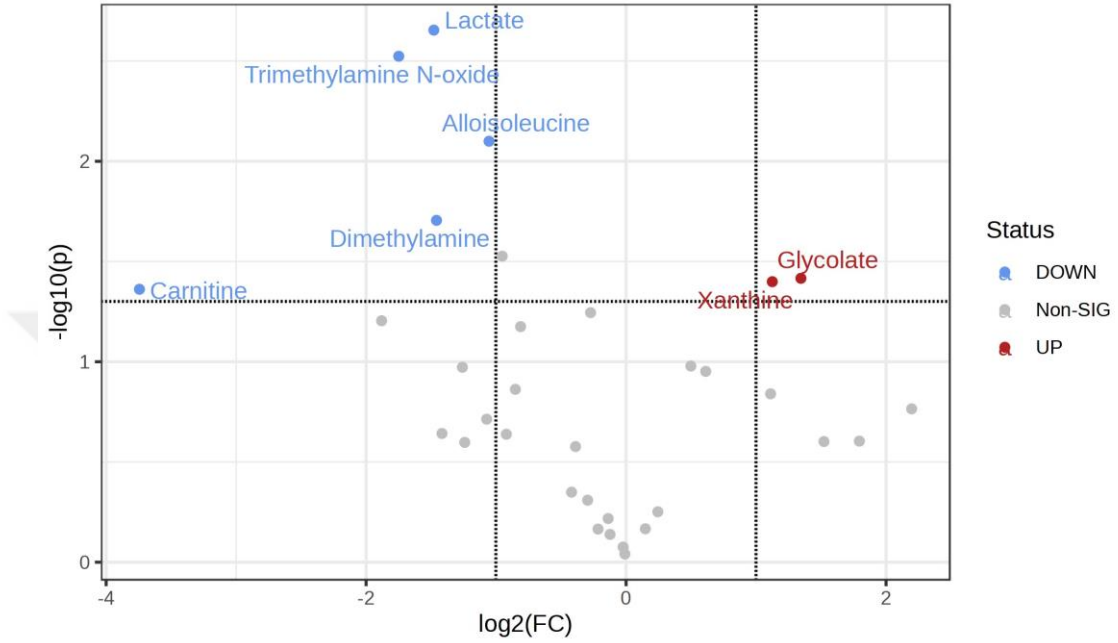
Şekil 5.16. Yol zenginleştirme analizinden alınan p değerlerine ve topoloji analizinden alınan yol etki değerlerine göre eşleşen yolları gösteren yolak dağılım grafiği. LPS-kontrol karşılaştırması.

Yolak	Toplam bileşen	Eşleşen metabolit sayısı	Eşlenen metabolit	p	Etki
Purine metabolism	65	1	Xanthine	0.017783	0.01217

5.5.3. Kontrol-TQ2 karşılaştırması

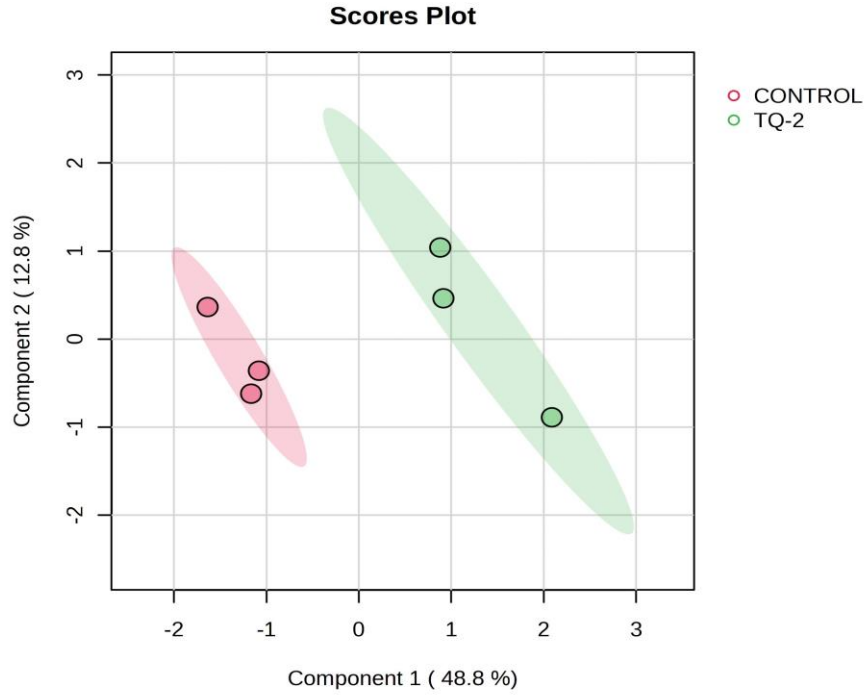
Kontrol ve TQ2 gruplarının NMR analizinden elde edilen her bir numune metabolit seviyesinin küp değeri alınarak median değere göre normalize edildi. Genel veriler ise aralık ölçeklendirme ile normal değerler elde edildi. Ksantin ve glikolat molekülleri Şekil 5.17’de gösterilen volkan grafiğine göre her iki grup arasında

anlamli seviyede farkli bulundu. Şekil 5.19’da gösterilen yol zenginleştirme analiz sonuçlarına göre, piruvat, glikoliz/glikoneogenez, valin-lösin-izolösin sentez ve yıkımı, pürin ve glutatyon metabolik yolakları gruplar arasında anlamli seviyede etkilenmiş bulundu.

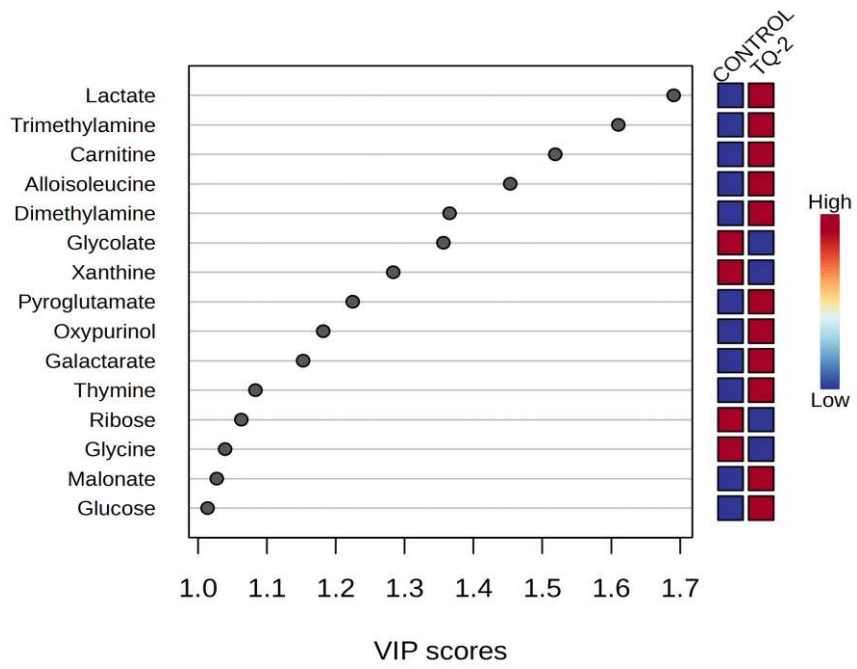


Şekil 5.17. Kontrol – TQ 2. Doz uygulanan hücre metabolit verileri ile oluşturulmuş volkan grafiği. $p \leq 0.05$ ve kat sayı (FC) eşik değeri 2.0 olarak alınmıştır. İki farklı grup arasındaki metabolitlerin istatistiksel farkları ve önemli metabolitleri görselleştirir. Grafiğin x eksenini metabolitlerin log2 tabanında katlanma sayısını, y eksenini ise $-\log_{10} p$ değerini temsil eder. Grafikte kırmızı renkli noktalar azalmış değerleri gösterir.

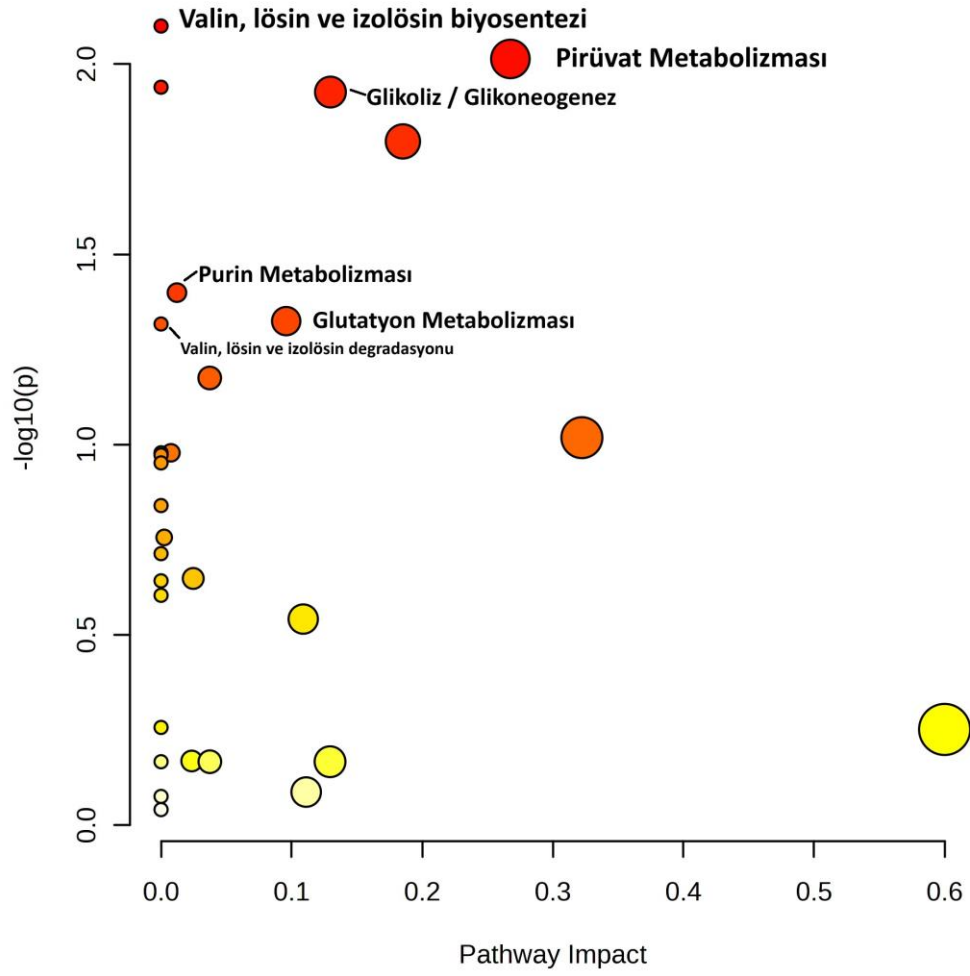
A)



B)



Şekil 5.18. Kontrol ve TQ 2. doz uygulaması yapılan hücre gruplarından elde edilen metabolitlerin PLS-DA analizi ile elde edilen 2 boyutlu görsel (A) ve değişkenlerin önem sıralamasını gösteren VIP grafiği (B).



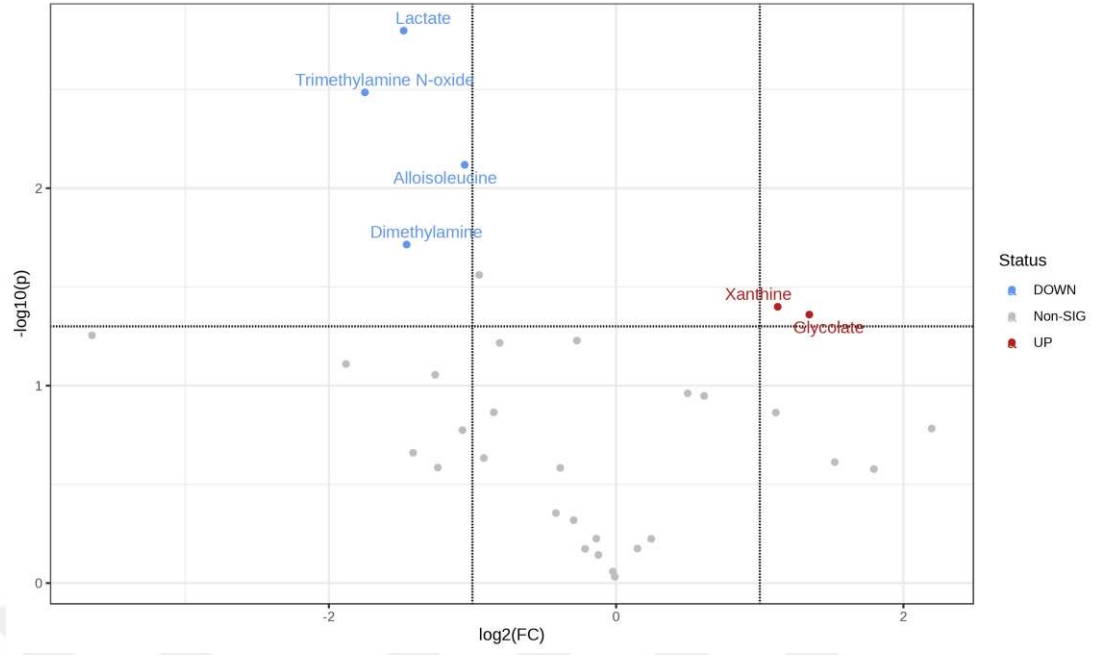
Şekil 5.19. Yol zenginleştirme analizinden alınan p değerlerine ve topoloji analizinden alınan yol etki değerlerine göre eşleşen yolları gösteren yolak dağılım grafiği. Kontrol – TQ 2. Doz uygulanan hücrelerin karşılaştırması.

	Total Cmpd	Hits	Eşlenen metabolit	Raw p	Impact
Pyruvate metabolism	22	4	Pyruvate; (S)-Lactate; Acetate; Fumarate	0.001749	0.26749
Glycolysis / Glukoneogenesis	26	4	Pyruvate; (S)-Lactate; beta-D- Glucose; Acetate	0.003017	0.12971
Valine, leucine and isoleucine biosynthesis	8	1	L-Isoleucine	0.007945	0

Valine, leucine and isoleucine degradation	40	2	Acetoacetate; L-Isoleucine	0.016336	0
Glutathione metabolism	28	2	Glycine; 5-Oxoproline	0.030274	0.09582
Purine metabolism	65	1	Xanthine	0.039874	0.01217

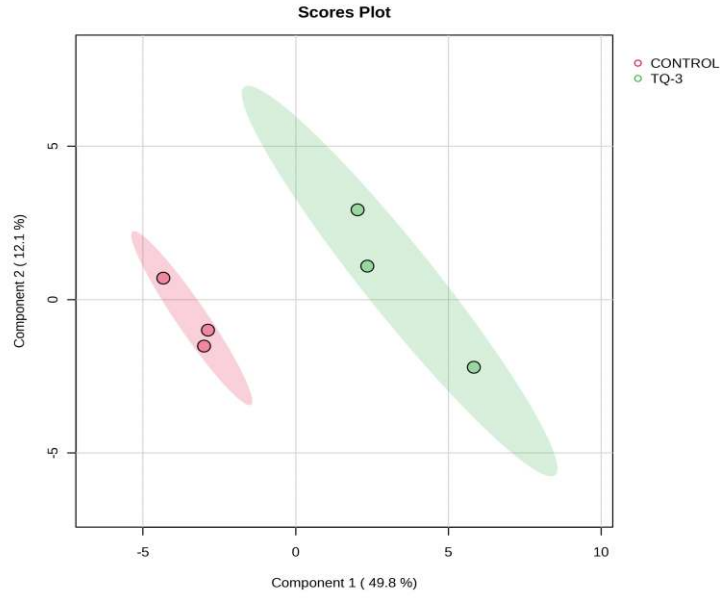
5.5.4. Kontrol-TQ3 gruplarının kıyaslanması

Kontrol ve TQ3 gruplarının NMR analizinden elde edilen her bir numune metabolit seviyesinin küp değeri alınarak median değere göre normalize edildi. Genel veriler ise aralık ölçeklendirme ile normal değerler elde edildi. Ksantin ve glikolat molekülleri Şekil 5.20’de gösterilen volkan grafiğine göre her iki grup arasında anlamlı seviyede farklı bulundu. Şekil 5.22’de gösterilen yol zenginleştirme analiz sonuçlarına göre, piruvat, aminoasit tRNA sentezi, glikoliz/glikoneogenez, valin-lösin-izolösin sentezi, pürin ve glutatyon metabolizması ile glioksalat ve dikarboksilat metabolizması yolları gruplar arasında anlamlı seviyede etkilenmiş bulundu.

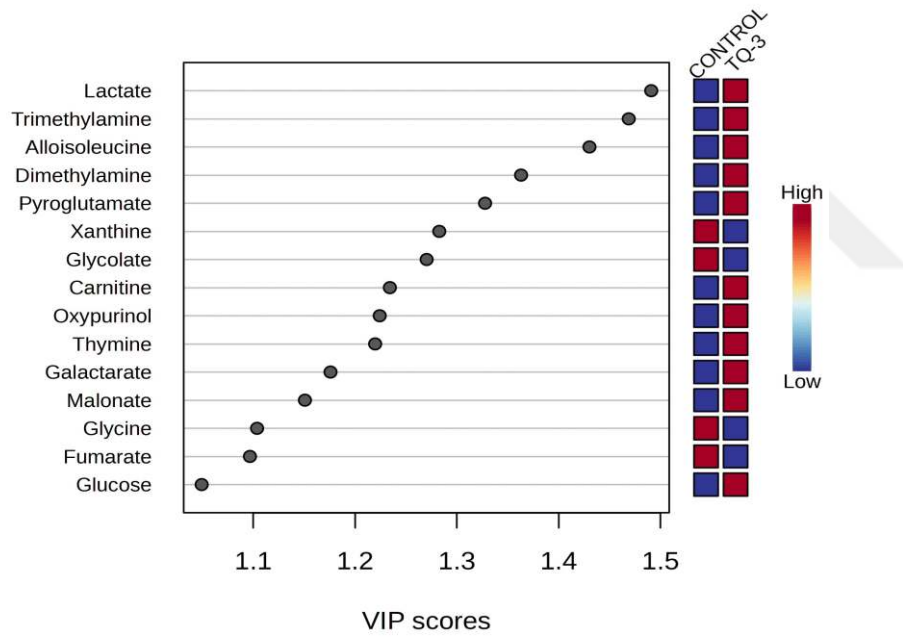


Şekil 5.20. Kontrol – TQ 3. Doz uygulanan hücre metabolit verileri ile oluşturulmuş volkan grafiği. $p \leq 0.05$ ve kat sayı (FC) eşik değeri 2.0 olarak alınmıştır. İki farklı grup arasındaki metabolitlerin istatistiksel farkları ve önemli metabolitleri görselleştirir

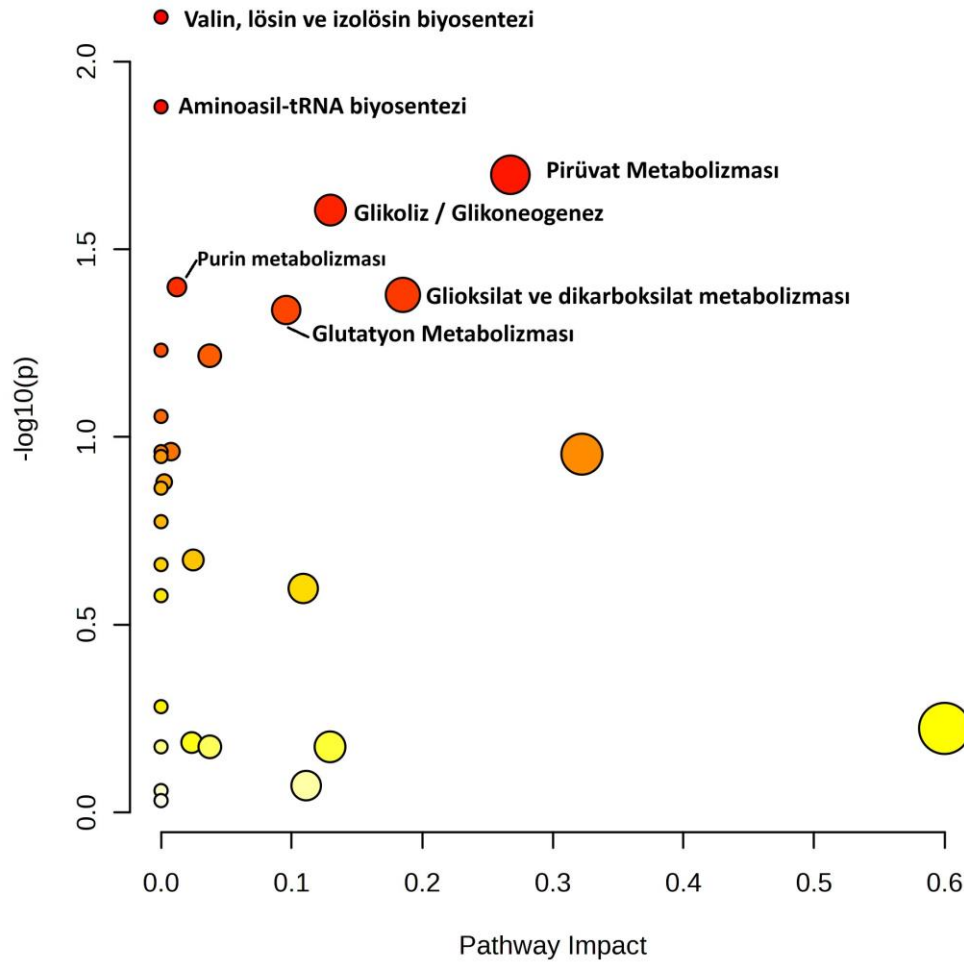
A)



B)



Şekil 5.21. Kontrol ve TQ 3. doz uygulaması yapılan hücre gruplarından elde edilen metabolitlerin PLS-DA analizi ile elde edilen 2 boyutlu görsel (A) ve değişkenlerin önem sıralamasını gösteren VIP grafiği (B).



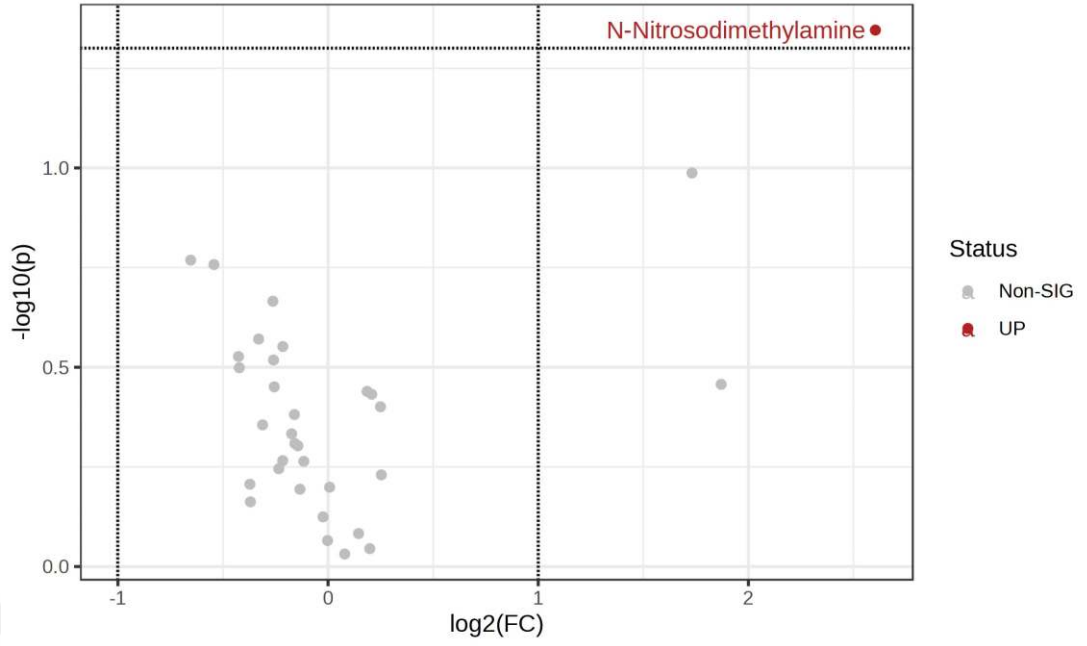
	Total Cmpd	Hits	Eşleşen metabolit	Raw p	Impact
Valine, leucine and isoleucine biosynthesis	8	1	L-Isoleucine	0.007612	0
Aminoacyl-tRNA biosynthesis	48	3	Glycine; L-Alanine; L-Isoleucine	0.013201	0
Pyruvate metabolism	22	4	Pyruvate; (S)-Lactate; Acetate; Fumarate	0.020028	0.26749
Glycolysis / Gluconeogenesis	26	4	Pyruvate; (S)-Lactate; beta-D-Glucose; Acetate	0.02487	0.12971

Purine metabolism	65	1	Xanthine	0.039863	0.01217
Glyoxylate and dicarboxylate metabolism	32	4	Glycolate; Glycine; Acetate; Pyruvate	0.041835	0.18519
Glutathione metabolism	28	2	Glycine; 5-Oxoproline	0.045902	0.09582

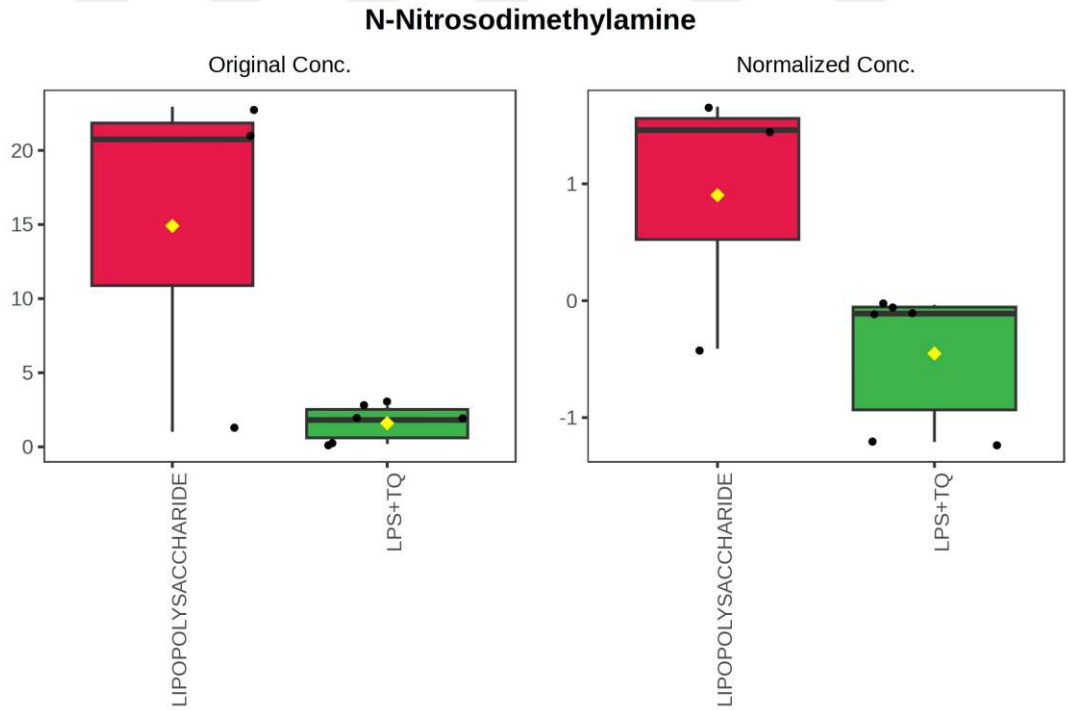
Şekil 5.22. Yol zenginleştirme analizinden alınan p değerlerine ve topoloji analizinden alınan yol etki değerlerine göre eşleşen yolları gösteren yolların dağılım grafiği. Kontrol – TQ 3. Doz uygulanan hücrelerin karşılaştırması.

5.5.5. LPS ve LPS+TQ uygulanan grupların karşılaştırması

LPS ve LPS+TQ gruplarının NMR analizinden elde edilen her bir numune metabolit seviyesinin küp değeri alınarak median değere göre normalize edildi. Genel veriler ise aralık ölçeklendirme ile normal değerler elde edildi. Yapılan analizlerde LPS+TQ2 ve LPS+TQ3 gruplarının sonuçları aynı çıktığı için bu sonuçlar LPS+TQ adıyla tek bir başlık altında toplandı. Şekil 5.23'te volkan grafiğine göre N-nitrosodimetilamin metabolit düzeyleri gruplar arasında anlamlı farklılık gösterdi. Yollar analizinde anlamlı bir metabolik yollar bulunmazken önem sırasına göre gruplar arası farklılık gösteren VIP skor > 1 olan metabolitler şekil 5.25'te gösterildi.

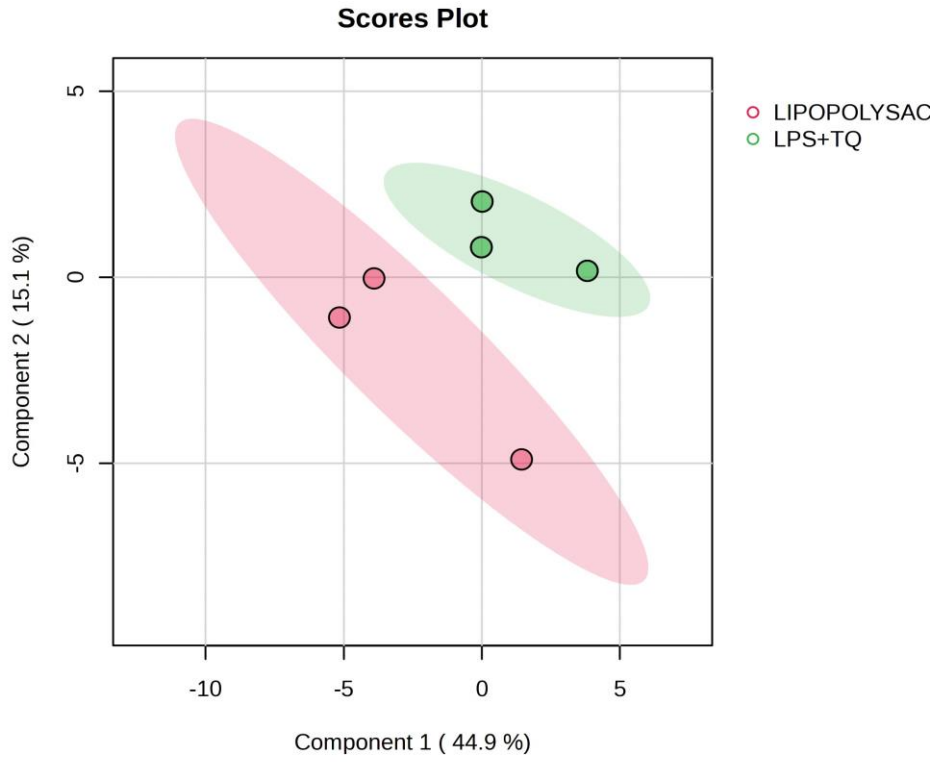


Şekil 5.23. LPS – LPS+TQ hücre metabolit verileri ile oluşturulmuş volkan grafiği. $p \leq 0.05$ ve kat sayı (FC) eşik değeri 2.0 olarak alınmıştır. İki farklı grup arasındaki metabolitlerin istatistiksel farkları ve önemli metabolitleri görselleştirir. Grafiğin x eksenini metabolitlerin log2 tabanında katlanma sayısını, y eksenini ise $-\log_{10} p$ değerini temsil eder. Grafikte kırmızı renkli noktalar azalmış değerleri gösterir.

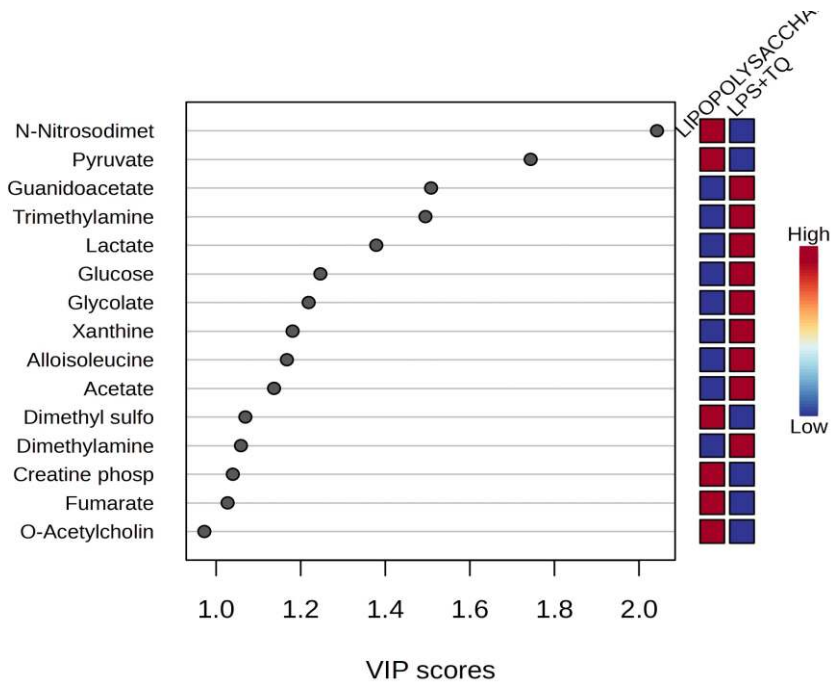


Şekil 5.24. Unsupervised analiz metodu olan PCA ile net bir sınıf ayrımı yapılamamasına rağmen supervised metot olan PLS-DA ile gruplar arası ayrım yapıldı .

A)



B)



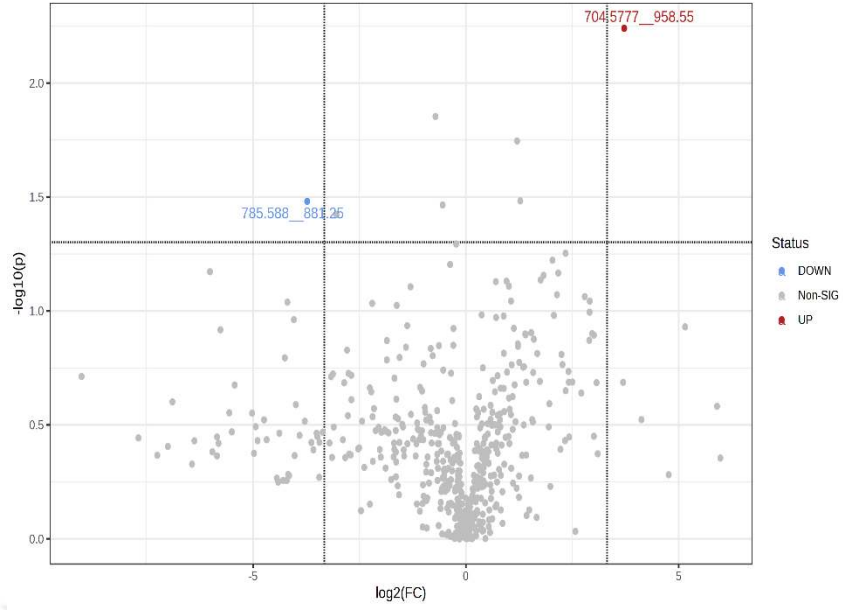
Şekil 5.25. LPS ve LPS-TQ uygulaması yapılan hücre gruplarından elde edilen metabolitlerin PLS-DA analizi ile elde edilen 2 boyutlu görsel (A) ve değişkenlerin önem sıralamasını gösteren VIP grafiği (B).

5.6. LC-MS/MS analizi

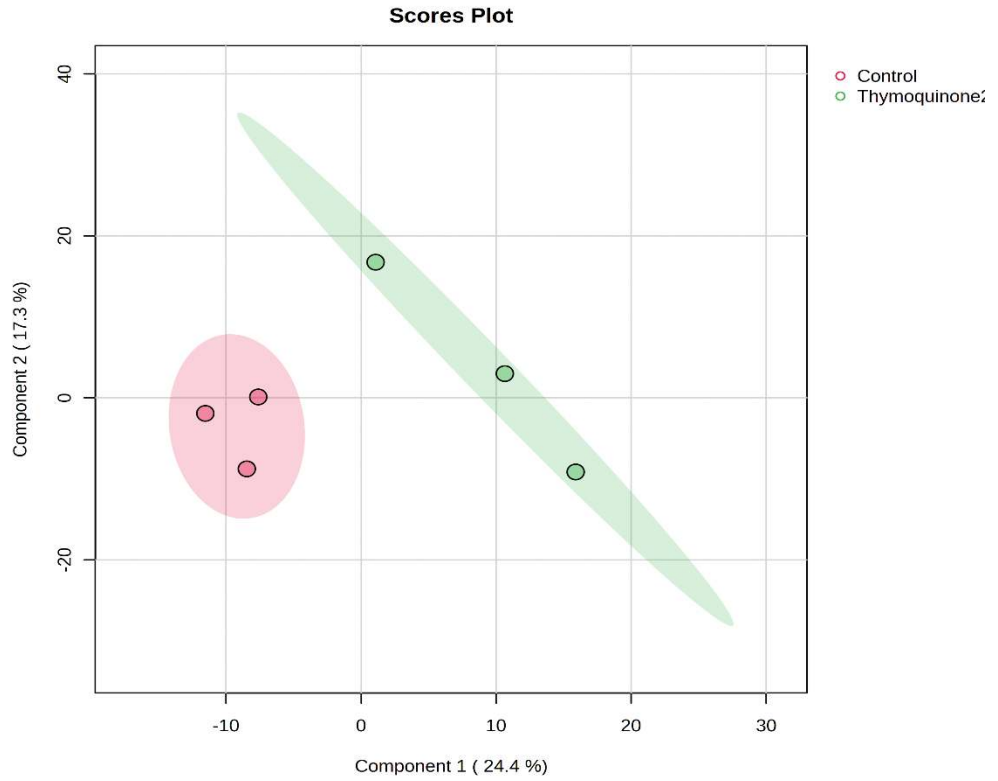
Metabolitlerin hücre kültürü ekstaktında kütle spektrometrisi metoduyla tanımlanması, Q-Exactive LC-MS/MS - Orbitrap (Thermo Scientific, Hemel Hempstead, UK) kullanılarak gerçekleştirildi. Doğru kütle ölçümü için hem negatif hem de pozitif iyonlaştırma modu Q Exactive hibrid quadrupole-Orbitrap kütle spektrometresi ile çalıştırıldı. Hedeflenmemiş LC-MS/MS analiziyle bulunan metabolitler m/z (kütle/yük) oranlarına göre belirlenmiştir. Veri önışlemesi XCalibur 2.2 yazılımı (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, ABD) kullanılarak gerçekleştirildi. Tepe seçimi, tepe hizalaması ve tepe notasyon işlemleri Mzmine3 ve Metaboanalyst 5.0 kullanılarak gerçekleştirildi. UHPLC-HRMS metabolomikten elde edilen metabolitler, doğru kütle ve MS/MS bilgilerini veritabanlarıyla karşılaştırarak tanımlandı: HMDB (İnsan Metabolom Veritabanı) (<http://www.hmdb.ca/>) ve mzCloud (<https://www.mzcloud.org/>).

5.6.1. Kontrol-TQ2

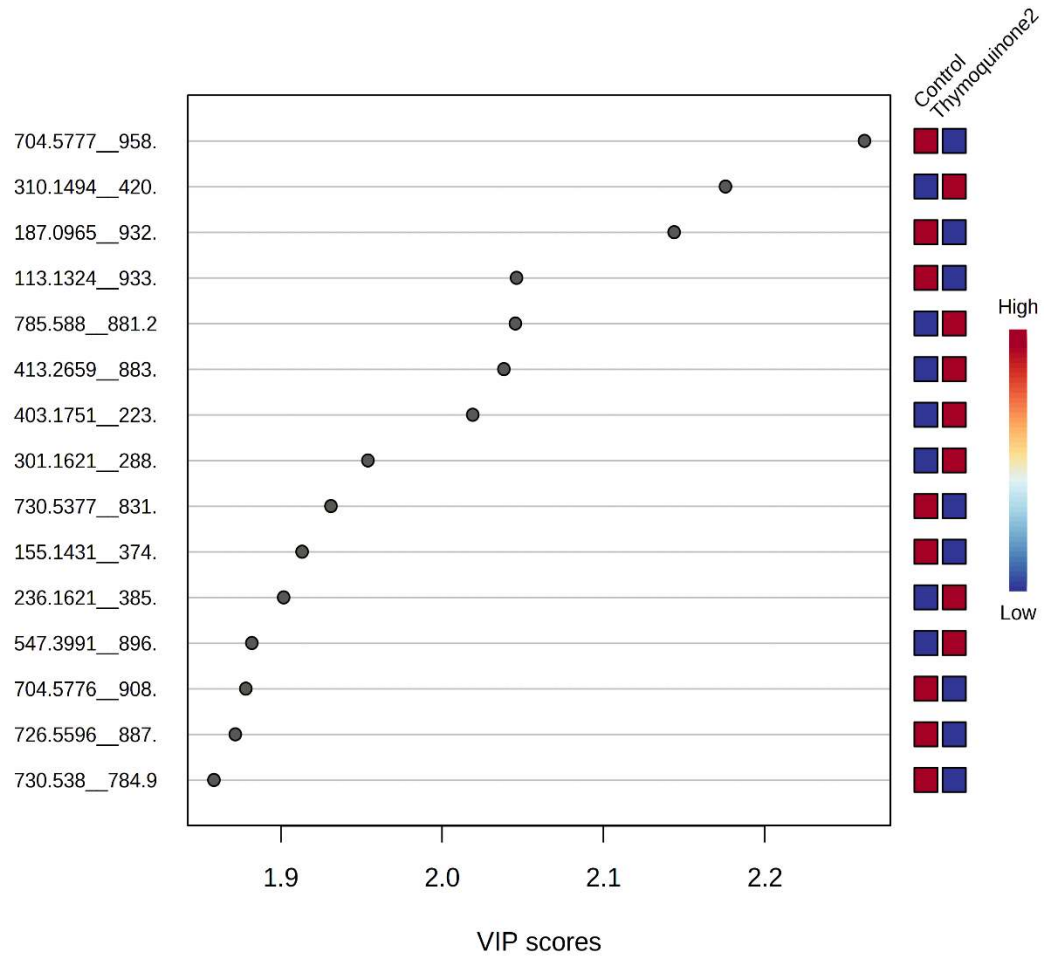
LC-MS/MS ile pozitif iyonizasyonda analiz edilen Kontrol-TQ2 gruplarının hücre metabolitleriyle m/z oranına göre oluşturulan volkan grafiğı şekil 5.26. da, PLS-DA analizi şekil 5.27. de, VIP grafiğı ise şekil 5.28. de gösterilmiştir.



Şekil 5.26. LC-MS/MS ile pozitif iyonizasyonda analiz edilen Kontrol- TQ2 hücre metabolitleriyle oluşturulmuş volkan grafiği. $p \leq 0.05$ ve kat sayı (FC) eşik değeri 10.0 olarak alınmıştır. (değişkenler m/z değerlerine göre ifade edilmiştir).

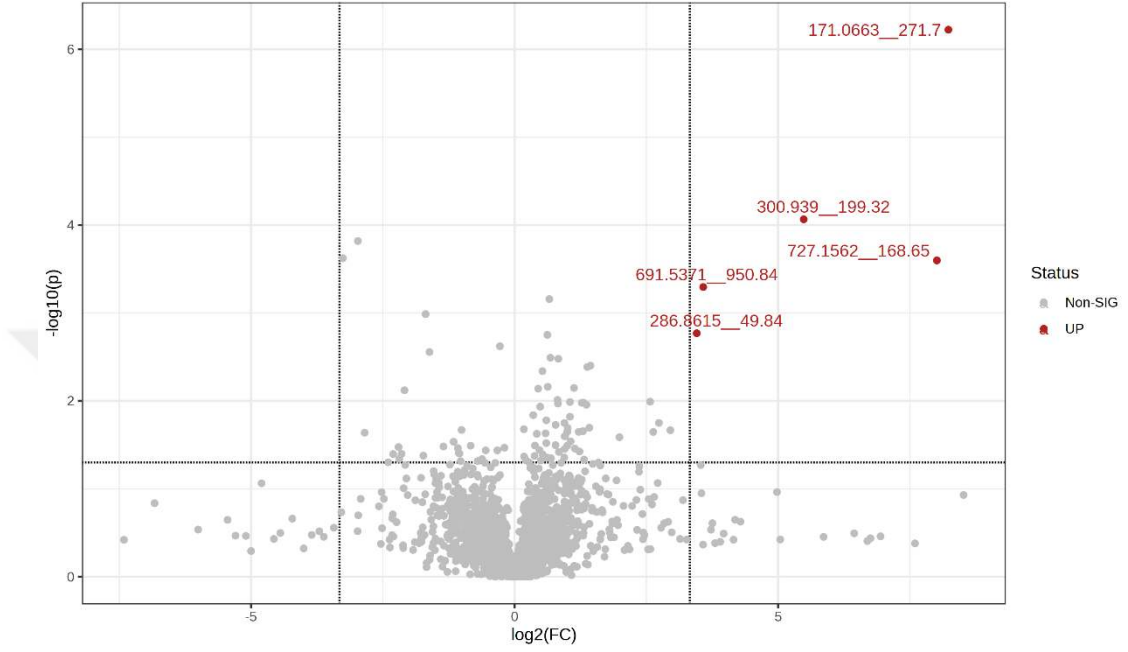


Şekil 5.27. LC-MS/MS ile pozitif iyonizasyonda analiz edilen Kontrol- TQ2 hücre metabolitlerinin PLS-DA analizi ile elde edilen 2 boyutlu görseli

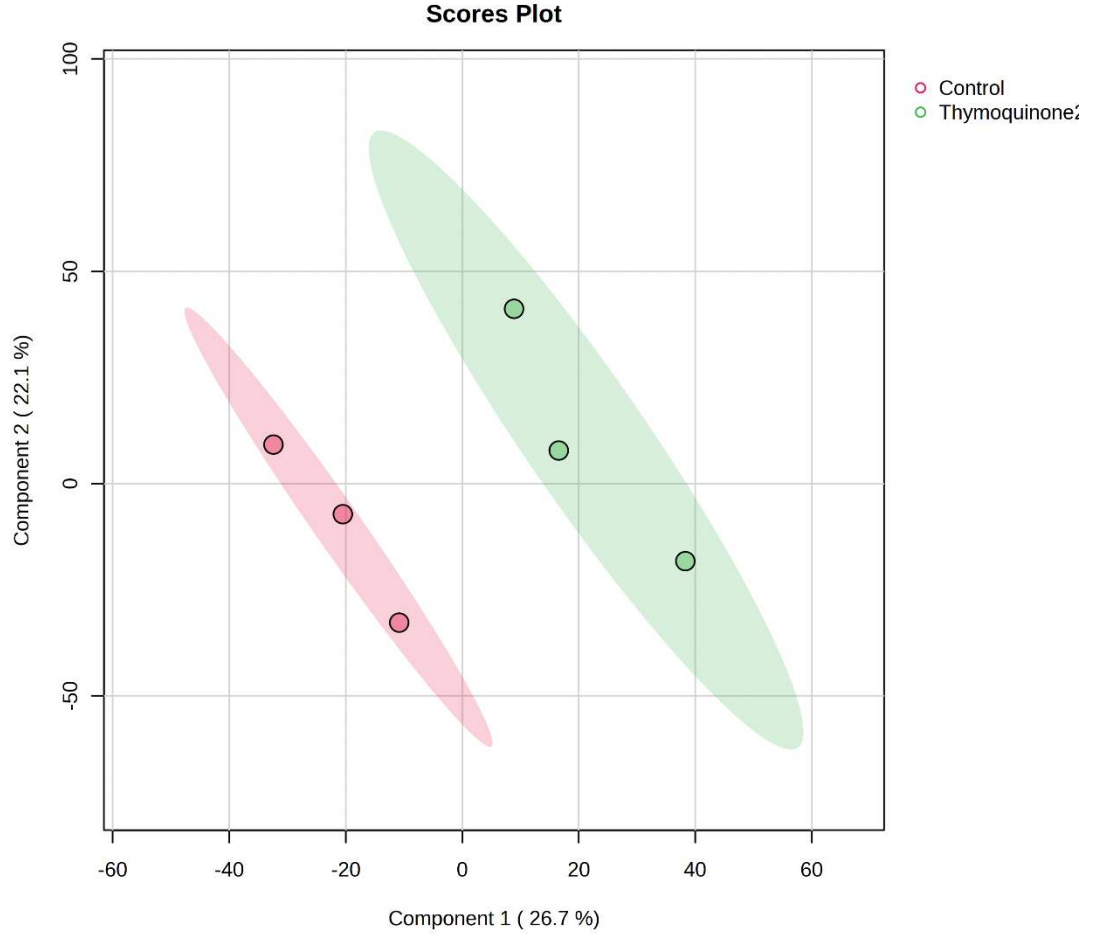


Şekil 5.28. LC-MS/MS ile pozitif iyonizasyonda analiz edilen Kontrol- TQ2 hücre metabolitlerinin önem sıralamasını gösteren VIP grafiği . (değişkenler m/z değerlerine göre ifade edilmiştir).

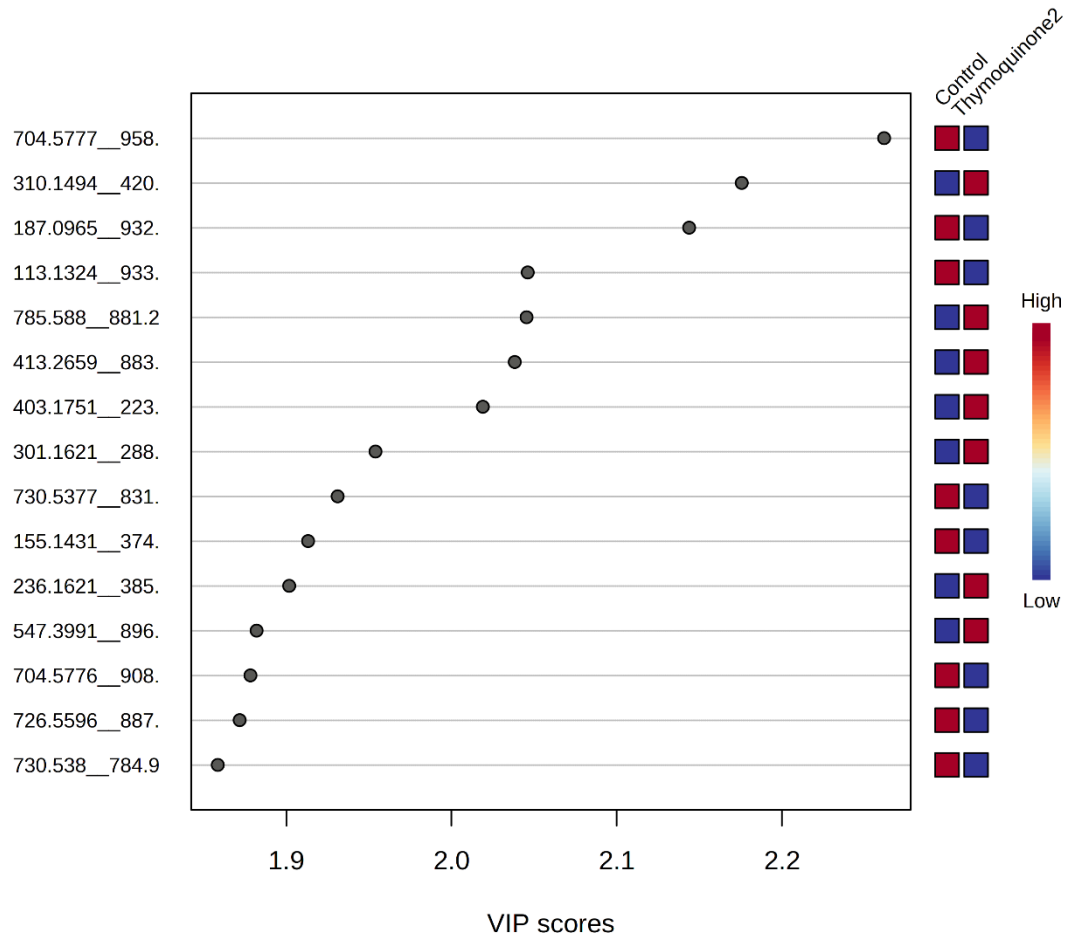
LC-MS/MS ile negatif iyonizasyonda analiz edilen Kontrol - TQ2 hücre metabolitleriyle oluşturulan volkan grafiği Şekil 5.29. da, PLS-DA analizi şekil 5.30. da, VIP grafiği ise şekil 5.31. de gösterildiği gibidir.



Şekil 5.29. LC-MS/MS ile negatif iyonizasyonda analiz edilen Kontrol- TQ2 hücre metabolitleriyle oluşturulmuş volkan grafiği. $p \leq 0.05$ ve kat sayı (FC) eşik değeri 10.0 olarak alınmıştır. (değişkenler m/z değerlerine göre ifade edilmiştir).



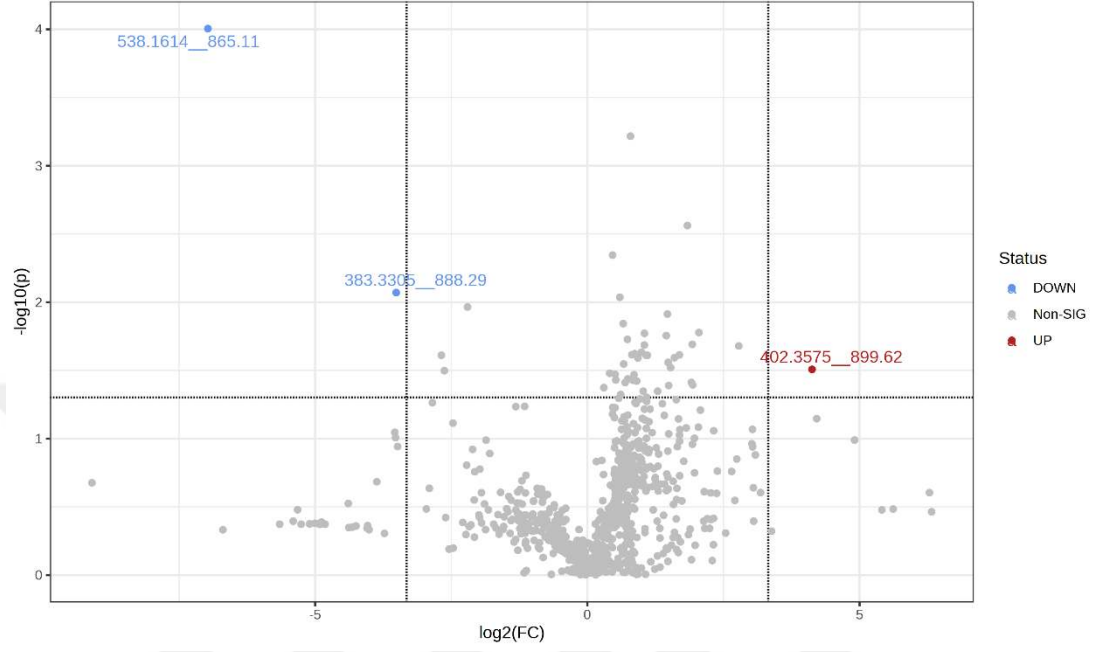
Şekil 5.30. LC-MS/MS ile negatif iyonizasyonda analiz edilen Kontrol- TQ2 hücre metabolitlerinin PLS-DA analizi ile elde edilen 2 boyutlu görseli



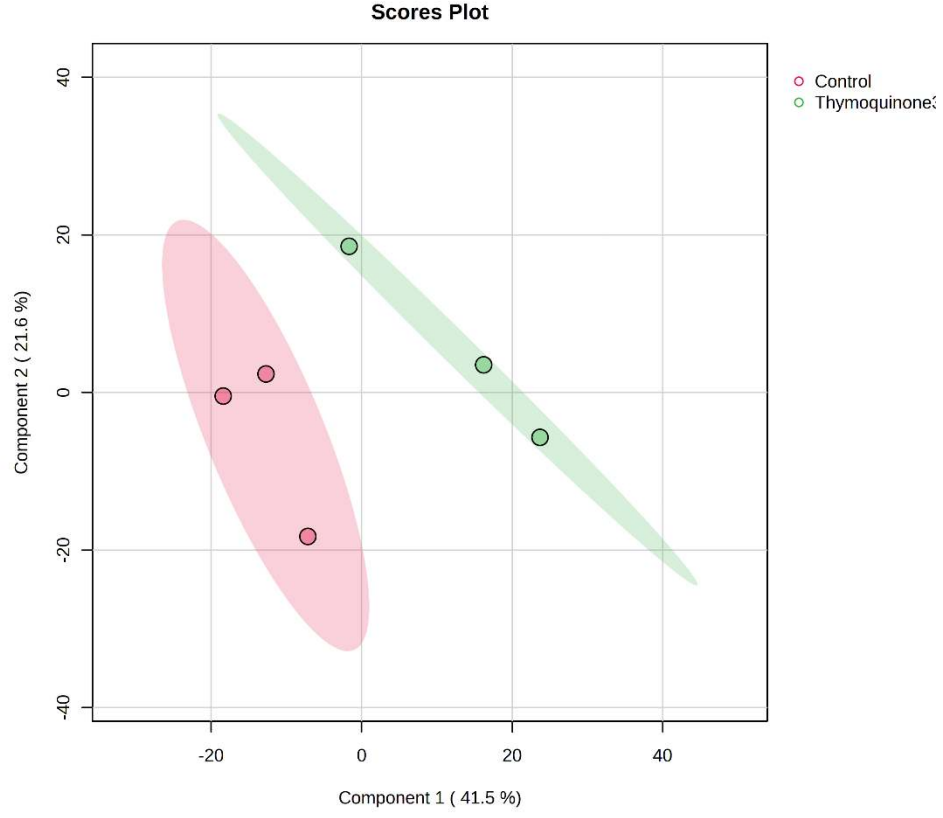
Şekil 5.31. LC-MS/MS ile negatif iyonizasyonda analiz edilen Kontrol- TQ2 hücre metabolitlerinin önem sıralamasını gösteren VIP grafiği . (değişkenler m/z değerlerine göre ifade edilmiştir).

5.6.2. Kontrol-TQ3

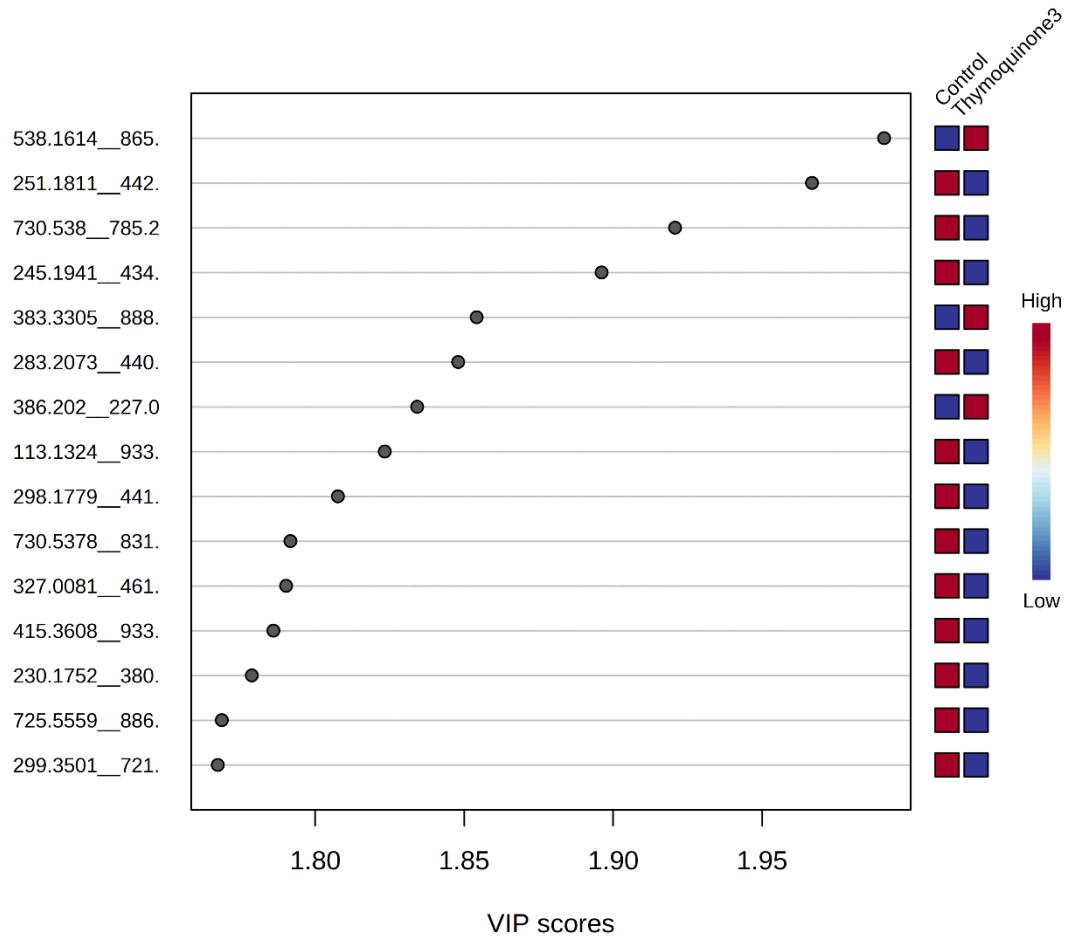
LC-MS/MS ile pozitif iyonizasyonda analiz edilen Kontrol- TQ2 hücre metabolitleriyle oluşturulan grafikler Şekil 5.32. de gösterildiği gibidir. m/z değerlerine göre karşılığı olan metabolitler belirlenerek MetaboAnalyst 5.0 programıyla incelendi ve yolak analizi yapıldı. Pürin, askorbat-aldehid ve vitamin B6 metabolizması anlamlı derecede farklı bulundu.



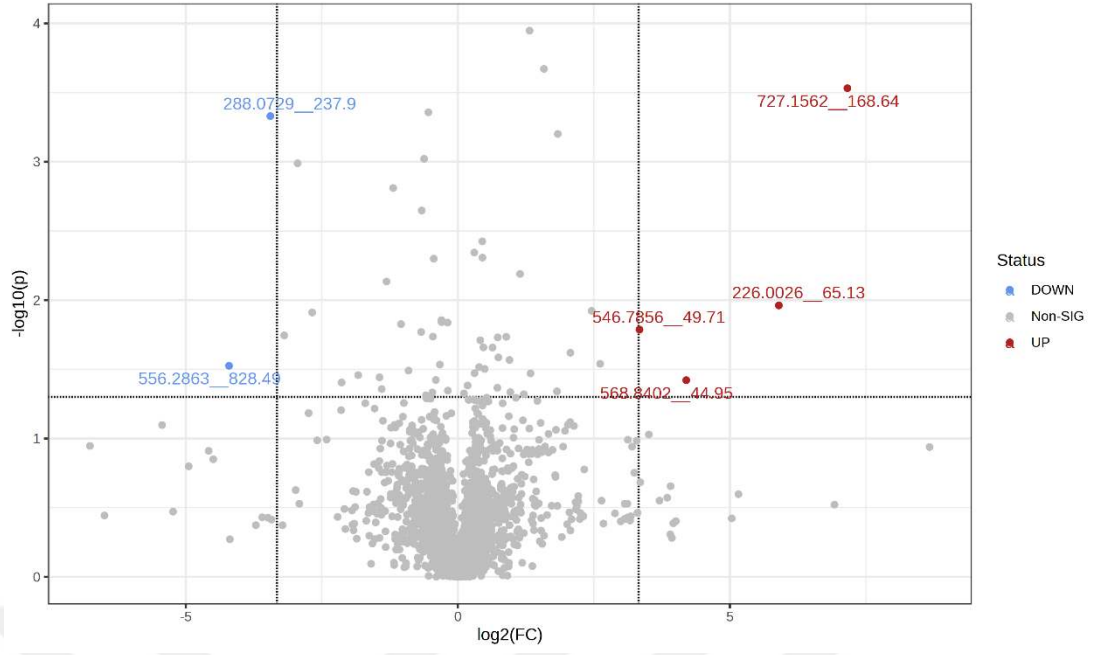
Şekil 5.32. LC-MS/MS ile pozitif iyonizasyonda analiz edilen Kontrol- TQ3 hücre metabolitleriyle oluşturulmuş volkan grafiği. $p \leq 0.05$ ve kat sayı (FC) eşik değeri 10.0 olarak alınmıştır. (değişkenler m/z değerlerine göre ifade edilmiştir).



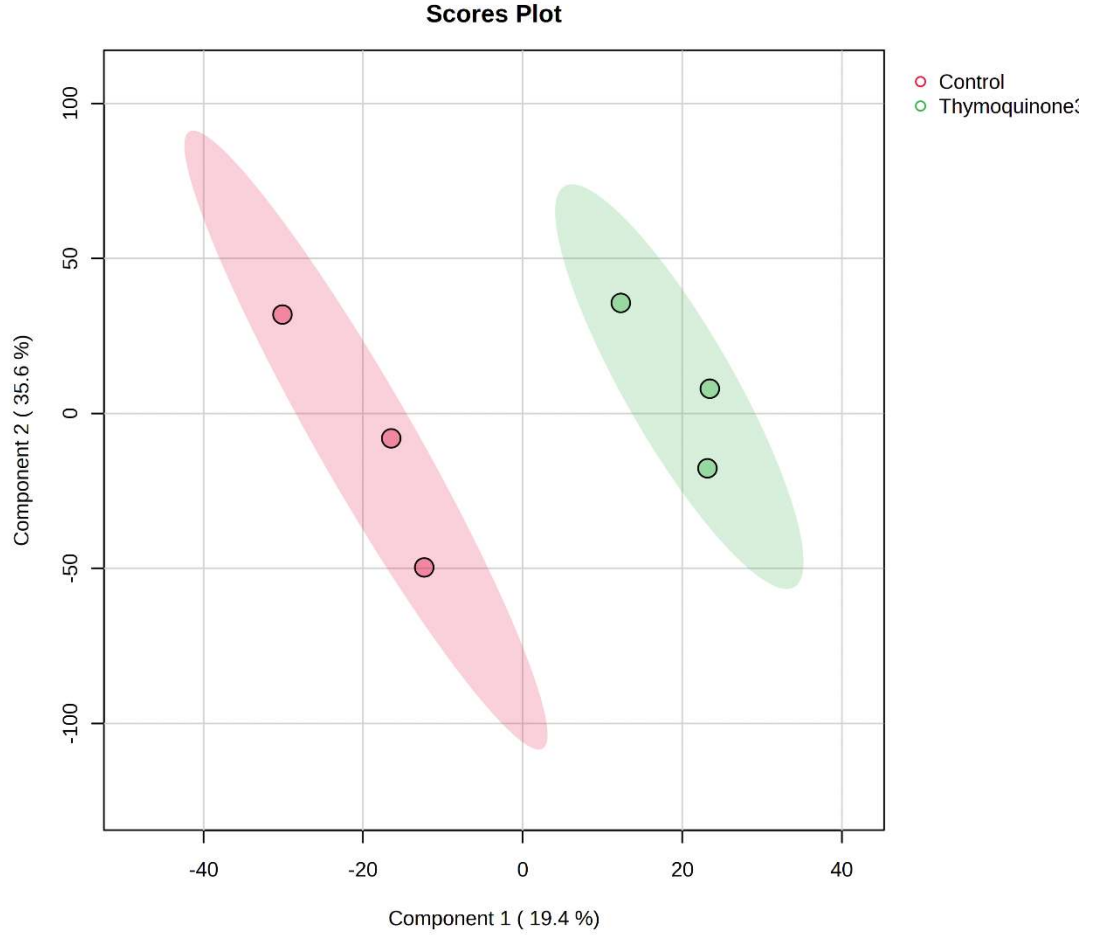
Şekil 5.33. LC-MS/MS ile pozitif iyonizasyonda analiz edilen Kontrol- TQ3 hücre metabolitlerinin PLS-DA analizi ile elde edilen 2 boyutlu görseli



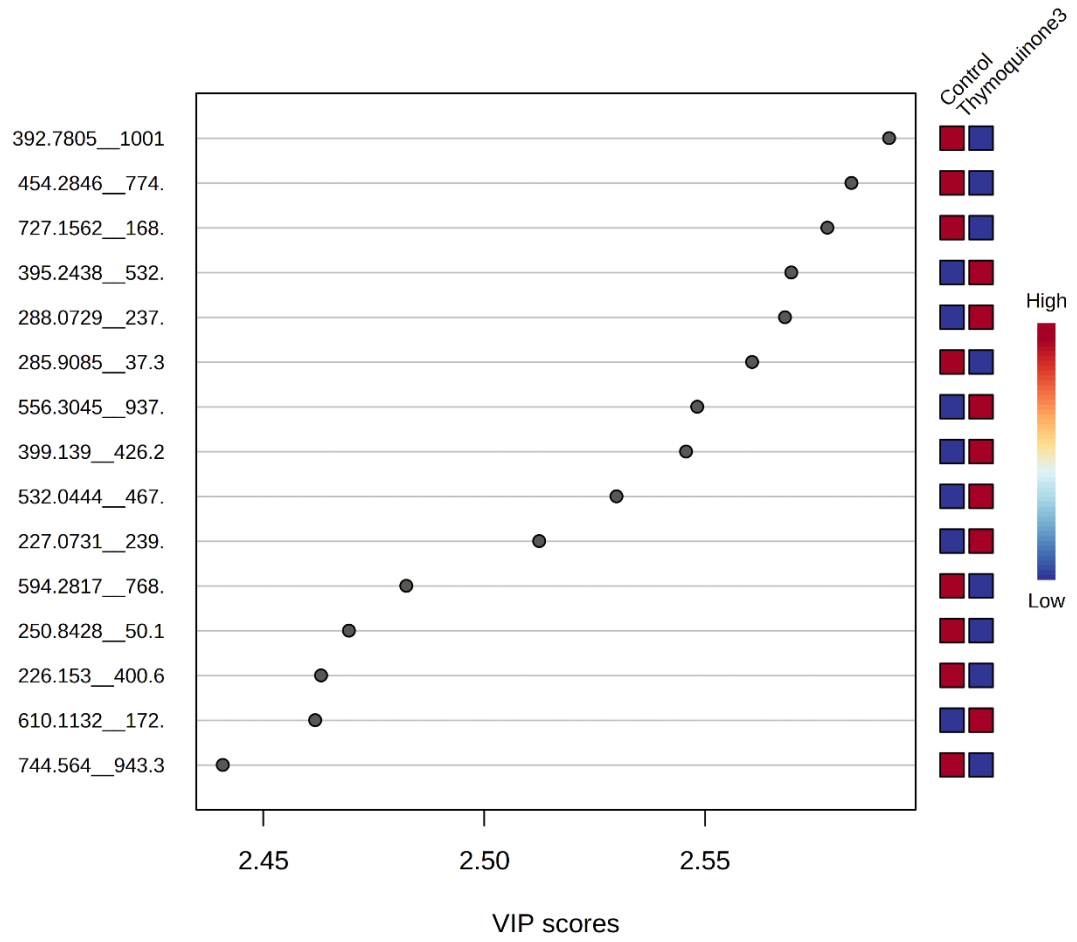
Şekil 5.34. LC-MS/MS ile pozitif iyonizasyonda analiz edilen Kontrol- TQ2 hücre metabolitlerinin önem sıralamasını gösteren VIP grafiği . (değişkenler m/z değerlerine göre ifade edilmiştir).



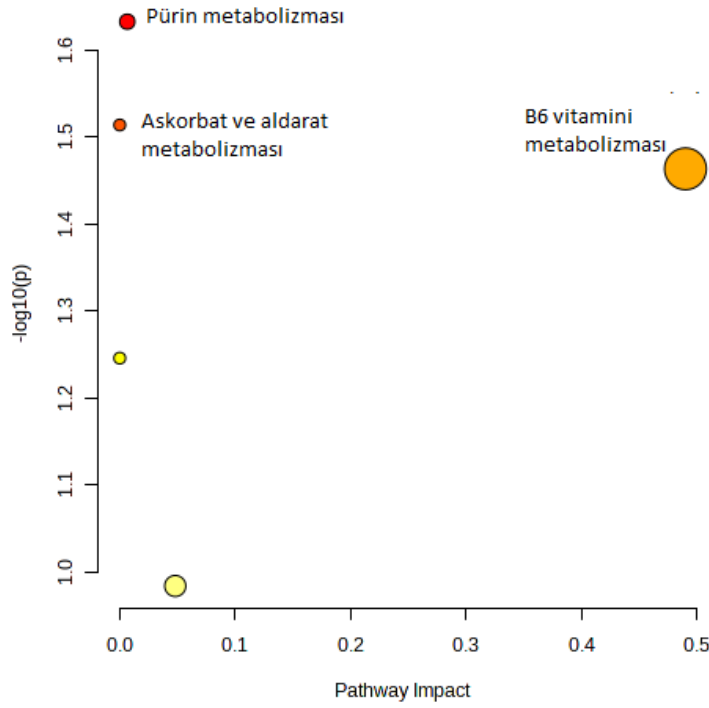
Şekil 5.35. LC-MS/MS ile negatif iyonizasyonda analiz edilen Kontrol- TQ3 hücre metabolitleriyle oluşturulmuş volkan grafiği. $p \leq 0.05$ ve kat sayı (FC) eşik değeri 10.0 olarak alınmıştır. (değişkenler m/z değerlerine göre ifade edilmiştir).



Şekil 5.36. LC-MS/MS ile negatif iyonizasyonda analiz edilen Kontrol- TQ3 hücre metabolitlerinin PLS-DA analizi ile elde edilen 2 boyutlu görseli



Şekil 5.37. LC-MS/MS ile negatif iyonizasyonda analiz edilen Kontrol- TQ3 hücre metabolitlerinin önem sıralamasını gösteren VIP grafiği . (değişkenler m/z değerlerine göre ifade edilmiştir).



Şekil 5.38. Kontrol-TQ3 karşılaştırmasına ait LC-HRMS fonksiyonel analiz zenginleştirme testi (enrichment test) sonuç gösterimi.

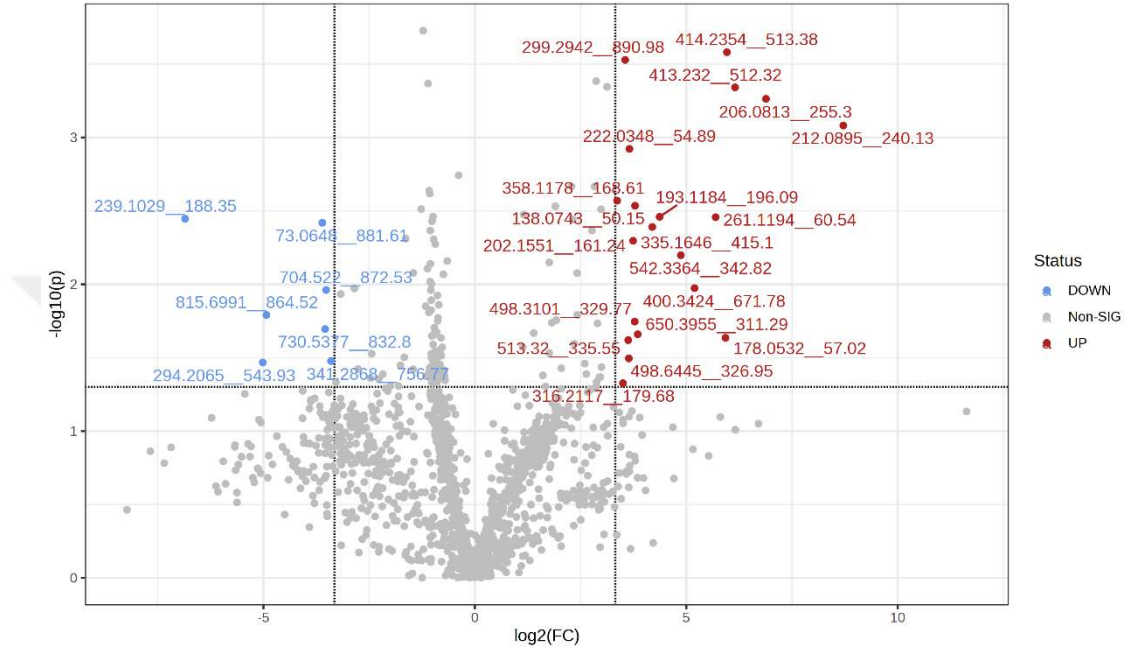
Yolak	Toplam bileşen	Eşleşen metabolit sayısı	Eşlenen metabolit	p	Etki
Purine metabolism	65	2	Adenosine, Adenine	0.023294	0.00652
Ascorbate and aldarate metabolism	8	1	D-Glucarate	0.03062	0
Vitamin B6 metabolism	9	1	Pyridoxal	0.034392	0.4902

Tablo 5.1. TQ3 grubunda kontrole göre anlamlı bulunan yolak analizi sonuçları (MetaboAnalyst v.5.0, KEGG veritabanı, yolak analizi).

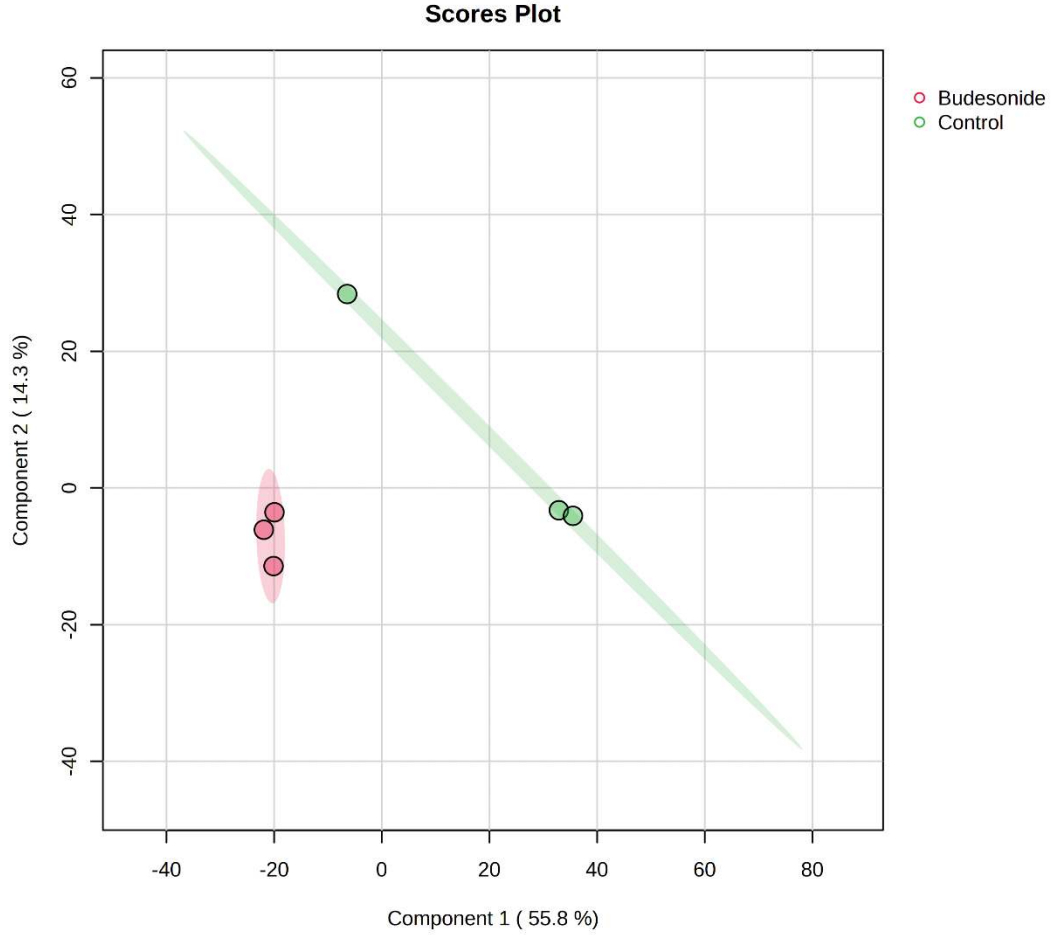
5.6.3. Kontrol-Budesonid

NMR analiziyle budesonid etkisinin incelenmesi yapılamadı. LC-MS/MS ile pozitif iyonizasyonda analiz edilen Kontrol-Budesonid gruplarının hücre metabolitleriyle oluşturulan grafikler aşağıdaki gibidir.

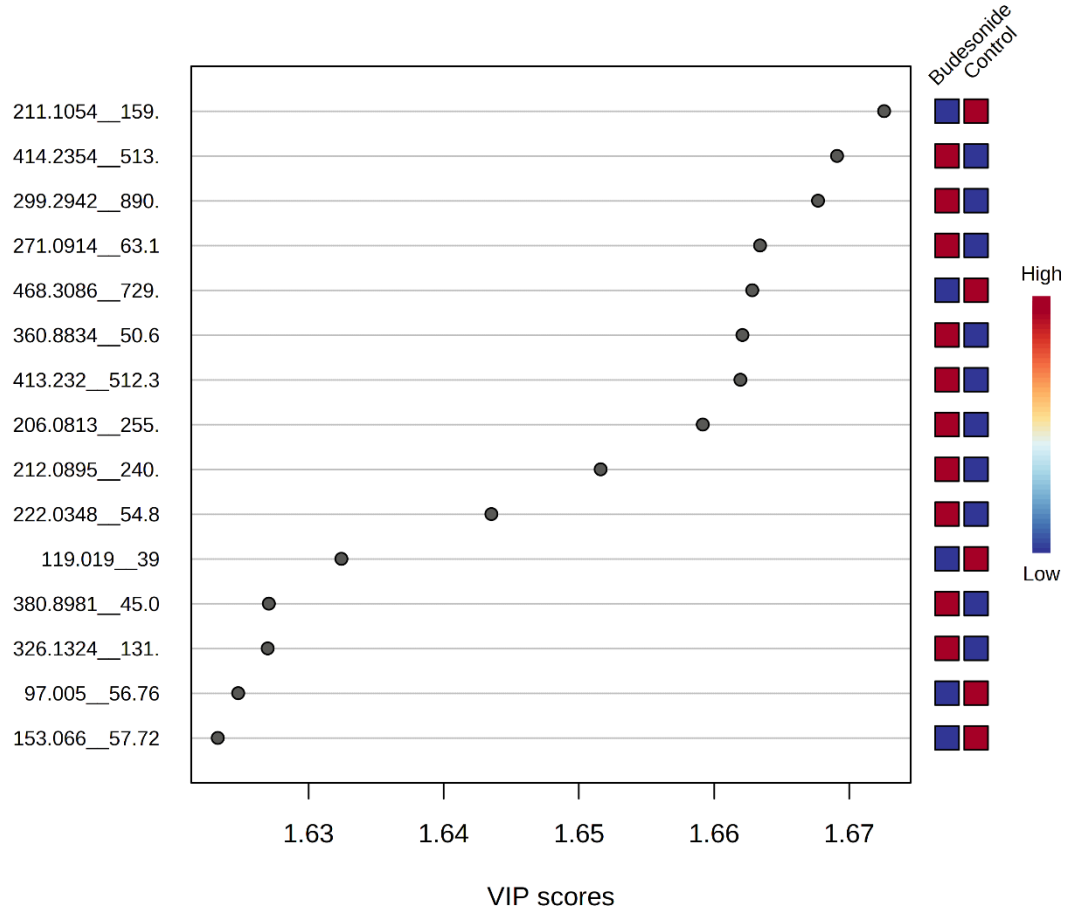
Yine m/z oranına göre metabolitlerin karşılığı bulunarak Metaboanalyste 5.0 programına yüklendi ve yolak analizi yapıldı. Analiz sonuçlarına göre valin, lösin, izolösin sentezi, askorbat-alderat metabolizması ile vitamin B6 metabolizması anlamlı derecede etkilenmiş bulundu (şekil 5.45.)



Şekil 5.39. LC-MS/MS ile pozitif iyonizasyonda analiz edilen Kontrol-Budesonid hücre metabolitleriyle oluşturulmuş volkan grafiği. $p \leq 0.05$ ve kat sayı (FC) eşik değeri 10.0 olarak alınmıştır. (değişkenler m/z değerlerine göre ifade edilmiştir).

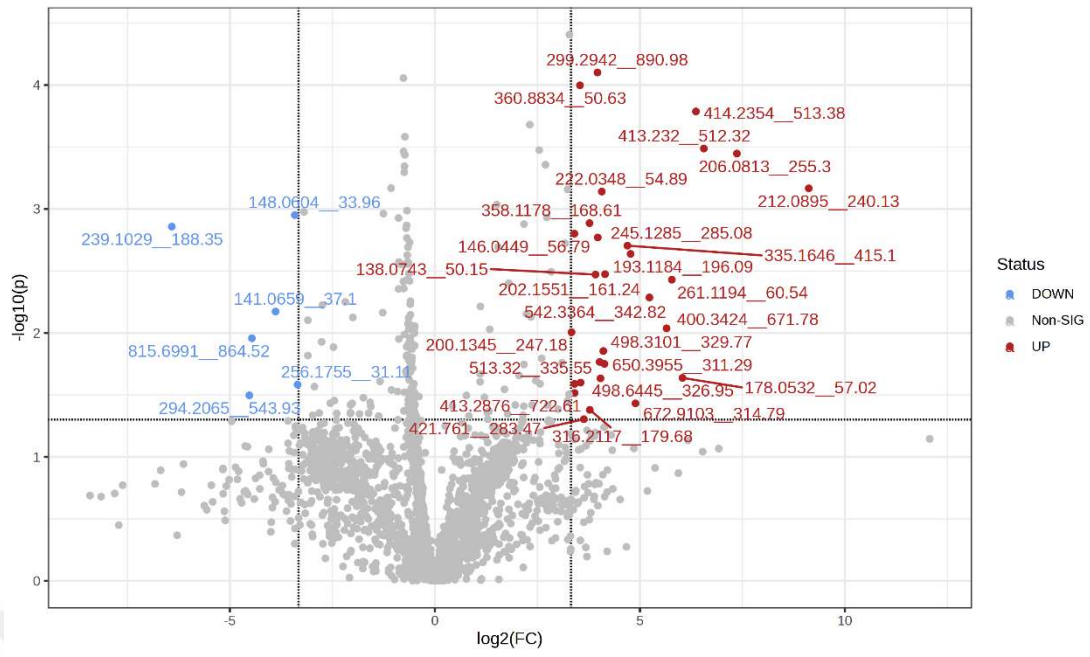


Şekil 5.40. LC-MS/MS ile pozitif iyonizasyonda analiz edilen Kontrol- Budesonid hücre metabolitlerinin PLS-DA analizi ile elde edilen 2 boyutlu görseli

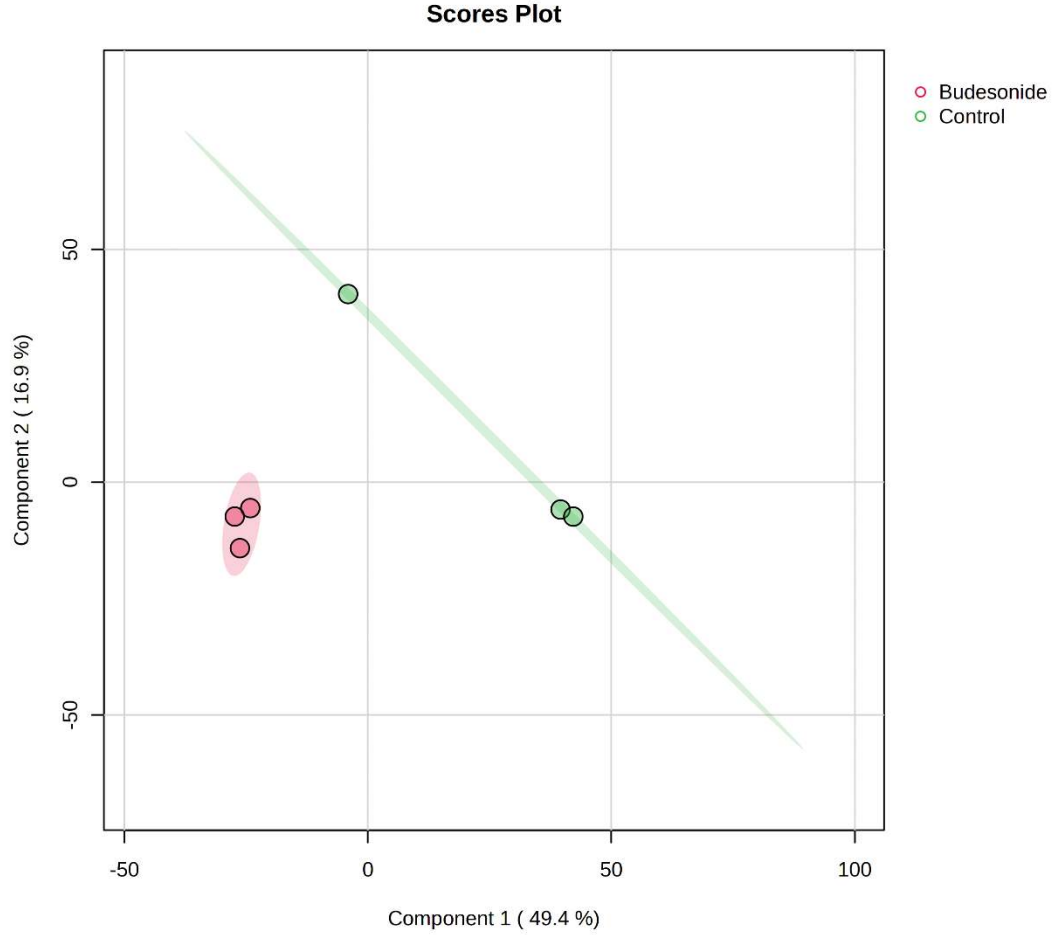


Şekil 5.41. LC-MS/MS ile pozitif iyonizasyonda analiz edilen Kontrol- Budesonid hücre metabolitlerinin önem sıralamasını gösteren VIP grafiği . (değişkenler m/z değerlerine göre ifade edilmiştir).

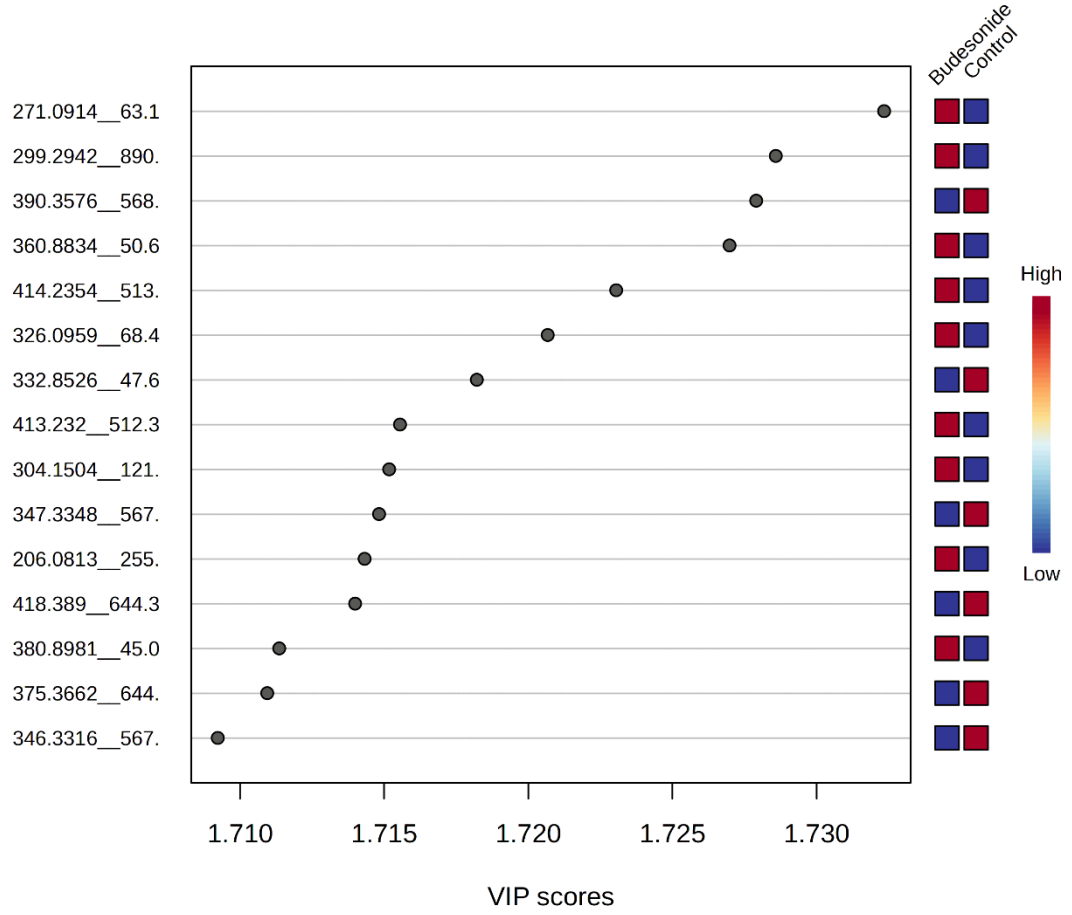
LC-MS/MS ile negatif iyonizasyonda analiz edilen Kontrol-Budesonid gruplarının hücre metabolitleriyle oluşturulan grafikler aşağıdaki gibidir.



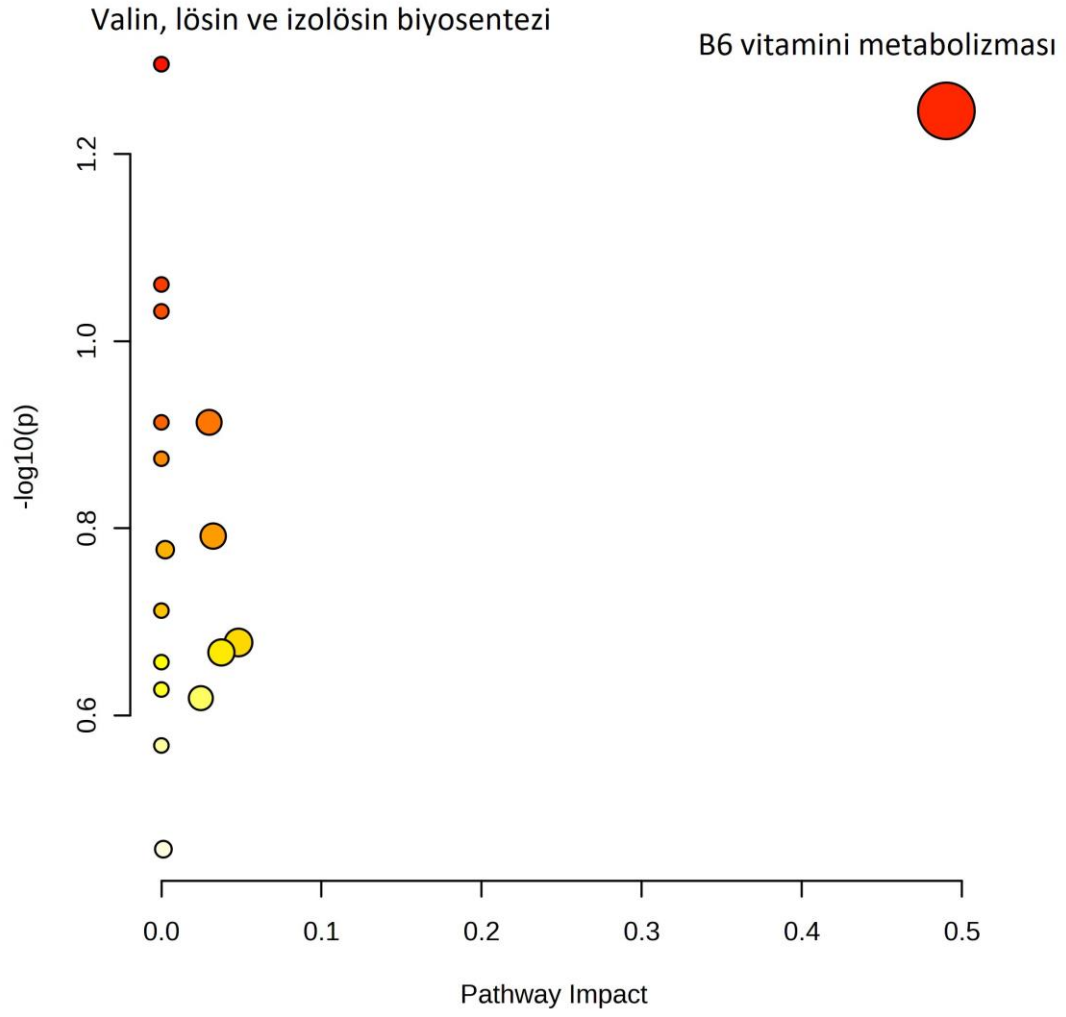
Şekil 5.42. LC-MS/MS ile negatif iyonizasyonda analiz edilen Kontrol-Budesonid hücre metabolitleriyle oluşturulmuş volkan grafiği. $p \leq 0.05$ ve kat sayı (FC) eşik değeri 10.0 olarak alınmıştır. (değişkenler m/z değerlerine göre ifade edilmiştir).



Şekil 5.43. LC-MS/MS ile negatif iyonizasyonda analiz edilen Kontrol- Budesonid hücre metabolitlerinin PLS-DA analizi ile elde edilen 2 boyutlu görseli



Şekil 5.44. LC-MS/MS ile negatif iyonizasyonda analiz edilen Kontrol- Budesonid hücre metabolitlerinin önem sıralamasını gösteren VIP grafiği . (değişkenler m/z değerlerine göre ifade edilmiştir).



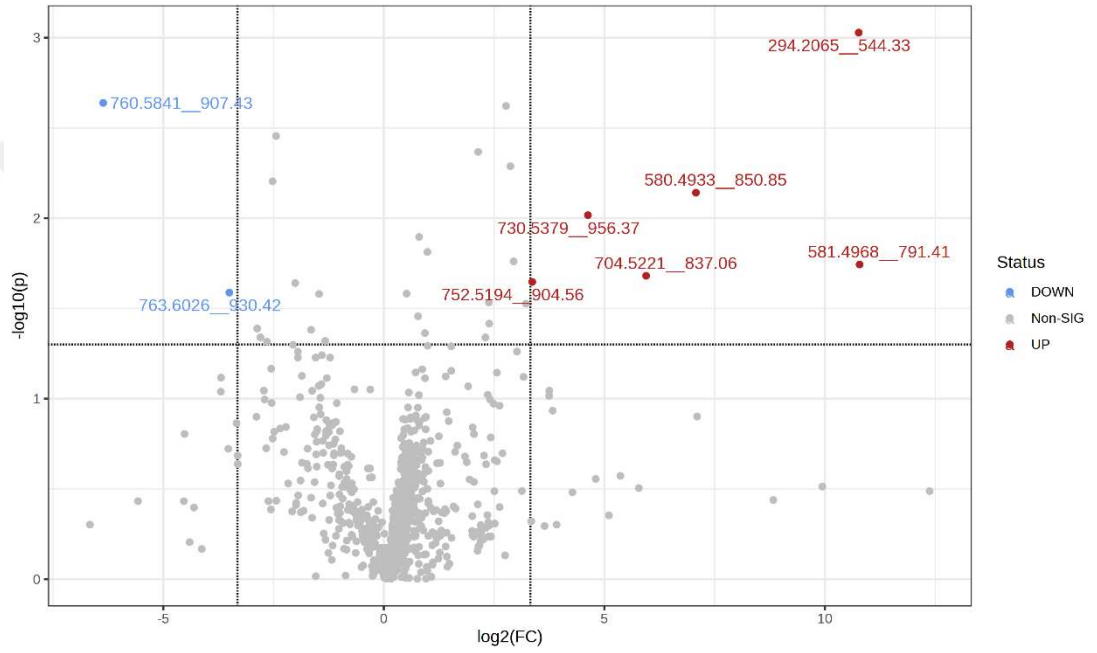
Şekil 5.45. Yol zenginleştirme analizinden alınan p değerlerine ve topoloji analizinden alınan yol etki değerlerine göre eşleşen yolları gösteren yolak dağılım grafiği. Kontrol – budesonid uygulanan hücrelerin karşılaştırması.

Yolak	Toplam bileşen	Eşleşen metabolit sayısı	Eşlenen metabolit	p	Etki
Valine leucine and isoleucine biosynthesis	8	1	L-Threonine	0.050574	0
Ascorbate and aldarate metabolism	8	1	D-Glucarate	0.050574	0
Vitamin B6 metabolism	9	1	Pyridoxal	0.056731	0.4902

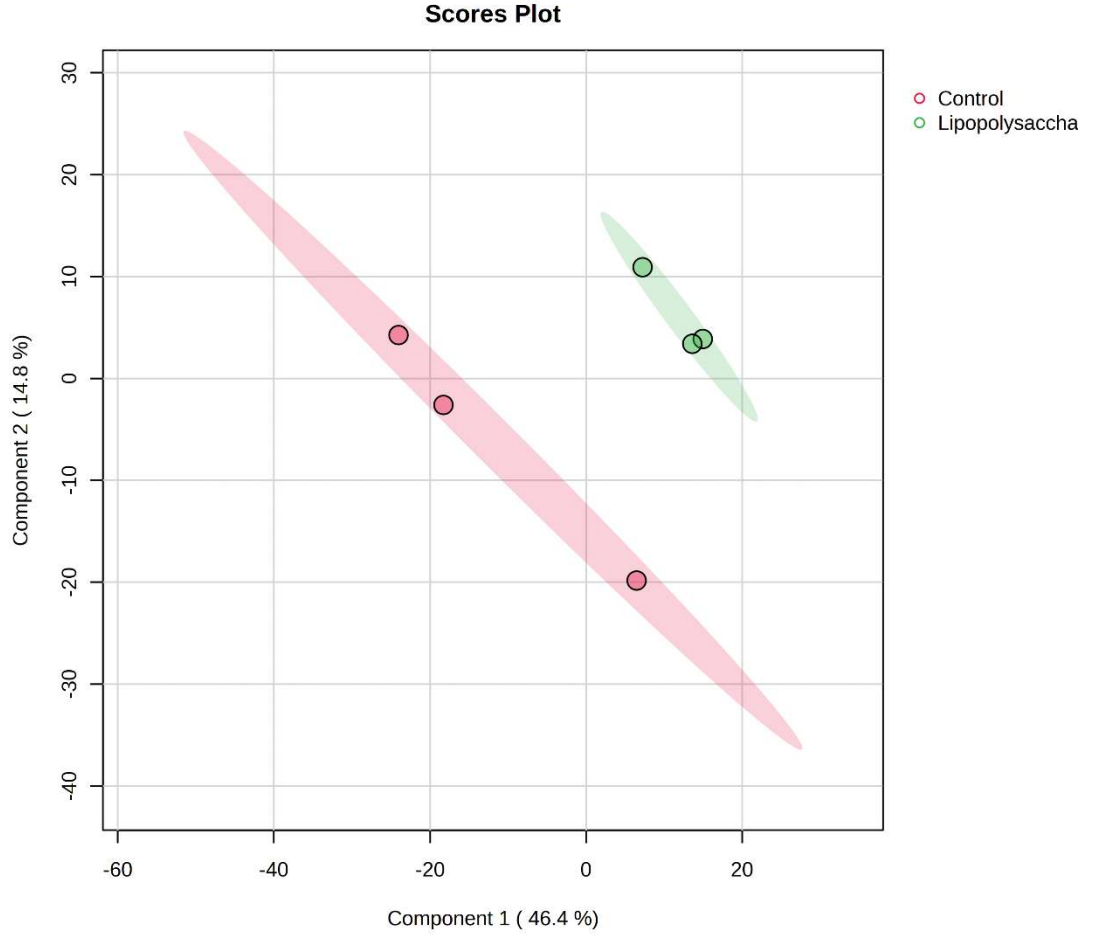
Tablo 5.2. Budesonid grubunda kontrole göre anlamlı bulunan yolak analizi sonuçları (MetaboAnalyst v.5.0, KEGG veritabanı, yolak analizi).

5.6.4. Kontrol-LPS

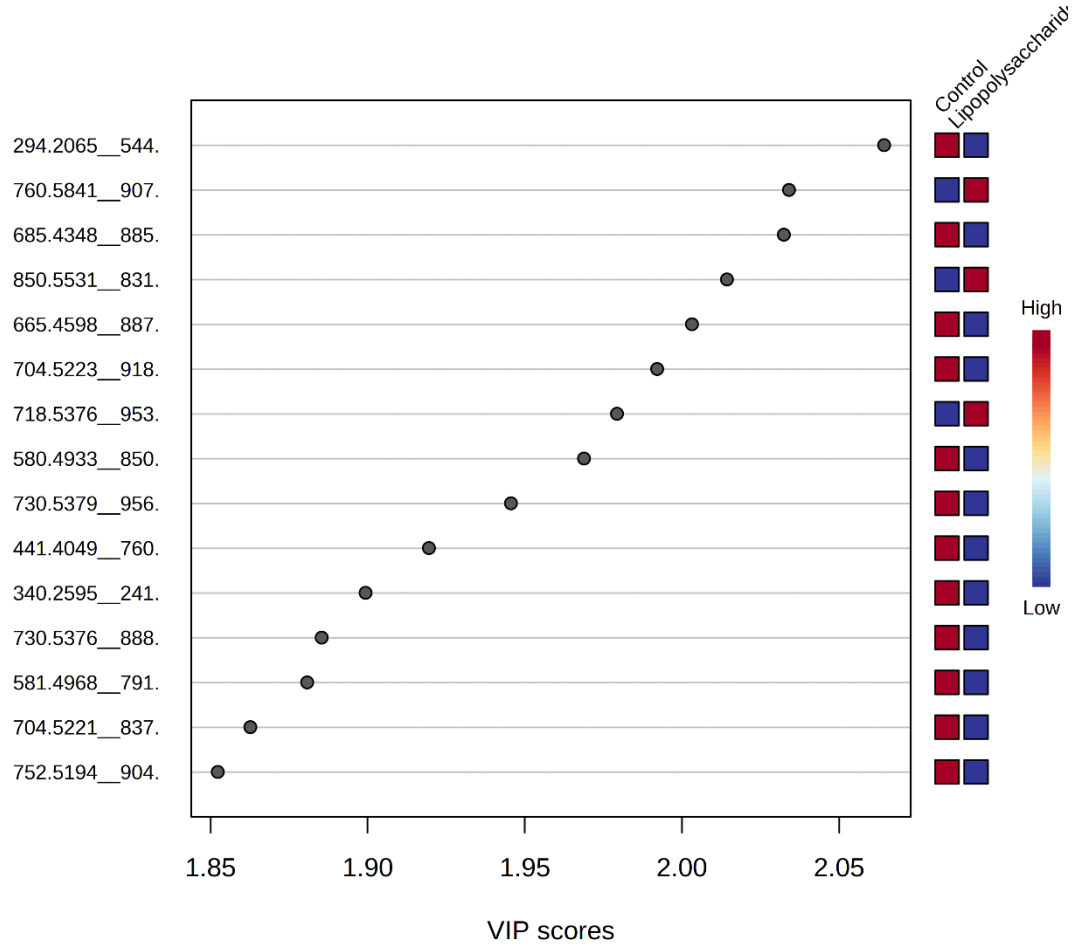
LC-MS/MS ile pozitif iyonizasyonda analiz edilen Kontrol-LPS gruplarının hücre metabolitleriyle oluşturulan grafikler aşağıdaki gibidir. MetaboAnalyst v.5.0 programını kullanarak yapılan yolak analizinde purin ve askorbat aldatat metabolizması yolakları anlamlı derecede etkilenmiş bulundu (şekil 5.52.).



Şekil 5.46. LC-MS/MS ile pozitif iyonizasyonda analiz edilen Kontrol-LPS hücre metabolitleriyle oluşturulmuş volkan grafiği. $p \leq 0.05$ ve kat sayı (FC) eşik değeri 10.0 olarak alınmıştır. (değişkenler m/z değerlerine göre ifade edilmiştir).

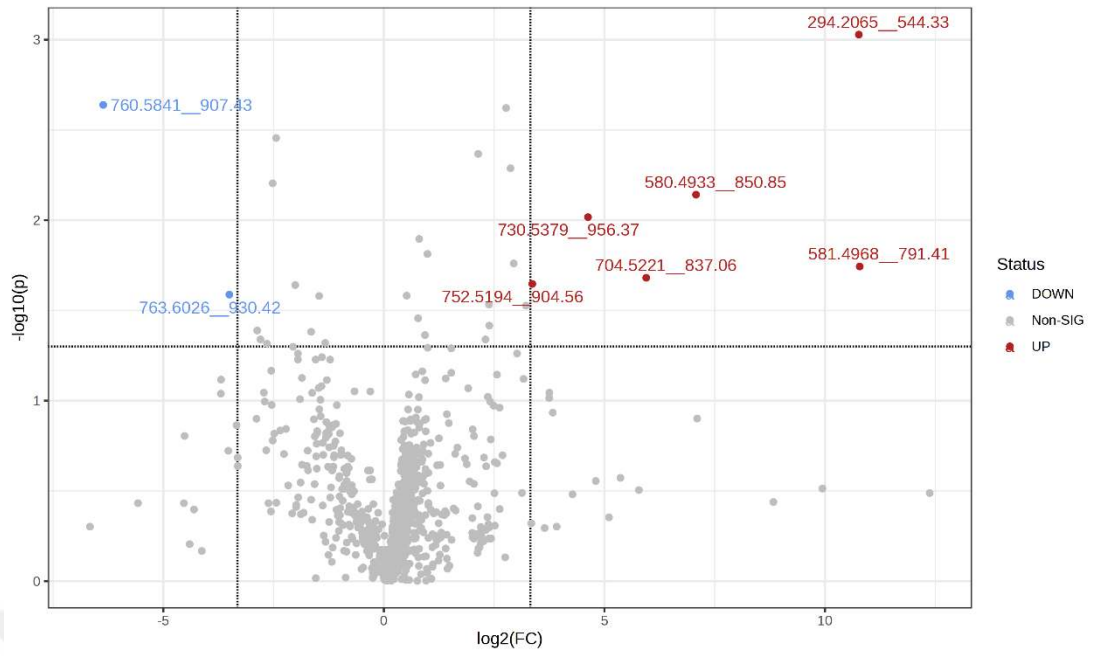


Şekil 5.47. LC-MS/MS ile pozitif iyonizasyonda analiz edilen Kontrol- LPS hücre metabolitlerinin PLS-DA analizi ile elde edilen 2 boyutlu görseli

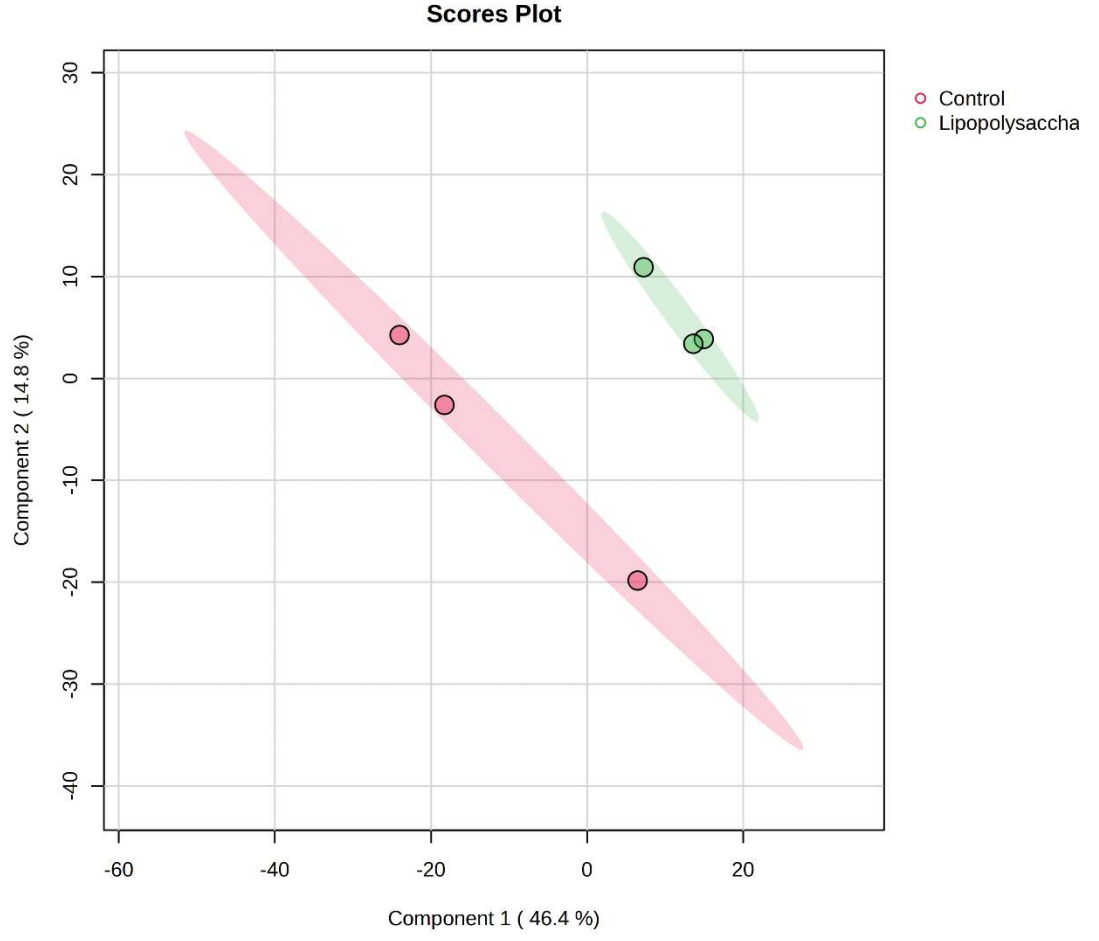


Şekil 5.48. LC-MS/MS ile pozitif iyonizasyonda analiz edilen Kontrol- LPS hücre metabolitlerinin önem sıralamasını gösteren VIP grafiği . (değişkenler m/z değerlerine göre ifade edilmiştir).

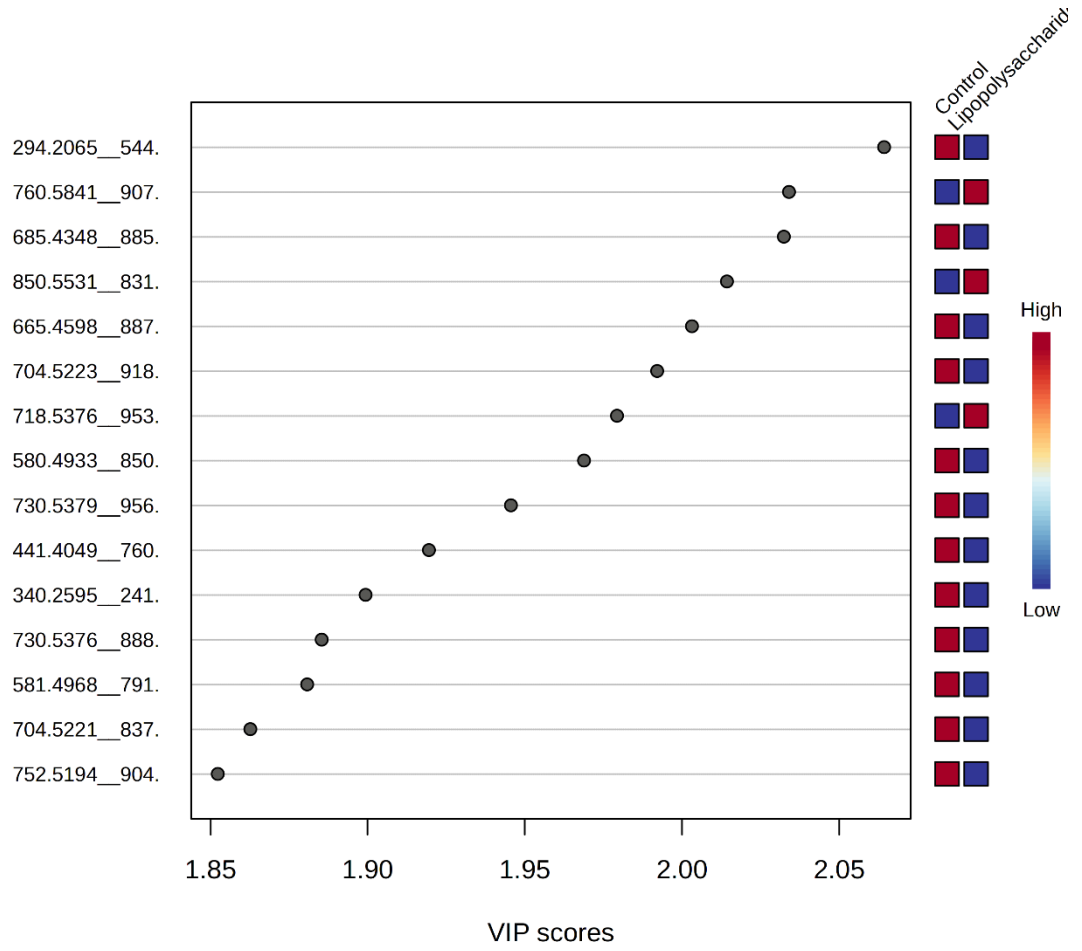
LC-MS/MS ile negatif iyonizasyonda analiz edilen Kontrol-LPS gruplarının hücre metabolitleriyle oluşturulan grafikler aşağıdaki gibidir.



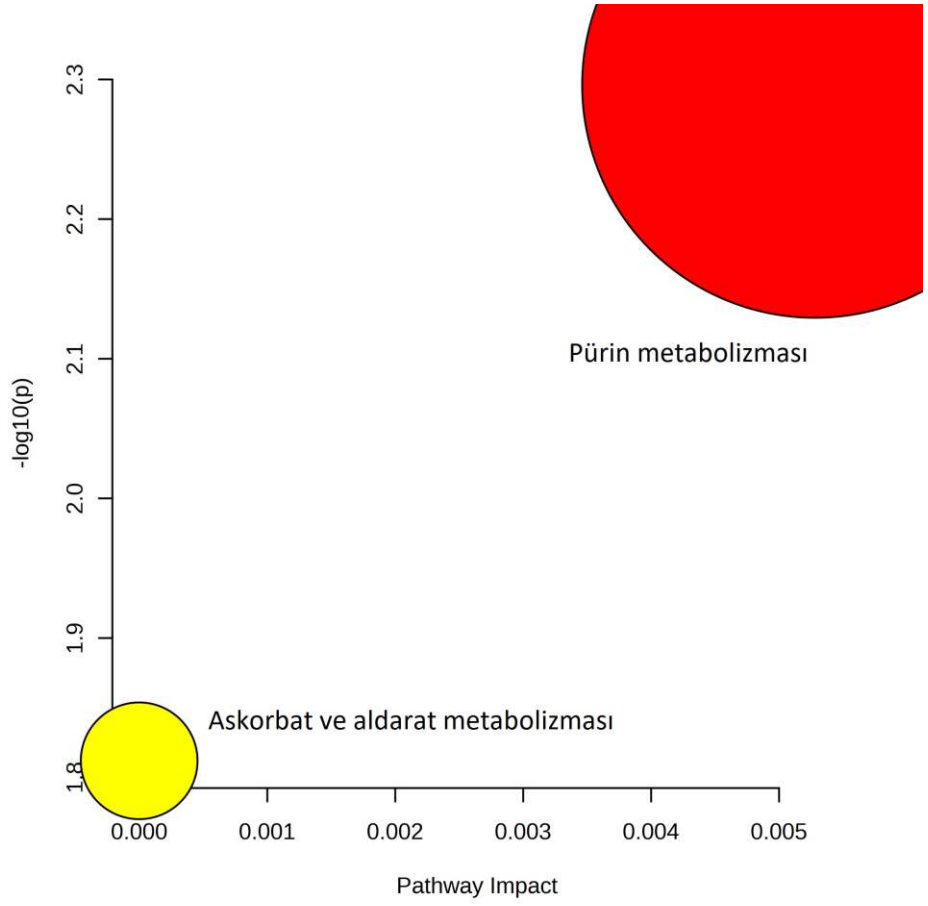
Şekil 5.49. LC-MS/MS ile negatif iyonizasyonda analiz edilen Kontrol-LPS hücre metabolitleriyle oluşturulmuş volkan grafiği. $p \leq 0.05$ ve kat sayısı (FC) eşik değeri 10.0 olarak alınmıştır. (değişkenler m/z değerlerine göre ifade edilmiştir).



Şekil 5.50. LC-MS/MS ile negatif iyonizasyonda analiz edilen Kontrol-LPS hücre metabolitlerinin PLS-DA analizi ile elde edilen 2 boyutlu görseli



Şekil 5.51. LC-MS/MS ile negatif iyonizasyonda analiz edilen Kontrol-LPS hücre metabolitlerinin önem sıralamasını gösteren VIP grafiği . (değişkenler m/z değerlerine göre ifade edilmiştir).



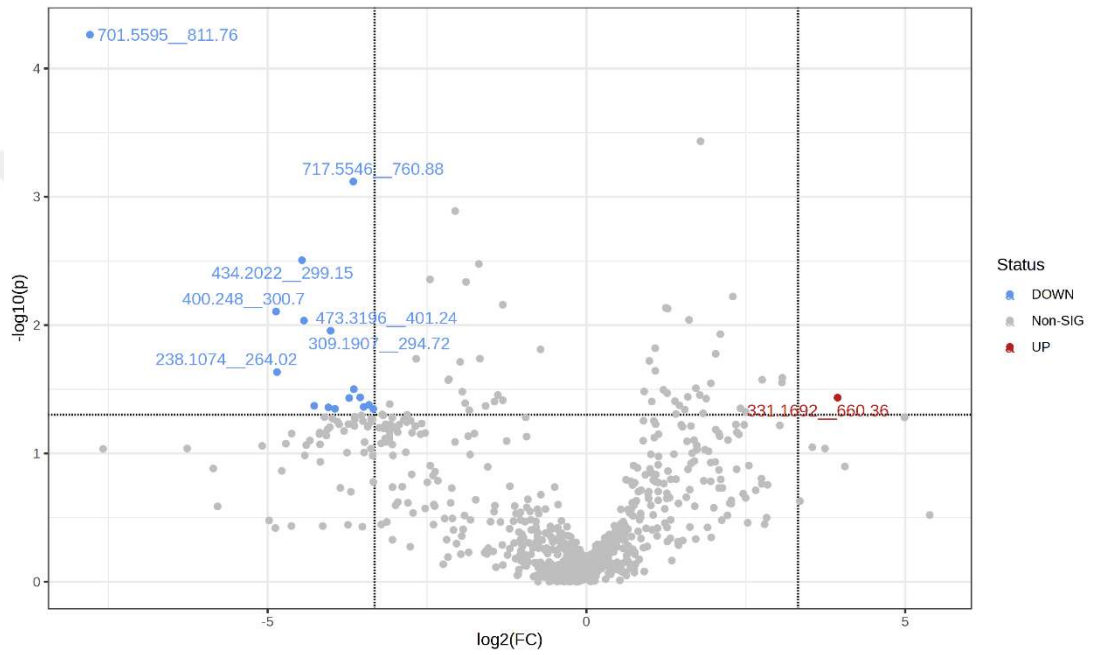
Şekil 5.52. Yol zenginleştirme analizinden alınan p değerlerine ve topoloji analizinden alınan yol etki değerlerine göre eşleşen yolları gösteren yolak dağılım grafiği. Kontrol – LPS uygulanan hücrelerin karşılaştırması.

	Toplam bileşen	Eşleşen metabolit sayısı	Raw p	Eşlenen metabolit	Impact
Purine metabolism	65	2	0.0050569	Xanthosine; Adenine	0.00528
Ascorbate and aldarate metabolism	8	1	0.015414	D-Glucarate	0

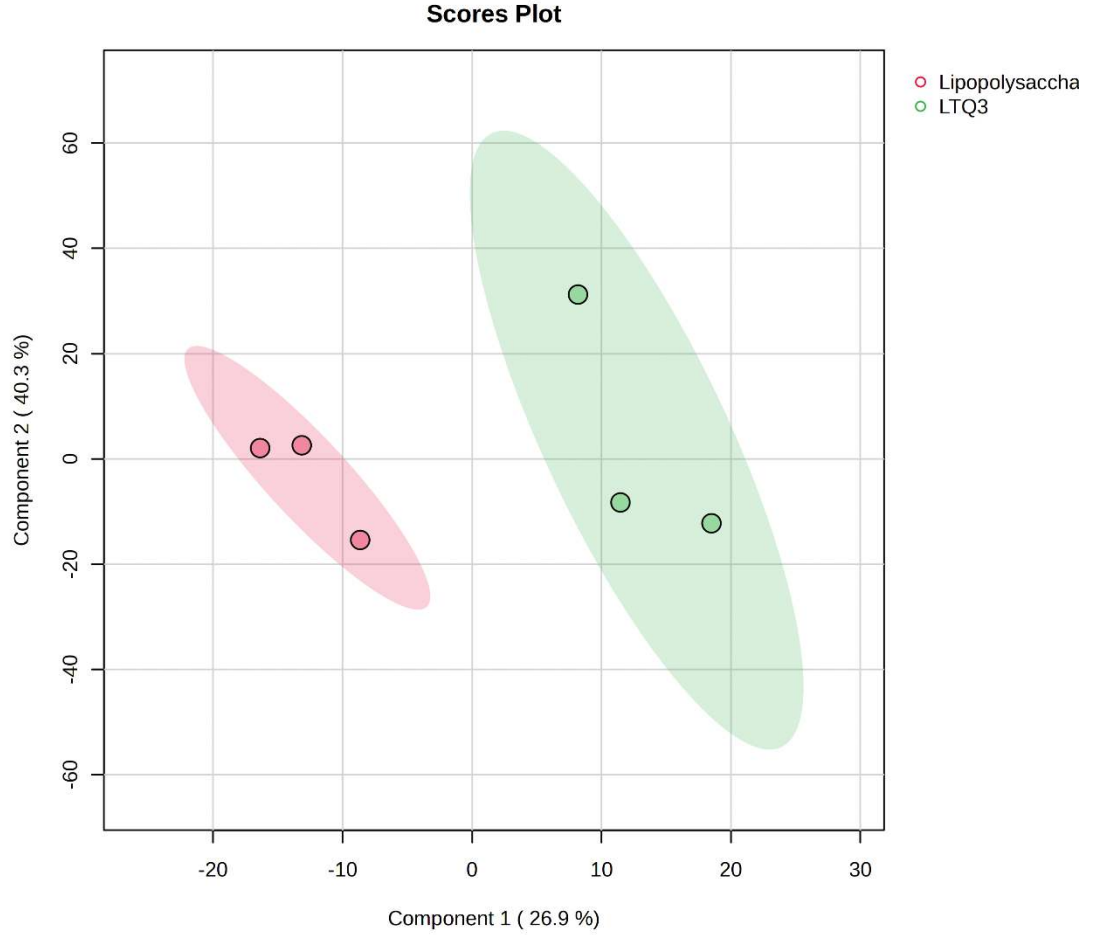
Tablo 5.3. LPS grubunda kontrole göre anlamlı bulunan yolak analizi sonuçları (MetaboAnalyst v.5.0, KEGG veritabanı, yolak analizi).

5.6.5. LPS+TQ – LPS

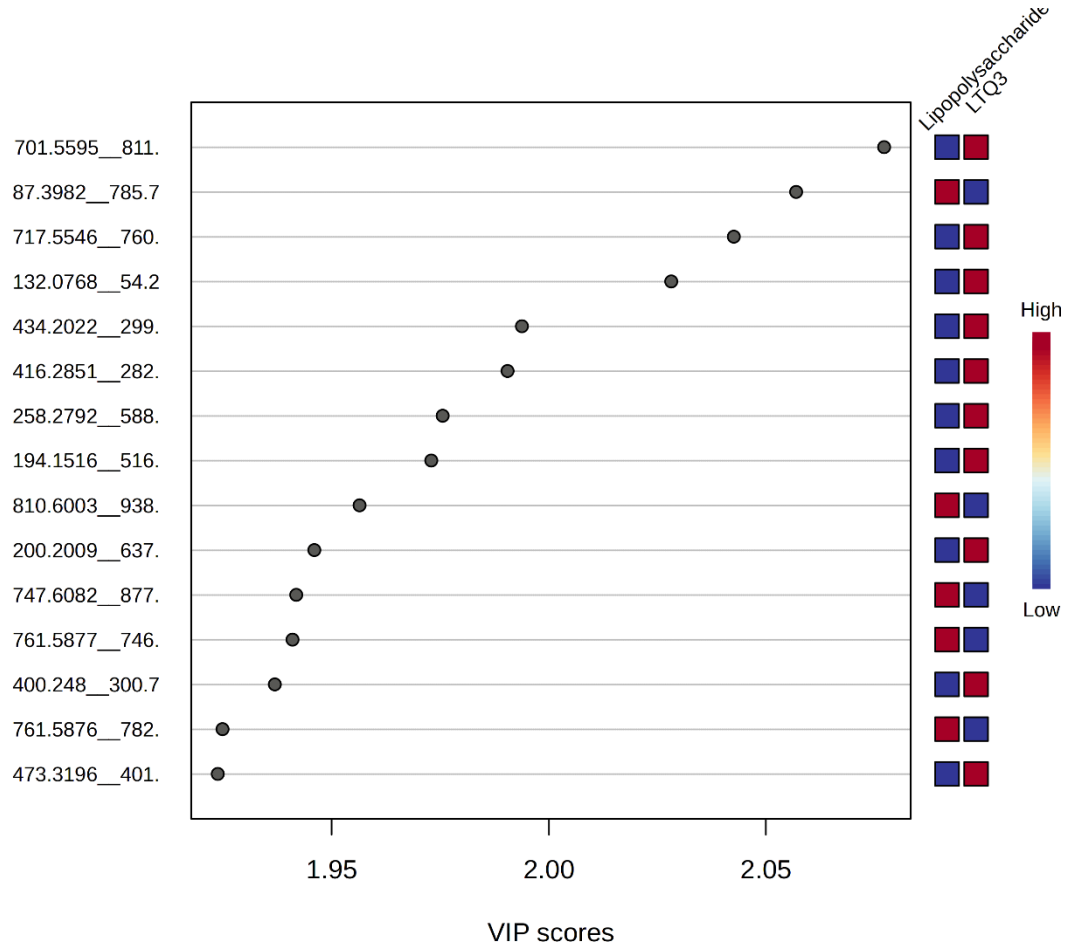
LC-MS/MS ile pozitif iyonizasyonda analiz edilen LPS+TQ – LPS gruplarının hücre metabolitleriyle oluşturulan grafikler aşağıdaki gibidir. MetaboAnalyst v.5.0 programı kullanılarak m/z oranına karşılık gelen metabolitlerle yolak analizi yapıldı. Nikotinat-nikotinamid ve eter-lipid metabolizması yolakları anlamlı derecede etkilenmiş bulundu (şekil 5.59.).



Şekil 5.53. LC-MS/MS ile pozitif iyonizasyonda analiz edilen LPS+TQ – LPS hücre metabolitleriyle oluşturulmuş volkan grafiği. $p \leq 0.05$ ve kat sayı (FC) eşik değeri 10.0 olarak alınmıştır. (değişkenler m/z değerlerine göre ifade edilmiştir).

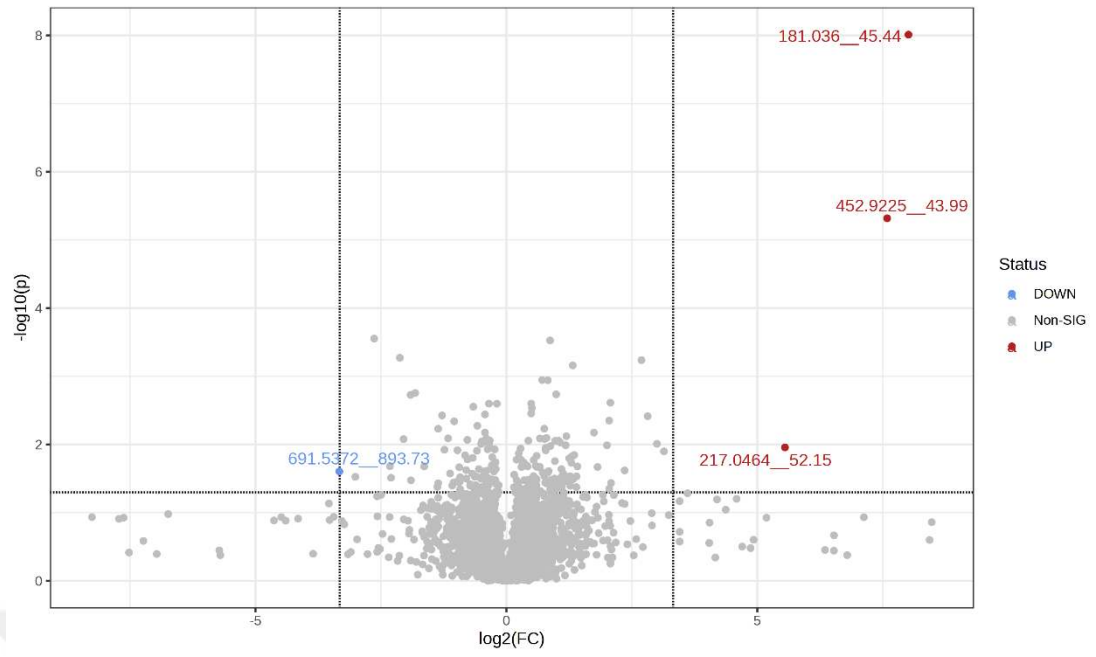


Şekil 5.54. LC-MS/MS ile pozitif iyonizasyonda analiz edilen LPS+TQ – LPS hücre metabolitlerinin PLS-DA analizi ile elde edilen 2 boyutlu görseli

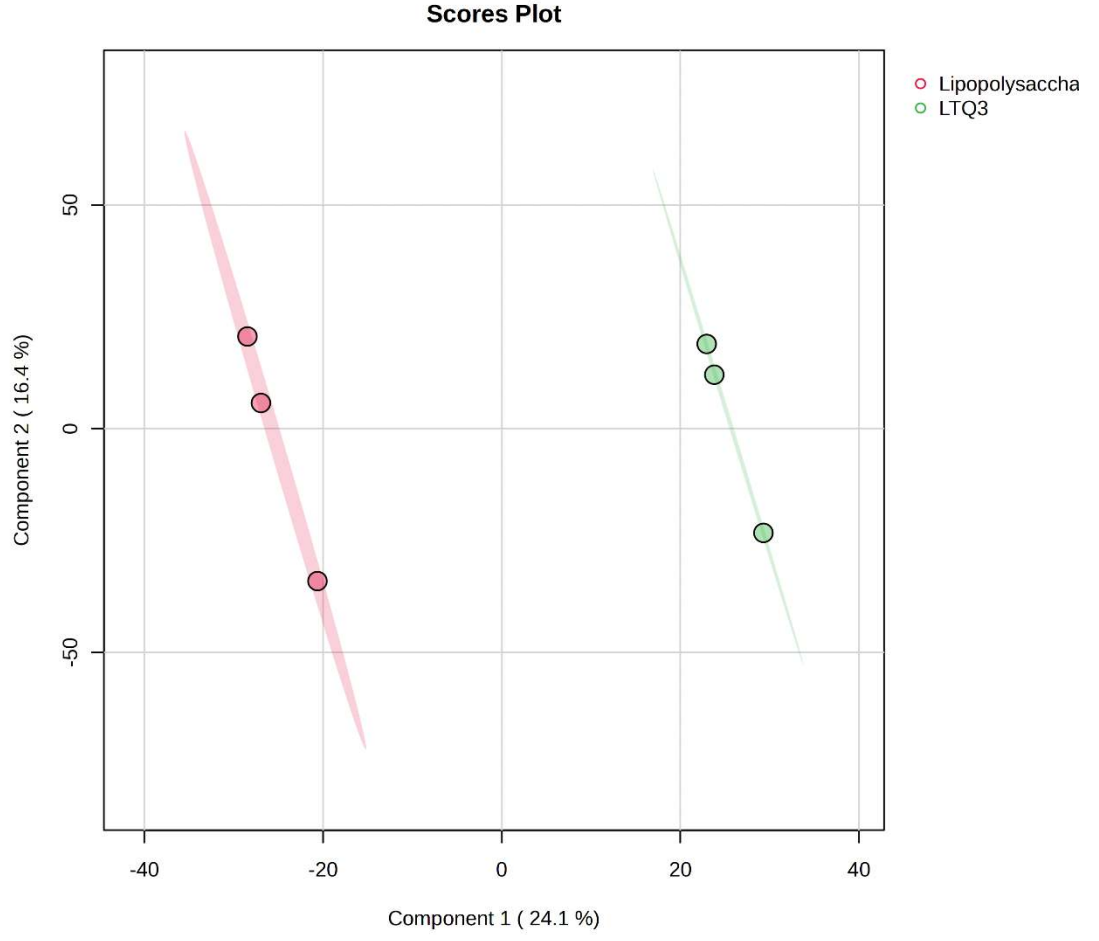


Şekil 5.55. LC-MS/MS ile pozitif iyonizasyonda analiz edilen LPS+TQ – LPS hücre metabolitlerinin önem sıralamasını gösteren VIP grafiği . (değişkenler m/z değerlerine göre ifade edilmiştir).

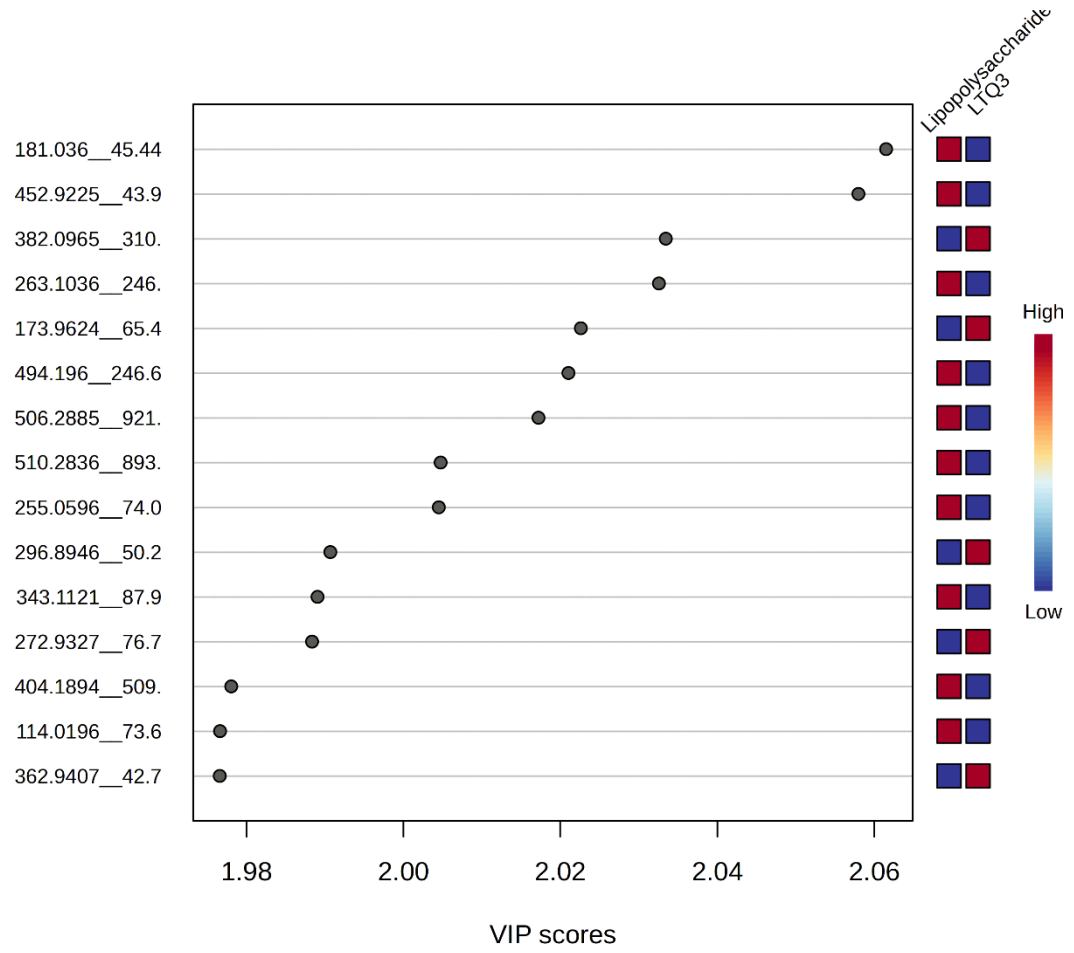
LC-MS/MS ile negatif iyonizasyonda analiz edilen LPS+TQ – LPS gruplarının hücre metabolitleriyle oluşturulan grafikler aşağıdaki gibidir.



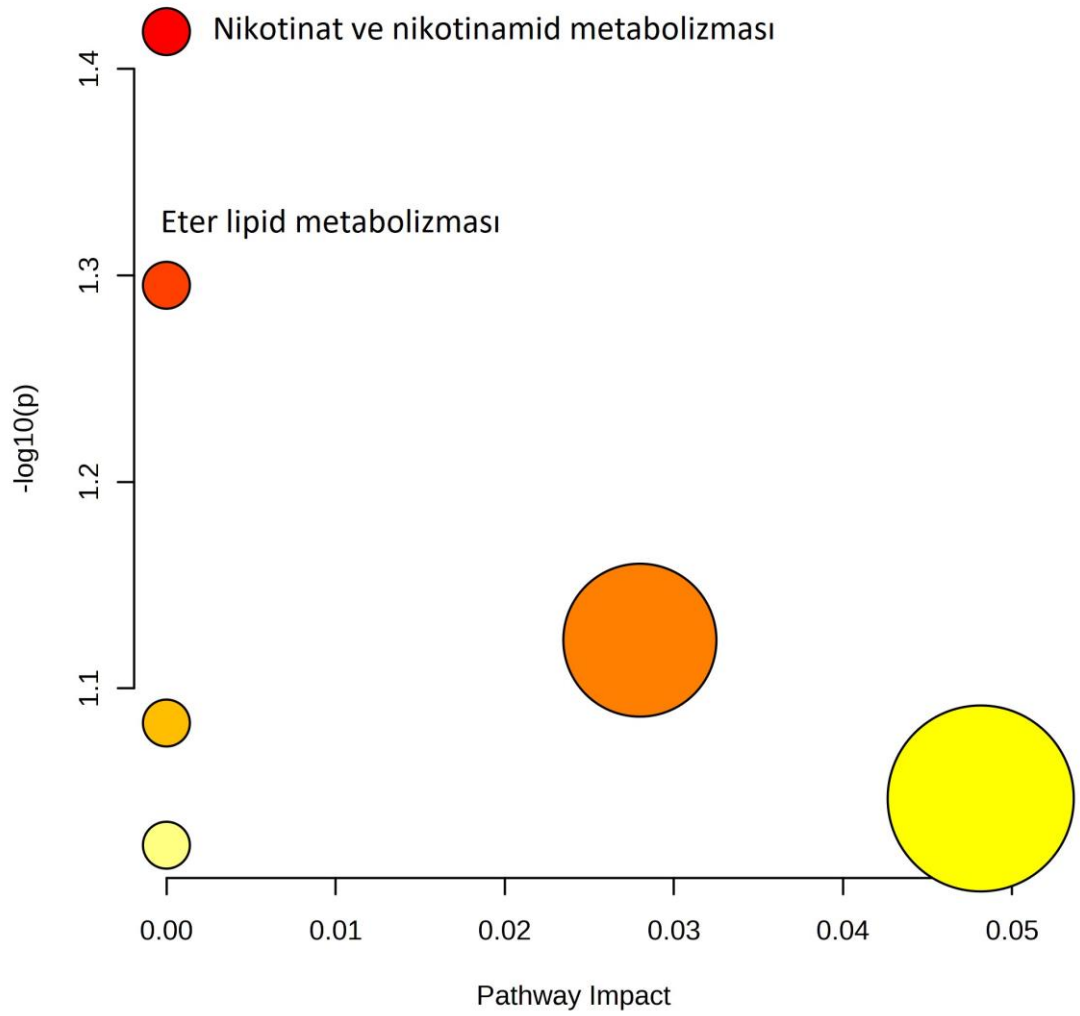
Şekil 5.56. LC-MS/MS ile negatif iyonizasyonda analiz edilen LPS+TQ – LPS hücre metabolitleriyle oluşturulmuş volkan grafiği. $p \leq 0.05$ ve kat sayı (FC) eşik değeri 10.0 olarak alınmıştır. (değişkenler m/z değerlerine göre ifade edilmiştir).



Şekil 5.57. LC-MS/MS ile negatif iyonizasyonda analiz edilen LPS+TQ – LPS hücre metabolitlerinin PLS-DA analizi ile elde edilen 2 boyutlu görseli



Şekil 5.58. LC-MS/MS ile negatif iyonizasyonda analiz edilen LPS+TQ – LPS hücre metabolitlerinin önem sıralamasını gösteren VIP grafiği . (değişkenler m/z değerlerine göre ifade edilmiştir).



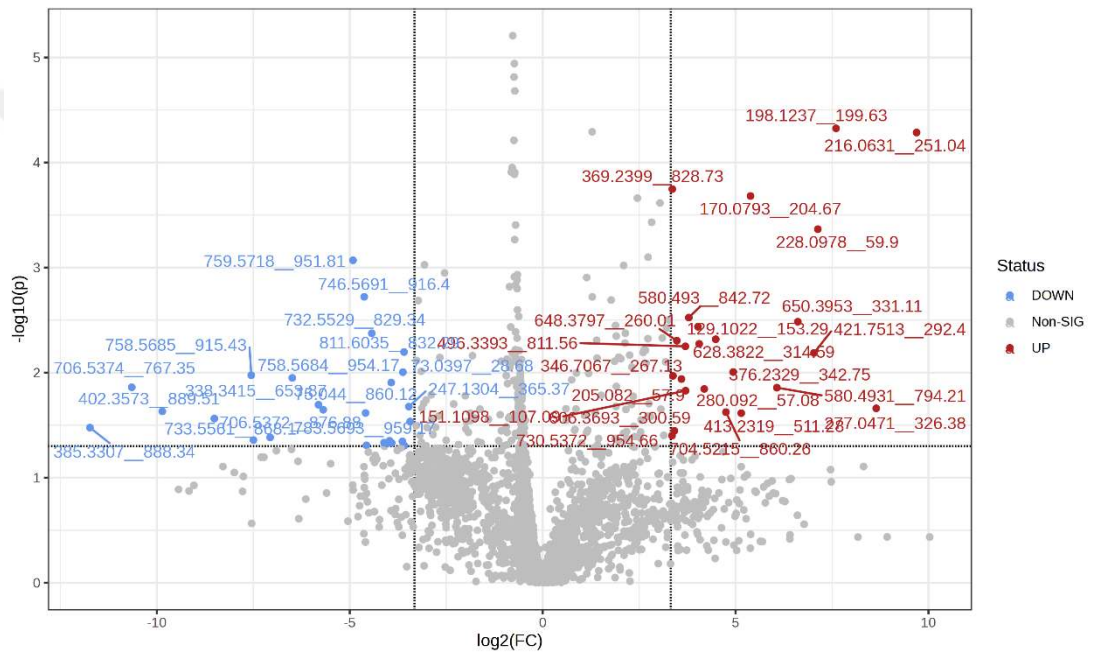
Şekil 5.59. Yol zenginleştirme analizinden alınan p değerlerine ve topoloji analizinden alınan yol etki değerlerine göre eşleşen yolları gösteren yolak dağılım grafiği. LPS+TQ – LPS gruplarının karşılaştırması.

YOLAK	Toplam bileşen	Eşleşen metabolit sayısı	Eşleşen metabolit	Raw p	Impact
Nicotinate and nicotinamide metabolism	15	1	Nicotinate	0.038188	0
Ether lipid metabolism	20	1	sn-Glycero-3- phosphocholine	0.050671	0

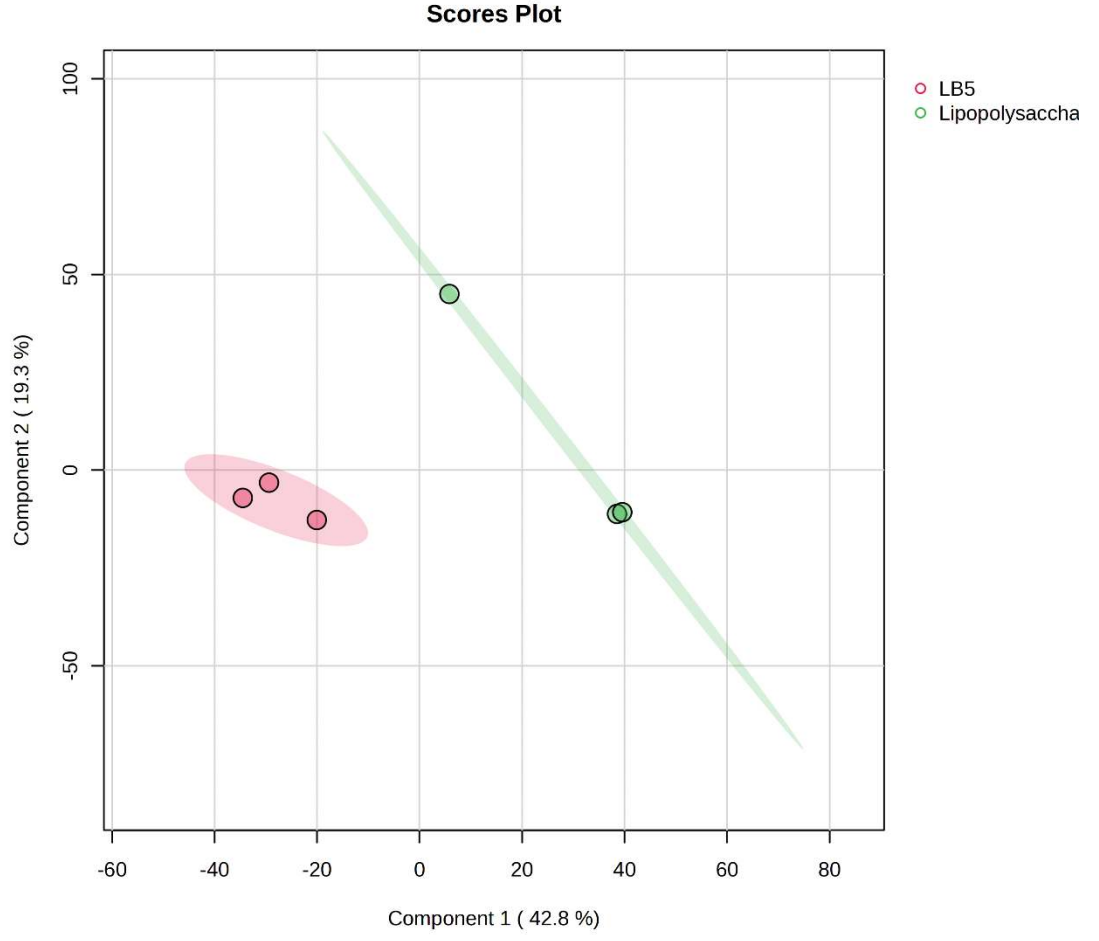
Tablo 5.4. LPS+TQ grubunda LPS grubuna göre anlamlı bulunan yolak analizi sonuçları (MetaboAnalyst v.5.0, KEGG veritabanı, yolak analizi).

5.6.6. LPS+Budesonid- LPS

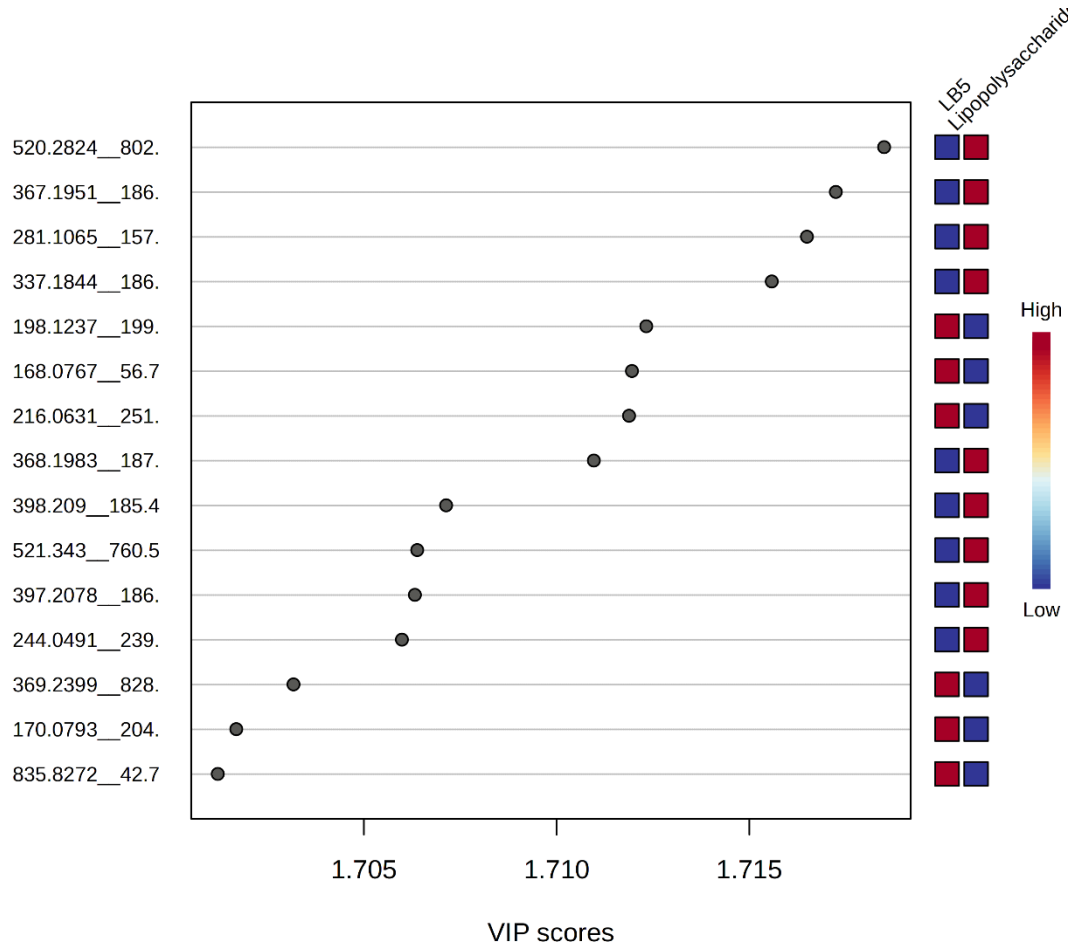
LC-MS/MS ile pozitif iyonizasyonda analiz edilen LPS+Budesonid- LPS gruplarının hücre metabolitleriyle oluşturulan grafikler aşağıdaki gibidir. MetaboAnalyst v.5.0 programı kullanılarak m/z oranına karşılık gelen metabolitlerin yolak analizi yapıldı. Butonat, nikotinat-nikotinamid ve eter-lipid metabolizması ile sitrat siklusu yolağının anlamlı derecede etkilendiği bulundu (şekil 5.66.).



Şekil 5.60. LC-MS/MS ile pozitif iyonizasyonda analiz edilen LPS+Budesonid- LPS hücre metabolitleriyle oluşturulmuş volkan grafiği. $p \leq 0.05$ ve kat sayısı (FC) eşik değeri 10.0 olarak alınmıştır. (değişkenler m/z değerlerine göre ifade edilmiştir).

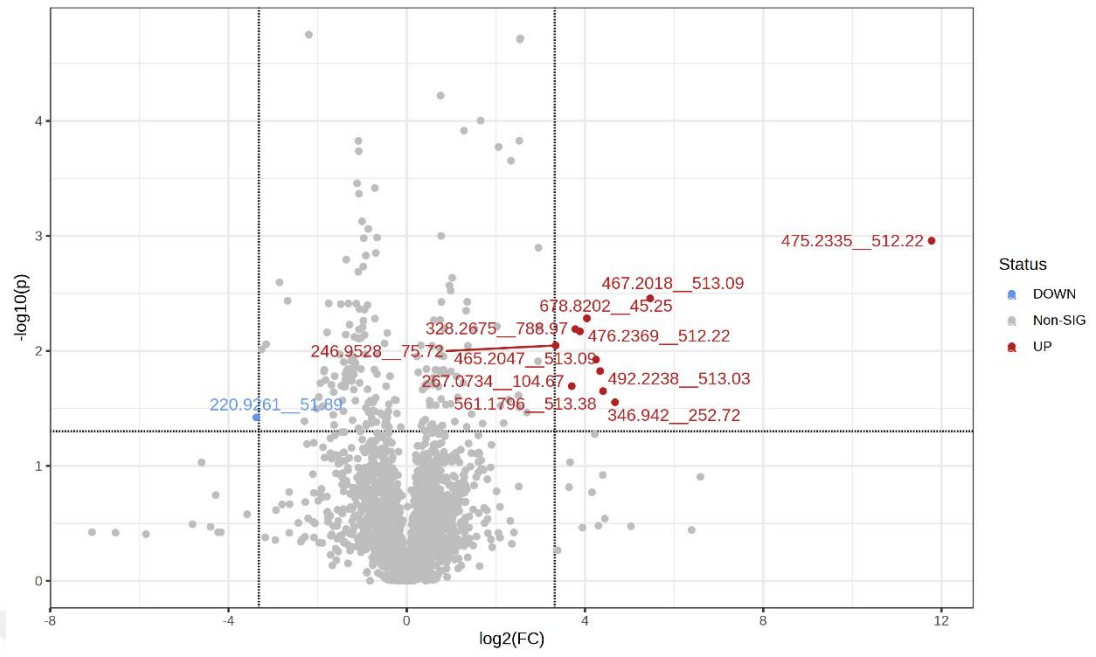


Şekil 5.61. LC-MS/MS ile pozitif iyonizasyonda analiz edilen LPS+Budesonid- LPS hücre metabolitlerinin PLS-DA analizi ile elde edilen 2 boyutlu görseli

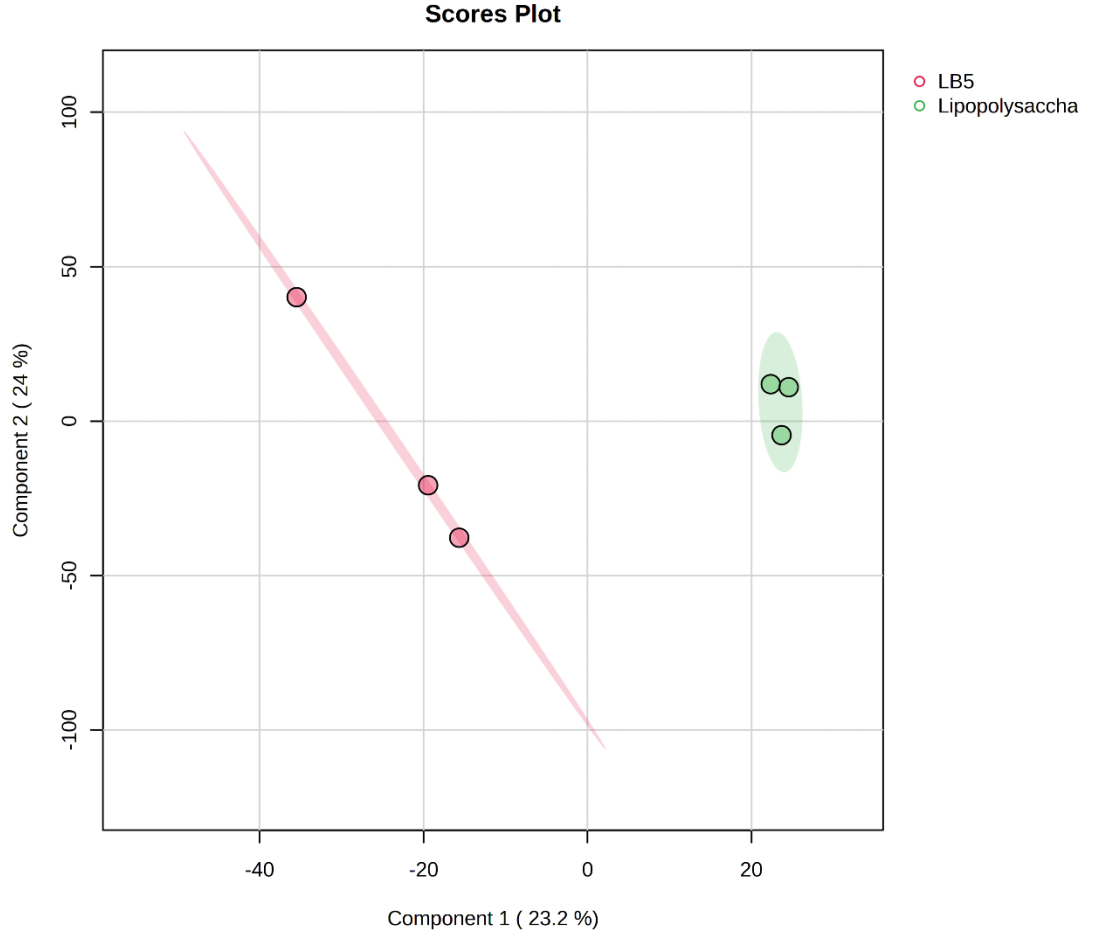


Şekil 5.62. LC-MS/MS ile pozitif iyonizasyonda analiz edilen LPS+Budesonid- LPS hücre metabolitlerinin önem sıralamasını gösteren VIP grafiği . (değişkenler m/z değerlerine göre ifade edilmiştir).

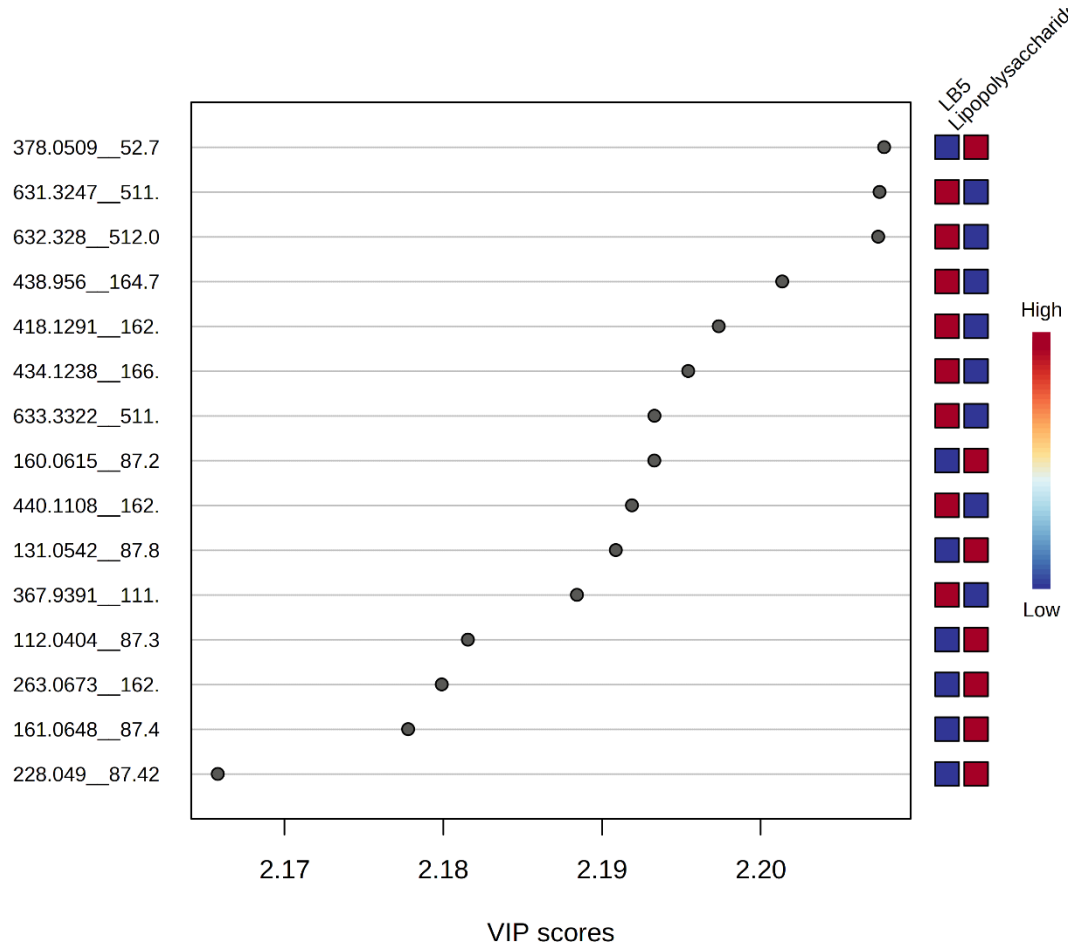
LC-MS/MS ile negatif iyonizasyonda analiz edilen LPS+Budesonid- LPS gruplarının hücre metabolitleriyle oluşturulan grafikler aşağıdaki gibidir.



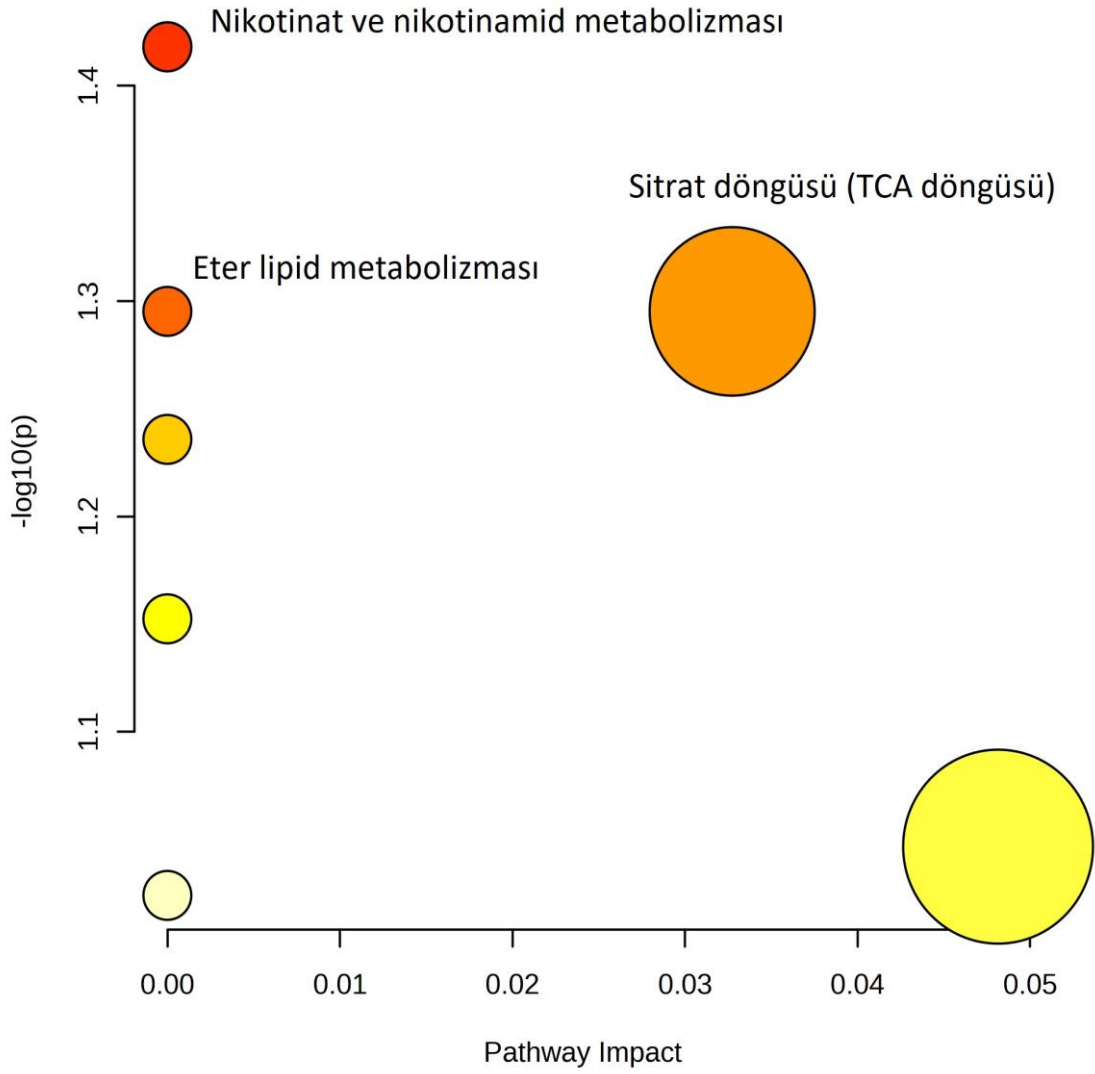
Şekil 5.63. LC-MS/MS ile negatif iyonizasyonda analiz edilen LPS+Budesonid- LPS hücre metabolitleriyle oluşturulmuş volkan grafiği. $p \leq 0.05$ ve kat sayı (FC) eşik değeri 10.0 olarak alınmıştır. (değişkenler m/z değerlerine göre ifade edilmiştir).



Şekil 5.64. LC-MS/MS ile negatif iyonizasyonda analiz edilen LPS+Budesonid- LPS hücre metabolitlerinin PLS-DA analizi ile elde edilen 2 boyutlu görseli



Şekil 5.65. LC-MS/MS ile negatif iyonizasyonda analiz edilen LPS+Budesonid- LPS hücre metabolitlerinin önem sıralamasını gösteren VIP grafiği . (değişkenler m/z değerlerine göre ifade edilmiştir).



Şekil 5.66. Yol zenginleştirme analizinden alınan p değerlerine ve topoloji analizinden alınan yol etki değerlerine göre eşleşen yolları gösteren yolak dağılım grafiği. LPS+Budesonid-LPS gruplarının karşılaştırması.

YOLAK	Toplam bileşen	Eşleşen metabolit sayısı	Eşleşen metabolit	Raw p	Impact
Butanoate metabolism	15	1	Succinate	0.038188	0
Nicotinate and nicotinamide metabolism	15	1	Nicotinate	0.038188	0
Ether lipid metabolism	20	1	sn-Glycero-3- phosphocholine	0.050671	0
Citrate cycle (TCA cycle)	20	1	Succinate	0.050671	0.03273

Tablo 5.5. . LPS+Budesonid grubunda LPS grubuna göre anlamlı bulunan yolak analizi sonuçları (MetaboAnalyst v.5.0, KEGG veritabanı, yolak analizi).

6. TARTIŞMA

Çalışmada hücre kültürü ile barsak enflamasyon modeli oluşturularak EBH hastalığı için TQ'nun olası terapötik etkisi ve bu etkiyi hangi metabolik yollar ve metabolitler üzerinden gerçekleştirebildiği araştırıldı. Bunun için öncelikle MTT canlılık analizi yapıldı ve uygun TQ dozlarıyla ROT/RNT etkisi araştırıldı. ROT/RNT seviyelerine negatif yönde etki eden TQ dozları seçilerek ileri deneylere devam edildi. Enflamasyon modeli üzerinde TQ'nun, sıkı bağlantı proteinlerinden olan claudin-5 ve okludin ifade seviyeleri ve ayrıca metabolomik parametreler üzerine etkisi araştırıldı.

6.1. TQ'nun ROT ve RNT üzerine etkisi

Hücrelerde ROTnin (ROT) üretimi ile vücudun antioksidanlarla serbest radikalleri nötralize etme yeteneği arasındaki dengesizlik olarak tanımlanan oksidatif stresin yaşlanma süreçlerini hızlandırabildiği ve kanser, kardiyovasküler hastalık ve nörolojik bozukluklar gibi kronik hastalıkların gelişimine yol açabildiği daha önceki çalışmalarla gösterilmiştir [227]. N. Sativa'nın bir bileşeni olan TQ'nun deneysel çalışmalarla antioksidan enzim sisteminin aktivitesini artırarak hücreleri, artmış oksidatif stresin hasarlarından koruduğu gösterilmiştir [228]. Çalışma sonuçlarımızda ROT ölçümüyle kontrol gruplarında gruplar arasında anlamlı farklılık bulunmasa da LPS gruplarında 2µM ve 3µM TQ uygulanmasının ROT seviyesini anlamlı derecede düşürdüğü bulundu. Bu da eski çalışmaları destekler nitelikte, uygun dozlarda TQ'nun enflamasyon durumunda antioksidan etki gösterebileceğini işaret etmektedir [188].

RNT değişimi, NO metabolizmasının son ürünü olan nitrit seviyesi Griess reaktifi ile ölçülerek dolaylı yoldan analiz edildi. Sonuçlarda LPS grubunda kontrole göre anlamlı seviyede nitrit yüksekliği bulundu. TQ2, TQ3 ve B5 gruplarında nitrit seviyelerinde düşme görülmesine rağmen kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı. L-B5 grubunda LPS'ye göre nitrit seviyelerinde anlamlı düşme gözlemlendi. L-TQ2 ve L-TQ3 gruplarında LPS'ye göre nitrit seviyelerinde rakamsal olarak düşüklük görülmesine rağmen istatistiksel olarak anlamlılık saptanmadı. RNT de tıpkı ROT gibi oksidan sistemin bir yönünü oluşturmaktadır ve antiinflamatuar olan budesonidin RNT seviyelerini düşürdüğü çalışmamızda gösterilmiştir. TQ gruplarında

anlamli fark olmasa ileri çalışmalarla daha uygun dozlarda RNT üretimini de azaltacak doz belirlemesi yapılabilir.

Lipopolisakkarit (LPS) veya proenflamatuvar sitokinlerle uyarılan hücrelerde indüklenebilir nitrik oksit sentaz (iNOS) ifadesi artar ve bu da nitrik oksit (NO) retimine yol açar [229, 230]. Daha önce yapılan çalışmalarda LPS ile enflamasyon oluşturulan sıçan bağırsağında iNOS tarafından üretilen NO'nun artan üretiminin arttığı ve bunun da sıkı bağılantı proteinlerinin ifadesinin azalmasına ve barsak geçirgenliğinin artmasına yol açtığı gösterilmiştir [231]. Çalışmamızda LPS grubunda sıkı bağılantı proteinlerinin ifade seviyelerindeki azalma da bunu desteklemektedir.

6.2. TQ'nun okludin ve kladin-5 üzerine etkisi

Yapılan araştırmalarda EBH hastalarının barsaklarında SB proteinlerinin yeniden dağılımına bağılı olarak artmış paraselüler geçiş gzlendiğı ve bunun da EBH'da epitelyal bariyer fonksiyonunun azaldığını yansıttığı tespit edilmiştir. Sıkı bağılantı proteinlerinden olan Claudin-5 normal yüzey ve kript epitelyumlarında sıkça bulunurken, aktif Crohn hastalığındaki (CH) sıkı bağılantılarda azaldığı ve yeniden dağılım gösterdiği daha önceki çalışmalarla kanıtlanmıştır. Bu da bariyer geçirgenliğinde artışa yol açmaktadır [232]. Yaptığımız alışmada, Claudin-5 seviyelerine hem LPS'li hem de LPS'siz gruplarda TQ'nun pozitif yönde etkisi görülmektedir. Oksidatif stresi düşürerek bu etkiyi yapabildiğı gibi anti-enflamatuvar zelliğıyle de barsak dokusuna iyileştirici etkisi bulunduğı düşünülmektedir. İleri çalışmalarla desteklenmesi gerekmektedir. Yine sıkı bağılantı proteinlerinden olan okludin seviyesi de hem kontrol hem de LPS grubunda anlamli olarak yükselmiştir. Her iki sıkı bağılantı proteini için benzer sonuçların görülmesi deneyin gücünü arttırmakta ve sonuçlar birbiriyle desteklenmektedir.

6.3. Barsak enflamasyonunun metabolomik incelenmesi

EBH toplumda sıklığı giderek artmakla birlikte kesin tanı ve tedavi yönteminin bulunmaması sebebiyle deneysel araştırmalara sıkça konu olmuştur. Tanı amacıyla yapılan biyobelirteç keşif çalışmaları son yıllarda oldukça artmış ancak serum, gaita ve doku örneklerinin toplanmasındaki zorluklar ve uzun süreçler araştırmacıları

alternatif deneysel yöntemlere yönlendirmiştir. Hücre kültür modellerinde metabolomik analizin ne kadar doğru ve anlamlı sonuç verdiği henüz bilinmese de çalışmamızda hücre kültüründe enflamasyon oluşturarak metabolomik analizin nasıl değiştiğini ve eski çalışmaları ne kadar desteklediğini göstermeye çalıştık.

Ksantin ve Pürin metabolik yolağı: LPS ile enflamasyon oluşturulan grupta hem volkan hem de bar grafiğinde, kontrol grubuna göre ksantin metabolit seviyesinin anlamlı derecede düştüğü gösterilmiştir. Yol zenginleştirme analizinde de ksantin de dahil olduğu pürin metabolizmasının her iki grup arasında anlamlı seviyede etkilendiği belirlenmiştir. Pürin metabolik yolağında hipoksantinden ksantin oluşumu ve ksantinden ürik asit oluşumu ksantin oksidaz enzimiyle katalize edilir. Ksantin oksidaz enzimi ROT oluşumunda önemli olan enzimlerden biridir. Artmış ksantin oksidaz aktivasyonu ROT üretimini de artırır [233]. LPS grubunda ROT üretiminin artışı, ksantin oksidaz aktivasyonu yoluyla pürin metabolik yolağının etkilendiğini düşündürmektedir. Daha önce yapılan deneysel kolit modeli bir çalışmada ksantin oksidaz inhibitörü olan allopurinol uygulamasının enflamasyonu sınırladığı saptanmıştır [177]. Bu da ksantin oksidaz aktivasyonun barsak enflamasyonunda arttığını düşündürmektedir. Ksantin artışının ksantin oksidaz aktivasyonuna bağlı olup olmadığı ve ksantin tedavisi takibinde kullanılabilecek bir biyobelirteç olup olmadığı ileri çalışmalarla gösterilmelidir. Diğer taraftan allopürinol metaboliti olarak bilinen oksipürinol bir ksantin oksidaz inhibitörüdür[234] ve kontrol grubunda, LPS grubuna göre yüksek bulunmuştur. İnflamasyon grubunda oksipürinol seviyesinin düşük bulunması ksantin oksidaz inhibisyonunun azalmasına ve oksidatif stres artışına yol açabilir.

Laktat: VIP skoru analiz sonuçlarında LPS uygulanan grupta laktat seviyelerinin anlamlı olarak arttığı görüldü. Laktat memelilerde L ve D stereoizomeri olarak iki farklı şekilde bulunur. Anaerobik glikoliz sırasında üretilen baskın form L-laktattır [235]. Tümör hücrelerinde görülen warburg etkisiyle oksidatif fosforilasyon anaerobik glikolize kayar. Enflamatuvar hücrelerin aktivasyonu da yine buna benzer etkiler görülür ve laktat seviyesinde artma saptanır. L-laktat artışı enflamasyonda metabolik bir yanıt olarak görülür ve laktatın varlığı, neoplazi malignitesi, sepsis ve otoimmün hastalıklar dahil olmak üzere çeşitli hastalıklarda bir biyobelirteç olarak önerilmiştir [236-238]. Çalışmamızda, enflamasyon grubunda görülen laktat yüksekliği de bu bilgileri destekler niteliktedir.

Glikolat: Bir diğerk anlamlı farklılık gösteren metabolit olan glikolat kontrol grubunda LPS grubuna göre daha yüksek bulundu. ÜK ve CH hastalarıyla yapılan bir çalışmada gaita metabolomik analizinde anti-enflamatuvar metabolit olarak kabul edilen glikolat düşük seviyelerde bulunmuştur [239]. Bu da glikolat seviyelerinin hastalık tedavi takibinde kullanılabilecek olası bir biyobelirteç olduğunu düşündürmektedir. Bunun için ileri deneysel çalışmalara ihtiyaç vardır.

Galaktarat: VIP skoruna göre galaktarat, LPS grubunda kontrol grubuna göre yüksek bulunmuştur. Glukarik asit ve galaktarat şeker oksidasyon ürünüdür. Galaktaratın enflamasyondaki rolü, barsak iltihabı sırasında oluşan bir karbon kaynağı olarak öne çıkmaktadır. İltihaplanma süreci sırasında, barsak dokularında meydana gelen hasar, enflamatuvar yanıtın bir parçası olarak vücut tarafından üretilen galaktarat gibi bazı metabolitlerin artmasına neden olabilir. Bu galaktarat, belirli bakteri türleri tarafından kullanılabilir [240]. Bu da bize galaktaratın enflamatuvar bir metabolit olabileceğini düşündürmektedir.

Fumarat: Fumarik asit bir dikarboksilik asittir. Krebs trikarboksilik asit (TCA) döngüsünde L-malatın öncüsüdür. Sükcinate dehydrogenase tarafından süksinik asidin oksidasyonu ile oluşur. Fumarat, fumaraz enzimi tarafından malata dönüştürülür. Fumarik asit, son zamanlarda bir onkometabolit veya doğal olarak oluşan, kansere neden olan bir metabolit olarak tanımlanmıştır. Bu organik asidin yüksek seviyeleri tümörlerde veya tümörleri çevreleyen sıvılarda bulunabilir. Onkogenik etkisi, prolil hidroksilaz içeren enzimleri inhibe etme yeteneğı nedeniyle görünmektedir [241]. Çalışmada kullandığımız HT-29 hücreleri kolon adenoca hattı olduğu için kontrol grubundaki yüksekliğı bu şekilde açıklanabilir. LPS grubunda ise fumarat düzeyleri kontrol grubuna göre anlamlı derecede düşük bulundu.

Myoinositol: VIP skoruna göre kontrol grubunda LPS grubuna göre yüksek bulunan diğerk bir molkül ise miyo-inositoldür. Myo-inositol, çeşitli inositol fosfatlar da dahil olmak üzere bir dizi ikincil haberci molekülün öncü molekülüdür. Ayrıca, inositol/myo-inositol, fosfatidylinositol (PI) fosfatidylinositol fosfat (PIP) olarak bilinen lipidlerin önemli bir bileşenidir. myo-Inositol, glikoz aracılığıyla, glikoz-6-fosfat (G-6-P) üzerinden iki adımda sentezlenir. İlk olarak, G-6-P, bir inositol-3-fosfat sentaz enzimi tarafından myo-inositol 1-fosfat haline getirilir, ardından bir inositol monofosfataz enzimi tarafından fosfatlı myo-inositol haline getirilir [242]. Yapılan

çalışmalarda myo inositolün antienflamatuvar ve antioksidan etkileri kanıtlanmıştır [243]. Raw makrofajla yapılan bir çalışmada myo-inositolün stres kaynaklı makrofaj metabolizmasına karşı antienflamatuvar yanıt sağlayarak koruyucu bir ortam oluşturduğu gösterilmiştir [244]. Tüm bu çalışmalar miyo-inositolün antienflamatuvar bir ara metabolit olarak değerlendirilebileceğini göstermektedir ve çalışmamızda enflamasyon grubunda düşük bulunması da bu tezimizi desteklemektedir.

2-Hidroksiizobütirat: 2-Hidroksiizobütirat, üçüncül alkoller sınıfına aittir. Üçüncül alkoller, bir hidroksi grubunun, -OH, doymuş bir karbon atomuna bağlı olduğu bileşiklerdir. 2-Hidroksiizobütirat bir ikincil metabolittir. İkincil metabolitler, metabolik veya fizyolojik olarak zorunlu olmayan metabolitlerdir ve savunma veya sinyalleme molekülleri olarak rol oynayabilirler [245]. Daha önce EBH hastalarıyla yapılan metabolomik çalışmalarda aktif EBH hastalarının idrar örneklerinde 2-Hidroksiizobütirat düzeylerinin kontrol grubuna göre daha düşük olduğu saptanmıştır [246]. Güncel çalışmamız sonucunda da önceki çalışmayı destekler nitelikte 2-Hidroksiizobütirat düzeyleri kontrol grubunda enflamasyon grubuna göre daha yüksek bulunmuştur.

Glisin: Glisin, alifatik, polar olmayan bir amino asit olarak sınıflandırılan en basit alfa-aminoasittir. Glutasyon sentezinde yer alan aminoasitlerden biri olan glisinin bu yolla anti-oksidan anti-enflamatuvar etkili bir metabolit olduğu düşünülmektedir. DSS ile kolit oluşturulmuş ratlarla yapılan bir çalışmada glisin metabolizmasının aşağı yönde regüle edildiği bulundu [247]. Başka bir çalışmada ÜK hastalarına berberin tedavisi uygulamasının metabolomik etkisi araştırılırken kontrol grubunda ÜK grubuna göre glisin seviyelerinin yüksek olduğu saptandı [248]. Çalışmamızda da LPS grubunda kontrol grubuna kıyasla glisin düzeyleri düşük bulundu. Glisinin antienflamatuvar etkisiyle ilgili yapılan çalışmalar da sonuçlarımızı destekler niteliktedir [249].

Dimetilamin: Dimetilamin (DMA), bir organik ikincil amindir. Çalışmamızda dimetilamin metaboliti LPS ile enflamasyon oluşturulan grupta yüksek bulundu. Dimetilamin, NOS inhibitörü olan ADMA (asimetrik dimetilarginin) 'nın parçalanma ürünüdür. Çalışmamızda enflamasyonla dimetilamin düzeyi artışı, artmış ADMA yıkımına bağlanabilir. Böylece NOS üzerindeki inhibitör etki azalır ve NO üretimi artar. Bu da RNT üretimi yolağına etki ederek enflamasyon gelişimine katkıda bulunur

[250]. Dimetilaminin enflamatuvar ara metabolit olabileceğine dair bir kanıt da kronik kolitli farelerle yapılan NMR analizinde dimethylamine düzeyinin kontrol grubuna göre yüksek bulunmasıdır [251]. Bu da çalışma sonuçlarımızı destekler niteliktedir.

Asetat: Asetat ve bununla ilgili asetil-CoA metabolizması, enerji üretimi, lipid sentezi ve protein asetilasyonu da dahil olmak üzere birçok metabolik işlevi sağlar [252]. Dışardan acetat alımının da antienflamatuvar yanıtı arttırdığına dair kanıtlar mevcuttur [253]. Çalışmamızda VIP skoruna göre asetat seviyesi, kontrol grubunda LPS grubuna göre daha yüksek bulundu. Bu sonuç EBH hastalarıyla daha önce yapılmış olan metabolomik analizleri destekler niteliktedir [246]. Daha önce yapılan çalışmalarda barsak kaynaklı asetat üretiminin anti-enflamatuvar Treg'leri teşvik ettiği ve fareleri tip 1 diyabet, kolit ve alerjilerden koruduğu gösterilmiştir. Ayrıca asetatin B hücrelerini IL-10 üreten B hücrelerine dönüşümünü arttıtarak anti enflamatuvar etkiye katkıda bulunduğu da saptanmıştır. Bu etkiler artmış asetil koenzim A üretimi yoluyla metabolik değişikliklere bağlanmış, TCA döngüsünün ve postranslasyonel lizin asetilasyonunun teşvik edildiği belirtilmiştir [254]. Bu sonuçlar da asetatin anti-enflamatuvar bir ara metabolit olabileceğini düşündürmekte ve bununla ilgili ileri çalışmalar gerektirmektedir.

Sitrakonat: Anti-inflamtuvar ve sitoprotektif özellikleri araştırılmış ve kanıtlanmış olan itakonatin izomeridir. Analizimizde kontrol grubunda seviyesi daha yüksek bulundu. Yapılan çalışmalarla sitrakonat güçlü elektrofıl ve nükleer faktör-eritroid 2 ile ilişkili faktör 2 (Nrf2) agonisti olduğu bulunmuştur [255]. Çalışmamızda gösterilmemiş olsa da itaconatin enflamasyon sırasında salındığı ve süksinat dehidrojenazın güçlü bir inhibitörü olduğu daha önceki çalışmalarla gösterilmiştir [256]. Güncel çalışmamızda enflamasyon grubunda fumarat azalmasını süksinat dehidrojenaz enzim aktivitesindeki inhibisyonla açıklamak da mümkündür.

6.4. TQ etkisinin metabolomik değerlendirilmesi

Uzun yıllardır anti-enflamatuvar, antioksidan, anti-tümör etkileri bilinen TQ'nun bu etkilerini hangi metabolik yollar üzerinden yaptığı halen net bir şekilde

anlaşılamamıştır. Uygun anti-oksidan doz belirlendikten sonra yaptığımız çalışmada TQ'nun metabolomik etkisi araştırıldı.

LPS uygulanan gruptaki ksantin azalması LPS+TQ grubunda ksantinin göreceli olarak artması şeklinde kendini göstermiştir. Önceki çalışmalarda radyasyona bağlı oksidatif stres oluşturulmuş sıçanlarda TQ'nun, ksantin oksidaz enzim aktivitesini azalttığı gösterilmiştir [257]. Yaptığımız çalışmada da TQ'nun ROT miktarını azaltması, ksantin oksidaz enzim inhibisyonuna bağlı olabilir ve yine aynı etki ile ksantin seviyesini arttırdığı düşünülmektedir.

Bir önceki bölümde enflamasyon grubunda laktat seviyesi kontrole göre yüksek bulunmuş ve bunun enflamasyonda görülen Warburg etkisiyle oksidatif fosforilasyondan aerobik glikolize kaymayla oluşabileceği belirtilmiştir. ROT ve RNT' yi düşüren dozlarda TQ nun LPS ile enflamasyon oluşturulan hücreler üzerine verilmesiyle laktat seviyesinin sadece LPS verilen gruplara göre daha yüksek olduğu çalışmamızda gösterilmiştir. Laktat genellikle glikolizisin metabolik atığı olarak kabul edilir; ancak birçok çalışma, laktatın bir ara metabolitten daha fazlası olduğunu ve enflamatuvar yanıtı düzenleyen immunomodulatuvar pleiotropik etkileri olduğunu öne sürmektedir. Laktat, enflamasyon süreci sırasında bağışıklık hücreleri tarafından önemli miktarlarda üretilir ve salgılanır [258, 259]. Kısa süreli laktat maruziyeti sitokin üretimi üzerinde sınırlı etkilere sahip olsa da, uzun süreli laktat tedavisi monositlerde güçlü anti-enflamatuvar etkiler gösterdiği önceki çalışmalarla kanıtlanmıştır [259]. Bağışıklık hücrelerinin, mikroçevredeki laktat konsantrasyonlarına uyum sağlaması, doku özgü bağışıklık hücrelerinin işlevlerini etkileyebilir [259]. Treg (regülatör T Hücreleri) hücreleri, bağışıklık sistemini dengelemeye ve aşırı iltihabı sınırlamaya yardımcı olan hücrelerdir. Laktatın, Treg hücrelerini aktive ederek iltihap yanıtını baskılama potansiyeline sahip olabileceği de yapılan çalışmalarla gösterilmiştir [260]. Tüm bunlardan yola çıkarak laktat enflamasyonu işaret eden bir ara metabolit olabildiği gibi immunomodülatör etkiyle artmış enflamasyonu sınırlayabilir. TQ'nun antienflamatuvar dozlarda yaptığı bu laktat artışının mekanizması henüz bilinmemekle birlikte ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

Yapılan çalışmalarda glikolatın serin ve glisine dönüşümü üzerinden antioksidan sistemi aktive ettiği ve bu yüzden endojen antioksidan olarak değerlendirildiği

belirtilmiştir. Glikolat takviyesinin, H₂O₂ maruziyeti nedeniyle oluşan GSH (redükte glutatyon)/GSSG (okside glutatyon) oranındaki düşmeyi önlediği de önceki çalışmalarla gösterilmiştir [261]. Hem LPS'li hem de LPS'siz gruplarda TQ takviyesiyle glikolat seviyesinde yükselme görülmesi TQ'nun anti-oksidan etkisiyle açıklanabilir.

NMR analizinde her iki TQ grubunda yapılan pathway analizlerine göre benzer metabolik yolların etkilendiği saptandı. Valin, lösin, izolösin sentez ve yıkım yolları TQ takviyesiyle değişmiş olarak saptandı. Valin, lösin ve izolösin dahil dallanmış zincirli amino asitler (DZAA) enerji dengesi, besin metabolizması, barsak sağlığı ve bağışıklık düzenlemesinde önemli bir rol oynarlar [262]. DZAA'ler barsak gelişimini teşvik eder, barsak amino asit taşımalarını ve mukus üretimini artırır ve aynı zamanda doğuştan gelen ve adaptif bağışıklık tepkilerini yükseltir [263], barsak SIgA salgısını uyarır, mukozal yüzey savunmasını iyileştirir ve patojenlerin LP'ya nüfuzunu inhibe eder [264]. Güncel çalışmamızda DZAA olan alloizolösinin TQ uygulanan grupta kontrol grubuna göre yükseldiği saptandı. Alloizolösin DZAA lerin hem sentez hem de yıkım yollarında bulunabilen bir metabolit olup TQ'la artması, daha önceki çalışmalarla gösterilmiş olan DZAA'lerin barsak gelişimini teşvik ettiğine bir kanıt olabilir.

NMR analizinde LPS verilmemiş gruplarda, TQ verilen gruplar ve kontrol arasında piruvat metabolik yolağı ve glikoliz-glukoneogenez yollarının etkilenmiş olduğu saptandı. Piruvat metabolizmasındaki ayırt edici metabolitler; piruvat, laktat, asetat ve fumarattı. Piruvat ve fumarat kontrol grubunda daha yüksek saptanırken, Glukoz ve laktat TQ verilen gruplarda daha yüksekti. TQ etkisinde, glikoliz sonucu üretilen piruvatın sitrat döngüsüne katılmak yerine laktat dehidriyaz enzimiyle laktata dönüştüğü düşünülmektedir. Bir ksenobiyotik olan timokinonun her ne kadar antienflamatuar dozlarıyla deneyler yürütülmüş olsa da hücrelerin TQ'u bir yabancı olarak algılayıp laktat üretimini artırarak bir metabolik değişikliğe gitmiş olması muhtemeldir. Bir diğer açıklama ise laktatın sadece oksidatif stres göstergesi olmayıp aynı zamanda bağışıklık sistemi aktivasyonunda da yer alabildiğidir [265]. TQ'nun laktat artışını hangi mekanizma üzerinden yaptığı ve bu laktat artışına rağmen barsak iyileşmesini gösteren sıkı bağlantı protein ekspresyonunu nasıl arttırdığı ileri araştırma gerektiren konulardır. Yine glukoneogenez yolağı TQ uygulanan grupta etkilenmiş ve ayırt edici metaboliti glukoz olarak bulunmuştur. TQ gruplarında laktat artışının

glukoneogenez yoluna kayarak glukoz seviyelerinin yine bu gruplarda yükselmesine sebep olduğu da düşünülmektedir.

LPS ile enflamasyon oluşturulan gruplarda TQ uygulanmasıyla NMR sonuçlarında pathway analizinde anlamlı değişen yolak bulunmazken N-nitrozodimetilamin (NDMA) düzeyleri LPS grubuna göre anlamlı düşük bulunmuştur. Birçok çalışma, N-nitrozaminlerin oksidatif aktivasyonları nedeniyle mutajenik ve kanserojen aktivitelerini ortaya koymuştur, bu aktivasyon N-demetilaz enzimi tarafından gerçekleşir. Ayrıca, NDMA'nın genotoksisite, hücre çoğalması ve patolojik apoptozu tetikleyebildiği daha önceki çalışmalarla gösterilmiştir [266]. Çalışmamızda toksik metabolit olan NDMA düzeylerin LPS grubuna göre LPS+TQ uygulanan grupta daha düşük olduğu saptandı. Bu da TQ'nun antioksidan etkisine bir destek niteliğindedir.

NMR analiziyle gösterilememesine rağmen anti-enflamatuvar terapötik ajan olan budesonidin metabolomik analizi LC-MS/MS ile yapılabilmüş ve TQ la kıyaslama fırsatı olmuştur. Yapılan yolak analiziyle LPS gruplarına verilen budesonid ve TQ'nun iki ortak metabolit yolağı etkilediği tespit edilmiştir. Nikotinat-nikotinamid metabolizması ile eter lipid metabolizması her iki grupta da etkilenmiştir ve yine iki grup için de etki eden yolak metabolitleri aynı bulunmuştur. Nikotinat-nikotinamid metabolizmasının etki metaboliti nikotinat olarak saptanmıştır. B3 vitamini olarak da bilinen nikotinat, in vivo transaminasyon yoluyla nikotinamid adenin dinükleotidinin (NAD^+) ana öncüsü olan nikotinamide dönüştürülebilir [267, 268]. Bir SIRT1 agonisti olarak NAD^+ , $NAD^+/NADH$ oranını düzenleyerek SIRT1'i aktive edecek şekilde hareket edebilir. SIRT1, proenflamatuvar sitokinlerin üretiminde rol oynayan önemli bir transkripsiyonel faktör olarak kabul edilen NF- κ B'nin pozitif bir düzenleyicisidir [269, 270]. Artan NAD^+ üretimi, SIRT1'in aktivasyonuna yol açar, bu da NF- κ B sinyal yolunun inhibisyonu ile sonuçlanır ve anti-enflamatuvar etki elde etmek amacıyla enflamatuvar faktörlerin salınmasını engeller [271]. Çalışmamızda enflamasyon oluşturulmuş hem TQ hem budesonid gruplarındaki antienflamatuvar etki bu mekanizmayla açıklanabilir.

Eter lipid metabolizmasının etki metaboliti glisero 3-fosfokolin olarak saptanmıştır. Eter lipitleri, sn-1 pozisyonuna bir eter bağıyla bağlanan bir alkil zincirine sahip benzersiz bir gliserofosfolipit sınıfıdır. Eter lipitlerindeki fosfat grubuna bağlı alkol kısmı genellikle kolin veya etanolamindir, ancak ara sıra inositol veya serin de

gözenmiştir. Hücresel fosfolipid bileşiminin bozulması, membran bütünlüğünü etkilediği, endoplazmik retikulum (ER) stresini aktive ettiği ve apoptozu desteklediği önceki çalışmalarla gösterilmiştir [272-274]. Tamoksifenle yağ asidi sentaz ifadesi susturulduğu bir çalışmada nötrofillerde eter bağlı gliserofosfokolinlerde azalma görülmüş, bunun da ER stresini ve apoptozu arttırarak neredeyse tam nötropeniye yol açtığı bulunmuştur [275]. Ayrıca eter lipid alt grubu olan plazmolojenlerin de hücreleri ROT hasarından koruyabildiğine dair kanıtlar da mevcuttur [276]. Tüm bu bilgilerden yola çıkarak membran eter lipidlerinin hücreyi koruyucu etkisi olduğu görülmektedir. Çalışmamızda hem budesonid hem de TQ verilen enflamasyonlu gruplarda eter lipid metabolik yolağının etkilenmesi ve sn-Glycero-3-phosphocholine metabolitinin farklı bulunması antienflamatuvar etkiyi bu yolak üzerinden gerçekleştirebileceğini düşündürmektedir.

7. SONUÇ ve ÖNERİLER

Güncel bilimsel çalışmalara sıklıkla konu olan EBH'nın hücre kültür modeli oluşturularak metabolomik profilinin araştırılması daha önceki çalışmalarla gösterilmiş olsa da güncel çalışmada hem NMR hem de HRMS'in birlikte kullanımı çalışmayı değerli kılmaktadır. Ayrıca anti-enflamatuvar etkisi bilinen TQ'nun bu etkisini hangi metabolik yollar üzerinden gerçekleştirildiği de bir kortikosteroid olan budesonid ile kıyaslanarak gösterilmiştir. Bu da ileri çalışmalara ışık tutacak nitelikte, tedavide bu yolların hedef alınabileceğini gösterir.

Gerek insan numunelerini toplamanın zorluğu gerekse maliyeti göz önüne alındığında hücre kültürü çalışmalarının bir ilk basamak olarak metabolomik analizlerde kullanılabileceği de yine mevcut çalışmayla gösterilmiştir. Yapılan hedeflenmemiş metabolomik analizde bulunan metabolitler daha sonrasında uygun standartlar kullanılarak ileri çalışmaların konusu olabileceği, böylelikle hem maliyetten hem de zamandan tasarruf edilebileceği de yine güncel çalışmayla gösterilmiştir.

TQ ile ilgili yapılan metabolomik analizler çok sınırlı olup, barsak enflamasyonu üzerine metabolomik etkisinin gösterildiği ilk çalışma olması da çalışmayı değerli kılmaktadır.

Tüm bu sonuçlarla birlikte hücre kültürü çalışmalarının insan metabolizmasını tam olarak yansıtmamaktadır. Bulunan sonuçlar ileri çalışmalara ışık tutabilmekle birlikte yapılacak in vivo çalışmalarla desteklenmelidir.

8. KAYNAKLAR

1. Hossen, I., et al., *Phytochemicals and inflammatory bowel disease: a review*. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2022. **60**(8): p. 1321-1345.
2. Sairenji, T., K.L. Collins, and D.V. Evans, *An update on inflammatory bowel disease*. Primary Care: Clinics in Office Practice, 2017. **44**(4): p. 673-692.
3. Zhang, Y.-Z. and Y.-Y. Li, *Inflammatory bowel disease: pathogenesis*. World journal of gastroenterology: WJG, 2014. **20**(1): p. 91.
4. Xavier, R.J. and D.K. Podolsky, *Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease*. Nature, 2007. **448**(7152): p. 427-434.
5. Cheifetz, A.S., R. Gianotti, R. Lubert, and P.R. Gibson, *Complementary and alternative medicines used by patients with inflammatory bowel diseases*. Gastroenterology, 2017. **152**(2): p. 415-429. e15.
6. Gröchenig, H.P., et al., *Prevalence and indicators of use of complementary and alternative medicine in Austrian patients with inflammatory bowel disease*. European journal of gastroenterology & hepatology, 2019. **31**(10): p. 1211-1219.
7. Tiwari, B.K., N. Brunton, and C.S. Brennan, *Handbook of plant food phytochemicals*. 2015: Wiley Online Library.
8. Garcia, R.N., et al., *Physicochemical properties of native and recombinant mungbean (Vigna radiata L. Wilczek) 8S globulins and the effects of the N-linked glycans*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2006. **54**(16): p. 6005-6010.
9. El-Dakhkhny, M., *STUDIES ON THE CHEMICAL CONSTITUTION OF EGYPTIAN NIGELLA SATIVA L. SEEDS. III) THE ESSENTIAL OIL*. Planta medica, 1963. **11**(04): p. 465-470.
10. Karaca, G., et al., *Effectiveness of thymoquinone, zeolite, and platelet-rich plasma in model of corrosive oesophagitis induced in rats*. Annals of surgical treatment and research, 2017. **92**(6): p. 396-401.
11. Wang, F., et al., *Protective role of thymoquinone in sepsis-induced liver injury in BALB/c mice*. Experimental and therapeutic medicine, 2019. **18**(3): p. 1985-1992.
12. Cobourne-Duval, M.K., E. Taka, P. Mendonca, and K.F. Soliman, *Thymoquinone increases the expression of neuroprotective proteins while decreasing the expression of pro-inflammatory cytokines and the gene expression NFκB pathway signaling targets in LPS/IFNγ-activated BV-2 microglia cells*. Journal of neuroimmunology, 2018. **320**: p. 87-97.
13. Weber, L., et al., *Anti-inflammatory and barrier-stabilising effects of myrrh, coffee charcoal and chamomile flower extract in a co-culture cell model of the intestinal mucosa*. Biomolecules, 2020. **10**(7): p. 1033.
14. Beaven, S.W. and M.T. Abreu, *Biomarkers in inflammatory bowel disease*. Current opinion in gastroenterology, 2004. **20**(4): p. 318-327.
15. Price, A.B., *Overlap in the spectrum of non-specific inflammatory bowel disease--'colitis indeterminate'*. Journal of clinical pathology, 1978. **31**(6): p. 567-577.
16. Joossens, S., et al., *The value of serologic markers in indeterminate colitis: a prospective follow-up study*. Gastroenterology, 2002. **122**(5): p. 1242-1247.

17. Roda, G., et al., *New proteomic approaches for biomarker discovery in inflammatory bowel disease*. Inflammatory bowel diseases, 2010. **16**(7): p. 1239-1246.
18. Kaddurah-Daouk, R., B.S. Kristal, and R.M. Weinshilboum, *Metabolomics: a global biochemical approach to drug response and disease*. Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol., 2008. **48**: p. 653-683.
19. Gallagher, K., et al., *Metabolomic analysis in inflammatory bowel disease: a systematic review*. Journal of Crohn's and Colitis, 2021. **15**(5): p. 813-826.
20. Gunes-Bayir, A., et al., *Anti-Inflammatory and Antioxidant Effects of Carvacrol on N-Methyl-N'-Nitro-N-Nitrosoguanidine (MNNG) Induced Gastric Carcinogenesis in Wistar Rats*. Nutrients, 2022. **14**(14): p. 2848.
21. Arulselvan, P., et al., *Role of antioxidants and natural products in inflammation*. Oxidative medicine and cellular longevity, 2016. **2016**.
22. Kuprash, D. and S. Nedospasov, *Molecular and cellular mechanisms of inflammation*. Biochemistry (Moscow), 2016. **81**: p. 1237-1239.
23. Lawrence, T. and D.W. Gilroy, *Chronic inflammation: a failure of resolution?* International journal of experimental pathology, 2007. **88**(2): p. 85-94.
24. Libby, P., *Inflammatory mechanisms: the molecular basis of inflammation and disease*. Nutrition reviews, 2007. **65**(suppl_3): p. S140-S146.
25. Zhang, J.-M. and J. An, *Cytokines, inflammation and pain*. International anesthesiology clinics, 2007. **45**(2): p. 27.
26. Ji, R.-R., A. Chamesian, and Y.-Q. Zhang, *Pain regulation by non-neuronal cells and inflammation*. Science, 2016. **354**(6312): p. 572-577.
27. Jang, D.-i., et al., *The role of tumor necrosis factor alpha (TNF- α) in autoimmune disease and current TNF- α inhibitors in therapeutics*. International journal of molecular sciences, 2021. **22**(5): p. 2719.
28. Rossi, A. and D.A. Sawatzky, *The resolution of inflammation*. 2008: Springer Science & Business Media.
29. Serhan, C.N., P.A. Ward, and D.W. Gilroy, *Fundamentals of inflammation*. 2010: Cambridge University Press.
30. Kumar, V., A. Abbas, and J. Aster, *Robbins Temel Patoloji (Çev. Ed: Tuzlalı S, Güllüoğlu M, Çevikbaş U)*. Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul, 2013: p. 29-73.
31. Mielke, M.E., C. Peters, and H. Hahn, *Cytokines in the induction and expression of T-cell-mediated granuloma formation and protection in the murine model of listeriosis*. Immunological reviews, 1997. **158**(1): p. 79-93.
32. Rubin, R., D.S. Strayer, and E. Rubin, *Rubin's pathology: clinicopathologic foundations of medicine*. 2008: Lippincott Williams & Wilkins.
33. Reuter, S., S.C. Gupta, M.M. Chaturvedi, and B.B. Aggarwal, *Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked?* Free radical biology and medicine, 2010. **49**(11): p. 1603-1616.
34. López-Armada, M.J., R.R. Riveiro-Naveira, C. Vaamonde-García, and M.N. Valcárcel-Ares, *Mitochondrial dysfunction and the inflammatory response*. Mitochondrion, 2013. **13**(2): p. 106-118.
35. Rehman, T., *Role of the gut microbiota in age-related chronic inflammation*. Endocrine, Metabolic & Immune Disorders-Drug Targets (Formerly Current Drug Targets-Immune, Endocrine & Metabolic Disorders), 2012. **12**(4): p. 361-367.
36. Coussens, L.M. and Z. Werb, *Inflammation and cancer*. Nature, 2002. **420**(6917): p. 860-867.

37. Lan, T., L. Chen, and X. Wei, *Inflammatory cytokines in cancer: comprehensive understanding and clinical progress in gene therapy*. Cells, 2021. **10**(1): p. 100.
38. Grivennikov, S.I., F.R. Greten, and M. Karin, *Immunity, inflammation, and cancer*. Cell, 2010. **140**(6): p. 883-899.
39. Flora, S., *Role of free radicals and antioxidants in health and disease*. Cellular and Molecular Biology, 2007. **53**(1): p. 1-2.
40. Valko, M., et al., *Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease*. The international journal of biochemistry & cell biology, 2007. **39**(1): p. 44-84.
41. Aviello, G. and U. Knaus, *ROS in gastrointestinal inflammation: rescue or sabotage?* British journal of pharmacology, 2017. **174**(12): p. 1704-1718.
42. Pham-Huy, L.A., H. He, and C. Pham-Huy, *Free radicals, antioxidants in disease and health*. International journal of biomedical science: IJBS, 2008. **4**(2): p. 89.
43. Winterbourn, C.C., *Toxicity of iron and hydrogen peroxide: the Fenton reaction*. Toxicology letters, 1995. **82**: p. 969-974.
44. Chiurchiu, V. and M. Maccarrone, *Chronic inflammatory disorders and their redox control: from molecular mechanisms to therapeutic opportunities*. Antioxidants & redox signaling, 2011. **15**(9): p. 2605-2641.
45. Rizwan, S., P. ReddySekhar, and B. MalikAsrar, *Reactive oxygen species in inflammation and tissue injury*. Antioxidants & redox signaling, 2014.
46. Alzoghaibi, M.A., *Concepts of oxidative stress and antioxidant defense in Crohn's disease*. World journal of gastroenterology: WJG, 2013. **19**(39): p. 6540.
47. Pravda, J., *Radical induction theory of ulcerative colitis*. World journal of gastroenterology: WJG, 2005. **11**(16): p. 2371.
48. Blaser, H., C. Dostert, T.W. Mak, and D. Brenner, *TNF and ROS crosstalk in inflammation*. Trends in cell biology, 2016. **26**(4): p. 249-261.
49. Grendell, J.H., K.R. McQuaid, and S.L. Friedman, *Current diagnosis & treatment in gastroenterology*. 1996: Appleton and Lange.
50. Ng, S.C., et al., *Incidence and phenotype of inflammatory bowel disease based on results from the Asia-pacific Crohn's and colitis epidemiology study*. Gastroenterology, 2013. **145**(1): p. 158-165. e2.
51. Zeng, Z., et al., *Incidence and clinical characteristics of inflammatory bowel disease in a developed region of Guangdong Province, China: A prospective population-based study*. Journal of gastroenterology and hepatology, 2013. **28**(7): p. 1148-1153.
52. Molodecky, N.A., et al., *Increasing incidence and prevalence of the inflammatory bowel diseases with time, based on systematic review*. Gastroenterology, 2012. **142**(1): p. 46-54. e42.
53. Ramos, G.P. and K.A. Papadakis. *Mechanisms of disease: inflammatory bowel diseases*. in *Mayo Clinic Proceedings*. 2019. Elsevier.
54. ÖZDEN, A., *Türkiye'de İltihabi Bağırsak Hastalığı Tarihine Kısa Bakış*. Güncel Gastroenteroloji Dergisi, Aralık, 2013. **17**(4).
55. Ük, D., M. Törüner, H. Hamzaoglu, and A. Tezel, *Ensari A. İnflamatuvar Barsak Hastalıkları El Kitabı* (Dağlı Ü, ed), 2006.
56. Tian, T., Z. Wang, and J. Zhang, *Pathomechanisms of oxidative stress in inflammatory bowel disease and potential antioxidant therapies*. Oxidative medicine and cellular longevity, 2017. **2017**.

57. Beisner, J., E.F. Stange, and J. Wehkamp, *Innate antimicrobial immunity in inflammatory bowel diseases*. Expert Review of Clinical Immunology, 2010. **6**(5): p. 809-818.
58. Pullan, R., et al., *Thickness of adherent mucus gel on colonic mucosa in humans and its relevance to colitis*. Gut, 1994. **35**(3): p. 353-359.
59. Parikh, K., et al., *Colonic epithelial cell diversity in health and inflammatory bowel disease*. Nature, 2019. **567**(7746): p. 49-55.
60. Tysk, C., E. Lindberg, G. Järnerot, and B. Floderus-Myrhed, *Ulcerative colitis and Crohn's disease in an unselected population of monozygotic and dizygotic twins. A study of heritability and the influence of smoking*. Gut, 1988. **29**(7): p. 990-996.
61. Laharie, D., et al., *Inflammatory bowel disease in spouses and their offspring*. Gastroenterology, 2001. **120**(4): p. 816-819.
62. Monsen, U., et al., *Prevalence of inflammatory bowel disease among relatives of patients with ulcerative colitis*. Scandinavian journal of gastroenterology, 1987. **22**(2): p. 214-218.
63. Snapper, S.B. and D. PODOLSKY, *Genetic factors in inflammatory bowel disease*. 2013, UpToDate.
64. Okada, Y., et al., *HLA-Cw* 1202-B* 5201-DRB1* 1502 haplotype increases risk for ulcerative colitis but reduces risk for Crohn's disease*. Gastroenterology, 2011. **141**(3): p. 864-871. e5.
65. Sekirov, I. and S. Russell, *Antunes LCM, Finlay BB. Gut microbiota in health and disease*. 2010.
66. McGuckin, M.A., S.K. Lindén, P. Sutton, and T.H. Florin, *Mucin dynamics and enteric pathogens*. Nature Reviews Microbiology, 2011. **9**(4): p. 265-278.
67. Peterson, L.W. and D. Artis, *Intestinal epithelial cells: regulators of barrier function and immune homeostasis*. Nature Reviews Immunology, 2014. **14**(3): p. 141-153.
68. Hepworth, M.R., et al., *Group 3 innate lymphoid cells mediate intestinal selection of commensal bacteria-specific CD4+ T cells*. Science, 2015. **348**(6238): p. 1031-1035.
69. Nanno, M., et al., *Exacerbating role of $\gamma\delta$ T cells in chronic colitis of T-cell receptor α mutant mice*. Gastroenterology, 2008. **134**(2): p. 481-490.
70. Chieppa, M., M. Rescigno, A.Y. Huang, and R.N. Germain, *Dynamic imaging of dendritic cell extension into the small bowel lumen in response to epithelial cell TLR engagement*. The Journal of experimental medicine, 2006. **203**(13): p. 2841-2852.
71. Neurath, M.F., *Cytokines in inflammatory bowel disease*. Nature Reviews Immunology, 2014. **14**(5): p. 329-342.
72. Wallace, K.L., L.-B. Zheng, Y. Kanazawa, and D.Q. Shih, *Immunopathology of inflammatory bowel disease*. World journal of gastroenterology: WJG, 2014. **20**(1): p. 6.
73. Mangerich, A., et al., *Chemistry meets biology in colitis-associated carcinogenesis*. Free radical research, 2013. **47**(11): p. 958-986.
74. Pacher, P., J.S. Beckman, and L. Liaudet, *Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease*. Physiological reviews, 2007. **87**(1): p. 315-424.
75. Knutson, C.G., et al., *Chemical and cytokine features of innate immunity characterize serum and tissue profiles in inflammatory bowel disease*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2013. **110**(26): p. E2332-E2341.

76. Rogler, G., et al., *Nuclear factor κ B is activated in macrophages and epithelial cells of inflamed intestinal mucosa*. Gastroenterology, 1998. **115**(2): p. 357-369.
77. Pasparakis, M., *IKK/NF- κ B signaling in intestinal epithelial cells controls immune homeostasis in the gut*. Mucosal immunology, 2008. **1**(1): p. S54-S57.
78. Kuwano, Y., et al., *Tumor necrosis factor α activates transcription of the NADPH oxidase organizer 1 (NOXO1) gene and upregulates superoxide production in colon epithelial cells*. Free Radical Biology and Medicine, 2008. **45**(12): p. 1642-1652.
79. Qiu, W., et al., *PUMA-mediated intestinal epithelial apoptosis contributes to ulcerative colitis in humans and mice*. The Journal of clinical investigation, 2011. **121**(5): p. 1722-1732.
80. Andresen, L., et al., *Activation of nuclear factor κ B in colonic mucosa from patients with collagenous and ulcerative colitis*. Gut, 2005. **54**(4): p. 503-509.
81. Khor, T.O., et al., *Nrf2-deficient mice have an increased susceptibility to dextran sulfate sodium-induced colitis*. Cancer research, 2006. **66**(24): p. 11580-11584.
82. Khor, T.O., et al., *Increased Susceptibility of Nrf2 Knockout Mice to Colitis-Associated Colorectal Cancer*Colorectal Cancer Susceptibility of Nrf2 Knockout Mice. Cancer prevention research, 2008. **1**(3): p. 187-191.
83. Buttó, L.F. and D. Haller, *Dysbiosis in intestinal inflammation: cause or consequence*. International Journal of Medical Microbiology, 2016. **306**(5): p. 302-309.
84. Eminler, A.T., B. Toka, and M.İ. Uslan, *İnflamatuvar barsak hastalığı ve barsak mikrobiyotası*. Journal of Biotechnology and Strategic Health Research, 2017. **1**: p. 81-85.
85. Campbell, E.L., et al., *Transmigrating neutrophils shape the mucosal microenvironment through localized oxygen depletion to influence resolution of inflammation*. Immunity, 2014. **40**(1): p. 66-77.
86. Rezaie, A., R.D. Parker, and M. Abdollahi, *Oxidative stress and pathogenesis of inflammatory bowel disease: an epiphenomenon or the cause?* Digestive diseases and sciences, 2007. **52**: p. 2015-2021.
87. Dashdorj, A., et al., *Mitochondria-targeted antioxidant MitoQ ameliorates experimental mouse colitis by suppressing NLRP3 inflammasome-mediated inflammatory cytokines*. BMC medicine, 2013. **11**(1): p. 1-13.
88. Holmström, K.M. and T. Finkel, *Cellular mechanisms and physiological consequences of redox-dependent signalling*. Nature reviews Molecular cell biology, 2014. **15**(6): p. 411-421.
89. Andersen, J.K., *Oxidative stress in neurodegeneration: cause or consequence?* Nature medicine, 2004. **10**(Suppl 7): p. S18-S25.
90. Banan, A., et al., *Ethanol-induced barrier dysfunction and its prevention by growth factors in human intestinal monolayers: evidence for oxidative and cytoskeletal mechanisms*. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 1999. **291**(3): p. 1075-1085.
91. Rao, R., R.D. Baker, and S.S. Baker, *Inhibition of oxidant-induced barrier disruption and protein tyrosine phosphorylation in Caco-2 cell monolayers by epidermal growth factor*. Biochemical pharmacology, 1999. **57**(6): p. 685-695.
92. Naito, Y., et al., *Changes in superoxide dismutase activity in the gastric mucosa of peptic ulcer patients*. Journal of clinical gastroenterology, 1992. **14**: p. S131-4.

93. Esworthy, R.S., et al., *Mice with combined disruption of Gpx1 and Gpx2 genes have colitis*. American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology, 2001. **281**(3): p. G848-G855.
94. Biasi, F., G. Leonarduzzi, P.I. Oteiza, and G. Poli, *Inflammatory bowel disease: mechanisms, redox considerations, and therapeutic targets*. Antioxidants & redox signaling, 2013. **19**(14): p. 1711-1747.
95. Kaplan, G.G., *The global burden of IBD: from 2015 to 2025*. Nature reviews Gastroenterology & hepatology, 2015. **12**(12): p. 720-727.
96. Levine, J.S. and R. Burakoff, *Extraintestinal manifestations of inflammatory bowel disease*. Gastroenterology & hepatology, 2011. **7**(4): p. 235.
97. Goyette, P., et al., *Molecular pathogenesis of inflammatory bowel disease: genotypes, phenotypes and personalized medicine*. Annals of medicine, 2007. **39**(3): p. 177-199.
98. Bergmark, E., C.J. Calleman, F. He, and L.G. CosTA, *Determination of hemoglobin adducts in humans occupationally exposed to acrylamide*. Toxicology and applied pharmacology, 1993. **120**(1): p. 45-54.
99. Fraga, C.G. and P.I. Oteiza, *Iron toxicity and antioxidant nutrients*. Toxicology, 2002. **180**(1): p. 23-32.
100. Zapolska-Downar, D., A. MIDER, and M. Naruszewicz, *TRANS FATTY ACIDS INDUCE APOPTOSIS*. Journal of physiology and pharmacology, 2005. **56**(4): p. 611-625.
101. Bhattacharyya, A., R. Chattopadhyay, S. Mitra, and S.E. Crowe, *Oxidative stress: an essential factor in the pathogenesis of gastrointestinal mucosal diseases*. Physiological reviews, 2014. **94**(2): p. 329-354.
102. Kolios, G., V. Valatas, and S.G. Ward, *Nitric oxide in inflammatory bowel disease: a universal messenger in an unsolved puzzle*. Immunology, 2004. **113**(4): p. 427-437.
103. Winter, S.E., et al., *Host-derived nitrate boosts growth of E. coli in the inflamed gut*. science, 2013. **339**(6120): p. 708-711.
104. Sasaki, M., et al., *Increased disease activity in eNOS-deficient mice in experimental colitis*. Free Radical Biology and Medicine, 2003. **35**(12): p. 1679-1687.
105. Krieglstein, C.F., et al., *Regulation of murine intestinal inflammation by reactive metabolites of oxygen and nitrogen: divergent roles of superoxide and nitric oxide*. The Journal of experimental medicine, 2001. **194**(9): p. 1207-1218.
106. Landy, J., et al., *Tight junctions in inflammatory bowel diseases and inflammatory bowel disease associated colorectal cancer*. World journal of gastroenterology, 2016. **22**(11): p. 3117.
107. Furuse, M., et al., *Occludin: a novel integral membrane protein localizing at tight junctions*. The Journal of cell biology, 1993. **123**(6): p. 1777-1788.
108. Furuse, M., et al., *Claudin-1 and-2: novel integral membrane proteins localizing at tight junctions with no sequence similarity to occludin*. The Journal of cell biology, 1998. **141**(7): p. 1539-1550.
109. Martín-Padura, I., et al., *Junctional adhesion molecule, a novel member of the immunoglobulin superfamily that distributes at intercellular junctions and modulates monocyte transmigration*. The Journal of cell biology, 1998. **142**(1): p. 117-127.

110. Ikenouchi, J., et al., *Tricellulin constitutes a novel barrier at tricellular contacts of epithelial cells*. The Journal of cell biology, 2005. **171**(6): p. 939-945.
111. Gonzalez-Mariscal, L., Betanzos A, Nava P, and Jaramillo BE. Tight junction proteins. Prog Biophys Mol Biol, 2003. **81**: p. 1-44.
112. Van Itallie, C.M. and J.M. Anderson, *Claudins and epithelial paracellular transport*. Annu. Rev. Physiol., 2006. **68**: p. 403-429.
113. Tsukita, S. and M. Furuse, *Pores in the wall: claudins constitute tight junction strands containing aqueous pores*. The Journal of cell biology, 2000. **149**(1): p. 13-16.
114. Turksen, K. and T.-C. Troy, *Barriers built on claudins*. Journal of cell science, 2004. **117**(12): p. 2435-2447.
115. Tamura, A., et al., *Loss of claudin-15, but not claudin-2, causes Na⁺ deficiency and glucose malabsorption in mouse small intestine*. Gastroenterology, 2011. **140**(3): p. 913-923.
116. Tsukita, S. and M. Furuse, *Occludin and claudins in tight-junction strands: leading or supporting players?* Trends in cell biology, 1999. **9**(7): p. 268-273.
117. Ando-Akatsuka, Y., et al., *Interspecies diversity of the occludin sequence: cDNA cloning of human, mouse, dog, and rat-kangaroo homologues*. The Journal of cell biology, 1996. **133**(1): p. 43-47.
118. McCarthy, K.M., et al., *Occludin is a functional component of the tight junction*. Journal of cell science, 1996. **109**(9): p. 2287-2298.
119. Gye, M., *Expression of occludin in canine testis and epididymis*. Reproduction in domestic animals, 2004. **39**(1): p. 43-47.
120. Kimura, Y., et al., *Expression of occludin, tight-junction-associated protein, in human digestive tract*. The American journal of pathology, 1997. **151**(1): p. 45.
121. Kuo, W.-T., et al., *Inflammation-induced occludin downregulation limits epithelial apoptosis by suppressing caspase-3 expression*. Gastroenterology, 2019. **157**(5): p. 1323-1337.
122. Lee, S.H., *Intestinal permeability regulation by tight junction: implication on inflammatory bowel diseases*. Intestinal research, 2015. **13**(1): p. 11-18.
123. Silverberg, M.S., et al., *Toward an integrated clinical, molecular and serological classification of inflammatory bowel disease: report of a Working Party of the 2005 Montreal World Congress of Gastroenterology*. Canadian journal of gastroenterology, 2005. **19**(Suppl A): p. 5A-36A.
124. Danese, S., et al., *Development of red flags index for early referral of adults with symptoms and signs suggestive of Crohn's disease: an IOIBD initiative*. Journal of Crohn's and Colitis, 2015. **9**(8): p. 601-606.
125. Ott, C. and J. Schölmerich, *Extraintestinal manifestations and complications in IBD*. Nature reviews Gastroenterology & hepatology, 2013. **10**(10): p. 585-595.
126. Flynn, S. and S. Eisenstein, *Inflammatory bowel disease presentation and diagnosis*. Surgical Clinics, 2019. **99**(6): p. 1051-1062.
127. Pepys, M.B. and G.M. Hirschfield, *C-reactive protein: a critical update*. The Journal of clinical investigation, 2003. **111**(12): p. 1805-1812.
128. Volanakis, J.E., *Human C-reactive protein: expression, structure, and function*. Molecular immunology, 2001. **38**(2-3): p. 189-197.
129. Peyrin-Biroulet, L., et al., *Clinical disease activity, C-reactive protein normalisation and mucosal healing in Crohn's disease in the SONIC trial*. Gut, 2014. **63**(1): p. 88-95.

130. Ministro, P. and D. Martins, *Fecal biomarkers in inflammatory bowel disease: how, when and why?* Expert Review of Gastroenterology & Hepatology, 2017. **11**(4): p. 317-328.
131. Bressler, B., R. Panaccione, R.N. Fedorak, and E.G. Seidman, *Clinicians' guide to the use of fecal calprotectin to identify and monitor disease activity in inflammatory bowel disease.* Canadian Journal of Gastroenterology and Hepatology, 2015. **29**(7): p. 369-372.
132. Zhou, G., et al., *ASCA, ANCA, ALCA and many more: are they useful in the diagnosis of inflammatory bowel disease?* Digestive Diseases, 2016. **34**(1-2): p. 90-97.
133. Prideaux, L., P. De Cruz, S.C. Ng, and M.A. Kamm, *Serological antibodies in inflammatory bowel disease: a systematic review.* Inflammatory bowel diseases, 2012. **18**(7): p. 1340-1355.
134. Annese, V., et al., *Familial expression of anti-Saccharomyces cerevisiae Mannan antibodies in Crohn's disease and ulcerative colitis: a GISC study.* The American journal of gastroenterology, 2001. **96**(8): p. 2407-2412.
135. Vermeire, S., G. Van Assche, and P. Rutgeerts, *Laboratory markers in IBD: useful, magic, or unnecessary toys?* Gut, 2006. **55**(3): p. 426-431.
136. Cioffi, M., et al., *Laboratory markers in ulcerative colitis: Current insights and future advances.* World journal of gastrointestinal pathophysiology, 2015. **6**(1): p. 13.
137. Maor, I., T. Rainis, A. Lanir, and A. Lavy, *Adenosine deaminase activity in patients with Crohn's disease: distinction between active and nonactive disease.* European journal of gastroenterology & hepatology, 2011. **23**(7): p. 598-602.
138. Díaz-Jiménez, D., et al., *Soluble ST2: a new and promising activity marker in ulcerative colitis.* World journal of gastroenterology: WJG, 2011. **17**(17): p. 2181.
139. Gupta, N.K., et al., *Serum analysis of tryptophan catabolism pathway: correlation with Crohn's disease activity.* Inflammatory bowel diseases, 2012. **18**(7): p. 1214-1220.
140. Mendoza, J. and M. Abreu, *Biological markers in inflammatory bowel disease: practical consideration for clinicians.* Gastroenterologie clinique et biologique, 2009. **33**: p. S158-S173.
141. Peyrin-Biroulet, L., et al., *Mesenteric fat as a source of C reactive protein and as a target for bacterial translocation in Crohn's disease.* Gut, 2012. **61**(1): p. 78-85.
142. Travis, S., et al., *Predicting outcome in severe ulcerative colitis.* Gut, 1996. **38**(6): p. 905-910.
143. Danik, J.S. and P.M. Ridker, *Genetic determinants of C-reactive protein.* Current atherosclerosis reports, 2007. **9**(3): p. 195-203.
144. Vermeire, S., G. Van Assche, and P. Rutgeerts, *C-reactive protein as a marker for inflammatory bowel disease.* Inflammatory bowel diseases, 2004. **10**(5): p. 661-665.
145. Foell, D., H. Wittkowski, and J. Roth, *Monitoring disease activity by stool analyses: from occult blood to molecular markers of intestinal inflammation and damage.* Gut, 2009. **58**(6): p. 859-868.
146. Chung-Faye, G., et al., *Fecal M2-pyruvate kinase (M2-PK): a novel marker of intestinal inflammation.* Inflammatory bowel diseases, 2007. **13**(11): p. 1374-1378.

147. Aomatsu, T., et al., *Faecal chitinase 3-like-1: a novel biomarker of disease activity in paediatric inflammatory bowel disease*. *Alimentary pharmacology & therapeutics*, 2011. **34**(8): p. 941-948.
148. Lehmann, F.S., E. Burri, and C. Beglinger, *The role and utility of faecal markers in inflammatory bowel disease*. *Therapeutic advances in gastroenterology*, 2015. **8**(1): p. 23-36.
149. Lasson, A., et al., *The intra-individual variability of faecal calprotectin: a prospective study in patients with active ulcerative colitis*. *Journal of Crohn's and Colitis*, 2015. **9**(1): p. 26-32.
150. Cracowski, J.-L., et al., *Increased urinary F2-isoprostanes in patients with Crohn's disease*. *The American journal of gastroenterology*, 2002. **97**(1): p. 99-103.
151. Johnson, J.C., et al., *Urine PGE-M: a metabolite of prostaglandin E2 as a potential biomarker of advanced colorectal neoplasia*. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, 2006. **4**(11): p. 1358-1365.
152. Stanke-Labesque, F., et al., *Urinary leukotriene E4 excretion: a biomarker of inflammatory bowel disease activity*. *Inflammatory bowel diseases*, 2008. **14**(6): p. 769-774.
153. Arai, Y., et al., *Prostaglandin E-major urinary metabolite as a reliable surrogate marker for mucosal inflammation in ulcerative colitis*. *Inflammatory bowel diseases*, 2014. **20**(7): p. 1208-1216.
154. Bolignano, D., et al., *Neutrophil gelatinase-associated lipocalin levels in patients with Crohn disease undergoing treatment with infliximab*. *Journal of Investigative Medicine*, 2010. **58**(3): p. 569-571.
155. Markó, L., et al., *Potential urinary biomarkers of disease activity in Crohn's disease*. *Scandinavian journal of gastroenterology*, 2010. **45**(12): p. 1440-1448.
156. Nancey, S., et al., *Urinary neopterin is a valuable tool in monitoring Crohn's disease activity*. *Inflammatory bowel diseases*, 2008. **14**(11): p. 1548-1554.
157. Stein, R.B. and G.R. Lichtenstein, *Medical therapy for Crohn's disease: the state of the art*. *Surgical Clinics of North America*, 2001. **81**(1): p. 71-101.
158. Pineton de Chambrun, G., L. Peyrin-Biroulet, M. Lémann, and J.-F. Colombel, *Clinical implications of mucosal healing for the management of IBD*. *Nature reviews Gastroenterology & hepatology*, 2010. **7**(1): p. 15-29.
159. Herfarth, H. and S.R. Vavricka, *5-Aminosalicylic acid chemoprevention in inflammatory bowel diseases: is it necessary in the age of biologics and small molecules?* *Inflammatory Intestinal Diseases*, 2022. **7**(1): p. 28-35.
160. Neurath, M.F., *Current and emerging therapeutic targets for IBD*. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 2017. **14**(5): p. 269-278.
161. Sc, T. and W. LJ, *Cortisone in ulcerative colitis; preliminary report on a therapeutic trial*. *British Medical Journal*, 1954. **2**(4884): p. 375-378.
162. Yasir, M., A. Goyal, and S. Sonthalia, *Corticosteroid adverse effects*. 2018.
163. Nielsen, O.H. and M.A. Ainsworth, *Tumor necrosis factor inhibitors for inflammatory bowel disease*. *New England Journal of Medicine*, 2013. **369**(8): p. 754-762.
164. Van Dullemen, H.M., et al., *Treatment of Crohn's disease with anti-tumor necrosis factor chimeric monoclonal antibody (cA2)*. *Gastroenterology*, 1995. **109**(1): p. 129-135.
165. Sands, B.E., et al., *Infliximab maintenance therapy for fistulizing Crohn's disease*. *New England Journal of Medicine*, 2004. **350**(9): p. 876-885.

166. Hanauer, S.B., et al., *Human anti-tumor necrosis factor monoclonal antibody (adalimumab) in Crohn's disease: the CLASSIC-I Trial*. Gastroenterology, 2006. **130**(2): p. 323-333.
167. Feagan, B.G. and A. Alfadhli, *Methotrexate in inflammatory bowel disease*. Gastroenterology Clinics, 2004. **33**(2): p. 407-420.
168. ÇAĞIN, Y.F. and Y. SEÇKİN, *İnflamatuvar Barsak Hastalığında Değişen Tedavi Stratejileri*.
169. Torres, J., et al., *Ulcerative colitis as a progressive disease: the forgotten evidence*. Inflammatory bowel diseases, 2012. **18**(7): p. 1356-1363.
170. Im, J.P., B.D. Ye, Y.S. Kim, and J.S. Kim, *Changing treatment paradigms for the management of inflammatory bowel disease*. The Korean journal of internal medicine, 2018. **33**(1): p. 28.
171. Dahan, A., G.L. Amidon, and E.M. Zimmermann, *Drug targeting strategies for the treatment of inflammatory bowel disease: a mechanistic update*. Expert review of clinical immunology, 2010. **6**(4): p. 543-550.
172. Yanai, H., N. Salomon, and A. Lahat, *Complementary therapies in inflammatory bowel diseases*. Current gastroenterology reports, 2016. **18**: p. 1-8.
173. Biasi, F., et al., *Polyphenol supplementation as a complementary medicinal approach to treating inflammatory bowel disease*. Current Medicinal Chemistry, 2011. **18**(31): p. 4851-4865.
174. Romier, B., Y.-J. Schneider, Y. Larondelle, and A. During, *Dietary polyphenols can modulate the intestinal inflammatory response*. Nutrition reviews, 2009. **67**(7): p. 363-378.
175. Chiba, M., et al., *Lifestyle-related disease in Crohn's disease: relapse prevention by a semi-vegetarian diet*. World journal of gastroenterology: WJG, 2010. **16**(20): p. 2484.
176. Vezza, T., et al., *Flavonoids in inflammatory bowel disease: a review*. nutrients, 2016. **8**(4): p. 211.
177. Keshavarzian, A., et al., *Role of reactive oxygen metabolites in experimental colitis*. Gut, 1990. **31**(7): p. 786-790.
178. Emerit, J., et al., *Phase II trial of copper zinc superoxide dismutase (CuZn SOD) in the treatment of Crohn's disease*. Free Radical Research Communications, 1991. **13**(1): p. 563-569.
179. Managlia, E., R.B. Katzman, J.B. Brown, and T.A. Barrett, *Antioxidant properties of mesalamine in colitis inhibit phosphoinositide 3-kinase signaling in progenitor cells*. Inflammatory bowel diseases, 2013. **19**(10): p. 2051-2060.
180. Guijarro, L.G., et al., *N-acetyl-L-cysteine combined with mesalamine in the treatment of ulcerative colitis: randomized, placebo-controlled pilot study*. World journal of gastroenterology: WJG, 2008. **14**(18): p. 2851.
181. DISEASES, S.O.F.S.O.I.B., *Allopurinol in addition to 5-aminosalicylic acid based drugs for the maintenance treatment of ulcerative colitis*. Alimentary pharmacology & therapeutics, 2000. **14**(9): p. 1159-1162.
182. Goreja, W., *Black seed: nature's miracle remedy*. 2003: Karger Publishers.
183. Kooti, W., et al., *Phytochemistry, pharmacology, and therapeutic uses of black seed (Nigella sativa)*. Chinese journal of natural medicines, 2016. **14**(10): p. 732-745.
184. Staniek, K. and L. Gille. *Is thymoquinone an antioxidant?* in *BMC pharmacology*. 2010. BioMed Central.

185. Kassab, R.B. and R.E. El-Hennamy, *The role of thymoquinone as a potent antioxidant in ameliorating the neurotoxic effect of sodium arsenate in female rat*. Egyptian Journal of Basic and Applied Sciences, 2017. **4**(3): p. 160-167.
186. Sayed-Ahmed, M.M., et al., *Thymoquinone attenuates diethylnitrosamine induction of hepatic carcinogenesis through antioxidant signaling*. Oxidative medicine and cellular longevity, 2010. **3**(4): p. 254-261.
187. Badary, O.A., R.A. Taha, A.M. Gamal El-Din, and M.H. Abdel-Wahab, *Thymoquinone is a potent superoxide anion scavenger*. Drug and chemical toxicology, 2003. **26**(2): p. 87-98.
188. Dur, A., et al., *The anti-inflammatory and antioxidant effects of thymoquinone on ceruleine-induced acute pancreatitis in rats*. 2016.
189. El-Dakhakhny, M., M. Barakat, M. Abd El-Halim, and S. Aly, *Effects of Nigella sativa oil on gastric secretion and ethanol induced ulcer in rats*. Journal of ethnopharmacology, 2000. **72**(1-2): p. 299-304.
190. Broom, O., et al., *Mitogen activated protein kinases: a role in inflammatory bowel disease?* Clinical & Experimental Immunology, 2009. **158**(3): p. 272-280.
191. Kaminska, B., *MAPK signalling pathways as molecular targets for anti-inflammatory therapy—from molecular mechanisms to therapeutic benefits*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics, 2005. **1754**(1-2): p. 253-262.
192. Waetzig, G.H., et al., *p38 mitogen-activated protein kinase is activated and linked to TNF- α signaling in inflammatory bowel disease*. The Journal of Immunology, 2002. **168**(10): p. 5342-5351.
193. Afroze, S.S., et al., *Targeting kinases with thymoquinone: A molecular approach to cancer therapeutics*. Drug Discovery Today, 2020. **25**(12): p. 2294-2306.
194. Lei, X., et al., *Thymoquinone prevents and ameliorates dextran sulfate sodium-induced colitis in mice*. Digestive diseases and sciences, 2012. **57**: p. 2296-2303.
195. Mahgoub, A.A., *Thymoquinone protects against experimental colitis in rats*. Toxicology letters, 2003. **143**(2): p. 133-143.
196. Chen, P., et al., *Serum biomarkers for inflammatory bowel disease*. Frontiers in Medicine, 2020. **7**: p. 123.
197. Patti, G.J., O. Yanes, and G. Siuzdak, *Metabolomics: the apogee of the omics trilogy*. Nature reviews Molecular cell biology, 2012. **13**(4): p. 263-269.
198. Chrysanthopoulos, P.K., C.T. Goudar, and M.I. Klapa, *Metabolomics for high-resolution monitoring of the cellular physiological state in cell culture engineering*. Metabolic engineering, 2010. **12**(3): p. 212-222.
199. Allen, J., et al., *High-throughput classification of yeast mutants for functional genomics using metabolic footprinting*. Nature biotechnology, 2003. **21**(6): p. 692-696.
200. Wang, J.-R., et al., *Improved sphingolipidomic approach based on ultra-high performance liquid chromatography and multiple mass spectrometries with application to cellular neurotoxicity*. Analytical chemistry, 2014. **86**(12): p. 5688-5696.
201. Winder, C.L., et al., *Global metabolic profiling of Escherichia coli cultures: an evaluation of methods for quenching and extraction of intracellular metabolites*. Analytical Chemistry, 2008. **80**(8): p. 2939-2948.

202. Bayet-Robert, M., D. Morvan, P. Chollet, and C. Barthomeuf, *Pharmacometabolomics of docetaxel-treated human MCF7 breast cancer cells provides evidence of varying cellular responses at high and low doses*. Breast cancer research and treatment, 2010. **120**: p. 613-626.
203. Cao, B., et al., *GC-TOFMS analysis of metabolites in adherent MDCK cells and a novel strategy for identifying intracellular metabolic markers for use as cell amount indicators in data normalization*. Analytical and bioanalytical chemistry, 2011. **400**: p. 2983-2993.
204. Strimbu, K. and J.A. Tavel, *What are biomarkers?* Current Opinion in HIV and AIDS, 2010. **5**(6): p. 463.
205. Kennedy, A.D., et al., *Metabolomics in the clinic: A review of the shared and unique features of untargeted metabolomics for clinical research and clinical testing*. Journal of Mass Spectrometry, 2018. **53**(11): p. 1143-1154.
206. Lane, A.N. and T.W.-M. Fan, *Quantification and identification of isotopomer distributions of metabolites in crude cell extracts using ¹H TOCSY*. Metabolomics, 2007. **3**: p. 79-86.
207. Martineau, E., et al., *Strategy for choosing extraction procedures for NMR-based metabolomic analysis of mammalian cells*. Analytical and bioanalytical chemistry, 2011. **401**(7): p. 2133.
208. Teng, Q., et al., *A direct cell quenching method for cell-culture based metabolomics*. Metabolomics, 2009. **5**: p. 199-208.
209. Barnes, S., et al., *Training in metabolomics research. I. Designing the experiment, collecting and extracting samples and generating metabolomics data*. Journal of Mass Spectrometry, 2016. **51**(7): p. 461-475.
210. Zhang, A., et al., *Cell metabolomics*. Omics: a journal of integrative biology, 2013. **17**(10): p. 495-501.
211. Laponogov, I., et al., *ChemDistiller: an engine for metabolite annotation in mass spectrometry*. Bioinformatics, 2018. **34**(12): p. 2096-2102.
212. Lee, S.Y., et al., *Comparison of GC/MS and LC/MS methods for the analysis of propofol and its metabolites in urine*. Journal of Chromatography B, 2012. **900**: p. 1-10.
213. Danielsson, A.P., T. Moritz, H. Mulder, and P. Spégel, *Development and optimization of a metabolomic method for analysis of adherent cell cultures*. Analytical biochemistry, 2010. **404**(1): p. 30-39.
214. Vuckovic, D., *Current trends and challenges in sample preparation for global metabolomics using liquid chromatography-mass spectrometry*. Analytical and bioanalytical chemistry, 2012. **403**(6): p. 1523-1548.
215. Want, E.J., et al., *Global metabolic profiling of animal and human tissues via UPLC-MS*. Nature protocols, 2013. **8**(1): p. 17-32.
216. Zhou, B., J.F. Xiao, L. Tuli, and H.W. Ransom, *LC-MS-based metabolomics*. Molecular BioSystems, 2012. **8**(2): p. 470-481.
217. Emwas, A.-H., et al., *NMR spectroscopy for metabolomics research*. Metabolites, 2019. **9**(7): p. 123.
218. Peisl, L., E.L. Schymanski, and P. Wilmes, *Dark matter in host-microbiome metabolomics: Tackling the unknowns—A review*. Analytica Chimica Acta, 2018. **1037**: p. 13-27.
219. Gorrochategui, E., J. Jaumot, S. Lacorte, and R. Tauler, *Data analysis strategies for targeted and untargeted LC-MS metabolomic studies: Overview and workflow*. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 2016. **82**: p. 425-442.

220. Worley, B. and R. Powers, *Multivariate analysis in metabolomics*. *Curr Metabol* 1: 92–107. 2012.
221. Jolliffe, I.T. and J. Cadima, *Principal component analysis: a review and recent developments*. *Philosophical transactions of the royal society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, 2016. **374**(2065): p. 20150202.
222. Bauset, C., L. Gisbert-Ferrándiz, and J. Cosín-Roger, *Metabolomics as a promising resource identifying potential biomarkers for inflammatory bowel disease*. *Journal of Clinical Medicine*, 2021. **10**(4): p. 622.
223. Čuperlović-Culf, M., D.A. Barnett, A.S. Culf, and I. Chute, *Cell culture metabolomics: applications and future directions*. *Drug discovery today*, 2010. **15**(15-16): p. 610-621.
224. León, Z., J.C. García-Cañaveras, M.T. Donato, and A. Lahoz, *Mammalian cell metabolomics: experimental design and sample preparation*. *Electrophoresis*, 2013. **34**(19): p. 2762-2775.
225. Khoo, S.H.G. and M. Al-Rubeai, *Metabolomics as a complementary tool in cell culture*. *Biotechnology and applied biochemistry*, 2007. **47**(2): p. 71-84.
226. HHHW, S., *Determination of nitrite and nitrate by the Griess reaction*. *Methods in nitric oxide research*, 1996: p. 491-497.
227. Pizzino, G., et al., *Oxidative stress: harms and benefits for human health*. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2017. **2017**.
228. Oskouei, Z., S. Mehri, F. Kalalinia, and H. Hosseinzadeh, *Evaluation of the effect of thymoquinone in d-galactose-induced memory impairments in rats: Role of MAPK, oxidative stress, and neuroinflammation pathways and telomere length*. *Phytotherapy Research*, 2021. **35**(4): p. 2252-2266.
229. Han, X., M.P. Fink, and R.L. Delude, *Proinflammatory cytokines cause NO-dependent and-independent changes in expression and localization of tight junction proteins in intestinal epithelial cells*. *Shock*, 2003. **19**(3): p. 229-237.
230. Han, X., M.P. Fink, R. Yang, and R.L. Delude, *Increased iNOS activity is essential for intestinal epithelial tight junction dysfunction in endotoxemic mice*. *Shock*, 2004. **21**(3): p. 261-270.
231. Hori, M., et al., *Upregulation of iNOS by COX-2 in muscularis resident macrophage of rat intestine stimulated with LPS*. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 2001. **280**(5): p. G930-G938.
232. Zeissig, S., et al., *Changes in expression and distribution of claudin 2, 5 and 8 lead to discontinuous tight junctions and barrier dysfunction in active Crohn's disease*. *Gut*, 2007. **56**(1): p. 61-72.
233. Ozcan, O., H. Erdal, and Z. Yonden, *İskemi-reperfüzyon hasari ve oksidatif stres ilişkisine biyokimyasal bakiş*. *The Medical Journal of Mustafa Kemal University*, 2015. **6**(23): p. 27-33.
234. Chu, W.-Y., et al., *Pharmacokinetic/pharmacodynamic modelling of allopurinol, its active metabolite oxypurinol, and biomarkers hypoxanthine, xanthine and uric acid in hypoxic-ischemic encephalopathy neonates*. *Clinical Pharmacokinetics*, 2022: p. 1-13.
235. Connor, H., H. Woods, and J. Ledingham, *Comparison of the kinetics and utilisation of D (–)-and L (+)-sodium lactate in normal man*. *Annals of nutrition and metabolism*, 1983. **27**(6): p. 481-487.
236. Ippolito, L., A. Morandi, E. Giannoni, and P. Chiarugi, *Lactate: a metabolic driver in the tumour landscape*. *Trends in biochemical sciences*, 2019. **44**(2): p. 153-166.

237. Jansen, T.C., J. van Bommel, and J. Bakker, *Blood lactate monitoring in critically ill patients: a systematic health technology assessment*. Critical care medicine, 2009. **37**(10): p. 2827-2839.
238. Pucino, V., M. Bombardieri, C. Pitzalis, and C. Mauro, *Lactate at the crossroads of metabolism, inflammation, and autoimmunity*. European journal of immunology, 2017. **47**(1): p. 14-21.
239. Sitkin, S., et al., *Dysbiosis in ulcerative colitis and celiac disease and its therapeutic correction by butyric acid plus inulin*. Experimental and Clinical Gastroenterology, 2017(6): p. 77-98.
240. Shelton, C.D. and M.X. Byndloss, *Gut epithelial metabolism as a key driver of intestinal dysbiosis associated with noncommunicable diseases*. Infection and Immunity, 2020. **88**(7): p. 10.1128/iai. 00939-19.
241. HMDB. *Fumaric acid*. 2023; Available from: <https://hmdb.ca/metabolites/HMDB0000134#identification>.
242. HMDB. *Showing metabocard for myo-Inositol (HMDB0000211)*. 2023; Available from: <https://hmdb.ca/metabolites/HMDB0000211#identification>.
243. Formoso, G., et al., *Inositol and antioxidant supplementation: Safety and efficacy in pregnancy*. Diabetes/metabolism research and reviews, 2019. **35**(5): p. e3154.
244. Kim, H.W., et al., *Myo-inositol restores the inflammation-induced down-regulation of taurine transport by the murine macrophage cell line, RAW 264.7*. Life sciences, 2003. **73**(19): p. 2477-2489.
245. HMDB. *Showing metabocard for 2-Hydroxyisobutyrate (HMDB0242161)*. 2021; Available from: <https://hmdb.ca/metabolites/HMDB0242161#identification>.
246. Dawiskiba, T., et al., *Serum and urine metabolomic fingerprinting in diagnostics of inflammatory bowel diseases*. World journal of gastroenterology: WJG, 2014. **20**(1): p. 163.
247. Oz, H.S., T.S. Chen, and H. Nagasawa, *Comparative efficacies of 2 cysteine prodrugs and a glutathione delivery agent in a colitis model*. Translational Research, 2007. **150**(2): p. 122-129.
248. Liao, Z., et al., *LC-MS-based metabolomics analysis of Berberine treatment in ulcerative colitis rats*. Journal of Chromatography B, 2019. **1133**: p. 121848.
249. Aguayo-Cerón, K.A., et al., *Glycine: The Smallest Anti-Inflammatory Micronutrient*. International journal of molecular sciences, 2023. **24**(14): p. 11236.
250. Hannemann, J. and R. Böger, *Dysregulation of the nitric oxide/Dimethylarginine pathway in hypoxic pulmonary vasoconstriction—molecular mechanisms and clinical significance*. Frontiers in Medicine, 2022. **9**: p. 835481.
251. Liu, Z., et al., *O31 Dysregulated gut microbiota-host metabolism underpins immune activation in a microbiota-dependent model of ulcerative colitis*. 2022, BMJ Publishing Group.
252. Bose, S., V. Ramesh, and J.W. Locasale, *Acetate metabolism in physiology, cancer, and beyond*. Trends in cell biology, 2019. **29**(9): p. 695-703.
253. Yang, H., et al., *Acetic acid alleviates the inflammatory response and liver injury in septic mice by increasing the expression of TRIM40*. Experimental and therapeutic medicine, 2019. **17**(4): p. 2789-2798.
254. Daïen, C.I., et al., *Gut-derived acetate promotes B10 cells with antiinflammatory effects*. JCI insight, 2021. **6**(7).

255. Chen, F., et al., *Citraconate inhibits ACOD1 (IRG1) catalysis, reduces interferon responses and oxidative stress, and modulates inflammation and cell metabolism*. *Nature Metabolism*, 2022. **4**(5): p. 534-546.
256. O'Neill, L.A. and M.N. Artyomov, *Itaconate: the poster child of metabolic reprogramming in macrophage function*. *Nature Reviews Immunology*, 2019. **19**(5): p. 273-281.
257. Akyuz, M., et al., *Radioprotective effect of thymoquinone on salivary gland of rats exposed to total cranial irradiation*. *Head & Neck*, 2017. **39**(10): p. 2027-2035.
258. Palsson-McDermott, E.M. and L.A. O'Neill, *The Warburg effect then and now: from cancer to inflammatory diseases*. *Bioessays*, 2013. **35**(11): p. 965-973.
259. Ratter, J.M., et al., *In vitro and in vivo effects of lactate on metabolism and cytokine production of human primary PBMCs and monocytes*. *Frontiers in immunology*, 2018. **9**: p. 2564.
260. Gu, J., et al., *Tumor metabolite lactate promotes tumorigenesis by modulating MOESIN lactylation and enhancing TGF- β signaling in regulatory T cells*. *Cell reports*, 2022. **39**(12).
261. Diez, V., et al., *Glycolate combats massive oxidative stress by restoring redox potential in *Caenorhabditis elegans**. *Communications biology*, 2021. **4**(1): p. 151.
262. Nie, C., et al., *Branched chain amino acids: beyond nutrition metabolism*. *International journal of molecular sciences*, 2018. **19**(4): p. 954.
263. Zhang, S., et al., *Novel metabolic and physiological functions of branched chain amino acids: a review*. *Journal of animal science and biotechnology*, 2017. **8**: p. 1-12.
264. Ma, N., et al., *Nutrients mediate intestinal bacteria–mucosal immune crosstalk*. *Frontiers in immunology*, 2018. **9**: p. 5.
265. Manosalva, C., et al., *Role of lactate in inflammatory processes: Friend or foe*. *Frontiers in Immunology*, 2022. **12**: p. 808799.
266. Adeleke, G.E. and O.A. Adaramoye, *Betulinic acid abates N-nitrosodimethylamine-induced changes in lipid metabolism, oxidative stress, and inflammation in the liver and kidney of Wistar rats*. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 2021. **35**(11): p. e22901.
267. Penberthy, W.T., *Editorial [hot topic: nicotinamide adenine dinucleotide biology and disease (executive editor: w. todd penberthy)]*. *Current pharmaceutical design*, 2009. **15**(1): p. 1-2.
268. Zhai, R.G., M. Rizzi, and S. Garavaglia, *Nicotinamide/nicotinic acid mononucleotide adenylyltransferase, new insights into an ancient enzyme*. *Cellular and molecular life sciences*, 2009. **66**: p. 2805-2818.
269. Matsushita, T., et al., *The overexpression of SIRT1 inhibited osteoarthritic gene expression changes induced by interleukin-1 β in human chondrocytes*. *Journal of Orthopaedic Research*, 2013. **31**(4): p. 531-537.
270. Imai, S.-i., *The NAD World: a new systemic regulatory network for metabolism and aging—Sirt1, systemic NAD biosynthesis, and their importance*. *Cell biochemistry and biophysics*, 2009. **53**: p. 65-74.
271. Ma, Y., et al., *Anti-inflammation effects and potential mechanism of saikosaponins by regulating nicotinate and nicotinamide metabolism and arachidonic acid metabolism*. *Inflammation*, 2016. **39**: p. 1453-1461.

272. Li, Z., et al., *The ratio of phosphatidylcholine to phosphatidylethanolamine influences membrane integrity and steatohepatitis*. Cell metabolism, 2006. **3**(5): p. 321-331.
273. Fu, S., et al., *Aberrant lipid metabolism disrupts calcium homeostasis causing liver endoplasmic reticulum stress in obesity*. Nature, 2011. **473**(7348): p. 528-531.
274. Yen, C.-L., M.-H. Mar, and S.H. Zeisel, *Choline deficiency-induced apoptosis in PC12 cells is associated with diminished membrane phosphatidylcholine and sphingomyelin, accumulation of ceramide and diacylglycerol, and activation of a caspase*. FASEB Journal, 1999. **13**(1): p. 135-142.
275. Lodhi, I.J., et al., *Peroxisomal lipid synthesis regulates inflammation by sustaining neutrophil membrane phospholipid composition and viability*. Cell metabolism, 2015. **21**(1): p. 51-64.
276. Broniec, A., et al., *Interactions of plasmalogens and their diacyl analogs with singlet oxygen in selected model systems*. Free Radical Biology and Medicine, 2011. **50**(7): p. 892-898.