



**Ülseratif Kolit Modelinde *Momordica charantia*'nın
İyileştirici Etkilerinin Moleküler Mekanizmalarının
Araştırılması**

Program Kodu: 3001

Proje No: 216Z093

Proje Yürütücüsü:

Doç. Dr. Aslı SEMİZ

Araştırmacı:

Prof. Dr. Hülya ÇETİN

Bursiyer:

Kübra KOCABIYIK

KASIM 2018

DENİZLİ

ÖNSÖZ

Ülseratif kolit rektum ve kolon mukozasının inflamasyon ve ülserleşmesi ile seyreden inflamatuvar bağırsak hastalığıdır. Ülseratif kolitin patogeneğinde genetik, çevresel ve özellikle immünolojik faktörlerin önemli rolü olduğu düşünülmektedir. Bu nedenle immüno-inflamatuvar yolları hedefleyen ilaçlar son 15 yıldan beri ülseratif kolit tedavisinde kullanılmaktadır. Bu amaçla birçok yeni ilaç geliştirilmiş olmakla birlikte, ülseratif kolitin tedavisinde en çok kullanılan ilaçlar aminosalisilatlar ve kortikosteroidlerdir. Günümüzde alternatif tedavi ürünlerine gösterilen ilgi her geçen gün artmaktadır. Özellikle ülkemizde bitkilerden çeşitli yollarla elde edilen ekstreler genel olarak iyileşmeyi sağlamak veya koruyucu amaçlar için gittikçe artan bir popülerite ile kullanılmaktadır. Ancak halk arasındaki bu preparatların doğal olduğu ve zararsız olduğu inancının aksine bu preparatların eş zamanlı olarak gıdalar, çevreden alınan kimyasallar veya diğer tıbbi ilaçlar ile etkileşerek hayati tehlike arz eden zararlar oluşturabilecekleri de göz önünde bulundurulmalıdır. Bu nedenle, alternatif tedaviler için halk arasında kullanılan bitkisel preparatların detaylı bir şekilde çalışılarak yararlı ve zararlı etkilerinin tanımlanması önem arz etmektedir.

Ülkemizde, *Momordica charantia* (kudret narı) bitkisi bu hastalığın tedavisinde ve yan etkilerinin azaltılması için çok fazla kullanılmaktadır. Fakat bu bitkinin iyileştirici etkisinin olup olmadığı ve varsa nasıl bu etkiyi gösterdiği hakkında bilimsel literatürde bir bilgi yoktur. Tüm bunların ışığında, çalışmamızda *Momordica charantia*'nın trinitrobenzen sülfonik asit uyarımlı ülseratif kolit modelinde terapötik etkisinin moleküler mekanizmaları araştırılmıştır. Bu çalışma, bir aktif bileşen izolasyonu ve karakterizasyonu çalışması değil aksine halkın kullandığı şekilde [ekstre halinde (zeytinyağlı marmelat)] etki mekanizmalarının tanımlanmasını kapsayan bir araştırmadır.

Çalışmanın sonuçları *Momordica charantia*'nın uygun dozlarda kullanıldığında ülseratif kolit hastalığında kullanılabilecek önemli bir alternatif bitkisel tedavi etmeni olduğunu göstermektedir.

Proje yürütücü olarak emeği geçen araştırmacı hocamıza, bursiyere ve araştırmacı veya bursiyer olmadığı halde bir şekilde katkı sağlayan ekip arkadaşlarımızdan Elif KALE'ye, Veteriner Öğr. Gör. Barbaros ŞAHİN'e, proje önerimizi değerlendiren ve raporlarımızı okuyan raportör hocalarımıza, TÜBİTAK'ta projemizin değerlendirme sürecine katılan KBAG çalışanlarına çok teşekkür ederim.

Bu çalışma 216Z093 numaralı TÜBİTAK projesi kapsamında gerçekleştirilmiştir.

Doç. Dr. Aslı SEMİZ

İÇİNDEKİLER

1. GİRİŞ.....	1
2. MATERYAL ve METOT.....	10
2.1. MC Zeytinyağlı Marmelatının Hazırlanması.....	10
2.2. Deneysel Hayvan Çalışmaları.....	10
2.2.1. Deneysel TNBS Kolit Oluşturulması ve MC Marmelatının Verilmesi.....	10
2.2.2. Dokuların Temini.....	12
2.3. Histopatolojik İncelemeler.....	14
2.4. Moleküler Mekanizma Belirleme Çalışmaları.....	14
2.4.1. MC Marmelatının Genlerin Transkripsiyonel İfade Düzeylerine Etkilerinin Belirlenmesi.....	14
2.4.1.1. Total RNA İzolasyonu.....	14
2.4.1.2. Total RNA'nın Agaroz Jel Elektroforezi ile Görüntülenmesi.....	15
2.4.1.3. RNA Miktar Tayini.....	16
2.4.1.4. mRNA Düzeyinde Ekspresyonların Tayin Edilmesi.....	17
2.4.2. MC Marmelatının Genlerin Translasyonel İfade Düzeylerine Etkilerinin Belirlenmesi.....	19
2.4.2.1. Kolon Total Protein Ekstraksiyonu-Örnek Hazırlanması.....	19
2.4.2.2. Bişinşonik Asit ile Protein Tayini.....	20
2.4.2.3. SDS-Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAJE) ve Western Blot.....	21
2.5. Diagnostik Enzim Aktiviteleri Üzerine Etkilerinin Saptanması.....	23
2.5.1. Serum Aminotransferazların Tayini (AST ve ALT).....	23
2.5.2. Serum Laktat Dehidrogenaz (LDH) Aktivite Tayini.....	23
2.6. İstatistiksel Analizler.....	24
3. BULGULAR.....	25
3.1. Enjeksiyon Aşaması- <i>in vivo</i> Hayvan Çalışmaları	25
3.2. Serum Aminotransferazların Tayini (AST ve ALT).....	26
3.3. Serum Laktat Dehidrogenaz Aktivitesi (LDH).....	27

3.4. Histopatolojik Analizler.....	29
3.5. MC Marmelatının Enzim Ekspresyon Düzeyleri Üzerine Etkilerinin Saptanması.....	31
3.5.1. mRNA Düzeyinde Ekspresyonların Tayin Edilmesi: RT-PZR.....	31
3.5.2. Protein Düzeyinde Ekspresyonların Tayin Edilmesi.....	41
4. TARTIŞMA.....	43
5. SONUÇ.....	49

TABLO LİSTESİ

Tablo 1. Deney hayvanlarına uygulama protokolü.....	12
Tablo 2. Seçilen genler için tanımlanan primer dizileri ve yapışma sıcaklıkları	17
Tablo 3. PZR karışımı	19
Tablo 4. PZR koşulları.....	19
Tablo 5. SDS-PAJE ayrıştırıcı ve sıkıştırıcı jellerin formülasyonları.....	21
Tablo 6. Denek bilgileri.....	25
Tablo 7. AST-ALT aktiviteleri.....	26
Tablo 8. LDH aktiviteleri.....	27
Tablo 9. mRNA ekspresyon analizleri sonucu elde edilen değerler.....	41
Tablo 10. Blotların görüntü analizleri sonucu elde edilen değerler.....	42

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1. ÜK patogenezinde rol oynayan genlerden bazılarının birbirleriyle olan ilişkilerinin Qiagen GNCPro analiz programı ile gösterilmesi.....	6
--	---

Şekil 2. <i>Momordica charantia</i> (kudret narı).....	9
Şekil 3. Sıçanların tartılıp, rastgele gruplandırılması.....	10
Şekil 4. Deneysel TNBS kolit oluşturulması.....	11
Şekil 5. Sıçanlara zeytinyağı, prednisolon ve MC marmelatının verilmesi.....	12
Şekil 6. Sıçanlardan dokuların temini.....	13
Şekil 7. Sıçanlardan kan alınması ve serum eldesi.....	13
Şekil 8. Sıvı azot ile doku öğütme.....	15
Şekil 9. Öğütülmüş dokuların tartımı.....	15
Şekil 10. İzole edilmiş total RNA'ların agaroz jel elektroforezde yürütülmesi.....	16
Şekil 11. İzole edilmiş total RNA'ların elektroforez görüntüsü.....	16
Şekil 12. Elde edilen RNA'ların Nanodrop'ta miktar tayini.....	16
Şekil 13. Kolon dokularından protein ekstraksiyonu.....	20
Şekil 14. BCA ile protein miktar tayini.....	20
Şekil 15. İzole edilen proteinlerin SDS-PAJE'de yürütülmesi.....	22
Şekil 16. İzole edilen proteinlerin jelden membrana elektroforetik transferi (Western blot)....	23
Şekil 17. Elektroforetik transfer sonucu membranın antikorlarla işaretlenmesi.....	23
Şekil 18. AST aktivitesi.....	27
Şekil 19. ALT aktivitesi.....	27
Şekil 20. LDH aktivitesi.....	28
Şekil 21. Normal kontrol grubuna ait kolon kesiti.....	29
Şekil 22. Hasta kontrol grubuna ait kolon kesiti.....	29
Şekil 23. Kolit grubuna ait kolon kesiti.....	30
Şekil 24. Tedavi grubuna ait kolon kesiti.....	30
Şekil 25. Tedavi pozitif kontrol grubuna ait kolon kesiti.....	31
Şekil 26. MC marmelatının ÜK oluşturulan sıçan kolon dokularında IFN- γ mRNA seviyesine etkisi.....	31
Şekil 27. MC marmelatının ÜK oluşturulan sıçan kolon dokularında CARD15 mRNA seviyesine etkisi.....	32
Şekil 28. MC marmelatının ÜK oluşturulan sıçan kolon dokularında GATA3 mRNA seviyesine etkisi.....	32
Şekil 29. MC marmelatının ÜK oluşturulan sıçan kolon dokularında TNF α mRNA seviyesine etkisi.....	33
Şekil 30. MC marmelatının ÜK oluşturulan sıçan kolon dokularında TIMP1 mRNA seviyesine etkisi.....	33
Şekil 31. MC marmelatının ÜK oluşturulan sıçan kolon dokularında STAT1 mRNA seviyesine etkisi.....	34

Şekil 32. MC marmelatının ÜK oluşturulan sıçan kolon dokularında STAT3 mRNA seviyesine etkisi.....	34
Şekil 33. MC marmelatının ÜK oluşturulan sıçan kolon dokularında JAK2 mRNA seviyesine etkisi.....	35
Şekil 34. MC marmelatının ÜK oluşturulan sıçan kolon dokularında NF-kB1 mRNA seviyesine etkisi.....	35
Şekil 35. MC marmelatının ÜK oluşturulan sıçan kolon dokularında IL-1 β mRNA seviyesine etkisi.....	36
Şekil 36. MC marmelatının ÜK oluşturulan sıçan kolon dokularında IL-2 mRNA seviyesine etkisi.....	36
Şekil 37. MC marmelatının ÜK oluşturulan sıçan kolon dokularında IL-10 mRNA seviyesine etkisi.....	37
Şekil 38. MC marmelatının ÜK oluşturulan sıçan kolon dokularında IL-23R mRNA seviyesine etkisi.....	37
Şekil 39. MC marmelatının ÜK oluşturulan sıçan kolon dokularında CCL17 mRNA seviyesine etkisi.....	38
Şekil 40. MC marmelatının ÜK oluşturulan sıçan kolon dokularında MMP9 mRNA seviyesine etkisi.....	38
Şekil 41. MC marmelatının ÜK oluşturulan sıçan kolon dokularında IL-4 mRNA seviyesine etkisi.....	39
Şekil 42. MC marmelatının ÜK oluşturulan sıçan kolon dokularında IL-5 mRNA seviyesine etkisi.....	39
Şekil 43. MC marmelatının ÜK oluşturulan sıçan kolon dokularında IL-6 mRNA seviyesine etkisi.....	40
Şekil 44. MC marmelatının ÜK oluşturulan sıçan kolon dokularında IL-13 mRNA seviyesine etkisi.....	40
Şekil 45. Western blot görüntüleri.....	42

ÖZET

Ülseratif Kolit Modelinde *Momordica charantia*'nın İyileştirici Etkilerinin Moleküler Mekanizmalarının Araştırılması

İnflamatuar bağırsak hastalıkları gastrointestinal sistemin kronik, tekrarlayıcı inflamatuvar hastalıklarıdır. Kronik inflamatuvar bağırsak hastalıklarının, ağızdan rektuma kadar bütün sindirim kanalını tutan Crohn Hastalığı (CH) ile sadece kolonu tutan Ülseratif Kolit (ÜK) olmak üzere başlıca iki tipi vardır. Otoimmün bir hastalık olarak tedavi edilen ÜK'in tedavisi anti-inflamatuar ilaçlarla, immünosupresyonla ve immün cevabın özgün bileşenlerini hedefleyen immünoterapi ile yapılır. Ülkemizde, *Momordica charantia* (kudret narı) bitkisi bu hastalığın tedavisinde ve yan etkilerinin azaltılması için halk arasında çok fazla kullanılmaktadır. Fakat bu bitkinin iyileştirici etkisinin olup olmadığı ve varsa nasıl bu etkiyi gösterdiği hakkında bilimsel literatürde bir bilgi yoktur. Önerilen bu çalışmada ülkemizde geleneksel tedavide kullanılan ve etki mekanizması üzerine yeteri kadar bilgi bulunmayan kudret narının (*M. charantia*) ülseratif kolit modelinde iyileştirici etkilerinin moleküler yaklaşımlar ile aydınlatılması amaçlanmıştır. Bu kapsamda; projede öncelikle Wistar albino sıçanlarda trinitrobenzen sülfonik asit (TNBS) ile ÜK modeli oluşturuldu. Deneysel ÜK oluşturulan sıçanlara kontrol ile eş zamanlı olarak *M. charantia* (MC) intragastrik gavaj ile verilerek deneysel ÜK oluşumu, iyileşmeler/değişiklikler histolojik boyamalarla tespit edildi. Çalışılan MC'nin etkilerinin moleküler düzeyde tanımlanması için ÜK patogenezinde rol aldığı bilinen genlerin [IFN- γ , CARD15/NOD2, GATA3, CCL17, MMP9, TNF α , TIMP1, STAT1, STAT3, JAK2, NF-kB1, 18S (normalizasyon geni), IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13 ve IL-23R] mRNA ve protein ifade düzeyleri saptandı. Ayrıca serum aspartat ve alanin aminotransferaz ve laktat dehidrogenaz aktivite ölçümleri ile kudret narının olası toksik etkileri araştırıldı.

Sonuç olarak, bu çalışmada kudret narı tüketiminin ülseratif kolit hastalığında önemli bir alternatif bitkisel tedavi etmeni olabileceği gösterilmiştir.

Anahtar Kelimeler: *Momordica charantia*, kudret narı, ülseratif kolit, mRNA ve protein ekspresyonu, trinitrobenzen sülfonik asit, IFN- γ , CARD15/NOD2, GATA3, CCL17, MMP9, TNF α , TIMP1, STAT1, STAT3, JAK2, NF-kB1, 18S, IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13, IL-23R

ABSTRACT

Investigation the Comprehensive Identification of the Molecular Mechanisms of the Healing Effects of *Momordica charantia* in Ulcerative Colitis Model

Inflammatory bowel disease is a group of chronic and relapsing inflammatory disorders of the gastrointestinal system. There are two main types of chronic inflammatory bowel diseases: Crohn's Disease (CD) affecting the whole digestion system from oral cavity to rectum and Ulcerative Colitis (UC) affecting only the colon. UC is treated as an autoimmune disease. Treatment plan is with anti-inflammatory drugs, immunosuppression, and immunotherapy targeting specific components of the immune response. In our country, *Momordica charantia* (bitter melon) plant in order to reduce the side effects of treatment of this disease, and too much is used. But this is the plant's healing effect is and how this effect is shown, as described in the scientific literature there is no information. The purpose of this proposed project is to elucidate the underlying mechanism defining the therapeutic effects of bitter melon (*M. charantia*) that used as alternative medicine in our country using molecular approaches. In this context: first UC were induced with trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS) in Wistar albino rats. *M. charantia* (MC) extract were given by intragastric gavage to UC induced-rats along with the control rats and were examined with histological assessment and macroscopic characteristics for improvements/changes. In order to understand the detailed molecular mechanism of actions of MC, mRNA and protein expression levels of genes which are known to be involved in UC progression including, IFN- γ , CARD15/NOD2, GATA3, CCL17, MMP9, TNF α , TIMP1, STAT1, STAT3, JAK2, NF- κ B1, 18S (housekeeping gene), IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13 and IL-23R, were determined. In addition, effects of bitter melon on aspartate and alanine aminotransferases and lactate dehydrogenase were investigated to study possible toxic properties.

In conclusion, the results obtained in this study have suggested that bitter melon might be used by people as an important alternative medicinal plant in UC disease.

Keywords: *Momordica charantia*, bitter melon, ulcerative colitis, mRNA and protein expression, trinitrobenzene sulfonic acid, IFN- γ , CARD15/NOD2, GATA3, CCL17, MMP9, TNF α , TIMP1, STAT1, STAT3, JAK2, NF- κ B1, 18S, IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13, IL-23R

1. GİRİŞ

İnflamatuvar bağırsak hastalıkları (İBH), gastrointestinal kanalda kronik veya tekrarlayan immün aktivasyon ve inflamasyon ile karakterli hastalıklardır. Kronik inflamatuvar bağırsak hastalıkları, Crohn Hastalığı (CH) ve Ülseratif Kolit (ÜK) olmak üzere iki ana gruba ayrılırlar (Stenson, 2004). CH, ağızdan anüse kadar tüm gastrointestinal kanalı tutabilen, remisyon ve alevlenmelerle seyreden bir hastalıktır (Aşık ve Bayraktar, 1998; Altıok, 2009). ÜK ise, rektumdan itibaren proksimale tüm kolon mukozasını diffüz olarak tutan yine remisyon ve alevlenmelerle seyreden bir kronik İBH'dır (Satsangi, vd., 1994; Altıok, 2009). ÜK, Samuel Wilks tarafından 1859 yılında tanımlanmış ve sonraki yıllarda bağırsak mukozasındaki patolojik değişiklikler ortaya konmuştur (Bliss ve Sawchuk, 1999). Irk, etnik köken, yaşanan coğrafya ÜK insidansını ve prevalansını etkiler. Bu hastalık, 15-35 yaş arasında daha sık görülür ve 60'lı yaşlar civarında ikinci bir pik yapar (Andres ve Friedman, 1999). Ancak ikinci pik ilkinden siliktir. İBH'ların cinsiyetler arası görülme farkı pek olmasa da ÜK erkeklerde, CH ise kadınlarda biraz daha fazla sıklıkla görülmektedir (Ülker vd., 1999; Rubin vd., 2004). İnflamatuvar hastalıklara rastlanma sıklığı coğrafik bölgelere göre büyük farklılıklar göstermektedir. Kuzey Avrupa ülkelerinde, Kafkas ırkında ve Yahudi kökenli toplumlarda daha fazla sıklıkla görülmektedir (Gilat vd., 1986). ÜK için aile insidansı yıllardır bilinmektedir. Veriler farklılık arz etmekle birlikte ÜK'li bireylerin %10 ile %20'sinin ailesinde en az bir birey daha etkilenmiştir (Satsangi vd., 1994). Ailesel ilişki genelde birinci derece akrabalarda görülür. Tutulum yeri ve hastalığın şiddetine bağlı olarak farklılıklar gösterse de ana semptomlar rektal kanama, karın ağrısı ve kanlı mukuslu ishaldir (Both vd., 1983; Rao ve Holdsworth, 1988; Sandle vd., 1990; Farmer, 1994). ÜK'in etiyoloji kesin olarak bilinmemekle birlikte yapılan son çalışmalar patogenezinde çeşitli faktörlerin (genetik, immün sistem, enfeksiyöz ve psikososyal nedenler, alkol ve sigara kullanımı, rafine yiyecekler) multifaktöriyel olarak etkili olduğunu göstermektedir (Bliss ve Sawchuk, 1999; Altıok, 2009). Etiyolojisi halen net olmasa da bugün için kabul edilen zemininde inflamatuvar hücreler ve sitokinlerle oluşan inflamasyonun yer aldığı görüşüdür (Altıok, 2009).

Kromozom 2, 3, 6, 7 ve 12'de bulunan genlerin ÜK eğilimi yarattıkları kabul edilmektedir. Özellikle 12. kromozomdaki lokusun, önem arz ettiği birçok farklı merkez tarafından ortaya konmuştur (Parkes vd., 2000). Bu lokusların bazıları CH tarafından da paylaşılmaktadır ve bu durum da İBH'na yakınlık yaratan gen havuzu fikrini ortaya koymuştur. Genetik yakınlık, bakteriyel antijenler ve mukozal immün cevap bozukluğu intestinal inflamasyonun majör faktörleridir (Lukas vd., 2006). ÜK için genetik yakın kişilerde bakteriyel antijenlere karşı immün cevap geliştiği, inflamasyon olduğu, çeşitli faktörlerin etkisiyle oluşan inflamasyonun

azaldığı ya da alevlendiği düşünülmektedir. Bağırsak bakterileri bağırsak mukozal immün sisteminin oluşumu ve intestinal epitel hücrelerin indüksiyonunda önemli fonksiyonlara sahiptir. Ayrıca lenfosit apoptozunun önlenmesi ve lenfositlerin uyarılmasında da rol alırlar (Marteau vd., 2004). ÜK'li hastalarda bifidobakteri ve laktobasiller gibi yararlı bakteriler genellikle yoktur. Ayrıca *E. coli*, *Fusobacterium* gibi gram negatif anaerob bakterilerin arttığı gösterilmiştir (Kleessen vd., 2002). Bazı çalışmalarda ÜK'li hastaların kolon biyopsi örneklerinde mukozal bakteriyel invazyon saptanmıştır (Ohkusa vd., 2002; Furrie vd., 2004; Macfarlane vd., 2004; Tamboli vd., 2004). Bu çalışmalar ÜK'te bakteriyel etkenlerin önemini vurgulamaktadır. Ancak aksi görüşü savunan ve ÜK etiolojisinde infeksiyöz nedenlerin bulunmadığını ileri süren çalışmalar da mevcuttur. Günümüze kadar hastalık etiolojisinde suçlanabilecek belirli bir mikrobiyal ajan saptanamamıştır (Lukas vd., 2006).

ÜK hastalarında epitel hücrelerinde de anormallikler bildirilmiştir. Bu anormallikler β -oksidasyon eksikliği, hücre membran geçirgenliğinde anormallik, mukus anormallikleri, strese hücresel cevapta bozukluk, 'toll-like' gen reseptör polimorfizmi gibi eksikliklerdir (Lukas vd., 2006). İntestinal epitel hücrelerinin kendi aralarında iletişimi ve patojenlerin saptanması için sahip oldukları mekanizmalardan en iyi bilineni 'toll-like' reseptör (TLR) ve 'nucleotide binding oligomerisation domain' (NOD) reseptördür. Bakteriler epitel hücreleri ve lenfoid dokuları uyararak lokal veya sistemik immün cevabı aktive eder. Bakteriyel antijenlerin teması membranöz TLR veya intrasellüler NOD reseptörlerince tanınır. Bakteriyel ligandlar intestinal hücre reseptörlerine bağlandığında sitokinler, eikosanoidler ve antimikrobiyal peptitler gibi değişik moleküllerin yapımına yol açarlar. Yapılan çalışmalar TLR'lerden özellikle 4 ve 9'un ÜK etiolojisi ve patogenezinde sorumlu olabileceğini desteklemektedir (Ismail ve Hooper, 2005). ÜK hastalığı sigara içmemiş ya da içip bırakmış kişilerde daha sık görülmektedir. Sigara içimi atakları düzeltebilir, oral steroid kullanımı ve kolektomi ihtiyacını azaltabilirken, içimin kesilmesi hastalığın aktivasyonunu artırır (Thomas, 1998). Aşırı miktarda süt ve süt ürünlerinin veya az miktarda lifli gıdaların alımı (Fernández-Bañares vd., 1999) ile sülfat ve sülfür içeren gıdalarla beslenmenin ÜK'i aktive edebileceği düşünülmektedir (Tilg ve Kaser, 2004).

ÜK'in en belirgin belirtileri kanlı ishal ve kramp tarzında karın ağrılarıdır. Orta düzey ÜK hastalarında kanamalar artar ve ateş, halsizlik, iştahsızlık gibi sistemik belirtiler ortaya çıkar. Ciddi ÜK hastalarında ise kanlı-mukuslu ishaller, yüksek ateş, beden ağırlığının %10'undan daha fazla kilo kaybı, anemi, taşikardi ve su kaybı da görülür (Bliss ve Sawchuk, 1999). ÜK'e özgü komplikasyonlar bağırsağa ait ve bağırsak dışı olarak iki bölümde incelenir. Bağırsağa ait komplikasyonlar kanama, darlık, delinme ve kolonun dilatasyonudur. Bağırsak dışı komplikasyonlar ise eklemlerde (periferal artrit, ankilozan spondilit), deride (eritema

nodosum, piyoderma gangrenosum), ağızda (aft ülserleri), gözlerde (uveit, konjonktivit) ve hematolojik sistemde (anemi, lökositoz, trombositoz) ortaya çıkar. Ayrıca, ince bağırsak patolojisine bağlı olarak malabsorbsiyon (kötü emilim), safra ve böbrek taşları görülebilir (Bliss ve Sawchuk, 1999). Sağlıklı bağırsak mukozasında besin maddeleri ve mikrobiyal ajanların uyarısıyla fizyolojik inflamasyon meydana gelmektedir; ancak bu inflamasyon CD4+ T hücrelerinden salınan dönüştürücü büyüme faktörü-beta 1 (TGF- β 1), IL-10 ve yardımcı T hücreleri (Th) ile bastırılarak belli bir düzeyde tutulmakta ve sonuçta bağırsakların zarar görmesi engellenmektedir. Buna "immün tolerans" denmektedir. İBH hastalarında ise bu inflamatuvar yanıt abartılı olmaktadır (Sands, 2006; Akıncioğlu, 2014).

ÜK, CH, ve deneysel kolit modellerinde aktif makrofajlar tarafından salınan interlökin-1 (IL-1) ve interlökin-6 (IL-6) gibi sitokinlerin inflamasyonlu dokuda artış gösterdiği bilinmektedir (Hyams vd., 1993; Youngman vd., 1993; Oktar ve Alican, 2000). Yapılan çalışmalarda, CH'nda, ÜK'li hastalarda ve TNBS (trinitrobenzen sülfonik asit) uyarımlı kolit modellerinde IL-1 üretiminde artışla birlikte IL-1 ile mukoza nötrofil infiltrasyonu arasında bir korelasyon olduğu gösterilmiştir (Rachmilewitz vd., 1989; Ligumsky vd., 1990; Oktar ve Alican, 2000). Ayrıca CH'nda tümör nekroz faktör- α (TNF- α) üreten lamina propria hücrelerinin sayısında artışla birlikte (Breese vd., 1994), anti-TNF- α antikor tedavisi ile ümit verici sonuçlar elde edilmiştir (Van Dulleman vd., 1995; Oktar ve Alican, 2000). TNF- α , mukozal immün yanıtın düzenlenmesinde önemli rol oynayan, makrofajlar ve bazı diğer hücreler tarafından üretilen pro-inflamatuvar bir sitokindir (Yıldız vd., 2008). İBH'nda dokuda TNF- α ekspresyonu artmaktadır (Kıyıcı vd., 2006). İmmün yanıt ve bağırsak florası arasındaki ekolojik denge kolit oluşumundaki önemli etkenlerdendir. Bazı çalışmalar sonucunda, sitokinlerin inflamatuvar reaksiyonu indükleyerek immün yanıtı etkiledikleri saptanmıştır (Oktar ve Alican, 2000). ÜK'te yardımcı T lenfositleri (Th2) aracılı etkiler meydana gelirken, CH'nda Th2 lenfositlerinin etkisi görülür. ÜK'te Th2 lenfositleri tarafından salınan IL-4 ve IL-10 gibi sitokinlerin doku konsantrasyonlarında artış olduğu gösterilmiştir (Mullin vd., 1993; Oktar ve Alican, 2000). Th1 lenfositleri tarafından salgılanan interferon-gama (IFN- γ) gibi sitokinlerin de ÜK patogenezinde etkin oldukları gösterilmiştir (Sartor, 1996; Simpson vd., 1998; Oktar ve Alican, 2000). Neurath vd. (1997), anti- IFN- γ antikor tedavisi ile TNBS uyarımlı kolit modelindeki hasarın belirgin derecede azaldığını göstermişlerdir. ÜK'te temel patofizyolojik mekanizmanın, Th1 ve Th2 lenfositlerinin aktivasyonunda bir bozukluk ya da pro-inflamatuvar sitokinler (IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, IL-12, TNF- α , IFN- γ) ile anti-inflamatuvar sitokinler (IL-1Ra, TNF bağlayan proteinler, IL-4, IL-10, IL-11, IL-13) arasındaki dengenin bozulmasına bağlı olduğu düşünülmektedir (Williams vd., 1990; Demir, 2011). İnflamatuvar yanıtta Th1 hücreleri abartılı olarak artar, pro-inflamatuvar sitokinleri salgımlarken, Th2 hücreleri anti-inflamatuvar sitokinleri salgımlar (Demir, 2011). CH'nda Th1 lenfositleri aktive olup IL-2 ve IFN- γ gibi

sitokinlerin yapımını sağlarken, ÜK'te IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 gibi Th2 tipi sitokinler Th1 tipi sitokinlerden daha fazla salgılanarak B lenfositlerin aşırı miktarda IgG salgılamasını sağlarlar (Itoh ve Strong, 2001; Özkan, 2003). Burada bir otoimmün yanıt söz konusudur. IgG komplemanı ve fagositleri aktive ederek görülen inflamasyon artışına, nötrofillerden reaktif oksijen metabolitlerinin artışı ve bunlara inflamatuvar sitokinlerin ve nitrik oksidin eklenmesi ile doku hasarı görülür (Abbas vd., 2000, Plevy, 2002; Özkan, 2003; Elmas, 2012). İnterlökin-23 (IL-23), pro-inflamatuvar sitokinlerin küçük bir ailesinin üyesidir (Oppmann vd., 2000) ve immün-aracılı inflamatuvar hastalıkların birçoğunun patogenizinde hayati rol oynar (Langrish vd., 2005). IL-23, Th17 hücrelerinin otoimmün inflamasyonun indüklenmesi ile ilişkili olan TNF- α , IL-17, IL-6 ve diğer yeni faktörleri üretmesini sağlar (Langrish vd., 2005; Brennan ve McInnes, 2008; Korn vd., 2009). IL-23 geni "Crohn hastalığı duyarlılık geni" olarak bilinmesinin yanında ÜK'teki önemi de gösterilmiştir (Hanauer, 2006; Akıncioğlu, 2014; El-Bassat vd., 2014).

Yapılan çalışmalarda kromozom 1, 3, 6, 7, 14, 16 ve 19'da İBH ile ilgili genler tespit edilmiştir. Tespit edilen en belirgin bağlantı 16. kromozomun perisentromerik bölgesindeki NOD2 geni ve proteini. NOD2 (CARD15 olarak ta bilinir), polimorfik bir gen olup doğal immünite ile ilgilidir. İBH ile ilgili olduğu tespit edilen ilk gen. NOD2/CARD15 (nükleotid bağlayıcı oligomerizasyon bölgesi protein 2/kaspaz toplama alanı içeren protein 15) geninin İBH oluşturma mekanizması tam olarak açıklanamamakla beraber; NOD2 monosit ve makrofajlara etkili olup hücrel immün cevapta NF-kB salınımına ve makrofaj apoptozisine yol açar (Büning vd., 2004). NOD2 gen mutasyonu komensal mikrofloraya karşı tolerans gelişimini engeller ve kronik intrasellüler enfeksiyona neden olur. NF-kB (aktifleşmiş B hücreleri nükleer faktör kappafaz zincir-arttırıcı), tüm hücre tiplerinde bulunan bir transkripsiyon faktörüdür. TNF- α , IL-1, IL-6 ve IL-8 için bir düzenleyici transkripsiyon faktörüdür (Aslan vd., 2004). NF-kB, nükleer transkripsiyonuna neden olduğu genler aracılığıyla apoptoza karşı direnç gelişiminde başrolü oynar. NF-kB, hücre içinde inhibitör kapa B (IKB) ile kompleks halde inaktif durumda bulunur. IKB'nin fosforilasyonu ve ubiquitinasyonu sonucu NF-kB aktif hale geçer ve hedefi olan genlerin transkripsiyonu yoluyla, özellikle apoptozu önleyici etkisiyle, kanserleşme sürecine katkıda bulunur (Yanmaz, 2006). NF-kB, sitokinlerin ekspresyonunda ana faktördür ve ÜK'in patogeneğinde temel bir rol oynar (Yun vd., 2009). İBH'da sitokin transkripsiyon faktörlerin aktivasyonu ile ilgili yapılan çalışmalarda NF-kB gibi STAT (sinyal dönüştürücü ve transkripsiyon aktivatörü) ailesi üyelerinin de ekspresyonunun ve aktivasyonunun arttığı gösterilmiştir (Nikolaus vd., 1998; Rogler vd., 1998; Schreiber vd., 1998). ÜK'te STAT1'in ekspresyonunun ve aktivasyonunun arttığı görülmüştür (Schreiber vd., 1997). STAT proteinleri etkin olmayan sitoplazmik transkripsiyon faktörleridir ve sitokin ve büyüme faktörü reseptörlerinin aktivasyonuna cevap

olarak JAK (janus kinaz) tarafından fosforillenirler (Kühbacher vd., 2001). JAK2, STAT1'in fosforilasyonunu indükler (Darnell, 1996).

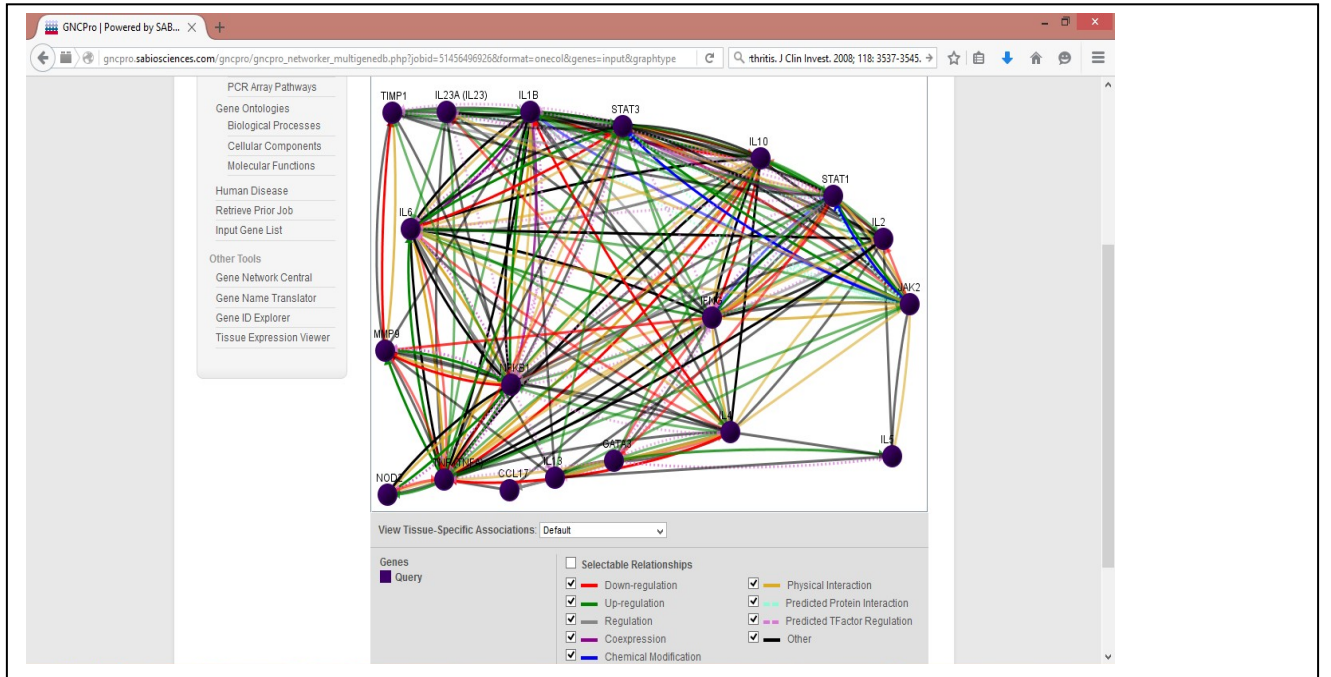
Sitokinler, İBH'larının patogenezinde immün sistemin düzenlenmesine katılırlar (Wiercinska-Drapalo vd., 2001). Adhezyon moleküllerinin, reaktif oksijen metabolitlerinin, prostaglandinlerin ve nitrik oksitini üretimini indüklerler (Wiercinska-Drapalo vd., 2001). Hedef hücrelerdeki spesifik ligandlarına bağlanmaları ile başlayan sinyal transdüksiyonu ve ikincil haberci iletimi gen aktivasyonu, mitotik bölünme, büyüme ve farklılaşma, migrasyon veya apoptoza neden olur (Bidwell vd., 1999; Bekalp vd., 2014). Sitokinler, inflamatuvar yanıtta ve kanser patogenezinde önemli roller üstlenirler. Bu grubun en iyi örneklerden birisi TNF ve IL-1'e cevap olarak üretilen, immün ve inflamatuvar olayların oluşumunda anahtar rolü üstlenen IL-6'dır (Kemik vd., 2010; Bekalp vd., 2014). IL-6'nın deregülasyonu inflamatuvar hastalıkların şiddeti ve kanser gelişiminde artışa neden olabilir (Lesina vd., 2014). IL-6, görevini sitokin reseptörlerinden JAK reseptörleri aracılığı ile yapar (Bekalp vd., 2014). Kanserli hastalarda IL-6/JAK sinyali kalıcı STAT3 aktivasyonu sağladığı için önemlidir. Oluşan bu kalıcı STAT3 aktivasyonu da hayatta kalma, anjiyogenez, invazyon ve tümör gelişiminde etkilidir (Bekalp vd., 2014; Lesina vd., 2014).

MMP'ler (matriks metalloproteinaz); ekstraselüler matriksin yıkılmasını sağlayabilen proteolitik enzim ailesine ait enzimlerdir. İnaktif zimojen formda (proMMP) sekrete edilirler ve proteolitik aktivasyona ihtiyaç duyarlar (Brummer vd., 2002). MMP'ler inflamasyon esnasında doku yenilenmesi ve yıkımında önemli rol oynarlar (Baugh vd., 1999; von Lampe vd., 2000). Tip IV kollajenaz, MMP-9'un tümör invazyonu ve metastazı gibi bir takım patolojik olayların yanında, İBH'nda inflamatuvar ve doku yenilenmesi süreçlerinde de rol aldığı gösterilmiştir (Bailey vd., 1999; Nelson vd., 2000; Kirkegaard vd., 2004). *In vivo* koşullarda, MMP aktivasyonunun regülasyonunda TIMP (metalloproteinazların doku inhibitörü)'ler önemli rol oynarlar. TIMP'ler doğal MMP inhibitörleridir (Gomez vd., 1997). TIMP'ler MMP'lere bağlanmanın yanında proMMP'lerle kompleks oluşturarak MMP aktivasyonunu düzenler (Lambert vd., 2004). TIMP-1 birçok doku, hücre ve vücut sıvısından salınmaktadır. MMP ve onların doku inhibitörleri TIMP arasındaki dengenin bozulması invazyonun oluşumunda önemlidir. TIMP-1'in MMP inhibisyonu dışında anti-apoptotik etkisi gibi tümör oluşumunu arttırıcı etkisi olduğu gösterilmiştir (Fowlkes vd., 2004). TIMP-1'in kolorektal kanserde arttığını gösteren çalışmalar da mevcuttur (Moller Sorensen vd., 2008).

Kemokinler, inflamasyonda ve homeostazda lökositlere ve kök hücrelere kemotaksi yaptıran sitokinlerdir (Bokoch, 1995; Calapoğlu ve Calapoğlu 2009). İnflamasyonla seyreden hastalıklarda kemokinler lökositlerin dokuya geçişine, inflamasyonun bulunduğu yerde birikimine ve aktivasyonuna neden olurlar (Çağlar ve Kansu, 2004; Gümüştekin, 2009). ÜK

ve CH vakalarında intestinal dokularda bazı kemokinlerin anlamlı artışı görülmektedir (Calapoğlu ve Calapoğlu 2009; Heiseke vd., 2012). CCL17, bir CC kemokindir ve timusta ekspres edilir (Ritter vd., 2005). CCL17, stres, yaralanma veya inflamasyonda upregülasyon (artış) gösterirken (Homey vd., 2007), ÜK ve CH gibi İBH'larını içeren otoimmün rahatsızlıklarda da overekspresyonu (aşırı ifadesi) görülmektedir (Kristensen vd., 2006). İnsan da CCL17'nin IFN- γ ve TNF- α uyarımı ile indüklendiği gösterilmiştir (Komine vd., 2005). GATA3 (GATA binding protein) Th2 hücreleri tarafından ekspres edilen bir transkripsiyon faktörüdür (Gálvez, 2014) ve T lenfositler (Ting vd., 1996), adipoz doku (Tong vd., 2000), böbrek (Grote vd., 2006), sempatik sinir sistemini (Tsarovina vd., 2004) içeren pekçok doku ve hücre tipinde hücre proliferasyonu, gelişimi ve farklılaşmasında önemli rol oynar (Liu vd., 2012). GATA3'ün T hücre farklılaşmasında anahtar yönetici olduğunun bilinmesinden sonra, bu regülatörün ÜK ve CH'ndaki rolü önem kazanmıştır. GATA3, IL-4 genini aktive eder (Zenewicz vd., 2009). IL-4 ve onun sinyal molekülü GATA3'ün ÜK'in patogenezinde katıldığı özellikle akut fazda gösterilmiştir (Ohtani vd., 2010).

ÜK'e yatkınlıkta birçok faktörün yanında genetik faktörlerin de önemli rol oynadığı bilinmektedir. ÜK gelişiminde pek çok gen hayati rol oynar. Bunlardan bazıları (çalışmamızda kullanılacak olan) ve bunların birbirleri ile olan ilişkileri Qiagen GNCPro analiz programı ile kontrol edilmiştir (Şekil 1).



Şekil 1. ÜK patogenezinde rol oynayan genlerden bazılarının birbirleriyle olan ilişkilerinin Qiagen GNCPro analiz programı ile gösterilmesi.

ÜK tedavisinde asıl amaç remisyonu sağlamak ve devam ettirmektir. Remisyonda iltihap belirtilerinin (rektal kanama, ishal) kaybolması ile birlikte mukozada iyileşme gözlenir. İdame tedavisi ile remisyonun devamı ve nüksün önlenmesi amaçlanmaktadır (Bliss ve Sawchuk, 1999). ÜK'in patogenezinde genetik, çevresel ve özellikle immünolojik faktörlerin önemli rolü olduğu düşünülmektedir. Bu nedenle immüno-inflamatuar yolları hedefleyen ilaçlar son 15 yıldan beri ÜK tedavisinde kullanılmaktadır. Bu amaçla birçok yeni ilaç geliştirilmiş olmakla birlikte, halen günümüzde ÜK tedavisinde en çok kullanılan ilaçlar aminosalisilatlar ve kortikosteroidlerdir. İBH'nın temel ilacı anti-inflamatuar etkili aminosalisilatlardır. İlk kez 1965 yılında kullanılmaya başlanmıştır. Sülfasalazin, 5-ASA bileşikler; sülfasalazin, sülfapiridine diazo bağı ile bağlanmış 5-aminosalisilik asit (5-ASA)'ten oluşur. Aktif kısım 5-ASA'dır (Altıok, 2009). Mesalazin (5-ASA) hafif veya orta şiddetteki ÜK vakalarının primer tedavisinde topikal veya sistemik ajan olarak sıklıkla kullanılan bir moleküldür. Proksimal ince bağırsaklardan hızla absorbe edilir, intestinal epitel ve karaciğerde metabolize edildikten sonra idrarla atılır. Mesalazin kullanımının ÜK'li hastada kolon kanseri riskini azalttığına dair yayınlar mevcuttur (Eaden vd., 2000). Kortikosteroidler, İBH'da remisyonu sağlamada en sık kullanılan ilaçlardır. Kortikosteroidler (prednisolon, metilprednisolon, budenosid, betametazon, tiksokortol) ciddi yan etkileri nedeniyle uzun dönem tedavisi önerilmeyen semptomların geriletilmesinde oldukça etkili ilaçlardır. Hücre içindeki glukokortikoid reseptörleri üzerinden etki ederler (Chapman vd., 1986). Bu tedavilere beklenen cevap alınamayan hastalarda immünomodülatör ajanlar olarak azatiyopürin (AZA), 6-merkaptopürin (6-MP), metotreksat (MTX) ve siklosporin kullanılmaktadır. Tiyopürin metil transferaz enzimi AZA yıkımında önemli olan, eksikliğinde ilaç yan etkilerinin sık izlendiği ve düzeyi ölçülebilen bir enzimdir (Lennard vd., 1989). Homozigot ya da heterozigot gen defektlerinde aşırı miktarda aktif metabolit birikimi ve sonuçta ciddi hematolojik yan etkiler izlenebilir. Azatiyopürini tolere edemeyen hastalarda 6-MP kullanılabilir (Collins ve Rhodes, 2006). ÜK'te pürin analogları olan 6-MP ve onun ön ilacı olan AZA, pürin antagonistleridir. Son yıllarda steroid ihtiyacının azalması ve dirençli vakalarda hızlı remisyon sağlaması nedeniyle daha çok kullanılmaktadır (Altıok, 2009). Kortikosteroidlere göre yan etkileri daha azdır (Fazio vd., 2006). Siklosporin ciddi refrakter kolitlerde salvaj tedavisinde önerilen kalsinörin inhibitörü bir ajandır (Hawthorne, 2003). IL-2 gen transkripsiyonunu inhibe ederek, Th lenfositlerin aktivasyonunu baskılar. Kortikosteroide yanıt alınamayan ÜK ataklarında kullanılabilir ancak 6 aydan uzun kullanımı önerilmemektedir. Ayrıca standart tedavilere cevap vermeyen hastalarda, etkileri kesinleşmiş olmamakla birlikte nikotin, heparin, antibiyotikler, probiyotikler ve kısa zincirli yağ asitleri de uygulanmaktadır.

İBH'larının tedavisi ile ilgili birçok araştırma mevcuttur. Bu araştırmaların birçoğunda deney hayvanları kullanılmaktadır. Kullanılan hayvanlarda deneysel kolit oluşturmak için

birçok madde tanımlanmıştır. Bu maddelerde aranan en temel özellik bağırsakta insan İBH'nda görülen patolojik değişikliklere benzer hasarlar oluşturmalarıdır. İndüklenebilir deneysel kolit modelinde TNBS, asetik asit, iodoasetamid, indometazin, okzasolon ve dekstran sülfat sodyum en sık kullanılan kimyasallardır (Altıok, 2009). Bu kimyasallar içinden en sık kullanılan ajanın TNBS olduğunu görmekteyiz (te Velde vd., 2006). TNBS uyarımlı kolit modelinin çalışmalardaki en faydalı yönleri, gelişen inflamasyonun İBH'daki inflamasyona benzerliği, sitokin sekresyonuna neden olması ve immünoterapiye uygun olmasıdır (Neurath vd., 1996; McCafferty vd., 1999; Stallmach vd., 1999; Altıok, 2009).

Bitkilerin insan sağlığı üzerine olan etkileri şüphesiz asırlardır ve son birkaç yüz yılda alternatif tedavi olarak karşımıza çıkmaktadır. Son yıllarda teknoloji bakımından ileri seviyedeki toplumların şifalı bitkilere olan ilgisi, kuşkusuz diyetel gıdalar veya tıbbi bitkilerle alınan fitokimyasallar (bitkisel kökenli kimyasallar) hakkında yapılan bilimsel çalışmalar sayesinde artmıştır. Tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de tıbbi bitkiler yüzyıllardan beri halk arasında kullanılmaktadır. Dünya Sağlık Teşkilatı (WHO)'nın 91 ülkenin farmokopelerinde ve tıbbi bitkileri üzerinde yapılmış olan bazı çalışmaları baz alarak hazırladığı bir araştırmaya göre yaklaşık 20.000 civarında tıbbi bitki halk arasında tedavi amacıyla kullanılmaktadır (Kırbağ ve Zengin, 2006). Günümüzde bitkiler ve bitkisel ilaç hammaddeleri, reçete ile satılan ilaçların % önemli bir bölümünü oluşturmaktadır. Bu nedenle birçok bitki farmakolojik olarak çok yönlü olarak araştırılmaktadır.

Kabakgiller familyasının bir üyesi olan *Momordica charantia* (kudret narı), tropik kökenli bir bitkidir ve çoğunlukla Doğu Afrika'da, Asya, Karayip Adaları, Amazon Havzası ve Güney Amerika'da yoğun olarak yetişir (Şekil 2). Bitkinin üretimi en iyi sıcak bölgelerde yapılmasına rağmen iklimin geniş bir varyasyon gösterdiği yerlere de adapte olabilir (Akay ve Kararlan, 2012). Bitkinin meyvesi acı tattadır bu nedenle halk arasında "acı kavun" olarak ta bilinir. Ülkemizde kudret narı karbohidrat, protein, vitamin, mineral ve diğer besinleri içermesinden dolayı bir yandan gıda maddesi olarak kullanırken (Ali vd., 2008) diğer yandan çeşitli ülser, diyabet ve enfeksiyonların alternatif tedavisinde de yaygın olarak kullanılmaktadır (Akay ve Kararlan, 2012). Literatürü incelediğimizde tümörlerde, deri hastalıklarında, yaralarda, egzamada, uyuzda, romatizmada, sıtmada, adet problemlerinde, şeker hastalığında, ateşli durumlarda ve bağırsak kurtlarına karşı kullanıldığı görülmektedir (Gurbuz vd., 2000; Scartezini ve Speroni, 2000; Beloin vd., 2005; Taylor, 2005; Ullah vd., 2011; Akay ve Kararlan, 2012).



Şekil 2. *Momordica charantia* (kudret narı)

Ülkemizde, *M. charantia* (MC) bitkisi bu hastalığın tedavisi ve yan etkilerinin azaltılması için çok fazla kullanılmaktadır. Fakat bu bitkinin iyileştirici etkisinin olup olmadığı ve varsa nasıl bu etkiyi gösterdiği hakkında bilimsel literatürde herhangi bir bilgi yoktur. Çalışmamızda MC'nın TNBS uyarımlı ÜK'te iyileştirici etkisinin moleküler mekanizmalarının araştırılması, tespit edilen koruyucu ve iyileştirici etkinin ne şekilde gerçekleştiğini anlamak için moleküler düzeyde ÜK oluşumu ve ilerlemesinde rol alan genlere/proteinlere etkilerinin histolojik ve genetik olarak saptanması gerçekleştirilmiştir. Aynı zamanda diagnostik markör enzimlere de bakılarak kullanılan dozda MC'nın yan etkisi olup olmadığı da araştırılmıştır. Günümüzde bitki ve bitkisel bazlı alternatif tedavi ürünlerine olan ilginin gün geçtikçe arttığını göz önüne alarak, halk arasında sıklıkla kullanılan ve bu hastalığın tedavisi için umut vaad edebilecek MC'nın ÜK hastalığında alternatif ürün olarak kullanımı ve bu kullanımda ortaya çıkabilecek tüm etkilerini belirlemek, insanların doğru kullanımı için bilimsel veriler üretecektir. Literatürde MC üzerine pek çok çalışma bulunmasına rağmen, bu projede araştırılacak olan MC'nın ÜK hastalığının patogenezinde rol alan genler üzerine etkisi ile ilgili çalışmaya literatürde rastlanmamıştır.

2. MATERYAL ve METOT

2.1. *Momordica charantia* Zeytinyağlı Marmelatının Hazırlanması

Ticari olarak satın alınan olgunlaşmış *M. charantia* meyveleri doğranıp 1 lt'lik cam kavanoza konuldu. Üzerine aynı hacim kadar ticari olarak satın alınan sızma zeytinyağı eklendi. Kavanozun ağzı sıkıca kapatılıp, hazırlanan karışım 6 hafta boyunca güneşte bekletildi. Süre sonunda oluşan marmelat blenderdan geçirilerek homojen hale getirilip karanlık bir ortamda oda sıcaklığında muhafaza edildi. Hiçbir kimyasal kullanmadan, insanların doğal olarak kullandığı şekliyle hazırlandı.

2.2. Deneysel Hayvan Çalışmaları

2.2.1. Deneysel TNBS Kolit Oluşturulması ve MC Marmelatının Verilmesi

Bu çalışmada Pamukkale Üniversitesi Deneysel Araştırma Biriminden temin edilen 12 haftalık erkek Wistar Albino (200-250 gr) soyu sıçanlar kullanıldı. Sıçanlar rasgele 5 gruba ayrılarak (her grupta 7 sıçan olacak şekilde), tartıldı ve ayrı kafeslerde tutuldu (Şekil 3). Tüm bu işlemler Pamukkale Üniversitesi Deney Hayvanları Laboratuvarında veteriner kontrolünde ve gözetiminde gerçekleştirildi. Bu işlemler için gerekli olan Etik Kurul izinleri Pamukkale Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurulu'ndan (PAUHDEK-2015/18) alınmıştır.



Şekil 3. Sıçanların tartılıp, rasgele gruplandırılması

Kolit oluşumu için 30 mg (80 mg/kg) TNBS (Trinitrobenzen sülfonik asit, Sigma-Aldrich®) + %50 etanol karışımı kullanıldı. Sıçanlarda kolit indüksiyonu 3.5 F plastik kanülün rektal yoldan 5-7 cm içeri itilmesi ve bu kanülden hazırlanan 30 mg/0,1 ml/rat TNBS + 0,5 ml %50 etanolün instile edilmesi ile gerçekleştirildi (Altıok, 2009). İndüklemenin ardından verilen maddenin geri kaçmaması için anestezi altındaki sıçanlar supin pozisyonunda ~15 dk kadar bekletildi (Şekil 4).



Şekil 4. Deneysel TNBS kolit oluşturulması

Grup I (Normal-Kontrol): Bu gruptaki sıçanlara hiç bir uygulama yapılmadı, ancak deney süresinde diğer gruplarla aynı koşullarda tutuldu.

Grup II (Hasta-Kontrol): Anestezi altındaki sıçanlarda kolit indüksiyonu rektal yoldan kataterizasyonu takiben 30 mg/0,1 ml TNBS ile 0,5 ml %50 etanol karışımı verilerek gerçekleştirildi (Şekil 4). Yedi gün sonunda hayvanların ÜK olması beklenmektedir. Bu sürenin sonunda, MC marmelatı zeytinyağında hazırlandığından dolayı, ondan gelecek etkileri görmek için sıçanlara 14 gün boyunca intragastik gavaj ile zeytinyağı içirildi (Şekil 5).

Grup III (Hasta): Anestezi altındaki sıçanlarda kolit indüksiyonu rektal yoldan kataterizasyonu takiben 30 mg/0,1 ml TNBS ile 0,5 ml %50 etanol karışımı verilerek gerçekleştirildi (Şekil 4). Yedi gün sonunda hayvanların ÜK olması beklenmektedir. Bu grup hayvanlar deney süresince bekletildi (Şekil 4).

Grup IV (Tedavi): Anestezi altındaki sıçanlarda kolit indüksiyonu rektal yoldan kataterizasyonu takiben 30 mg/0,1 ml TNBS ile 0,5 ml %50 etanol karışımı verilerek gerçekleştirildi (Şekil 4). Yedi gün sonunda hayvanların ÜK olması beklenmektedir. Bu sürenin sonunda, sıçanlara intragastrik gavaj ile 14 gün boyunca zeytinyağlı MC

marmelatından 4 gr/kg/gün yedirildi (Şekil 5). Verilen doz halk arasında kullanılan doz göz önüne alınarak saptanmıştır.

Grup V (Tedavi-Pozitif Kontrol): Anestezi altındaki sıçanlarda kolit indüksiyonu rektal yoldan kataterizasyonu takiben 30 mg/0,1 ml TNBS ile 0,5 ml %50 etanol karışımı verilerek gerçekleştirildi (Şekil 4). Aynı gün Prednisolon ağızdan gavaj ile (2 mg/kg/gün, 7 gün) verildi (Şekil 5). Bu grup hayvanlar deney süresince bekletildi.



Şekil 5. Sıçanlara zeytinyağı, prednisolon ve MC marmelatının verilmesi

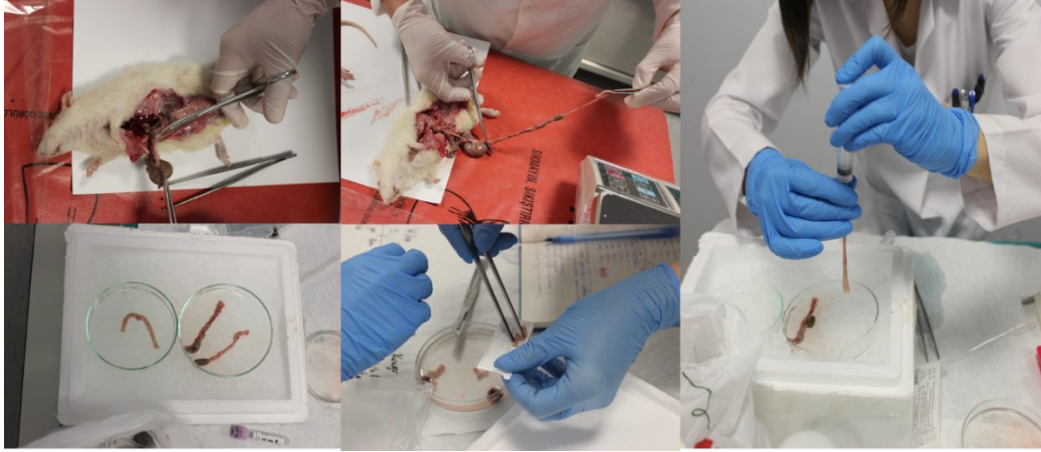
Tablo 1. Deney hayvanlarına uygulama protokolü

Gruplar	Denek (Sıçan) Sayısı
Grup I (Normal-Kontrol)	7
Grup II (Hasta-Kontrol)	7
Grup III (Hasta)	7
Grup IV (Tedavi)	7
Grup V (Tedavi-Pozitif Kontrol)	7

2.2.2. Dokuların Temini

Deney işlemleri süreci sonunda tüm sıçanlara kas içine, 80 mg/kg ketamin hidroklorür (Ketalar®, Pfizer, NewYork, USA) ve 8 mg/kg xylazin (Rompun®, Bayer, Toronto, CANADA)

verilerek, genel anestezi sağlandı. Rektum distalinden m¼mk¼n olan en aşağı seviyeden transekte edilerek, ~10 cm'lik kolon segmenti çıkarıldı (Altıok, 2009). Buz ¼st¼ne alınan kolon materyali ¼nce soğuk distile su, daha sonra da soğuk fizyolojik serum ile yıkanarak dokuların kanı vb. uzaklaştırıldı (şekil 6). Biyokimyasal parametreler için yaklaşık 5 cc kan alındı (şekil 7). Histopatolojik alışmalar için kolon dokusundan alınan ¼rnekler %10 paraformadehit içerisinde fikse edildi ve Pamukkale ¼niversitesi Tıp Fak¼ltesi Histoloji ve Embriyoloji Laboratuvarına g¼t¼r¼ld¼. Kalan doku ¼rnekleri molek¼ler etki belirleme çalışmaları için kullanılacaktır. Dokular ¼nce steril buzdolabı poşetlerine ve daha sonra al¼minyum folyoya sarılıp etiketlenerek sıvı azotta donduruldu. Ardından Pamukkale ¼niversitesi Fen Edebiyat Fak¼ltesi Biyokimya ve Molek¼ler Toksikoloji Araştırma Laboratuvarına getirilen dokular -80°C'ye kaldırıldı. Kanlardan 10.000 rpm 5 dk 4°C'de santrif¼j edilerek elde edilen serumlar derin dondurucuda muhafaza edildi (şekil 7).



şekil 6. Sıçanlardan dokuların temini



şekil 7. Sıçanlardan kan alınması ve serum eldesi

2.3. Histopatolojik İncelemeler

Elde edilen ~1 cm uzunluğundaki kolon dokuları Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarına taşınarak rutin takip işlemlerine başlandı. Tespit solüsyonu olarak kullanılan %10'luk formaldehit solüsyonunda 24 saat bekleyen kolon dokuları bir gece çeşme suyu altında yıkandıktan sonra sırasıyla %50, %70, %80, %96 ve absöü alkol serilerinde birer saat tutularak dehidre edildi. Saydamlaştırma aşamasına alınan dokular 2x1 saat süre ksilolde bekletildikten sonra 60°C'deki yumuşak parafin içerisinde alındı. 45 dk yumuşak parafin emdirme işleminden sonra dokular eriyik haldeki sert parafine alındı. Parafin dispenser yardımı ile yapılan bloklama işleminden sonra kolon dokularından Leica RM2125RT Rotary Mikrotom kullanılarak 3-4 mikron kalınlığında kesitler alındı. Kolon dokusu genel histolojik incelemesi için kesitlere Hematoksilen-Eozin (H&E) boyaması yapıldı.

2.4. Moleküler Mekanizma Belirleme Çalışmaları

2.4.1. MC Marmelatının Genlerin Transkripsiyonel İfade Düzeylerine Etkilerinin Belirlenmesi

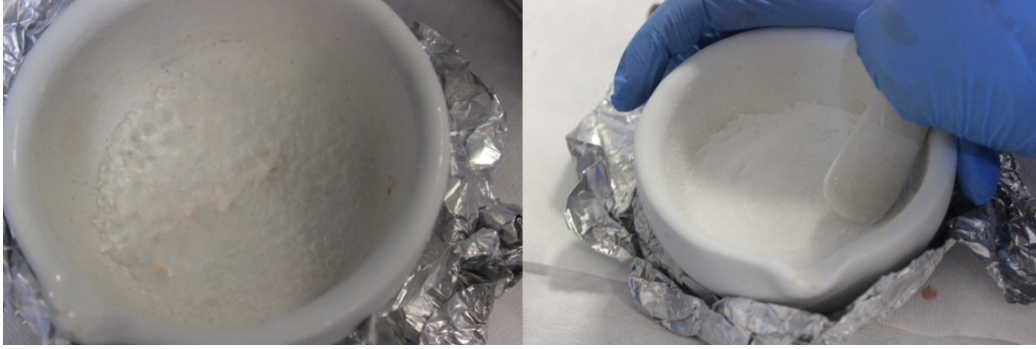
MC marmelatının ÜK oluşumunda rol aldığı düşünölen genlerin ifade düzeylerine etkilerini saptamak için doku örneklerinden total RNA izolasyonları yapıldı.

2.4.1.1. Total RNA izolasyonu

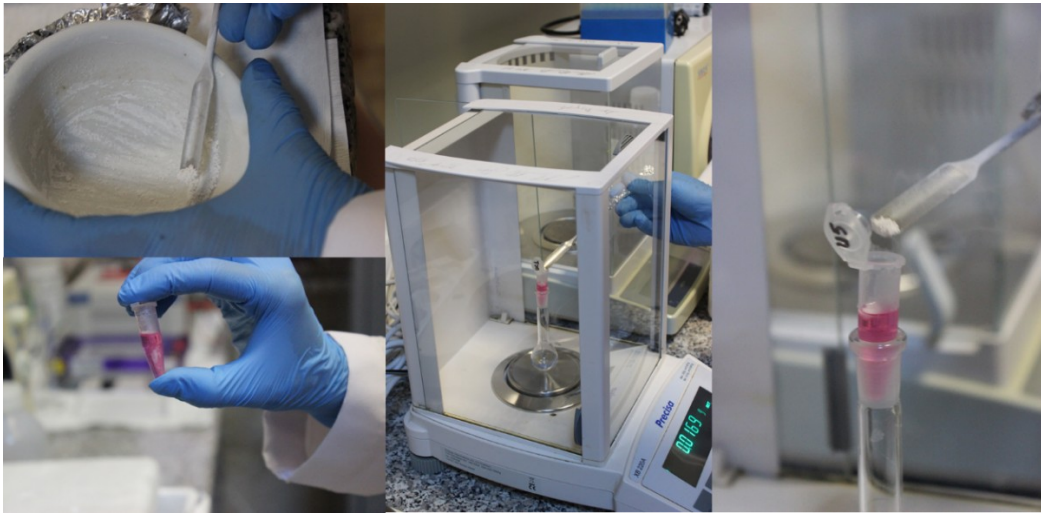
MC marmelatının moleküler etki mekanizmasını belirlemek üzere ilk etapta bu çalışmalarda kullanılacak RNA'lar, "Qiagen RNeasy Plus Universal Kit" kullanılarak üretici firmanın talimatları baz alınarak kendi laboratuvarımızda optimize ettiğimiz prosedür ile izole edildi.

-80°C'de bulunan kolon dokuları DEPC ile muamele edilmiş havanda sıvı azotla iyice öğütöldü (Şekil 8). 2 ml'lik eppendorf tüplere 0,9 ml "Qiazol Lysis" solüsyonundan eklendi. Darası alınan eppendorf tüplere 30 mg olacak şekilde öğütölen dokudan tartıldı ve iyice karıştırıldı (Şekil 9). Oda sıcaklığında 5 dk inkübe edildikten sonra üzerine 100 µl "gDNA Eliminasyon" solüsyonundan eklenerek 15 sn karıştırıldı. Daha sonra 200 µl kloroform eklendi ve tekrar iyice karıştırıldı. 3 dk oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra 12.000 xg'de 4°C'de 15 dk santrifüj edildi. Üst faz alınıp yeni 2 ml'lik eppendorf tüpe alındı ve alınan üst fazın üzerine eşit miktarda %70'lik etanol eklendi ve iyice karıştırıldı. Karışım "Rneasy Mini Spin" kolona eklendi ve 30 sn 9.000 xg'de santrifüj edildi ve alta geçen kısım dököldü. Kolonun üzerine 700 µl "Yıkama Tamponu (RWT)" eklendi ve 30 sn 9.000 xg'de santrifüj edildi. Alta geçen kısım dököldü. Kolonun üzerine "RPE Tamponu"ndan 500 µl eklendi ve 30

sn 9.000 xg'de santrifüj edildi, alta geçen kısım yine döküldü. Kolonun üzerine tekrar 500 µl "RPE Tamponu"ndan eklendi ve 2 dk 15 sn 9.000 xg'de santrifüj edildi. Alta geçen kısım döküldü. Son olarak kolon yeni tüpe alındı ve üzerine 50 µl RNaz içermeyen su eklendi ve 1 dk 15 sn 9.000 xg'de santrifüj edilerek RNA'ların alta geçmesi sağlandı.



Şekil 8. Sıvı azot ile doku öğütme



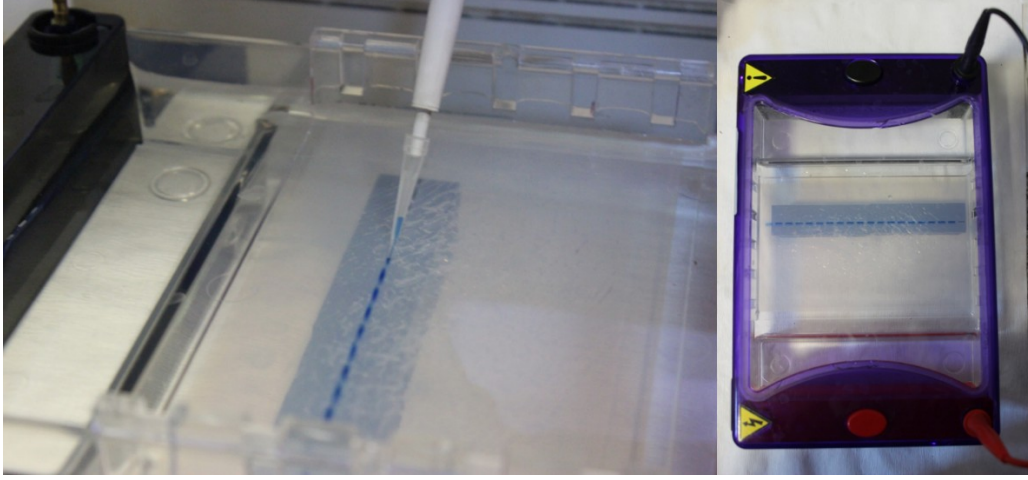
Şekil 9. Öğütülmüş dokuların tartımı

2.4.1.2. Total RNA'nın Agaroz Jel Elektroforezi ile Görüntülenmesi

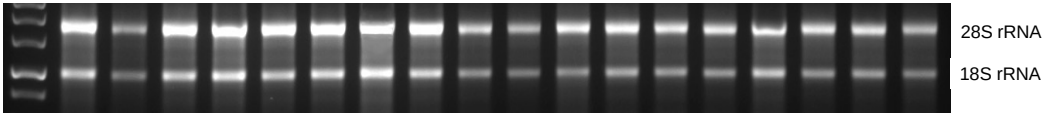
İzole edilen RNA'ların kalitesi %1'lik agaroz jel hazırlanarak Thermo yatay agaroz elektroforezinde 28S ve 18S bantlarının durumuna göre belirlendi. %1'lik agaroz jel, Tris-Asetik asit-EDTA (TAE) tamponu ile hazırlandı. Agaroz çözünene kadar mikrodalga fırında kontrollü bir şekilde ısıtma işlemi yapıldı. Çözünme işleminden sonra agaroz solüsyonu soğutulmuş olarak üzerine 1 µl EtBr (Etidyum Bromür) eklendi ve elektroforez tablasına dökülerek katı hal oluşuncaya kadar beklendi. Katı hal alan agaroz jel, elektroforez tankına, kuyucuklar RNA'nın - yükten + yüke yürüyebilmesi için elektroforezin '-' kutbuna yerleştirildi. Elektroforez tankı RNA'yı yürütmek için 1X TAE tamponu ile dolduruldu. 3 µl RNA örneği, 5 µl steril su ve 2 µl yürütme boyası ile muamele edilerek mikro pipet ile jelde bulunan

kuyucuklara yüklendi. Elektroforez güç kaynağına bağlandı ve 90 V, maksimum 500 mA'de 45 dk süre ile yürütüldü

(Şekil 10). Yürütme bitince jeller UV transillünatörde görüntülenip, DNR LightBis Pro Image Analysis System cihazında fotoğraflandı (Şekil 11).



Şekil 10. İzole edilmiş total RNA'ların agaroz jel elektroforezde yürütülmesi



Şekil 11. İzole edilmiş total RNA'ların agaroz jel elektroforez görüntüsü

2.4.1.3. RNA Miktar Tayini

Elde edilen RNA örneklerinin konsantrasyonları Nanodrop cihazında (MaestroNano Spectrophotometer) 260/280 nm ölçümü ile belirlenerek cDNA sentezi için kullanıldı (Şekil 12).



Şekil 12. Elde edilen RNA'ların Nanodrop'ta miktar tayini

2.4.1.4. mRNA Düzeyinde Ekspresyonların Tayin Edilmesi

ÜK patogenezinde rol aldığı bilinen genlerin [IFN- γ , CARD15/NOD2, GATA3, CCL17, MMP9, TNF α , TIMP1, STAT1, STAT3, JAK2, NF-kB1, 18S (normalizasyon geni), IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13 ve IL-23R] ekspresyon tayini tamamlanmıştır. Bu amaçla elde edilen RNA'lardan cDNA sentezi oligo(dT) primer ve RevertAid Revers Transkriptaz kullanılarak üretici firmanın talimatlarına göre gerçekleştirildi. cDNA sentezi için 5 μ g total RNA ve 0,5 μ g oligo(dT) primeri karıştırılıp, son hacmi 11 μ l RNaz içermeyen su ile tamamlandı. Karışım 70°C'de 5 dk inkübe edildikten sonra, üzerine 4 μ l, 5X reaksiyon tamponu (250 mM Tris-HCl pH 8.3, 250 mM KCl, 20 mM MgCl₂ ve 50 mM DDT) ve 2 μ l dNTP karışımı eklendi. 5 dk, 37°C'de inkübasyondan sonra 200 U RevertAid Revers Transkriptaz eklenerek son hacim 20 μ l'ye tamamlandı. Enzim eklendikten sonra, son karışım cDNA sentezi için 42°C'de 1 saat inkübe edildi. Süre sonunda, 70°C'de 10 dk bekletilerek enzim inhibisyonu gerçekleşti. Sentezlenen cDNA'lar, daha sonra PZR yapmak üzere -80°C'de muhafaza edildi.

Literatür ve veri bankaları taranarak belirlenen genler için uygun primer dizileri saptandı (Tablo 2) ve PZR işlemi Hot Start Taq DNA Polimeraz kullanılarak üretici firmanın önerdiği talimatlara göre gerçekleştirildi. Çalışmanın başında primerler için doğru yapışma (annealing) sıcaklığının belirlenmesi için gradiyent-PZR yapıldı. Tipik reaksiyon karışımı ve koşulları Tablo 3 ve Tablo 4'te verilmektedir. Reaksiyon karışımı (tüpü) PZR işlemi için önce 95°C'de 5 dk denatürasyona tabi tutuldu. Amplikasyon işlemi her bir gen için özel koşullarda gerçekleştirildi. PZR ürününün 5 μ l'si %1'lik agaroz jelde yürütüldü ve UV ışığı altında EtBr boyamayla gözlemlendi. mRNA düzeyleri 18S genine göre normalize edilerek kantite edildi.

Tablo 2. Seçilen genler için tanımlanan primer dizileri ve yapışma sıcaklıkları

Primer Adı	Primer Dizisi (5'→3')	Yapışma Sıcaklığı (°C)
INF-g_F	GCCGCGTCTTGGTTTTGCAG	65
INF-g_R	TACCGTCCTTTTGCCAGTTCCTCCA	
CARD15_F	AGTGAAGGCAAATGGACTGG	59
CARD15_R	TCTGTCCGCAGCTCTAAGGT	
GATA3_F	CCTACCGGGTTCGGATGTAA	63
GATA3_R	CACACACTCCCTGCCTTCTGT	
CCL17_F	ACCTTCACCTCAGCTTTTGGTACCATG	68
CCL17_R	GCGTCTCCAAATGCCTCAGCGGGAAGG	

MMP9_F	CCTCTGCATGAAGACGACAT	59
MMP9_R	GAGGTGCAGTGGGACACATA	
TNFα_F	GCCAATGGCATGGATCTCAAAG	59
TNFα_R	CAGAGCAATGACTCCAAAGT	
TIMP1_F	CTGGCATAATCTGAGCCCTG	60
TIMP1_R	GCAAAGTGATCGCTCTGGTAG	
STAT1_F	TGAGTTCCGACACCTGCAACTGAA	65
STAT1_R	AGGTGGTCTCAAGGTCAATCACCA	
STAT3_F	TGGAAGAGGGCGGCAGCAGATAGC	66
STAT3_R	CACGGCCCCCATTCCCACAT	
JAK2_F	TTTGAAGACAGGGACCCTACACAG	62
JAK2_R	TCATAGCGGCACATCTCCACA	
NFKB1_F	ACCTGGAGCAAGCCATTAGC	55
NFKB1_R	CGGACCGCATTCAAGTCATA	
IL-1B_F	CATCAGCACCTCTCAAGCAGA	63
IL-1B_R	CATTCTCGACAAGGGGGCTC	
IL-2_F	GCCCAAGCAGGCCACAGAATTGA	65
IL-2_R	CCACCACAGTTGCTGGCTCATC	
IL-4_F	CAGAAAAAGGGACTCCATGCACCG	66
IL-4_R	TTGCGAAGCACCTGGAAGCC	
IL-5_F	GAGGGGGCACTGTGGAAATA	59
IL-5_R	ACTCATCACGCCAAGGAACT	
IL-6_F	TCTCTCCGAAGAGACTTCC	60
IL-6_R	TCTTGGTCCTTAGCCACTCC	
IL-10_F	TCCCAGTCAGCCAGACCCACA	65
IL-10_R	AATCGATGACAGCGTCGCAGC	
IL-13_F	CCTGGAATCCCTGACCAACA	59
IL-13_R	GCCATAGCGGAAAAGTTGCT	
IL-23R_F	AAAGGAGGTTGATAGAGGGT	57
IL-23R_R	TCTTAGTAGATCCATTTGTCCC	
18S_F*	GAATCCCAGTAAGTGCGGGTCATA	65
18S_R*	CGAGGGCCTCACTAAACCATC	

F (forward), R (reverse) primerleri simgelemektedir.		
* Kontrol amaçlı kullanılan (normalizasyon) primerler.		

Tablo 3. PZR karışımı

Bileşenler	Hacim (µl)	Son Konsantrasyon
10X PZR amplifikasyon tamponu	2	1X
MgCl ₂ (25 mM)	1,5	1,875 mM
Forward Primer (10 µM)	1,5	0,75 µM
Reverse Primer (10 µM)	1,5	0,75 µM
dNTP karışımı (10 mM)	0,75	0,375 mM
cDNA	1,5	2 ng/µl
Ultra Saf Su	10,75	
Hot Start Taq DNA polimeraz (5 U/µl)	0,5	2,5 U
Toplam Hacim	20	

Tablo 4. PZR koşulları

Basamaklar	Sıcaklık (°C)	Süre
Ön Denatürasyon	95	5 dk
Denatürasyon	95	30 sn
Yapışma	55-68	1 dk
Uzama	72	1 dk
Son Uzama	72	5 dk

2.4.2. MC Marmelatının Genlerin Translasyonel İfade Düzeylerine Etkilerinin Belirlenmesi

2.4.2.1. Kolon Total Protein Ekstraksiyonu-Örnek Hazırlanması

Kolon dokusundan total protein ekstraksiyonu gerçekleştirildi. Bunun için derin dondurucudan çıkarılan kolon dokuları önceden soğutulmuş (-80°C) havan ve tokmaklar kullanılarak sıvı azot içinde iyice öğütüldü. Ependorf tüplere aseton içerisinde %10 TCA ve 20 mM DTT içeren çöktürme çözeltisi eklenip, daraları alındı. Öğütülmüş doku soğutulmuş steril spatula yardımı ile yaklaşık 100 mg olacak şekilde tüplere eklendi ve karıştırıldı. Tüpler buz üzerinde 1 saat inkübe edildikten sonra 12.500 rpm'de 20 dk santrifüj edildi. Santrifüj

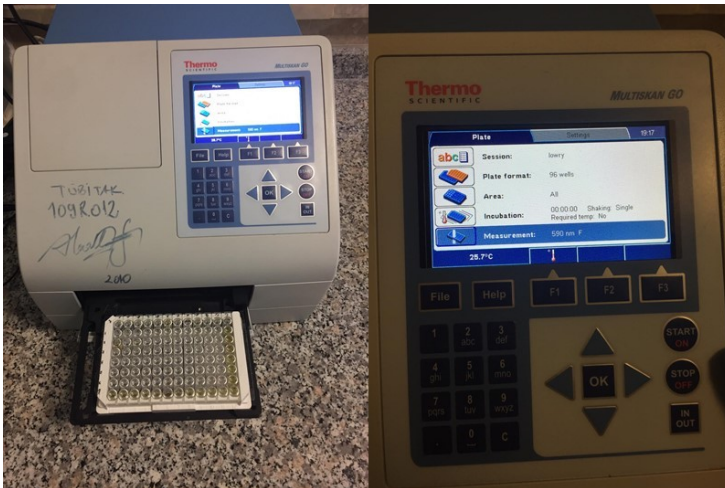
atılarak elde edilen çökelek 7 M üre, 2 M tiyoüre, %2 CHAPS, 1 tablet proteaz inhibitörü ve 2 mM DTT içeren solubilizasyon tamponunda çözüldü. İzole edilen proteinler -20°C'ye kaldırıldı. (Şekil 13).



Şekil 13. Kolon dokularından protein ekstraksiyonu

2.4.2.2. Bişinşonik Asit ile Protein Tayini

Kolon dokusundan izole edilen proteinlerin protein miktar tayini yapıldı. Protein tayini için gerekli olan Bişinşonik Asit Solüsyonu (BCA), Mikro BCA Reaktif A (0,65 M sodyum karbonat monohidrat ve 0.65 M sodyum potasyum tartarat hazırlanıp, pH 11,25'e 10 N sodyum birkarbonat ile titre edilir), Mikro BCA Reaktif B (0,1 M bişinşonik asit suda çözülerek hazırlanır) ve Mikro BCA Reaktif C (0,015 M bakır sülfat) 25:1:1 oranında karıştırılarak hazırlandı. 96 kuyucuklu plakalara 0,1 ml seyreltilmiş örnek (10X-25X) veya standard protein solüsyonu (sığır serum albümin) ve 0,1 ml BCA solüsyonu eklenerek karıştırıldı. 15 dk 60°C'de inkübe edildi ve 590 nm'de Eliza okuyucuda (Thermo Multiskan Go) ölçüldü. (Şekil 14).



Şekil 14. BCA ile protein miktar tayini

2.4.2.3. SDS-Poliakrilamit Jel Elektroforezi (SDS-PAJE) ve Western Blot

Kolon dokusundan izole edilen proteinler Laemmli (1970)'de belirtildiği gibi dikey elektroforez tekniği uygulanarak SDS-Poliakrilamit Jel Elektroforez (SDS-PAJE) yöntemi ile ayrıştırıldı ve protein profilleri elde edildi. Proteinlere özgü spesifik antikorlar kullanılarak Western Blot tekniği ile protein düzeyleri immünolojik olarak tayin edildi.

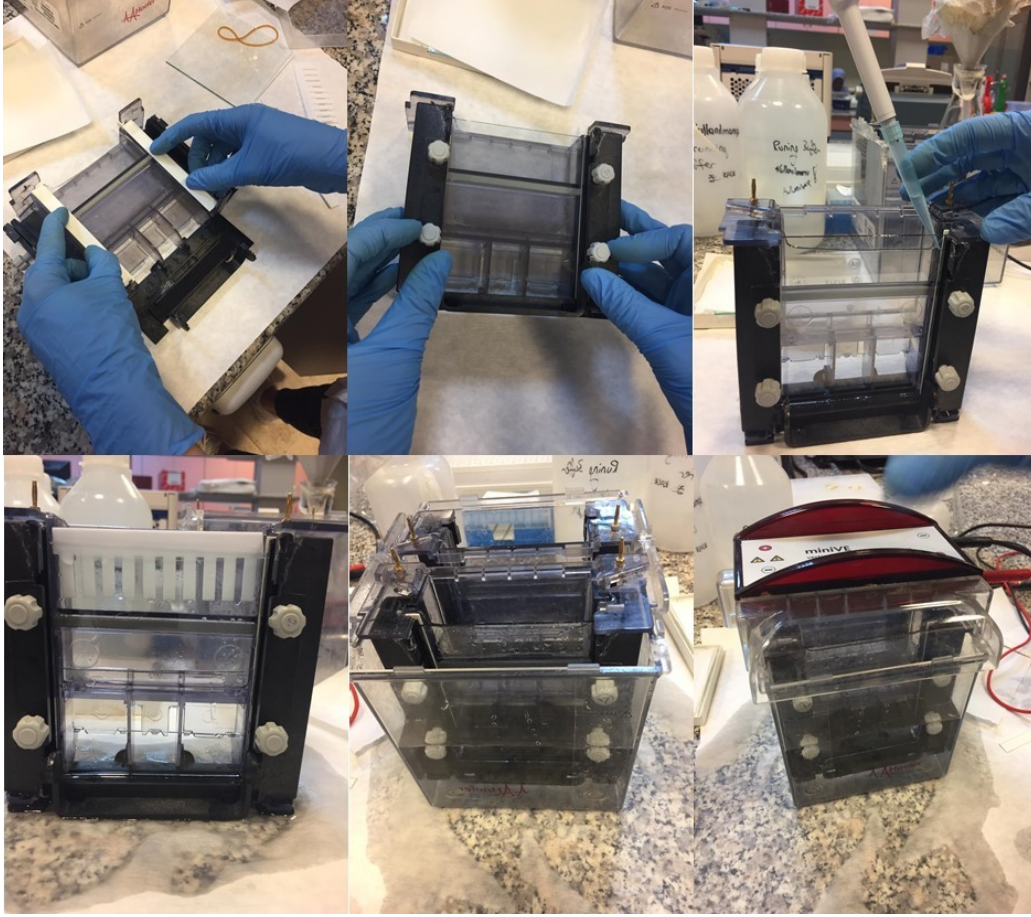
Poliakrilamit jel elektroforezi (PAJE), iyonik deterjan sodyum dodesil sülfat (SDS) varlığında Laemmli (1970) tarafından tanımlanmış olan kesintili bir tampon sistemi kullanılarak gerçekleştirildi. Ayrıştırıcı ve sıkıştırıcı jel solüsyonları Tablo 5'te belirtildiği gibi verilen miktarlar ve verilen sırayla kullanımdan hemen önce karıştırılarak hazırlandı.

Tablo 5. SDS-PAJE ayrıştırıcı ve sıkıştırıcı jellerin formülasyonları

Stok Çözeltiler	Ayrıştırıcı Jel (%8,5)	Sıkıştırıcı Jel (%4)
Jel Çözeltisi(ml)	8,5	1,5
Distile Su (ml)	13,55	5,88
Ayrıştırıcı Jel Tamponu	7,5	-
Sıkıştırıcı Jel Tamponu	-	2,5
%10 SDS (ml)	0,4	0,16
%10 APS (ml)	0,15	0,065
TEMED (ml)	0,015	0,012

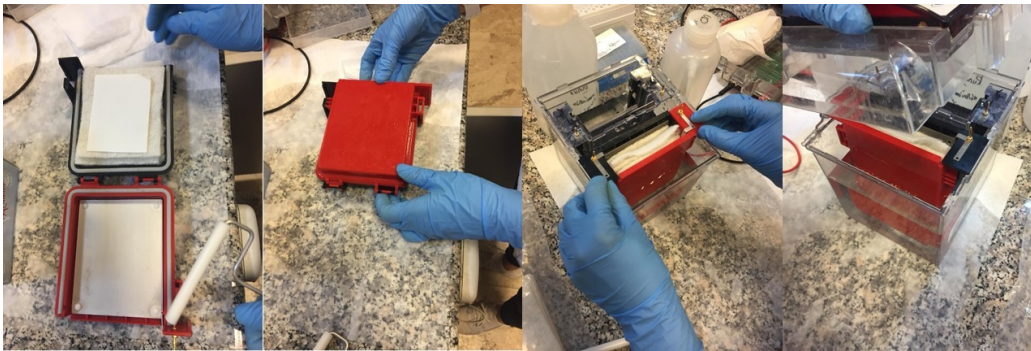
Poliakrilamit slab jelleri, jel sandviçinin hazırlanması ile Hoefer MiniVe entegre dikey elektroforez sistemi kullanılarak gerçekleştirildi (Şekil 15). Elektroforetik ayrıştırma sistemi Thermo EC1000-90 güç kaynağına bağlandı. İzleme boyası tabana ulaştığı zaman güç kaynağı kapatıldı. Elektroforez tamamlanınca, jel sandviçten çıkarılarak Western blot analizi [Kyhse-Anderson (1984) ile Tovey ve Baldo (1987) tarafından tanımlandığı gibi] için elektroforezi takiben transfer tamponu (25 mM Tris, 192 mM glisin ve %10 metanol) içerisinde 10 dk süreyle sabit hızlı bir çalkalayıcıda inkübasyona bırakıldı. Elektroforetik transfer Hoefer MiniVe elektrotransfer sistemi ile yapıldı. MiniVe Blotter'ın katot (siyah) kısmı alta gelecek şekilde sistem kurulmaya başlanır. En alta sünger konuldu, bunun üzerine önceden nemlendirilmiş Whatman # 1 filtre kağıdı yerleştirildi ve hava kabarcıklarını gidermek amacıyla sistemden çıkan roller (silindir) üzerinde yuvarlandı. Jelin üzerine nitroselüloz membran da dikkatli bir şekilde yerleştirildi. Daha sonra membran üzerine önceden ıslatılmış başka bir Whatman # 1 filtre kağıdı yerleştirildi ve en üste tekrar sünger yerleştirilip sandviç tamamlandı. Hava kabarcıklarından tamamen kurtulmak için membranı kendi pozisyonunda sabit tutarken roller (silindir) nazikçe üzerinde yuvarlandı. Sandviç hazırlandıktan sonra

sistem kapatıldı ve tankın içine katot kısmı arkaya gelecek şekilde yerleştirildi. Sistem üzerine 300-350 ml transfer tamponu kondu ve üzerine 1-1,2 L distile su eklenerek tank dolduruldu.



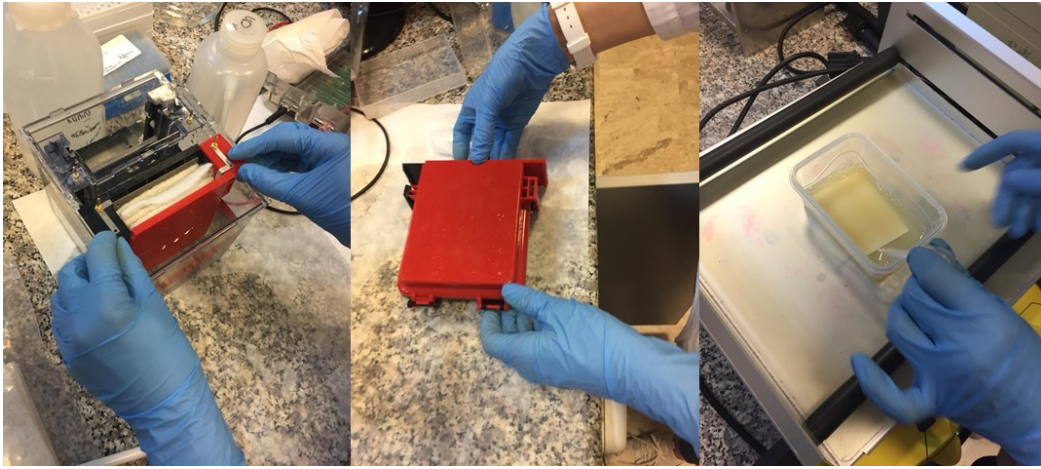
Şekil 15. İzole edilen proteinlerin SDS-PAJE'de yürütülmesi

Elektroforetik transfer sistemi Thermo EC1000-90 model güç kaynağına bağlanıp, 90 V, 500 mA'de 90 dk transfer gerçekleştirildi. (Şekil 16).



Şekil 16. İzole edilen proteinlerin jelden membrana elektroforetik transferi (Western blot)

Süre sonunda güç kaynağı kapatıldı. Transfer tamamlandıktan sonra üzerinde transfer edilmiş proteinleri barındıran membran elde edildi. Membran, protein içeren yüzeyi üste gelecek şekilde küçük plastik bir kabın içine yerleştirilerek 1 saat süreyle bloklama çözeltisi (TBST içinde yağsız %5'lik süt tozu) ile çalkalayıcı inkübatörde inkübe edildi. Süre sonunda membran önce bloklama çözeltisi içinde hazırlanan primer antikolar ve daha sonra işaretleyici enzim-horseradish peroksidaz (anti-rabbit/anti-mouse IgG-HRP konjugatı) ile bağlı olan ikincil antikolarla inkübe edildi. İşaretleme oda sıcaklığında 1 saat yapıldıktan sonra, ECL çözeltisi kullanılarak kemilüminesans reaksiyonu başlatıldı ve özgül primer bantları kemilüminesansa duyarlı film kullanılarak belirlendi (Şekil 17).



Şekil 17. Elektroforetik transfer sonucu membranın antikorlarla işaretlenmesi

2.5. Diagnostik (Sitotoksik) Enzim Aktiviteleri Üzerine Etkilerinin Saptanması

2.5.1. Serum Aminotransferazların Tayini (AST ve ALT)

Aspartat ve alanin aminotransferaz aktiviteleri Reitman ve Frankel (1957) metodu ile tanımlandığı üzere aktivite sonucunda keto asitin alkali ortamda 2,4-dinitrofenilhidrazin ile kenetlenmesi sonucu oluşan renk kompleksinin spektrofotometrik olarak ölçümü ile tayin edildi. 0,2 ml serum 1 ml AST substratı ile 37°C'de bir saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda ortama renk reaktifi olan alkali dinitrofenilhidrazin eklendi ve oda sıcaklığında 20 dk bekletildi. Son olarak reaksiyon tüplerine 0,4 N NaOH eklenerek oda sıcaklığında 5 dk inkübe edilip oluşan renk 505 nm'de köre karşı okundu. Standard eğriden elde edilen eğimin kullanılması ile enzim aktiviteleri hesaplandı.

2.5.2. Serum Aminotransferazların Tayini (AST ve ALT)

LDH ölçümü Kubowitz ve Ott (1943) tarafından tanımlanmış metodunun Wroblewski ve LaDue (1955) tarafından optimize edilmiş olan spektrofotometrik metot ile yapıldı. LDH

aktivite tayini, piruvatın laktata indirgenmesinin spektrofotometrik olarak 340 nm'de kinetik takibi ile ölçümüne dayanır. 0,1 M fosfat tamponu pH 7,5 ve 0,05 ml serum içeren ölçüm tüpüne 0,5 mM NADH eklenip, oda sıcaklığında 20 dk inkübe edildi. İnkübasyon sonrası 0,1 M Na-piruvat eklenip karıştırıldı ve spektrofotometre küvetine transfer edildi. Absorbans değişimi spektrofotometrede 340 nm'de 3 dk boyunca takip edildi. Enzim aktiviteleri, elde edilen dakikada absorbans değişimleri kullanılarak aşağıdaki formül ile hesaplandı:

$$\text{Serum LDH aktivitesi (ünite/L)} = [\text{OD}_{340}/\text{dk} \times \text{DF}] / [0.001 \times 0.05 \times l \text{ (cm)}]$$

2.6. İstatistiksel Analizler

Elde edilen sonuçlar her biri veri için Ortalama \pm Standart Hata olarak ifade edildi. Farklı gruplar içinde ve arasında kayda değer bir fark olup olmadığını analiz etmek için Varyans Analizi (Tek Yönlü Anova-Tukey) ve parametrik olmayan veriler için ise Mann-Whitney U testleri uygulandı. İstatistiksel hesaplamalar SPSS 15.0 programında analiz edildi.

3. BULGULAR

3.1. Enjeksiyon Aşaması-*in vivo* Hayvan Çalışmaları

Enjeksiyon işleminde kullanılan deneklerle ilgili bilgiler Tablo 6'da verilmiştir.

Tablo 6. Denek bilgileri

Grup	Sıçan Sayısı	Sıçan Grupları	Vücut Ağırlığı (gr)	
			Deney Öncesi	Deney Sonrası
Normal-Kontrol	7	NK1	254	259
		NK2	266	264
		NK3	259	261
		NK4	257	255
		NK5	204	204
		NK6	203	204
		NK7	201	206
Hasta-Kontrol	7	HK1	223	232
		HK2	225	226
		HK3	216	214
		HK4	221	222
		HK5	231	243
		HK6	235	242
		HK7	232	237
Hasta	7	H1	276	266
		H2	268	242
		H3	215	200
		H4	217	201
		H5	210	194
		H6	206	198
		H7	207	196
Tedavi	7	T1	198	212
		T2	208	216
		T3	251	255
		T4	270	280
		T5	228	238
		T6	257	275
		T7	253	269
Tedavi-Pozitif Kontrol	7	TPK1	282	292
		TPK2	239	237
		TPK3	243	250
		TPK4	242	245
		TPK5	278	287
		TPK6	259	292
		TPK7	256	262

Her bir değer, her biri en az triplike olan iki set ölçümün ortalamasıdır.

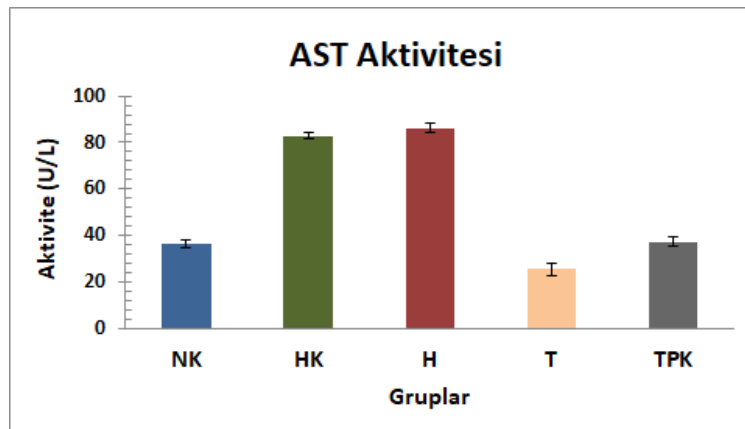
3.2. Serum Aminotransferazların Tayini (AST ve ALT)

Aspartat ve alanin aminotransferaz aktiviteleri Reitman ve Frankel (1957) metodu ile tanımlandığı üzere aktivite sonucunda keto asitin alkali ortamda 2,4-dinitrofenilhidrazin ile kenetlenmesi sonucu oluşan renk kompleksinin spektrofotometrik olarak ölçümü ile tayin edildi (Tablo 7 ve Şekil 18, 19).

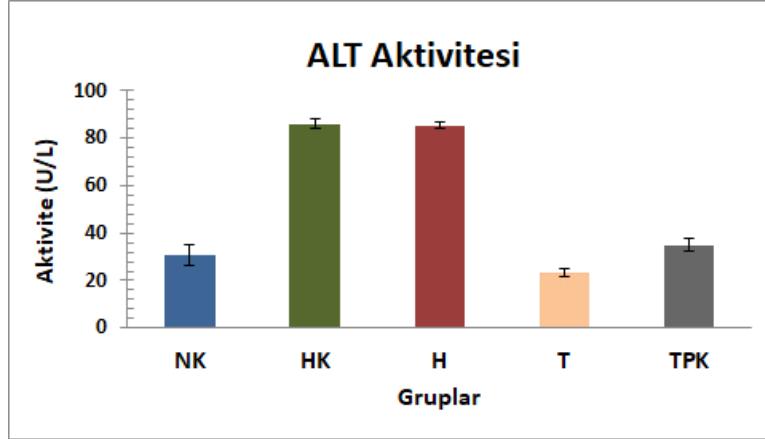
Tablo 7. AST-ALT aktiviteleri

Sıçan Kodu	Enzim Aktivitesi (Ünite/L)	
	AST (Ortalama)	ALT (Ortalama)
NK1	29,32	35,13
NK2	39,32	30,09
NK3	37,38	35,76
NK4	34,93	34,32
NK5	38,85	22,77
NK6	36,25	28,15
NK7	38,52	27,69
HK1	80,03	87,39
HK2	84,45	89,16
HK3	83,34	84,17
HK4	83,35	83,73
HK5	83,53	85,14
HK6	83,48	85,75
HK7	82,78	86,25
H1	82,65	86,12
H2	83,46	82,71
H3	88,53	84,35
H4	87,43	86,49
H5	86,25	85,65
H6	87,02	84,78
H7	86,29	86,03
T1	24,53	20,52
T2	27,61	22,59
T3	20,29	22,16
T4	22,98	24,34
T5	27,12	23,13
T6	25,85	24,53
T7	26,86	24,29
TPK1	37,25	30,01
TPK2	33,46	32,61
TPK3	36,26	35,25
TPK4	38,89	38,07
TPK5	37,53	36,49
TPK6	39,21	37,92
TPK7	38,02	35,23

Her bir değer, her biri en az triplike olan iki set ölçümün ortalamasıdır.



Şekil 18. AST aktivitesi



Şekil 19. ALT aktivitesi

3.3. Serum Laktat Dehidrogenaz Tayini (LDH)

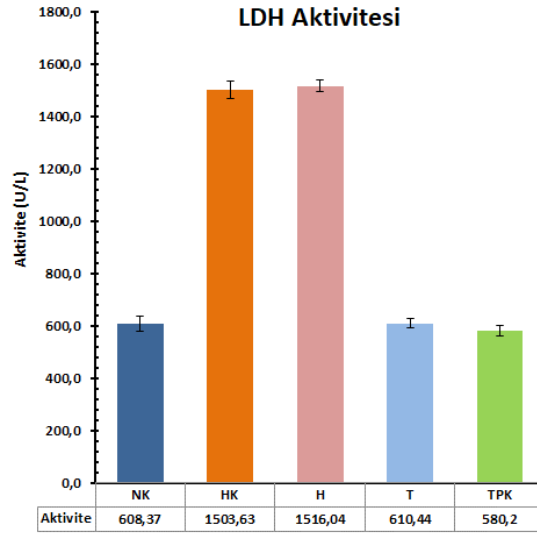
LDH ölçümü Kubowitz ve Ott (1943) tarafından tanımlanmış metodunun Wroblewski ve LaDue (1955) tarafından optimize edilmiş olan spektrofotometrik metot ile tayin edildi (Tablo 8, Şekil 20).

Tablo 8. LDH aktivitesi

Sıçan Kodu	Enzim Aktivitesi (Ünite/L)
NK1	598,32
NK2	623,02
NK3	580,78
NK4	625,22
NK5	589,94
NK6	636,28
NK7	605,09
HK1	1405,59
HK2	1322,08
HK3	1469,01
HK4	1521,83
HK5	1600,19
HK6	1608,49
HK7	1598,24
H1	1526,20
H2	1525,34
H3	1718,22
H4	1443,23
H5	1478,12
H6	1502,11
H7	1419,11
T1	524,53

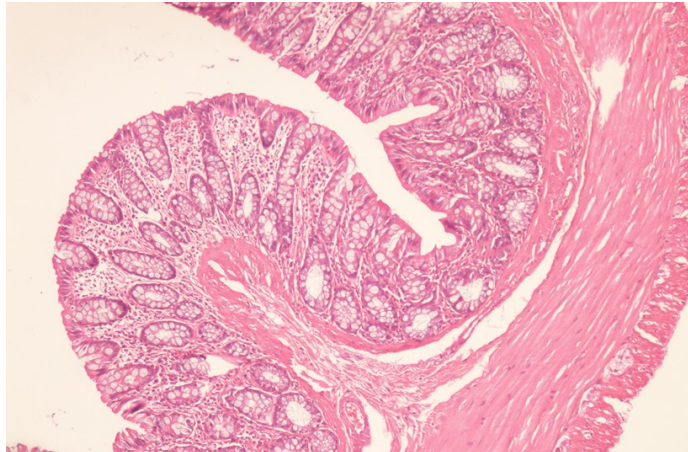
T2	627,81
T3	620,12
T4	622,23
T5	627,15
T6	625,17
T7	626,09
TPK1	537,12
TPK2	633,47
TPK3	536,23
TPK4	538,92
TPK5	637,56
TPK6	639,23
TPK7	538,88

Her bir değer, her biri en az triplike olan iki set ölçümün ortalamasıdır.

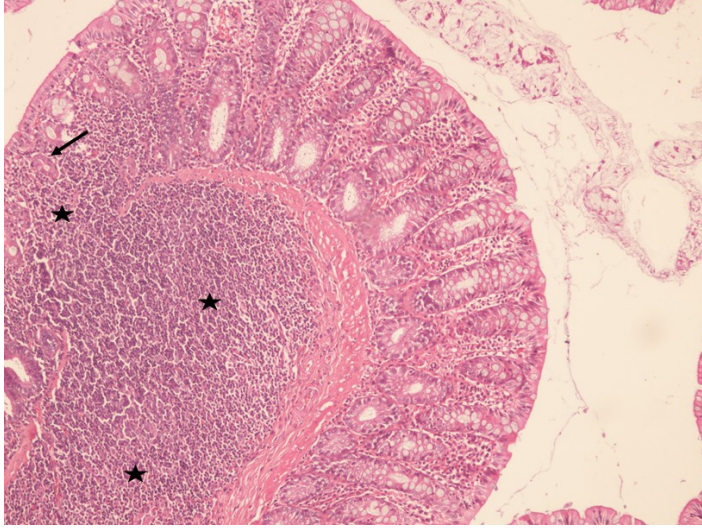


Şekil 20. LDH aktivitesi

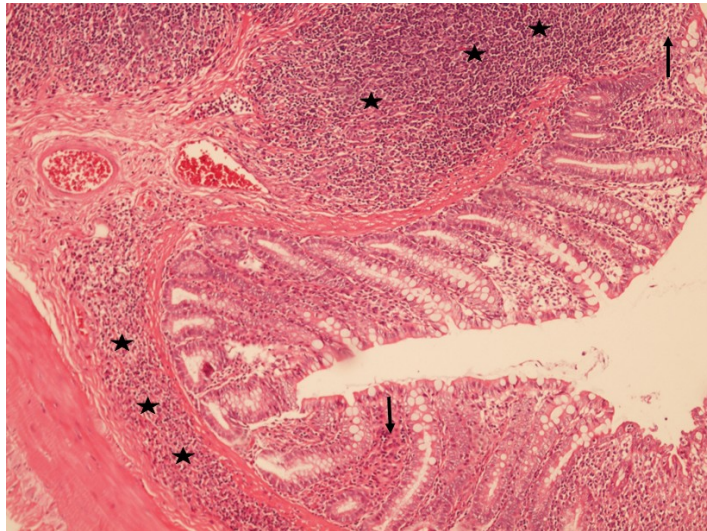
3.4. Histopatolojik Analizler



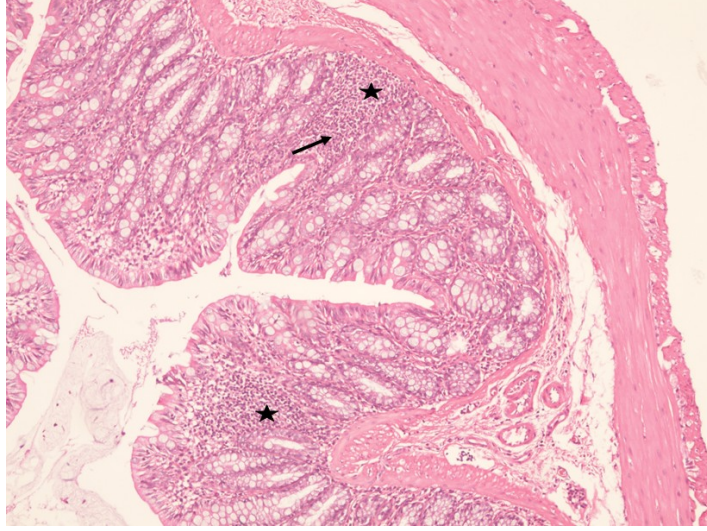
Şekil 21. Normal kontrol grubuna ait kolon kesiti. (H&E boyaması, X100)



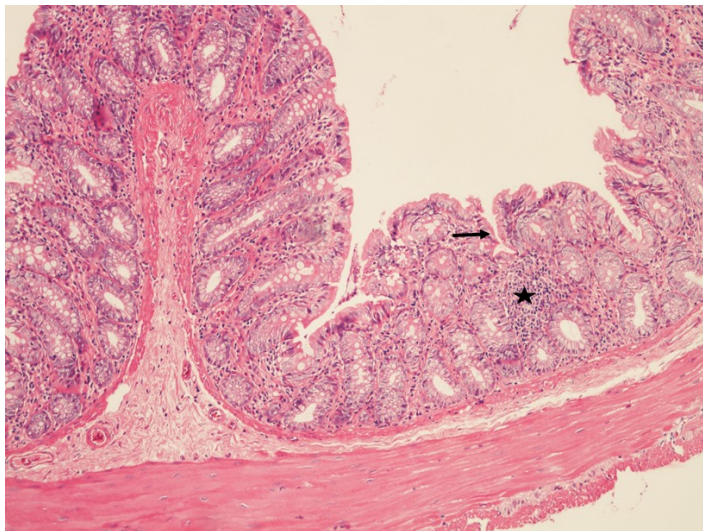
Şekil 22. Hasta kontrol grubuna ait kolon kesiti. Hasta kontrol grubu mukoza ve submukozasında yoğun inflamatuvar hücre infiltrasyonu (★; infiltrasyon alanları, ; kripta kaybı). (H&E boyaması, X100)



Şekil 23. Kolit (hasta) grubuna ait kolon kesiti. Kolit grubu mukoza ve submukozasında yoğun inflamatuvar hücre infiltrasyonu (; infiltrasyon alanları, ; kripta kaybı). (H&E boyaması, X100)



Şekil 24. Tedavi grubuna ait kolon kesiti. Mukozanın lamina propria tabakasında infiltrasyon alanlarının azalışı ve kolit grubuna göre daha az görülen kripta kaybı (★; infiltrasyon alanları, ; kripta kaybı). (H&E boyaması, X100)

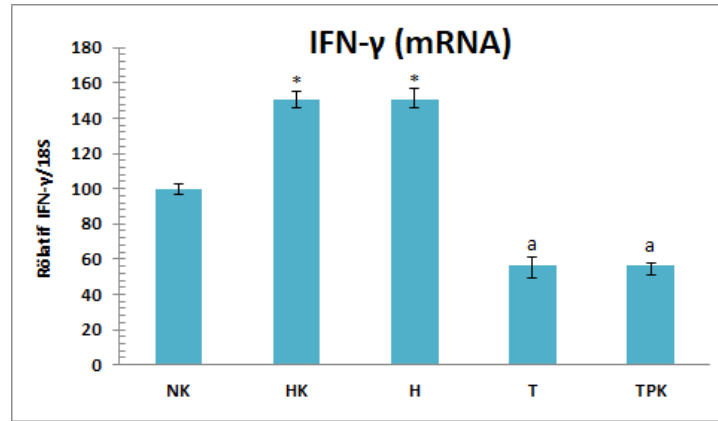


Şekil 25. Tedavi pozitif kontrol grubuna ait kolon kesiti. Mukozanın lamina propria tabakasında infiltrasyon alanlarının azalışı ve kolit (hasta) grubuna göre daha az görülen kripta kaybı (; infiltrasyon alanları, ; kripta kaybı). (H&E boyaması, X100)

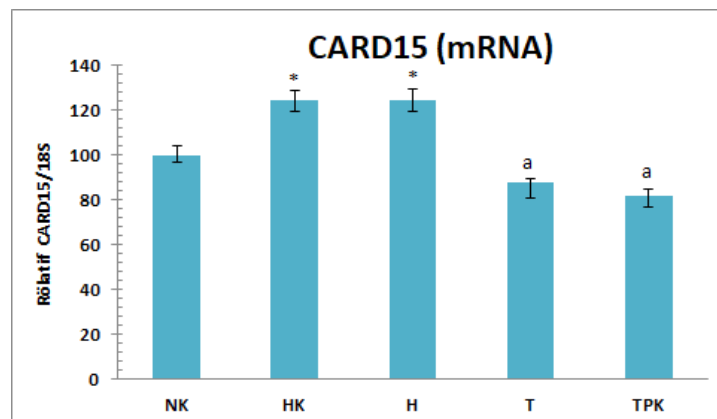
3.5. MC Marmelatının Enzim Ekspresyon Düzeyleri Üzerine Etkilerinin Saptanması

3.5.1. mRNA Düzeyinde Ekspresyonlarının Tayin Edilmesi: RT-PZR

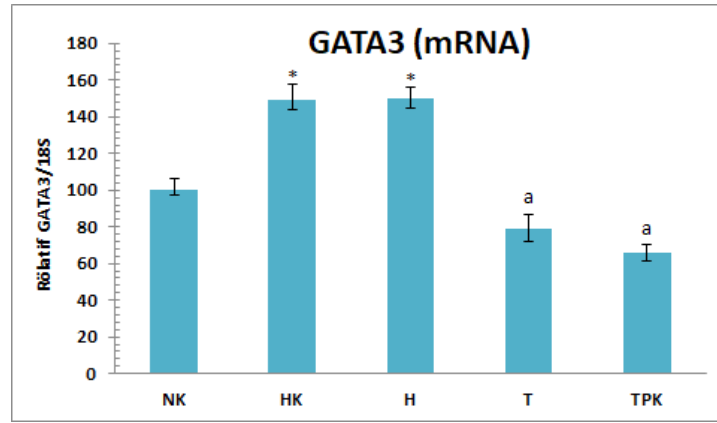
ÜK patogenezinde rol aldığı bilinen genlere [IFN- γ , CARD15/NOD2, GATA3, CCL17, MMP9, TNF α , TIMP1, STAT1, STAT3, JAK2, NF- κ B1, IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13 ve IL-23R] ait mRNA ekspresyonlarında meydana gelen değişiklikler ile ilgili sonuçlar aşağıda belirtilmektedir.



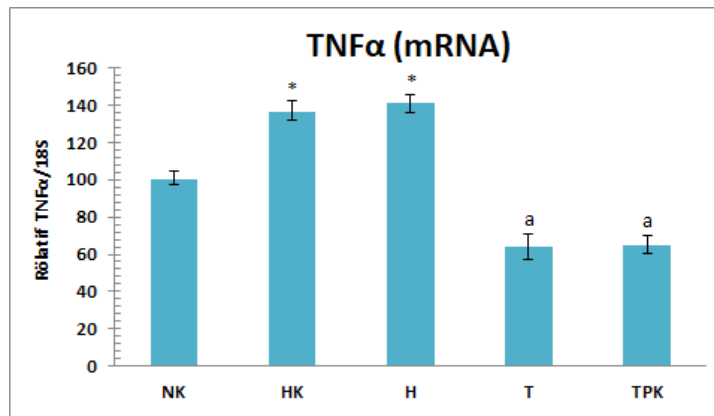
Şekil 26. MC marmelatının ÜK oluşturulan sıçan kolon dokularında IFN- γ mRNA seviyesine etkisi. Sonuçlar 18S ile normalize edildi. Kontrol değerleri 100 alındı. (*) $p < .05$ düzeyinde kontrol grubundan anlamlı olarak farklılık gösteren örneklerdir. (a) $p < .05$ düzeyinde hasta grubundan anlamlı olarak farklılık gösteren örneklerdir.



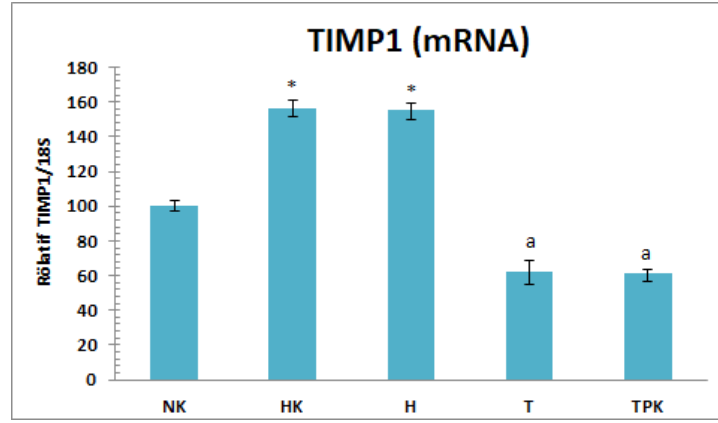
Şekil 27. MC marmelatının ÜK oluşturulan sıçan kolon dokularında CARD15 mRNA seviyesine etkisi. Sonuçlar 18S ile normalize edildi. Kontrol değerleri 100 alındı. (*) $p < .05$ düzeyinde kontrol grubundan anlamlı olarak farklılık gösteren örneklerdir. (a) $p < .05$ düzeyinde hasta grubundan anlamlı olarak farklılık gösteren örneklerdir.



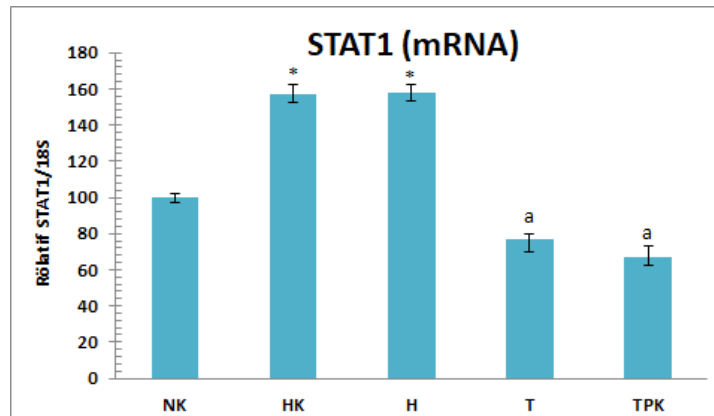
Şekil 28. MC marmelatının ÜK oluşturulan sıçan kolon dokularında GATA3 mRNA seviyesine etkisi. Sonuçlar 18S ile normalize edildi. Kontrol değerleri 100 alındı. (*) $p < .05$ düzeyinde kontrol grubundan anlamlı olarak farklılık gösteren örneklerdir. (a) $p < .05$ düzeyinde hasta grubundan anlamlı olarak farklılık gösteren örneklerdir.



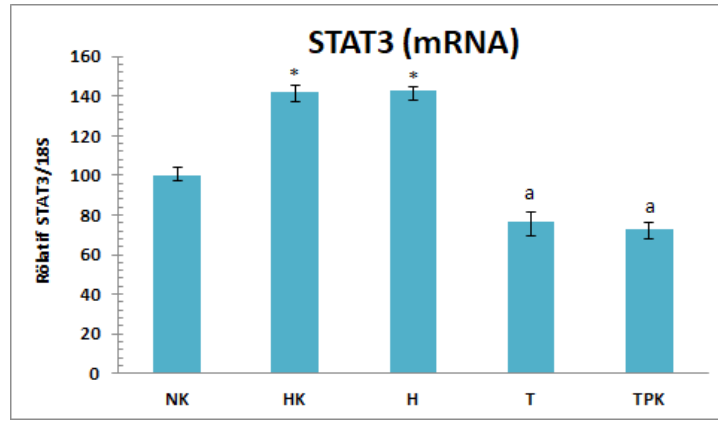
Şekil 29. MC marmelatının ÜK oluşturulan sıçan kolon dokularında TNF α mRNA seviyesine etkisi. Sonuçlar 18S ile normalize edildi. Kontrol değerleri 100 alındı. (*) p < .05 düzeyinde kontrol grubundan anlamlı olarak farklılık gösteren örneklerdir. (a) p < .05 düzeyinde hasta grubundan anlamlı olarak farklılık gösteren örneklerdir.



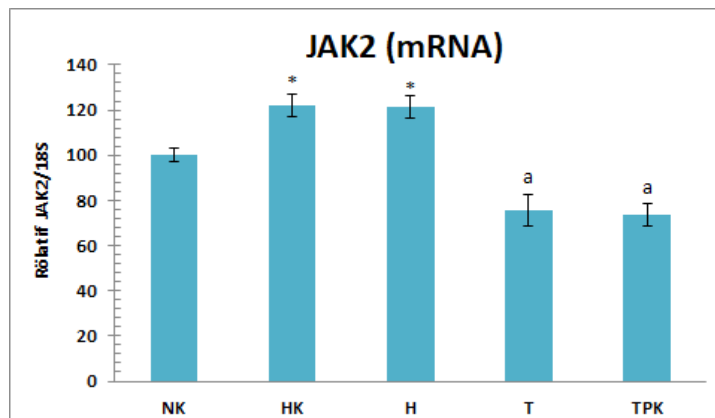
Şekil 30. MC marmelatının ÜK oluşturulan sıçan kolon dokularında TIMP1 mRNA seviyesine etkisi. Sonuçlar 18S ile normalize edildi. Kontrol değerleri 100 alındı. (*) p < .05 düzeyinde kontrol grubundan anlamlı olarak farklılık gösteren örneklerdir. (a) p < .05 düzeyinde hasta grubundan anlamlı olarak farklılık gösteren örneklerdir.



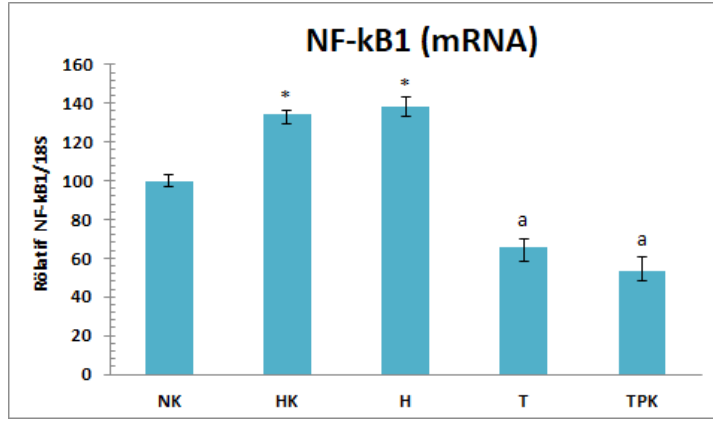
Şekil 31. MC marmelatının ÜK oluşturulan sıçan kolon dokularında STAT1 mRNA seviyesine etkisi. Sonuçlar 18S ile normalize edildi. Kontrol değerleri 100 alındı. (*) $p < .05$ düzeyinde kontrol grubundan anlamlı olarak farklılık gösteren örneklerdir. (a) $p < .05$ düzeyinde hasta grubundan anlamlı olarak farklılık gösteren örneklerdir.



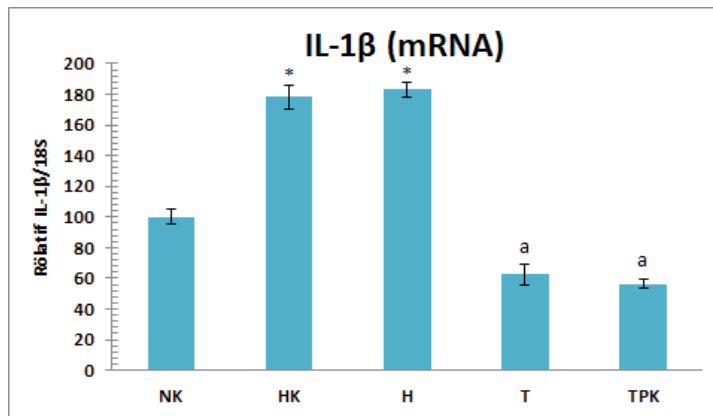
Şekil 32. MC marmelatının ÜK oluşturulan sıçan kolon dokularında STAT3 mRNA seviyesine etkisi. Sonuçlar 18S ile normalize edildi. Kontrol değerleri 100 alındı. (*) $p < .05$ düzeyinde kontrol grubundan anlamlı olarak farklılık gösteren örneklerdir. (a) $p < .05$ düzeyinde hasta grubundan anlamlı olarak farklılık gösteren örneklerdir.



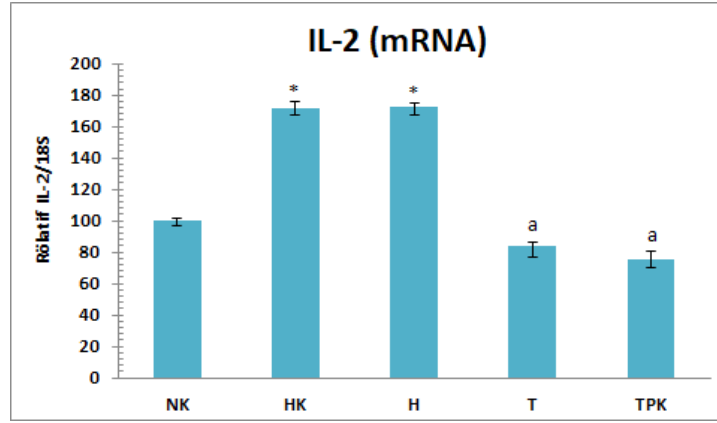
Şekil 33. MC marmelatının ÜK oluşturulan sıçan kolon dokularında JAK2 mRNA seviyesine etkisi. Sonuçlar 18S ile normalize edildi. Kontrol değerleri 100 alındı. (*) $p < .05$ düzeyinde kontrol grubundan anlamlı olarak farklılık gösteren örneklerdir. (a) $p < .05$ düzeyinde hasta grubundan anlamlı olarak farklılık gösteren örneklerdir.



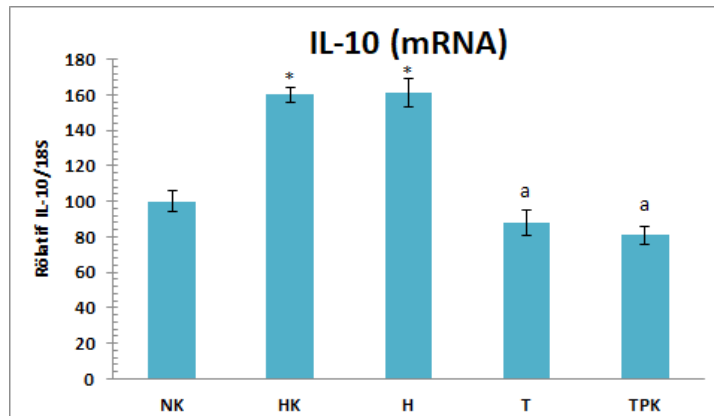
Şekil 34. MC marmelatının ÜK oluşturulan sıçan kolon dokularında NF-kB1 mRNA seviyesine etkisi. Sonuçlar 18S ile normalize edildi. Kontrol değerleri 100 alındı. (*) $p < .05$ düzeyinde kontrol grubundan anlamlı olarak farklılık gösteren örneklerdir. (a) $p < .05$ düzeyinde hasta grubundan anlamlı olarak farklılık gösteren örneklerdir.



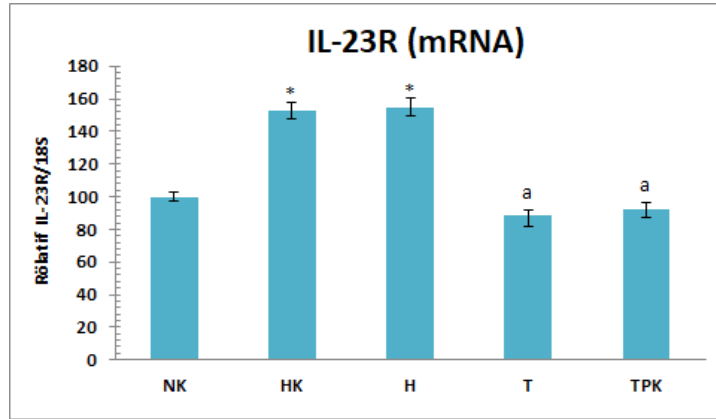
Şekil 35. MC marmelatının ÜK oluşturulan sıçan kolon dokularında IL-1 β mRNA seviyesine etkisi. Sonuçlar 18S ile normalize edildi. Kontrol değerleri 100 alındı. (*) p < .05 düzeyinde kontrol grubundan anlamlı olarak farklılık gösteren örneklerdir. (a) p < .05 düzeyinde hasta grubundan anlamlı olarak farklılık gösteren örneklerdir.



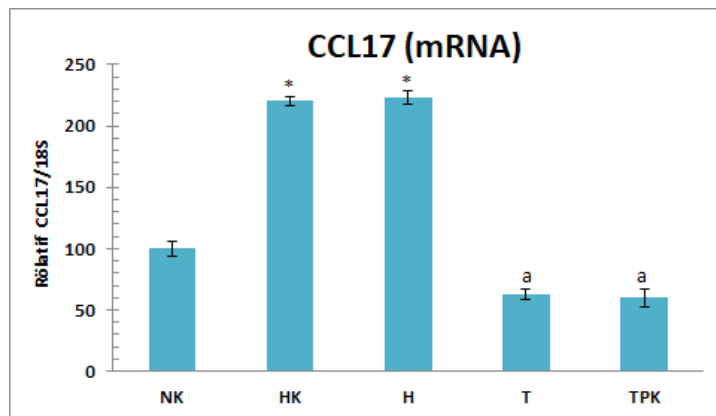
Şekil 36. MC marmelatının ÜK oluşturulan sıçan kolon dokularında IL-2 mRNA seviyesine etkisi. Sonuçlar 18S ile normalize edildi. Kontrol değerleri 100 alındı. (*) p < .05 düzeyinde kontrol grubundan anlamlı olarak farklılık gösteren örneklerdir. (a) p < .05 düzeyinde hasta grubundan anlamlı olarak farklılık gösteren örneklerdir.



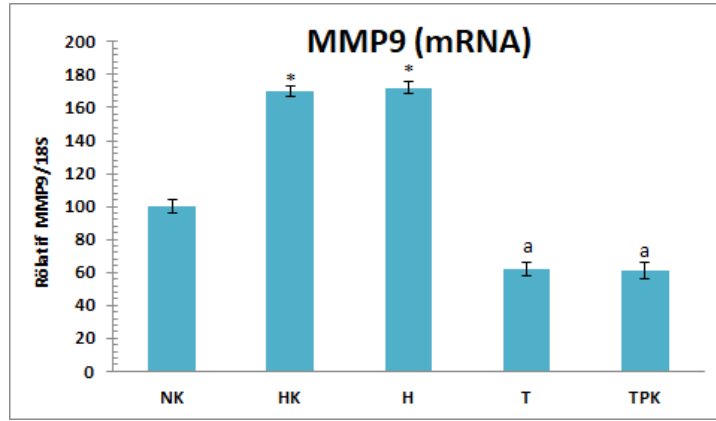
Şekil 37. MC marmelatının ÜK oluşturulan sıçan kolon dokularında IL-10 mRNA seviyesine etkisi. Sonuçlar 18S ile normalize edildi. Kontrol değerleri 100 alındı. (*) $p < .05$ düzeyinde kontrol grubundan anlamlı olarak farklılık gösteren örneklerdir. (a) $p < .05$ düzeyinde hasta grubundan anlamlı olarak farklılık gösteren örneklerdir.



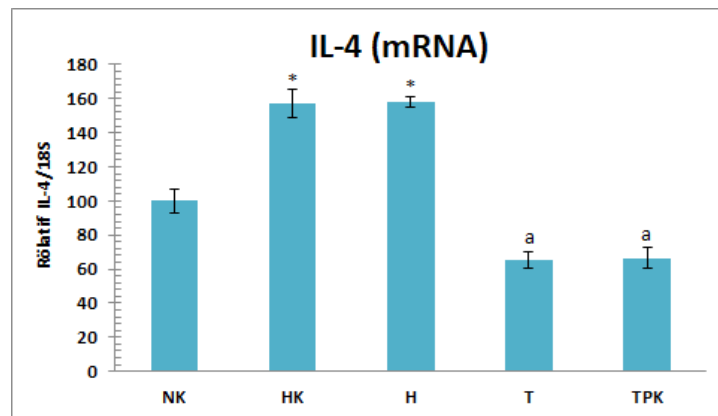
Şekil 38. MC marmelatının ÜK oluşturulan sıçan kolon dokularında IL-23R mRNA seviyesine etkisi. Sonuçlar 18S ile normalize edildi. Kontrol değerleri 100 alındı. (*) $p < .05$ düzeyinde kontrol grubundan anlamlı olarak farklılık gösteren örneklerdir. (a) $p < .05$ düzeyinde hasta grubundan anlamlı olarak farklılık gösteren örneklerdir.



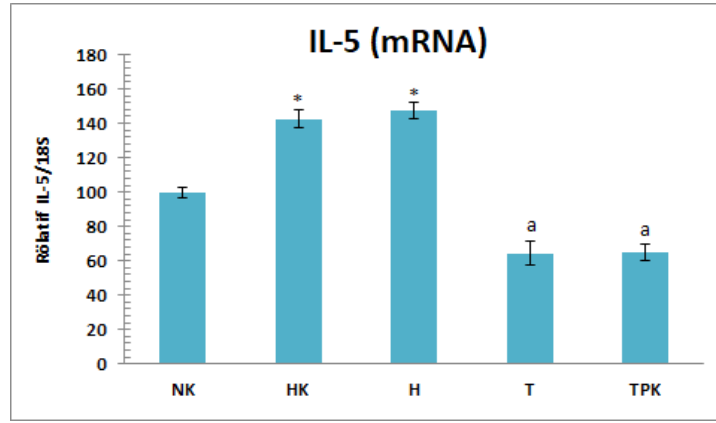
Şekil 39. MC marmelatının ÜK oluşturulan sıçan kolon dokularında CCL17 mRNA seviyesine etkisi. Sonuçlar 18S ile normalize edildi. Kontrol değerleri 100 alındı. (*) p < .05 düzeyinde kontrol grubundan anlamlı olarak farklılık gösteren örneklerdir. (a) p < .05 düzeyinde hasta grubundan anlamlı olarak farklılık gösteren örneklerdir.



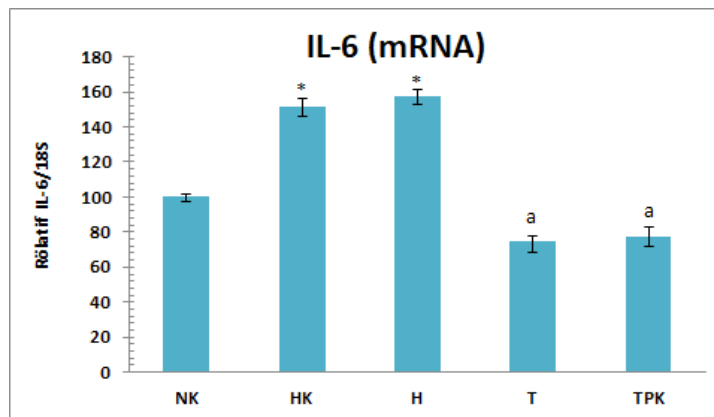
Şekil 40. MC marmelatının ÜK oluşturulan sıçan kolon dokularında MMP9 mRNA seviyesine etkisi. Sonuçlar 18S ile normalize edildi. Kontrol değerleri 100 alındı. (*) p < .05 düzeyinde kontrol grubundan anlamlı olarak farklılık gösteren örneklerdir. (a) p < .05 düzeyinde hasta grubundan anlamlı olarak farklılık gösteren örneklerdir.



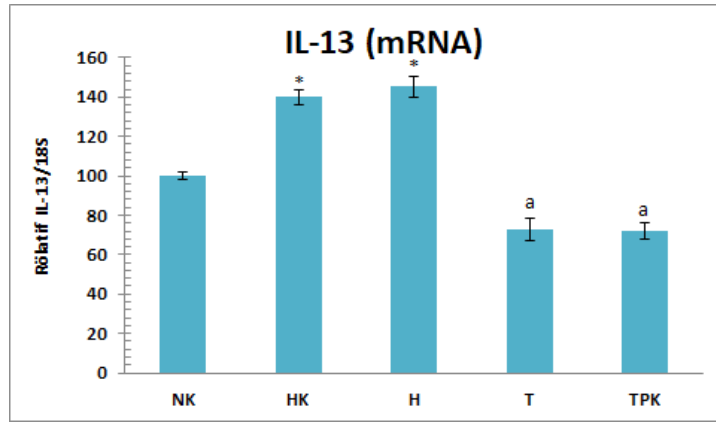
Şekil 41. MC marmelatının ÜK oluşturulan sıçan kolon dokularında IL-4 mRNA seviyesine etkisi. Sonuçlar 18S ile normalize edildi. Kontrol değerleri 100 alındı. (*) $p < .05$ düzeyinde kontrol grubundan anlamlı olarak farklılık gösteren örneklerdir. (a) $p < .05$ düzeyinde hasta grubundan anlamlı olarak farklılık gösteren örneklerdir.



Şekil 42. MC marmelatının ÜK oluşturulan sıçan kolon dokularında IL-5 mRNA seviyesine etkisi. Sonuçlar 18S ile normalize edildi. Kontrol değerleri 100 alındı. (*) $p < .05$ düzeyinde kontrol grubundan anlamlı olarak farklılık gösteren örneklerdir. (a) $p < .05$ düzeyinde hasta grubundan anlamlı olarak farklılık gösteren örneklerdir.



Şekil 43. MC marmelatının ÜK oluşturulan sıçan kolon dokularında IL-6 mRNA seviyesine etkisi. Sonuçlar 18S ile normalize edildi. Kontrol değerleri 100 alındı. (*) p < .05 düzeyinde kontrol grubundan anlamlı olarak farklılık gösteren örneklerdir. (a) p < .05 düzeyinde hasta grubundan anlamlı olarak farklılık gösteren örneklerdir.



Şekil 44. MC marmelatının ÜK oluşturulan sıçan kolon dokularında IL-13 mRNA seviyesine etkisi. Sonuçlar 18S ile normalize edildi. Kontrol değerleri 100 alındı. (*) p < .05 düzeyinde kontrol grubundan anlamlı olarak farklılık gösteren örneklerdir. (a) p < .05 düzeyinde hasta grubundan anlamlı olarak farklılık gösteren örneklerdir.

mRNA ekspresyon çalışmalarından elde edilen sonuçlar aşağıdaki Tablo 9'da toplu halde verilmektedir.

Tablo 9. mRNA ekspresyon analizleri sonucu elde edilen değerler

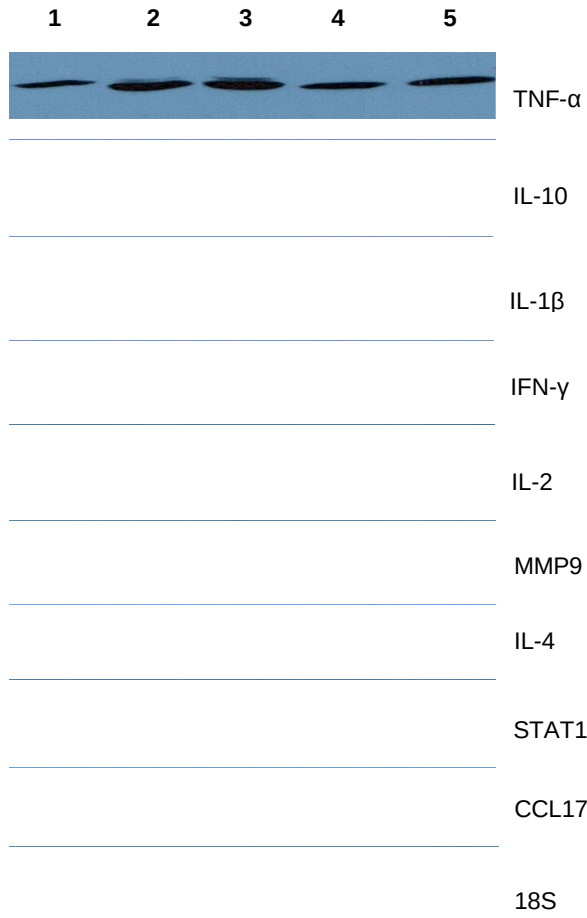
Enzim	NK (Ort ± SS)	HK (Ort ± SS)	H (Ort ± SS)	Normal Kontrolle Göre Değişim (Hastada)	T (Ort ± SS)	TPK (Ort ± SS)	Hastaya Göre Değişim (Tedavide)
IFN- γ	100 ± 3	150,79 ± 4	150,89 ± 6	2,27x ↑	56,37 ± 5	56,13 ± 2	1,77x ↓
CARD15	100 ± 4	124,81 ± 4	124,62 ± 5	1,55x ↑	87,80 ± 2	81,76 ± 3	1,14x ↓

GATA3	100 ± 6	148,81 ± 9	149,97 ± 6	2,23x ↑	78,78 ± 8	66,24 ± 4	1,27x ↓
CCL17	100 ± 6	220,23 ± 4	223,05 ± 5	4,91x ↑	63,04 ± 4	59,93 ± 7	1,58x ↓
MMP9	100 ± 3	169,73 ± 1	172,23 ± 4	2,92x ↑	61,81 ± 2	61,28 ± 2	1,65x ↓
TNFα	100 ± 5	136,54 ± 6	141,27 ± 4	1,92x ↑	63,84 ± 7	65,10 ± 5	1,57x ↓
TIMP1	100 ± 3	156,34 ± 5	155,22 ± 4	2,43x ↑	61,81 ± 7	61,28 ± 2	1,61x ↓
STAT1	100 ± 2	157,43 ± 5	158,22 ± 4	2,49x ↑	77,00 ± 3	67,00 ± 6	1,30x ↓
STAT3	100 ± 4	142,39 ± 3	143,03 ± 5	2,03x ↑	76,58 ± 5	72,87 ± 3	1,30x ↓
JAK2	100 ± 3	121,97 ± 5	121,16 ± 5	1,48x ↑	75,46 ± 5	73,74 ± 3	1,32x ↓
NF-kB1	100 ± 3	134,34 ± 2	138,48 ± 5	1,86x ↑	65,55 ± 4	53,44 ± 7	1,52x ↓
IL-1β	100 ± 5	178,17 ± 8	183,24 ± 5	3,26x ↑	62,64 ± 7	56,46 ± 3	1,60x ↓
IL-2	100 ± 2	171,93 ± 4	172,32 ± 3	2,96x ↑	83,72 ± 3	75,55 ± 5	1,20x ↓
IL-4	100 ± 7	157,08 ± 8	158,11 ± 3	2,48x ↑	65,53 ± 5	66,55 ± 6	1,53x ↓
IL-5	100 ± 2	142,67 ± 4	147,43 ± 3	2,10x ↑	64,24 ± 3	64,99 ± 5	1,56x ↓
IL-6	100 ± 2	151,34 ± 5	157,58 ± 4	2,38x ↑	75,16 ± 3	77,17 ± 6	1,33x ↓
IL-10	100 ± 6	160,07 ± 4	160,81 ± 8	2,57x ↑	87,74 ± 7	80,98 ± 5	1,14x ↓
IL-13	100 ± 2	139,86 ± 4	145,16 ± 5	2,03x ↑	72,74 ± 6	72,14 ± 4	1,37x ↓
IL-23R	100 ± 3	152,41 ± 5	154,60 ± 6	2,35x ↑	88,55 ± 3	92,46 ± 4	1,13x ↓

NK: Normal Kontrol; HK: Hasta Kontrol; H: Hasta; T: Tedavi; TPK: Tedavi Pozitif Kontrol

3.5.2. Protein Düzeyinde Ekspresyonlarının Tayin Edilmesi

Proje süreci devam ederken döviz kurunda meydana gelen aşırı yükselme ve proje bütçesine ait olanaklarının kısıtlı olmasından dolayı proje önerisinde teklif edilen antikörlerin tamamı temin edilememiştir. Bu bağlamda, transkript düzeyinde anlamlı değişiklik gösteren genlerden bazıları (en çok artış gösteren) protein düzeyinde Western blot tekniği uygulanarak analiz edilebildi. Bu genler seçilirken önemli düzeyde indüklenme/değişim gösteren genler çalışıldı. Tüm örneklerin görüntü analizleri Scion Image (Versiyon Beta, 4.0.2) yazılımı kullanılarak gerçekleştirildi. İç standart olarak 18S geni kullanıldı. Sonuçlar Tablo 10 ve Şekil 45'te toplu halde verilmektedir.



Şekil 45. Western blot görüntüleri (Kuyu 1: NK, kuyu 2: HK, kuyu 3: H, kuyu 4: T, kuyu 5: TPK)

Tablo 10. Blotların görüntü analizleri sonucu elde edilen değerler

Enzim	NK (Ort ± SS)	HK (Ort ± SS)	H (Ort ± SS)	Normal Kontrolle Göre Değişim (Hastada)	T (Ort ± SS)	TPK (Ort ± SS)	Hastaya Göre Değişim (Tedavide)
IFN- γ	100 ± 7	201,03 ± 9	197,97 ± 8	1,98x ↑	103,43 ± 5	97,30 ± 6	1,91x ↓
CCL17	100 ± 8	555,08 ± 11	549,15 ± 9	5,50x ↑	170,21 ± 6	117,42 ± 7	3,22x ↓
MMP9	100 ± 6	256,90 ± 10	305,51 ± 6	3,06x ↑	186,25 ± 4	143,70 ± 9	1,64x ↓
TNF α	100 ± 4	143,58 ± 9	146,00 ± 8	1,46x ↑	111,11 ± 7	107,30 ± 8	1,31x ↓
STAT1	100 ± 8	216,00 ± 5	208,24 ± 6	2,08x ↑	135,43 ± 3	122,70 ± 8	1,53x ↓
IL-1 β	100 ± 4	282,07 ± 8	316,50 ± 13	3,16x ↑	113,60 ± 7	158,92 ± 4	2,78x ↓
IL-2	100 ± 6	250,42 ± 4	248,69 ± 7	2,49x ↑	155,60 ± 8	157,90 ± 9	1,60x ↓
IL-4	100 ± 8	220,83 ± 8	204,86 ± 10	2,05x ↑	117,66 ± 5	103,27 ± 7	1,74x ↓
IL-10	100 ± 5	227,10 ± 10	240,90 ± 5	2,40x ↑	92,11 ± 7	120,70 ± 8	2,62x ↓

*Sadece resmedilen değil tüm örneklerin ortalama değerleridir.

4. TARTIŞMA

Ülseratif kolit (ÜK)'in patogeneğinde giriş bölümünde de anlatıldığı gibi genetik, çevresel ve özellikle immünolojik faktörlerin önemli rolü olduğu düşünülmektedir. Bu nedenle immüno-inflamatuar yolları hedefleyen ilaçlar son 15 yıldan beri ÜK tedavisinde kullanılmaktadır. Bu amaçla birçok yeni ilaç geliştirilmiş olmakla birlikte, halen günümüzde ÜK tedavisinde en çok kullanılan ilaçlar aminosalisilatlar ve kortikosteroidlerdir. Bununla birlikte, hastalığın tedavisinde bitkilere dayalı alternatif tedaviler de halk arasında fazlaca kullanılmaktadır. Ülseratif kolit modelinin deneysel olarak sıçanlarda kolayca oluşturulabilmesi, bu hastalığın tedavisinde değişik ajanların araştırılmasına olanak sağlamıştır. Ülkemizde, *Momordica charantia* (MC) bitkisi bu hastalığın tedavisinde ve yan etkilerinin azaltılması için çok fazla kullanılmaktadır. Bu çalışmada halk arasında sıklıkla kullanılan ve bu hastalığın tedavisi için umut vaat edebilecek MC'nın TNBS (Trinitrobenzen sülfonik asit) uyarımlı ÜK modelinde terapötik etkisinin moleküler mekanizmaları çalışıldı. TNBS uyarımlı kolit modelinin çalışmalardaki en faydalı yönleri, gelişen inflamasyonun İBH'daki inflamasyona benzerliği, sitokin sekresyonuna neden olması ve immünoterapiye uygun olmasıdır (Neurath vd., 1996; McCafferty vd., 1999; Stallmach vd., 1999; Altıok, 2009).

ÜK'in en belirgin belirtileri kanlı ishal ve kramp tarzında karın ağrılarıdır. Orta düzey ÜK hastalarında kanamalar artar ve ateş, halsizlik, iştahsızlık gibi sistemik belirtiler ortaya çıkarken, ciddi ÜK hastalarında ise kanlı-mukuslu ishaller ve beden ağırlığının %10'undan daha fazla kilo kaybı da tabloya ilave olur (Bliss ve Sawchuk, 1999). TNBS uyarımlı kolit modelinde, insan ÜK'ine benzer olarak vücut ağırlığında değişimler ve kilo kayıpları meydana geldiği bilinmektedir (Karaboga, 2015). Yaptığımız çalışmada da literatüre uygun olarak TNBS uyarımlı deneysel kolit (hasta) grubunda kontrol grubuna kıyasla vücut ağırlık ortalamalarında anlamlı bir azalmanın olduğu gözlenmiştir.

MC zeytinyağlı marmelatının serum transaminazlar (AST ve ALT) ve LDH üzerine etkileri Tablo 7 ve Tablo 8'de verilmiştir. Kontrol ve hasta grubu hayvanların ortalama transaminaz (ALT ve AST) ve LDH değerleri arasında önemli farklılıklar gözlendi. Transaminaz enzim düzeyindeki düşüşler genellikle önemsizdir. Bu enzimlerin düzeylerinde bir artış gözlenmemiş olması (tedavi grubunda) bu enzimlerin yaygın olarak buldukları özellikle eritrosit, kalp kası, karaciğer ve akciğer gibi dokularda herhangi bir doku harabiyeti olmadığı anlamına gelmektedir. Özellikle akut hepatik hasar göstergesi olan ALT'de artış meydana gelmemiş olması nedeni ile (tedavi grubunda) kullanılan MC dozunun akut ya da kronik toksisite oluşturmadığını göstermektedir.

Çalışmamızda H&E boyanmış kontrol grubu kolon dokularının normal histolojik yapıya sahip oldukları gözlenirken (Şekil 21), kolit (hasta) ve kolit kontrol (hasta kontrol) grubunda yaygın inflamasyon alanlarının bulunması ve kripta yapılarının özelliklerini kaybetmesi gibi histopatolojik değişiklikler farklı araştırmacılar tarafından yapılan çalışmalarda elde edilen mikroskopik bulgularla benzerlik göstermektedir (Yamamoto vd., 2000; Santiago vd., 2007; Okayasu, 2012; Luo vd., 2018). Çalışmamızda kolit ve kolit kontrol grupları ile kudret narı ekstraktı (ve prednisolon) uygulanan tedavi grubumuz karşılaştırıldığında inflamatuvar hücre infiltrasyon alanlarında bir azalma olduğu tespit edilmiştir (Şekil 22-25). İlhan vd. (2015), yapmış oldukları çalışmada *M. charantia*'nın anti-inflamatuvar etkisinin ratların ağız mukozasında oluşturulan yaraların iyileşmesinde hızlandırıcı bir etkiye sahip olabileceğini belirtmişlerdir. Ayrıca *M. charantia*'nın koruyucu etkisi üzerine yapılan araştırmalarda (Özbakış-Dengiz ve Gürsan, 2005; Raish vd., 2018) gastrik ülser oluşturulan ratlarda; mukozal hasarda, ülser alanında, ödem ve lökosit infiltrasyonunda azalma olduğu ve ortadan kalktığı ifade edilmiştir. Bu yönüyle yapılan çalışmalar bizim çalışmamızı desteklemektedir.

Bu çalışmada inflamasyon/sitokin/kemokin/apoptoz/T hücre aktivasyonu ile ilişkili genleri seçtik. Bunlar; IFN- γ , CARD15/NOD2, GATA3, CCL17, MMP9, TNF α , TIMP1, STAT1, STAT3, JAK2, NF-kB1, IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13 ve IL-23R'dir. 18S geni normalizasyon için seçilmiştir. İncelendiğinde bu genlerin Ük patogenezi ile bir şekilde ilgili olduğu görülmektedir. Bu genlerin proje ile ilgi ve önemini açmak ve yorumlamalar getirebilmek için, öncelikle kısa kısa teorik bilgiler ele alınarak yapılan değerlendirmeler aşağıda verilmiştir.

NF-kB, DNA transkripsiyonu, sitokin üretimi ve hücre canlılığını kontrol eden bir protein kompleksidir (Gilmore, 2006). Hemen hemen tüm hayvan hücre tiplerinde bulunur ve stres gibi birçok uyarılara karşı hücrel tepkileri düzenlemede görev almaktadır. NF-kB, immünite ve inflamasyon ile ilişkili çok sayıda genin transkripsiyonunun regüle edilmesinde kritik rol oynayan bir nükleer transkripsiyon faktörüdür (Blackwell ve Christman, 1997). Literatürde İBH patogeneziinde NF-kB'nin önemini vurgulayan deneysel çalışmalar mevcuttur ve giderek te artmaktadır (Schreiber vd., 1998; Garcia-Mediavilla vd., 2007). Bu çalışmamızda NF-kB ÜK modelinde yaklaşık 1,86x artış göstermiştir (Şekil 34).

Hücrel bağışıklık yanıtları, sitokinler olarak adlandırılan protein ve glikoprotein yapısındaki maddeler tarafından düzenlenir. Sitokinler; inflamasyonun başlaması, düzenlenmesi ve immün yanıt oluşturulmasında önemli moleküllerdir. Normal kolon homeostazisi için kolonik mukozada anti-inflamatuvar ve pro-inflamatuvar sitokinlerin dengede olması gerekmektedir. ÜK'de meydana gelen immün hiperaktivasyonla bu denge Th1 lehine

bozular (Williams vd., 1990). İnflamatuvar yanıtta Th1 hücreleri abartılı olarak artar, pro-inflamatuvar sitokinleri (IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, IL-12, TNF- α , IFN- γ) salgımlarken, Th2 hücreleri anti-inflamatuvar sitokinleri (IL-4, IL-10, IL-11, IL-13) salgılar (Demir, 2011). ÜK'te IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 gibi Th2 tipi sitokinler Th1 tipi sitokinlerden daha fazla salgılanarak B lenfositlerin aşırı miktarda IgG salgılamasını sağlarlar (Itoh ve Strong, 2001; Özkan, 2003). Mullin vd. (1993), ÜK'li vakalarda Th2 lenfositleri tarafından salınan IL-4 ve IL-10 tip sitokinlerin doku konsantrasyonlarının yüksek olduğunu belirtmiştir (Oktar ve Alican, 2000). Aktif makrofajlar tarafından salınan IL-1 ve IL-6 gibi sitokinlerin ÜK ve deneysel kolit modellerinde inflamasyonlu dokuda miktarca arttığı da bilinmektedir (Hyams vd., 1993; Youngman vd., 1993; Oktar ve Alican, 2000). Funakoshi vd. (1998), yaptıkları çalışmada; kontrol grubuyla karşılaştırıldığında, ÜK'li hastalarda IL-1 β , IL-6 ve TNF α ekspresyonlarının artışı göstermişlerdir (Funakoshi vd., 1998). Benzer bir şekilde diğer çalışmalarda da TNF- α , IL-1 β ve IL-6 gibi pro-inflamatuvar sitokinlerin seviyelerinin İBH'da yükseldiği ve inflamasyonun şiddeti ile bu sitokinlerin seviyelerinin doğru orantılı olduğu gösterilmiştir (Strober ve Fuss, 2011; Yang vd., 2014). Th1 yanıtı hücresel immünite ile ilişkili olarak IL-2, IFN- γ ve TNF α sentezini artırır. Hümorale immünitede ise Th2 uyarısıyla IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 ve IL-13 salgılanır. Simpson vd. (1998), çalışmalarında Th1 lenfositleri tarafından salgılanan IFN- γ gibi sitokinlerin kolit patogenezinde yer aldığını göstermişlerdir. Literatürde yer alan sonuçlara paralel olarak, çalışmamızda da, kolit (hasta) grubunda kolonik IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-10 ve IL-13 ekspresyon seviyeleri kontrol grubuna kıyasla yüksek bulunmuştur (Şekil 35-37, 41-43 ve 45).

GATA3, Th2 hücreleri tarafından ekspres edilen bir transkripsiyon faktörüdür (Gálvez, 2014). T lenfositler (Ting vd., 1996), adipoz doku (Tong vd., 2000), böbrek (Grote vd., 2006), sempatik sinir sistemini (Tsarovina vd., 2004) içeren pekçok doku ve hücre tipinde hücre proliferasyonu, gelişimi ve farklılaşmasında önemli rol oynar (Liu vd., 2012). IL-4 uyarılması GATA3 transkripsiyon faktörlerini aktive eder ve Th2 tipi hücreler gelişir. GATA3, Th2 farklılaşmasında kritik bir öneme sahiptir (Yoh vd., 2003). Ohtani vd. (2010), IL-4 ve onun sinyal molekülü GATA3'ün ÜK'in patogenezinde katıldığını göstermiştir. Bu çalışmamızda da, kolit (hasta) grubunda GATA3 geni anlamlı artış göstermiştir (Şekil 28).

TNF α geni, TNF süper ailesine ait olan çok fonksiyonlu bir pro-inflamatuvar sitokini kodlar. Bu sitokin özellikle makrofajlar tarafından salgılanır. Bu sitokin hücre çoğalması, farklılaşma, apoptoz ve lipid metabolizması dahil birçok biyolojik sürecin düzenlenmesinde yer alır. Konağın viral, bakteriyel ve parazitik enfeksiyonlara normal cevabında TNF α önemlidir, fakat yetersiz veya aşırı üretimi konak için zararlı olmaktadır (Bradley, 2008). Aşırı TNF α ekspresyonu epitelyal bariyere zarar vermekte, epitel hücrelerinde apoptozisi indüklemekte

ve kolonik epitelyal hücrelerden kemokinlerin salgılanmasına sebep olmaktadır (Yang vd., 2014). İBH'da dokuda TNF α ekspresyonu artmaktadır (Kıyıcı vd., 2006). Zhou vd. (2006), TNBS uyarımlı kolit modelinde kolonik TNF α ekspresyonunun arttığını göstermişlerdir. İBH'da doğal bağışıklık immün sistem hücreleri ile adaptif bağışıklık immün sistem hücrelerinin artan aktivasyonu TNF α , IL-1 β ve IL-23/Th17 yolağı sitokinlerinin artmasına sebep olur (Abraham ve Cho, 2009). Gelişim ve çoğalma aşamalarında spesifik sitokinler ve transkripsiyon faktörlerinin görev yaptığı Th17'nin stabilizasyonu, IL-23 ile sağlanır (Liu vd., 2009; Zenewicz vd., 2009). IL-23, aktifleşmiş makrofajlar ve dendritik hücrelerde eksprese edilmektedir (Iwakura ve Ishigame, 2006). IL-23, pro-inflamatuar sitokinlerin küçük bir ailesinin üyesidir (Oppmann vd., 2000) ve immün-aracılı inflamatuvar hastalıkların birçoğunun patogeneğinde hayati rol oynar (Langrish vd., 2005). IL-23, İBH'da majör pro-inflamatuar role sahiptir (Zenewicz vd., 2009). Yapılan birçok farklı çalışma ile, IL-23'ün İBH gelişimi için gerekli olduğu gösterilmiştir (Kullberg vd., 2006; Yen vd., 2006). ÜK hastalarında artmış IL-23 ekspresyonu Yu vd. (2013), tarafından gösterilmiştir. Zhang vd. (2009), oksazolun uyarımlı deneysel kolit modelinde, serum IL-23 seviyesinde artış tespit etmişlerdir. IL-23 eksikliğinde, TNF- α , IFN- γ ve IL-6 pro-inflamatuar sitokinlerin seviyesinde önemli düşüşler tespit edilmiştir (Kullberg vd., 2006; Yen vd., 2006; Zenewicz vd., 2009). Bu sonuca benzer olarak oluşturduğumuz TNBS uyarımlı deneysel kolit modelinde, artan IL-23 ekspresyonu ile beraber kolonik IFN- γ , IL-6 ve TNF- α ekspresyonunda da artışlar meydana gelmiştir (Şekil 26, 29, 38 ve 44).

JAK/STAT (janus kinaz/sinyal dönüştürücü ve transkripsiyon aktivatörü) sinyal yolu sitokinlerin biyolojik aktivitelerine aracılık eder ve bağışıklık tepkilerinin geliştirilmesi ve düzenlenmesinde önemlidir (O'Shea ve Plenge, 2012). JAK/STAT yolunun regülasyonu pekçok otoimmün hastalığa katkı sağlar (Benveniste vd., 2014). İBH'da STAT ailesi üyelerinin de ekspresyonunun ve aktivasyonunun arttığı gösterilmiştir (Nikolaus vd., 1998; Rogler vd., 1998; Schreiber vd., 1998). STAT proteinleri sitokin ve büyüme faktörü reseptörlerinin aktivasyonuna cevap olarak JAK tarafından fosforillenirler (Kühbacher vd., 2001). Literatürde ÜK'te STAT1'in ekspresyonunun ve aktivasyonunun arttığı görülmüştür (Schreiber vd., 1997). STAT3 aktivasyonu hayatta kalma, anjiyogenez, invazyon ve tümör gelişiminde etkilidir (Bekalp vd., 2014; Lesina vd., 2014). Bu çalışmamızda da, TNBS uyarımlı ÜK modelinde JAK2, STAT1 ve STAT3 gen ifade düzeylerinde anlamlı artışlar (1,48x, 2,49x ve 2,03x) kaydedilmiştir (Şekil 31-33).

MMP'ler; doku tamirinde, anjiyogenezde, apoptozda, tümör invazyonunda ve metastazda önemli rol oynarlar (Rahman vd., 2006). Matriks metalloproteinazların aktivitelerinde meydana gelen kontrolsüz artışların ekstrasellüler matriks yıkımı yoluyla akut

ve kronik hastalıkların patogenezinde rol oynadığı düşünülmektedir. *In vivo* koşullarda, MMP aktivasyonunun regülasyonunda TIMP'ler önemli rol oynarlar. MMP ve onların doku inhibitörleri TIMP arasındaki dengenin bozulması invazyonun oluşumunda önemlidir. TIMP-1'in MMP inhibisyonu dışında anti-apoptotik etkisi gibi tümör oluşumunu artırıcı etkisi olduğu gösterilmiştir (Fowlkes vd., 2004). TIMP-1'in kolorektal kanserde arttığını gösteren çalışmalar da mevcuttur (Moller Sorensen vd., 2008). Bizim çalışmamızda da, MMP9 ve TIMP1 için TNBS uyarımlı ÜK modelinde anlamlı artışlar (2,92x ve 2,43x) tespit edilmiştir (Şekil 30 ve 40).

ÜK'li vakaların intestinal dokularında bazı kemokinlerin anlamlı artışı tespit edilmiştir (Heiseke vd., 2012). CCL17, bir CC kemokindir ve timusta ekspres edilir (Ritter vd., 2005). CCL17, stres, yaralanma veya inflamasyonda upregülasyon gösterirken (Homey vd., 2007), ÜK ve CH gibi İBH'larını içeren otoimmün rahatsızlıklarda da overekspresyonu görülmektedir (Kristensen vd., 2006). İnsanda CCL17'nin IFN- γ ve TNF α uyarımı ile indüklendiği gösterilmiştir (Komine vd., 2005). CCL17, proje çalışmamızda en fazla artış gösteren (4,91x) gen olmuştur (Şekil 39).

İBH ile ilgili olduğu tespit edilen kromozom 16'nın perisentromerik bölgesindeki NOD2/CARD15 immünite ile ilgili polimorfik bir gendir (Hanauer, 2006). Bu gen, konakçının adaptif immün yanıtının kontrolünden sorumlu bir proteini kodlamaktadır (Cario, 2005). Ayrıca IL-1, IL-17 ve IL-23 ekseninde yer alan antibakteriyel özellikli Th17 hücrelerinin yapımında da önemli rol oynamaktadır (Tsianos vd., 2011). NOD2 gen mutasyonu komensal mikrofloraya karşı tolerans gelişimini engeller, inflamatuvar sitokinleri artırır ve kronik intrasellüler enfeksiyona neden olur (Cuthbert vd., 2002). CARD15/NOD2 gen mutasyonunun CH ve ÜK ile bağlantılı olduğu tespit edilmiştir (Hugot vd., 2001b; Ogura, vd., 2001b). Yapılan bu çalışmada da, kolon CARD15/NOD2 ekspresyonu incelendiğinde; kolit (hasta) grubu CARD15/NOD2 ekspresyon seviyesi kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak yüksek bulunmuştur (Şekil 27).

Sonuç olarak, yapılan çalışmalar ile IFN- γ , CARD15/NOD2, GATA3, CCL17, MMP9, TNF α , TIMP1, STAT1, STAT3, JAK2, NF-kB1, IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13 ve IL-23R genleri projenin tedavi protokollerinde takip edilen genler olarak seçilmiştir. Bu genlerin tasarlanan primerler ile mRNA ekspresyon düzeylerine bakıldı. MC zeytinyağlı marmelatı uygulaması ile seçilen hedef genlerin ifade düzeylerinde TNBS uyarımlı deneysel kolit oluşturulmuş hasta hayvanlara göre değişimlerini dikkatle incelediğimizde önemli değişimler olduğu görülmektedir. MC uygulaması çalışılan genlerin tamamında, gen ifade düzeylerinde hastalığın oluşturduğu etkiler hemen hemen kontrol, yani hasta olmayan hayvan değerlerine

yaklaşacak şekilde değiştirilmiştir. Ayrıca bu genlerin bazılarını protein düzeyinde de (Western blotting) analizini gerçekleştirdik. Yapılan çalışmada mRNA ile protein ekspresyon düzeyleri arasında (artış/azalma düzeyleri) önemli paralellik bulunmuştur. Yapılan rutin histolojik boyamalar ve immünokimyasal çalışmalarla elde edilen veriler, gen ifade düzeyinde elde ettiğimiz sonuçları destekler niteliktedir. Bu veriler ışığında çalıştığımız genlerin ÜK patofizyolojisi ile bir şekilde ilişkili olduğu görülmektedir.

Literatürü detaylı olarak incelediğimizde, MC'nın ÜK hastalığının patogenezinde rol alan genler üzerine etkisi ile ilgili çalışmaya rastlanmamıştır, ancak MC'nın deri hastalıklarında, yaralarda, egzamada, uyuzda, romatizmada, sıtmada, adet problemlerinde, şeker hastalığında, tümörlerde, ateşli durumlarda ve bağırsak kurtlarına karşı terapötik (tedavi) amaçlı kullanıldığı görülmektedir (Gurbuz vd., 2000; Scartezini ve Speroni, 2000; Beloin vd., 2005; Taylor, 2005; Ullah vd., 2011; Akay ve Kararslan, 2012). Çalışmamızda TNBS uyarımlı deneysel kolit oluşturulmuş hayvanlarda MC uygulamasının incelenen genlerde baskılama etkisi göstermiş olması bu bitkinin terapötik önemini vurgulamaktadır.

Gerçekleştirilen deneyler ve elde edilen bulgular, uygun dozlarda kullanıldığında kudret narının (*Momordica charantia*) ÜK için kullanılabilir çok önemli bir alternatif bitkisel tedavi etmeni veya alternatif koruyucu ve/veya destek etmeni olduğunu göstermektedir. Ancak bireysel doz ayarlaması yapılmasının şart olduğu da unutulmamalıdır.

5. SONUÇ

Günümüzde alternatif tedavi ürünlerine gösterilen ilgi her geçen gün artmakla, hem halk sağlığı açısından önem oluşturmakta ve hem de çok büyük bir ekonomik değer olarak ortaya çıkmaktadır. Özellikle ülkemizde bitkilerden çeşitli yollarla elde edilen ekstraktlar genel olarak iyileşmeyi sağlamak veya koruyucu amaçlar için gittikçe artan bir popülerite ile kullanılmaktadır. Ancak halk arasındaki bu preparatların doğal ve zararsız olduğu inancının aksine bu preparatların eş zamanlı olarak gıdalar, çevreden alınan kimyasallar veya diğer tıbbi ilaçlar ile etkileşerek hayati tehlike arz eden zararlar oluşturmalarıdır. Bu nedenle, alternatif tedaviler için halk arasında kullanılan bitkisel preparatların detaylı bir şekilde çalışılarak yararlı ve zararlı etkilerinin tanımlanması önem arz etmektedir. Günümüzde kullanılan tedavi yöntemlerinin yetersiz kalması ve yan etkiler göstermesi pek çok araştırmacıyı yeni çalışmalar konusunda da teşvik etmektedir.

Projemiz kapsamında yaptığımız çalışmalar göstermiştir ki; TNBS ile indüklenen deneysel kolit modelinde tedavi amaçlı olarak kullanılan *Momordica charantia* (kudret narı) zeytinyağlı marmelatı hastalıkla ilişkilendirilen genlerin mRNA ekspresyonları, histolojik analizleri ve protein seviyelerindeki değişimleri gruplar arasında karşılaştırıldığında elde edilen sonuçlar bu bitkinin Ülseratif kolit hastalığında iyileştirici etkisinin bulunduğunu göstermektedir. Tüm bu sonuçlar *Momordica charantia* (kudret narı) bitkisinin Ülseratif kolit hastalığı için hem düşük maliyetli hem de yan etkilerinin olmaması ve aynı zamanda kolay

ulaşılabilirliği ve kolay kullanılabilirliği göz önüne alındığında önemli bir alternatif tedavi etmeni veya alternatif koruyucu olduğunu desteklemektedir.

6. KAYNAKLAR

Abbas, A. K., Lithman, A. H., Pober, J. S. 2000. Page 343-467. "Immunity to Microbes. In: Cellular and Molecular Immunology 4th ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company.

Abraham, C., Cho, J. H. 2009. "Inflammatory bowel disease", The New England Journal of Medicine, 361(21), 2066-2078.

Akay, A., Kararslan, E. 2012. "Mikoriza aşılanmış kudret narı (*Momordica charantia*) bitkisine farklı dozlarda fosforlu ve demirli gübre uygulamasının yaprak klorofil içeriğine etkisi", Iğdır Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 2(3), 103-108.

Akıncioğlu, P. 2014. "Serum hepsidin seviyesinin inflamatuvar barsak hastalıklarında incelenmesi ve hastalık aktivasyonu açısından fekal kalprotektin ile karşılaştırılması", Başkent Üniversitesi, Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Hematoloji Bilim Dalı, Uzmanlık Tezi, Ankara.

Ali, M. S., Sayeed, M. A., Reza, M. S., Yesmeen, S., Khan, A. M. 2008. "Characteristic of seed oils and nutritional composition of seeds from different varieties of *Momordica charantia* Linn. cultivated in Bangladesh", Czech Journal of Food Sciences, 26, 275-283.

Altıok, M. 2009. "Trinitrobenzensülfonik asit ile oluşturulan deneysel kolit modelinde progesteronun etkileri". Sağlık Bakanlığı Okmeydanı Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Genel Cerrahi Uzmanlık Tezi, İstanbul.

Andres, P. G., Friedman, L. S. 1999. "Epidemiology and the natural course of inflammatory bowel disease", *Gastroenterology Clinics of North America*, 28(2), 255-281.

Aslan, A. T., Doğru, D., Özçelik, U. 2004. "Akut respiratuar distres sendromu", *Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi*, 47, 209-221.

Aşık, M., Bayraktar, Y. 1998. "İnflamatuvar bağırsak hastalığında patogenez ve tedavide yenilikler. *Güncel Gastroenteroloji*, 2, 156-162.

Bailey, C. J., Hembry, R. M., Alexander, A., Irving, M. H., Grant, M. E., Shuttleworth, C. A. 1994. "Distribution of the matrix metalloproteinases stromelysin, gelatinases A and B, and collagenase in Crohn's disease and normal intestine", *Journal of Clinical Pathology*, 47, 113-116.

Baugh, M. D., Perry, M. J., Hollander, A. P., Davies, D. R., Cross, S. S., Lobo, A. J., Taylor, C. J., Evans, G. S. 1999. "Matrix metalloproteinase levels are elevated in inflammatory bowel disease", *Gastroenterology*, 117, 814-822.

Bekalp, I., Arslan-Mamur, B., Derici-Yildirim, D., Tamer, L., Çolak, T., Aras, N. 2014. "İnterlökin-6 ve interlökin-18 gen polimorfizmlerinin ve plazma düzeylerinin kolorektal kanser ile ilişkisi", *Mersin Üniversitesi Sağlık Bilim Dergisi*, 7(2), 35-46.

Beloin, N., Gbeassor, M., Akpagana, K., Hudson, J., de Soussa, K., Koumaglo, K., Arnason, J. T. 2005. "Ethnomedicinal uses of *Momordica charantia* (Cucurbitaceae) in Togo and relation to its phytochemistry and biological activity", *Journal of Ethnopharmacology*, 96, 49-55.

Benveniste, E. N., Liu, Y., McFarland, B. C., Qin, H. 2014. "Involvement of the janus kinase/signal transducer and activator of transcription signaling pathway in multiple sclerosis and the animal model of experimental autoimmune encephalomyelitis", *Journal of Interferon & Cytokine Research*, 34, 577-588.

Bidwell, J., Keen, L., Gallagher, G. 1999. "Cytokine gene polymorphism in human disease", *Genes and Immunity*, 1(1), 3-19.

Blackwell, T. S., Christman, J. W. 1997. "The role of nuclear factor kappa B in cytokine gene regulation" *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 17, 3-9.

Bliss, D. Z., Sawchuk, L. 1999. Page 1136-1190. Nursing management: Lower gastrointestinal problems. Editors: Lewis, S. M., Heitkemper, M. M., Dirksen, S. R. Medical-Surgical Nursing, 5th ed. Mosby, St. Louis.

Bokoch, G. M. 1995. "Chemoattractant signalling and leukocyte activation", *Blood*, 86,1649-1660.

Both, H.,Torp-Pedersen, K., Kreiner, S., Hendriksen, C., Binder, V. 1983. "Clinical appearance at diagnosis ulcerative colitis and Chron's disease in regional patient group", *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 18(7), 987-991.

Bradley, J. 2008. "TNF-mediated inflammatory disease", *The Journal of Pathology*, 214(2), 149-60.

Breese, E. J., Michie, C. A., Nicholls, S. W., Murch, S. H., Williams, C. B., Domizio, P., Walker-Smith, J. A., MacDonald, T. T. 1994. "Tumor necrosis factor alpha-producing cells in the intestinal mucosa of children with inflammatory bowel disease", *Gastroenterology*, 106, 1455-1466.

Brennan, F. M., McInnes, I. B. 2008. "Evidence that cytokines play a role in rheumatoid arthritis", *The Journal of Clinical Investigation*", 118, 3537-3545.

Brummer, O., Bohmer, G., Hollwitz, B., Flemming, P., Petry, K. U. 2002. "MMP-1 and MMP-2 in the cervix uteri in different steps of malignant transformation-an immunohistochemical study" *Gynecologic Oncology*, 84(2), 222-227.

Büning, C. B., Genschel, J., Bühner, S., Krüger, S., Kling, K., Dignass, A., Baier, P., Bochow, B., Ockenga, J., Schmidt, H. H. J., Lochs, H. 2004. "Mutations in the NOD2/CARD15 gene in Crohn's disease are associated with ileocecal resection and are a risk factor for reoperation", *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, 19, 1073-1078.

Calapoğlu, N. Ş., Calapoğlu, M. 2009. "Alzheimer hastalığında kemokin ve kemokin reseptörlerin rolü", *Süleyman Demirel Üniversitesi, Tıp Fakültesi Dergisi*, 16(4), 39-44.

Cario, E. 2005. "Bacterial interactions with cells of the intestinal mucosa: Toll-like receptors and NOD2", *Gut*, 54, 1182-1193.

Chapman, R. W., Selby, W. S., Jewell, D. P. 1986. "Controlled trial of intravenous metronidazole as an adjunct to corticosteroids in severe ulcerative colitis", *Gut*, 27(10), 1210-1212.

Collins, P., Rhodes, J. 2006. "Ulcerative colitis: diagnosis and management", *British Medical Journal*, 333, 340-343.

Cuthbert, A. P., Fisher, S. A., Mirza, M. M. 2002. "The contribution of NOD2 gene mutations to the risk and site of disease in inflammatory bowel disease", *Gastroenterology*, 122, 867-874.

Çağlar, M., Kansu, E. 2004. "Kemokinler, kemokin reseptörleri ve inflamasyon", *Ankem Dergisi* 18(2), 164-168.

Darnell, J. E. 1996. "The Jak-STAT pathway: summary of initial studies and recent advances", *Recent Progress in Hormone Research*, 51, 391-403.

Demir, C. 2011. "Sistemik sklerozlu hastalarda interlökin-17 ve interlökin-23 seviyeleri ile hastalık aktivitesi, sistemik organ tutulumu ilişkisi", Ankara Üniversitesi, Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Uzmanlık Tezi, Ankara.

Eaden, J., Abrams, K., Ekbom, A., Jackson, E., Mayberry, J. 2000. "Colorectal cancer prevention in ulcerative colitis: a case-control study", *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, 14(2), 145-153.

El-Bassat, H., AboAli, L., El Yamany, S., Al Shenawy, H., Al Din, R. A., Taha, A. 2014. "Interleukin 23 P 19 gene expressions in patients with ulcerative colitis and its relation to disease severity", *Journal of Disease Markers*, 1(1), 1-5.

Elmas, D. 2012. "İnflamatuar bağırsak hastalarında matriks metalloproteinaz-3, matriks metalloproteinaz-9 ve metalloproteinaz-1 doku inhibitörünün spondiloartropati gelişiminde rolü", Ankara Üniversitesi, Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Uzmanlık Tezi, Ankara.

Ey, P. L., Ashman, L. K. 1986. "The use of alkaline phosphatase-conjugated anti-immunoglobulin and immunoblots for determining the specificity of monoclonal antibodies to protein mixtures", *Methods in Enzymology*, 121, 497-509.

Farmer, R. G. 1994. Page 1338-1342. Inflammatory bowel disease, clinical features. Editors: Berk, J. E., Haubrich, W. S., Kalser, M. H., Roth, J. L. A., Schaffner, F. In: *Bockus gastroenterology*. Vol 2. 5th ed. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers.

Fazio, V. W., Church, J. M., Delaney, C. P. 2006. Page 257-261. "Current Therapy in Colon and Rectal Surgery, Türkçe Çevirisi", İstanbul.

Fernández-Bañares, F., Hinojosa, J., Sánchez-Lombraña, J. L., Navarro, E., Martínez-Salmerón, J. F., García-Pugés, A., González-Huix, F., Riera, J., González-Lara, V., Domínguez-Abascal, F., Giné, J. J., Moles, J., Gomollón, F., Gassull, M. A. 1999. "Randomized clinical trial of *Plantago ovata* seeds (dietary fiber) as compared with mesalamine in maintaining remission in ulcerative colitis. Spanish group for the study of Crohn's disease and ulcerative colitis (GETECCU)", *The American Journal of Gastroenterology*, 94(2), 427-433.

Fowlkes, J. L., Serra, D. M., Bunn, R. C., Thrailkill, K. M., Enghild, J. J., Nagase, H. 2004. "Regulation of insulin-like growth factor (IGF)-I action by matrix metalloproteinase-3 involves selective disruption of IGF-I/IGF-binding protein-3 complexes", *Endocrinology*, 145(2), 620-626.

Funakashi, K., Sugimura, K., Anezaki, K., Bannai, H., Ishizuka, K., Asakura, H. 1998. "Spectrum of cytokines gene expression in intestinal mucosal lesions of Crohn's disease and ulcerative colitis", *Digestion*, 59(1), 73-78.

Furrie, E., Macfarlane, S., Cummings, J. H., Macfarlane, G. T. 2004. "Systemic antibodies towards mucosal bacteria in ulcerative colitis and Crohn's disease differentially activate the innate immune response", *Gut*, 53(1), 91-98.

Gálvez, J. 2014. "Role of Th17 cells in the pathogenesis of human IBD", *ISRN Inflammation*, 928461.

García-Mediavilla, V., Crespo, I., Collado, P. S., Esteller, A., Sánchez-Campos, S., Tuñón, M. J., González-Gallego, J. 2007. "The anti-inflammatory flavones quercetin and kaempferol cause inhibition of inducible nitric oxide synthase, cyclooxygenase-2 and reactive C-protein, and down-regulation of the nuclear factor kappa B pathway in Chang Liver cells", *European Journal of Pharmacology*, 557, 221-229

Gilat, T., Grossman, A., Fireman, Z., Rozen, P. 1986. Page 84-88. "Inflammatory bowel disease in jews". Editors: McConnell, R., Rozen, R., Langman, M., Gilat, T. *The genetics and epidemiology of inflammatory bowel disease*. New York: Karger.

Gilmore, T. D. 2006. "Introduction of NF-kappaB: players, pathways, perspectives", *Oncogene*, 25, 6680-6684.

Gomez, D. E., Alonso, D. F., Yoshiji, H., Thorgeirsson, U. P. 1997. "Tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation and biological functions", *European Journal of Cell Biology*, 74(2), 111-122.

Grote, D., Souabni, A., Busslinger, M., Bouchard, M. 2006. "Pax 2/8-regulated Gata 3 expression is necessary for morphogenesis and guidance of the nephric duct in the developing kidney", *Development*,133, 53-61.

Gurbuz, I., Akyuz, C., Yesilada, E., Bilge, S. 2000. "Anti-ulcerogenic effect of *Momordica charantia* L. fruits on various ulcer models in rats", *Journal of Ethnopharmacology*, 71, 77-82.

Gümüştekin, Ç. 2009. "Aterosiklerozis'e proteomik yaklaşımlar", Ankara Üniversitesi, Biyoteknoloji Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi.

Hanauer, S. B. 2006. "Inflammatory bowel disease: epidemiology, pathogenesis and therapeutic opportunities", *Inflammatory Bowel Diseases*, 12(1), 3-9.

Hawthorne, A. B. 2003. "Ciclosporin and refractory colitis", *European Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 15(3), 239-244.

Heiseke, A. F., Faul, A. C., Lehr, H. A., Förster, I., Schmid, R. M., Krug, A. B., Reindl, W. 2012. "CCL17 promotes intestinal inflammation in mice and counteracts regulatory T cell-mediated protection from colitis", *Gastroenterology*,142(2), 335-345.

Homey, B., Meller, S., Savinko, T., Alenius, H., Lauerma, A. 2007. "Modulation of chemokines by staphylococcal superantigen in atopic dermatitis", *Chemical Immunology and Allergy*, 93(1), 181-194.

Hugot, J. P., Chamaillard, M., Zouali, H., Lesage, S., Cézard, J. P., Belaiche, J., Almer, S., Tysk, C., O'Morain, C. A., Gassull, M., Binder, V., Finkel, Y., Cortot, A., Modigliani, R., Laurent-Puig, P., Gower-Rousseau, C., Macry, J., Colombel, J. F., Sahbatou, M., Thomas, G. 2001. "Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease", *Nature*, 411, 599-603.

Hyams, J. S., Fitzgerald, J. E., Treem, W. R., Wyzga, N., Kreutzer, D. 1993. "Relationship of functional and antigenic interleukin 6 to disease activity in inflammatory bowel disease", *Gastroenterology*, 104, 1285-1292.

İlhan, M., Bolat, I. E., Süntara, I., Kutluay Köklü, H., Dilek A, Çankal, U., Keleş, H., Küpeli Akkol, E. 2015. "Topical application of olive oil macerate of *Momordica charantia* L. promotes healing of excisional and incisional wounds in rat buccal mucosa", *Archives of Oral Biology*, 60, 1708-1713.

Ismail, A. S., Hooper, L. V. 2005. "Epithelial cells and their neighbors. IV. Bacterial contributions to intestinal epithelial barrier integrity", *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*, 289(5), 779-784.

Itoh, J., Strong, S. A. 2001. "Decreased Bax expression by mucosal T cells favours resistance to apoptosis in Crohn's disease", *Gut*, 49, 35-41.

Iwakura, Y., Ishigame, H. 2006. "The IL-23/IL-17 axis in inflammation", *Journal of Clinical Investigation*, 116(5),1218.

Karaboga, I. 2015. "TNBS ile deneysel kolit oluşturulmuş sıçanlarda T lenfositlerin ve bazı sitokinlerin immünohistokimyasal ve western blot yöntemleriyle incelenmesi", Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Morfoloji (Histoloji ve Embriyoloji) Doktora Programı, Doktora Tezi, Edirne.

Kemik, Ö., Kemik, A. S., Dülger, A. C., Hasırcı, İ., Daştan, E., Bartın, M. K., Purisa, S., Tüzün, S. 2010. "Karaciğer metastazlı kolon kanserli hastalarda interlökin-6 düzeyleri", *Van Tıp Dergisi*,17(2), 42-45.

Kırbağ, S., Zengin, F. 2006. "Elazığ yöresindeki bazı tıbbi bitkilerin antimikrobiyal aktiviteleri", *Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarım Bilimleri Dergisi (Journal of Agricultural Science)*, 16(2), 77-80.

Kıyıcı, M., Özal, G., Dolar, E., Gülten, M., Giray-Nak, S., Gürel, S., Uslusoy, H., Keskin, M. 2006. "Fistülizan tip crohn hastalığında infliksimab kullanımı sonrasında yaygın tüberküloz enfeksiyonu gelişen bir olgu – reaktivasyon mu? IRIS mi?", *Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 32(2), 65-70.

Kirkegaard, T., Hansen, A., Bruun, E., Brynskov, J. 2004. "Expression and localisation of matrix metalloproteinases and their natural inhibitors in fistulae of patients with Crohn's disease", *Gut*, 53, 701-709.

Kleessen, B., Kroesen, A. J., Buhr, H. J, Blaut, M. 2002. "Mucosal and invading bacteria in patients with inflammatory bowel disease compared with controls", *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 37(9), 1034-1041.

Komine, M., Kakinuma, T., Kagami, S., Hanakawa, Y., Hashimoto, K., Tamaki, K. 2005. "Mechanism of thymus and activation-regulated chemokine (TARC)/CCL17 production and its modulation by roxithromycin", *Journal of Investigative Dermatology*, 125, 491-498.

Korn, T., Bettelli, E., Oukka, M., Kuchroo, V. K. 2009. "IL-17 and Th17 cells", *Annual Review of Immunology*, 27, 485-517.

Kristensen, N. N., Brudzewsky, D., Gad, M., Claesson, M. H. 2006. "Chemokines involved in protection from colitis by CD4+CD25+ regulatory T cells", *Inflammatory Bowel Diseases*, 12(7), 612-618.

Kubowitz, F., Ott, P. 1943. "Isolierung und krystallisation eines garungsfermentes aus tumoren", *Biochemische Zeitschrift*, 314, 94-102.

Kullberg, M. C., Jankovic, D., Feng, C. G., Hue, S., Gorelick, P. L., McKenzie, B.S. 2006. "IL-23 plays a key role in helicobacter hepaticus-induced T cell-dependent colitis", *Journal of Experimental Medicine*, 203(11), 2485-2494.

Kühbacher, T., Gionchetti, P., Hampe, J., Helwigi U., Rosenstiel, P., Campieri, M., Buhr, H. J., Schreiber, S. 2001. "Activation of signal-transducer and activator of transcription 1 (STAT1) in pouchitis", *Clinical and Experimental Immunology*, 123, 395-401.

Kyhse-Anderson, J. 1984. "Electroblotting of multiple gels. A simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose", *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 10, 203-209.

Laemmli, U. K. 1970. "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4", *Nature*, 227, 680-684.

Lambert, E., Dassé, E., Haye, B., Petitfrère, E. 2004. "TIMPs as multifacial proteins", *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 49(3), 187-198.

Langrish, C. L., Chen, Y., Blumenschein, W. M., Jeanine, M., Basham, B., Sedgwick, J. D., McClanahan, T., Kastelein, R. A., Cua, D. J. 2005. "IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation", *The Journal of Experimental Medicine*, 201, 233-240.

Lennard, L., Van Loon, J. A., Weinshilboum, R. M. 1989. "Pharmacogenetics of acute azathioprine toxicity: relationship to thiopurine methyltransferase genetic polymorphism", *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 46(2), 149-154.

Lesina, M., Wörmann, S. M., Neuhöfer, P., Song, L., Algül, H. 2014. "Interleukin-6 in inflammatory and malignant diseases of the pancreas", *Seminars in Immunology*, 26(1), 80-87.

Ligumsky, M., Simon, P.L., Karmeli, F., Rachmilewitz, D. 1990. "Role of interleukin 1 in inflammatory bowel disease: enhanced production during active disease", *Gut*, 31, 686-689.

Liu, Z-J., Yadav, P. K., Su, J-L., Wang, J. S., Fei, K. 2009. "Potential role of Th17 cells in the pathogenesis of inflammatory bowel disease", *World Journal of Gastroenterology*, 15(46), 5784.

Liu, H., Shi, J., Wilkerson, M. L., Lin, F. 2012. "Immunohistochemical evaluation of GATA3 expression in tumors and normal tissues", *American Journal of Clinical Pathology*, 138, 57-64.

Lukas, M., Bortlik, M., Maratka, Z. 2006. "What is the origin of ulcerative colitis? Still more questions than answers", *Postgraduate Medical Journal*, 82(972), 620-625.

Luo, S., Wen, R., Wang, Q., Zhao, Z., Nong, F., Fu, Y., Huang, S., Chen, J., Zhou, L., Luo, X. 2018. "Rhubarb peony decoction ameliorates ulcerative colitis in mice by regulating gut microbiota to restoring Th17/Treg balance", *Journal of Ethnopharmacology*, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2018.08.033>

Macfarlane, S., Furrie, E., Cummings, J. H., Macfarlane, G. T. 2004. "Chemotaxonomic analysis of bacterial populations colonizing the rectal mucosa in patients with ulcerative colitis", *Clinical Infectious Diseases*, 38(12), 1690-1699.

Marteau, P., Lepage, P., Mangin, I., Suau, A., Doré, J., Pochart, P., Seksik, P. 2004. "Review article: gut flora and inflammatory bowel disease", *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, Suppl 4, 18-23.

McCafferty, D. M., Smith, C. W., Granger, D. N., Kubes, P. 1999. "Intestinal inflammation in adhesion molecule-deficient mice: an assessment of P-selectin alone and in combination with ICAM-1 or E-selectin", *Journal of Leukocyte Biology*, 66, 67-74.

Moller Sorensen, N., Vejgaard Sorensen, I., Ornbjerg Wurtz, S., Schrohl, A. S., Dowell, B., Davis, G. 2008. "Biology and potential clinical implications of tissue inhibitor of metalloproteinases-1 in colorectal cancer treatment", *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 43(7), 774-786.

Mullin, G. E., Vezza, F. R., Sampat, A. 1993. "Abnormal IL-10 mRNA production in the intestinal mucosal lesions of inflammatory bowel disease", *Gastroenterology*, 104, A751.

Nelson, A. R., Fingleton, B., Rothenberg, M. L., Matrisian, L. M. 2000. "Matrix metalloproteinases: biologic activity and clinical implications", *Journal of Clinical Oncology*, 18, 1135-1149.

Neurath, M. F., Fuss, I., Kelsall, B. L., Presky, D. H., Waegell, W., Strober, W. 1996. "Experimental granulomatous colitis in mice is abrogated by induction of TGF-beta-mediated oral tolerance", *The Journal of Experimental Medicine*, 183, 2605-2616.

Neurath, M. F., Fuss, I., Pasparakis, M., Alexopoulou, L., Haralambous, S., Meyer zum Buschenfelde, K. H., Strober, W., Kollias, G. 1997. "Predominant pathogenic role of tumor necrosis factor in experimental colitis in mice", *European Journal of Immunology*, 27, 1743-1750.

Nikolaus, S., Bauditz, J., Gionchetti, P., Witt, C., Lochs, H., Schreiber, S. 1998. "Increased secretion of proinflammatory cytokines by polymorphonuclear neutrophils regulation by Interleukin 10 in inflammatory bowel disease", *Gut*, 42, 470-476.

Ogura, Y., Inohara, N., Benito, A., Chen, F. F., Yamaoka, S., Nunez, G. 2001b. "Nod2, a Nod1/Apaf-1 family member that is restricted to monocytes and activates NF- κ B", *The Journal of Biological Chemistry*, 276, 4812-4818.

Ohkusa, T., Sato, N., Ogihara, T., Morita, K., Ogawa, M., Okayasu, I. 2002. "Fusobacterium varium localized in the colonic mucosa of patients with ulcerative colitis stimulates species-specific antibody", *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 17(8), 849-853.

Ohtani, K., Ohtsuka, Y., Ikuse, T., Baba, Y., Yamakawa, Y., Aoyagi, Y., Fujii, T., Kudo, T., Nagata, S., Shimizu, T. 2010. "Increased mucosal expression of GATA-3 and STAT-4 in pediatric ulcerative colitis", *Pediatrics International*, 52, 584-589.

Okayasu, I. 2012. "Development of ulcerative colitis and its associated colorectal neoplasia as a model of the organ-specific chronic inflammation-carcinoma sequence", *Pathology International*, 62(6), 368-380.

Oktar, B. K., Alican, I. 2000. "İnflamatuvar bağırsak hastalıklarının etyopatogenezindeki olası mekanizmalar ve mediyatörler", *İç Hastalıkları Dergisi*, 7(3), 155-161.

Oppmann, B., Lesley, R., Blom, B., Timans, J. C., Xu, Y., Hunte, B., Vega, F., Yu, N., Wang, J., Singh, K., Zonin, F., Vaisberg, E., Churakova, T., Liu, M., Gorman, D., Wagner, J., Zurawski, S., Liu, Y., Abrams, J. S., Moore, K. W., Rennick, D., de Waal-Malefyt, R., Hannum, C., Bazan, J. F., Kastelein, R. A. 2000. "Novel p19 protein engages IL-12p40 to

form a cytokine, IL-23, with biological activities similar as well as distinct from IL-12", *Immunity*, 13, 715-725.

O'Shea, J. J., Plenge, R. 2012. "JAK and STAT signaling molecules in immunoregulation and immune-mediated disease", *Immunity*, 36(4), 542-550.

Özbakış Dengiz, G., Gürsan, N. 2005. "Effects of *Momordica charantia* L. (Cucurbitaceae) on indomethacin-induced ulcer model in rats", *The Turkish Journal of Gastroenterology*, 16(2), 85-88.

Özkan, T. B. 2003. "İnflamatuvar barsak hastalıkları-derleme", *The Journal of Current Pediatrics*, 1, 79-91.

Parkes, M., Barmada, M. M., Satsangi, J., Weeks, D. E., Jewell, D. P., Duerr, R.H. 2000. "The IBD2 locus shows linkage heterogeneity between ulcerative colitis and Crohn's disease", *The American Journal of Human Genetics*, 67, 1605-1610.

Plevy, S. 2002. "The immunology of inflammatory bowel disease", *Gastroenterology Clinics of North America*, 31(1), 77-92.

Rachmilewitz, D., Simon, P. L., Schwartz, L.W., Griswold, D. E., Fondacaro, J. D., Wasserman, M. A. 1989. "Inflammatory mediators of experimental colitis in rats", *Gastroenterology*, 97, 326-337.

Rahman, K. M., Sarkar, F. H., Banerjee, S., Wang, Z., Liao, D. J., Hong, X., Sarkar, N. H. 2006. "Therapeutic intervention of experimental breast cancer bone metastasis by indole-3-carbinol in SCID-human mouse model", *Molecular Cancer Therapeutics*, 5, 2747-2756.

Raish, M., Ahmad, A., Ansari, M. A., Alkharfy, K. M., Aljenoobi, F. I., Jan, B. L., Al-Mohizea, A. M., Khan, A., Ali, N. 2018. "*Momordica charantia* polysaccharides ameliorate oxidative stress, inflammation, and apoptosis in ethanol-induced gastritis in mucosa through NF-κB signaling pathway inhibition", *International Journal of Biological Macromolecules*, 111, 193-199.

Rao, S. S., Holdsworth, C. D., Read, N. W. 1988. "Symptoms and stool patterns in patients with ulcerative colitis", *Gut*, 29(3), 342-345.

Reitman, S., Frankel, S. 1957. "A colorimetric method for the determination of serum glutamic oxalacetic and glutamic pyruvic transaminases", *American Journal of Clinical Pathology*, 28(1), 56-63.

- Ritter, M., Göggel, R., Chaudhary, N., Wiedenmann, A., Jung, B., Weith, A., Seither, P. 2005. "Elevated expression of TARC (CCL17) and MDC (CCL22) in models of cigarette smoke-induced pulmonary inflammation", *Biochemical and Biophysical Research Communications* 334, 254-262.
- Rogler, G., Brand, K., Vogl, D. Page, S., Hofmeister, R., Andus, T., Knuechel, R., Baeuerle, P. A., Scholmerich, J., Gross, V. 1998. "Nuclear Factor kappa B is activated in macrophages and epithelial cells of inflamed intestinal mucosa", *Gastroenterology*, 115, 357-369.
- Rubin, G. P., Hungin, A. P. S., Kelly, P. J., Ling, J. 2004. "Inflammatory bowel disease: epidemiology and management in English general practice population", *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, 14, 1553-1559.
- Sandle, G. I., Higgs, N., Crowe, P., Marsh, M. N., Venkatesan, S., Peters, T. J. 1990. "Cellular basis for defective electrolyte transport in inflamed human colon", *Gastroenterology*, 99(1), 97-105.
- Sands, B. E. 2006. Page 2459-2498. *Crohn's Disease*. Sleisenger & Fordtran's *Gastrointestinal and Liver Disease*. Editor: Feldman, M. 8th ed, Saunders.
- Santiago, C., Pagán, B., Isidro, A. A., Appleyard, C. B. 2007. "Prolonged chronic inflammation progresses to dysplasia in a novel rat model of colitis-associated colon cancer", *Cancer Research*, 67(22), 10766-10773.
- Sartor, R. B. 1996. "Cytokine regulation of experimental intestinal inflammation genetically engineered and T-lymphocyte reconstituted rodents", *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, 10, 36-42.
- Satsangi, J., Jewell, D. P., Rosenberg, W. M. C., Bell, J. I. 1994. "Genetics of inflammatory bowel disease", *Gut*, 35, 696-700.
- Scartezzini, P., Speroni, E. 2000. "Review on some plants of Indian traditional medicine with antioxidant activity", *Journal of Ethnopharmacology*, 71, 23-43.
- Schreiber, S., Hampe, J., Nikolaus, S., Koop, I., Ortner, M., Weber, J., et Lochs, H. 1997. "Activation of signal transducer and activator of transcription (STAT) 1", *Gastroenterology*, 112, A1086.
- Schreiber, S., Nikolaus, S., Hampe, J. 1998. "Activation of nuclear factor kappa B in inflammatory bowel disease", *Gut*, 42, 477-484.

Simpson, S. J., Shah, S., Comiskey, M., de Jong, Y. P., Wang, B., Mizoguchi, E., Bhan, A. K., Terhorst, C. 1998. "T-cell mediated pathology in two models of experimental colitis depends predominantly on the interleukin 12/signal transducer and activation of transcription (stat)-4 pathway, but is not conditional on interferon gamma expression by T cells", *The Journal of Experimental Medicine*, 187, 1225-1234.

Stallmach, A., Wittig, B., Giese, T., Pfister, K., Hoffmann, J. C., Bulfone-Paus, S., Kunzendorf, U., Meuer, S. C., Zeitz, M. 1999. "Protection of trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis by an interleukin 2-IgG2b fusion protein in mice", *Gastroenterology*, 117, 866-876.

Stenson, W. F. 2004. Page 861-868. Inflammatory bowel disease. Editors: Goldman, L., Ausiello, D. In: *Cecil Textbook of Medicine*, 22nd ed, New York: Saunders Philadelphia.

Strober, W., Fuss, I. J. 2004. "Proinflammatory cytokines in the pathogenesis of inflammatory bowel diseases" *Gastroenterology*, 140(6), 1756-1767.

Tamboli, C. P., Neut, C., Desreumaux, P., Colombel, J. F. 2004. "Dysbiosis in inflammatory bowel disease". *Gut*, 53(1), 1-4.

Taylor, L. 2005. Page 1-5. Bitter melon: Herbal properties and actions. *The Healing Power of Rainforest Herbs*. Editor: Taylor, L. Square One Publication Inc., New York.

te Velde, A. A., Verstege, M. I., Hommes, D. W. 2006. "Critical appraisal of the current practice in murine TNBS-induced colitis", *Inflammatory Bowel Disease*, 12, 995-999.

Thomas, G. A., Rhodes, J., Green, J. T. 1998. "Inflammatory bowel disease and smoking--a review", *The American Journal of Gastroenterology*, 93(2), 144-149.

Tilg, H., Kaser, A. 2004. "Diet and relapsing ulcerative colitis: take off the meat?", *Gut*, 53(10), 1399-1401.

Ting, C. N., Olson, M. C., Barton, K. P., Leiden, J. M. 1996. "Transcription factor GATA-3 is required for development of the T-cell lineage", *Nature*, 384, 474-478.

Tsianos, E. V., Katsanos, K. H., Tsianos, V. E. 2011. "Role of genetics in the diagnosis and prognosis of Crohn's disease", *World Journal of Gastroenterology*, 14(18), 105-118.

Tong, Q., Dalgin, G., Xu, H., Ting, C. N., Leiden, J. M., Hotamisligil, G. S. 2000. "Function of GATA transcription factors in preadipocyte-adipocyte transition", *Science* 290,134-138.

- Tovey, E.R., Baldo, B. A. 1987. "Comparison of semidry and conventional tank buffer electrotransfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose membranes", *Electrophoresis*, 8, 384-387.
- Tsarovina, K., Pattyn, A., Stubbusch, J., Muller, F., Van Der Wees, J., Schneider, C., Brunet, J. F., Rohrer, H. 2004. "Essential role of gata transcription factors in sympathetic neuron development", *Development*, 131, 4775-4786.
- Ullah, M., Chy, F. K., Sarkar, S. K., Islam, M. K., Absar, N. 2011. "Nutrient and phytochemical analysis of four varieties of bitter gourd (*Momordica charantia*) grown in chittagong hill tracts, Bangladesh", *Asian Journal of Agricultural Research*, 5(3), 186-193.
- Ülker, A., Parlak, E., Dağlı, Ü., Tezel, A. D., Alkım, C., Şahin, B. 1999. "Epidemiology of inflammatory bowel disease", *Turkish Journal of Gastroenterology*, 10, 55-59.
- Van Dullemen, H. M., Van Deventer, S. J. H., Hommes, D. W. Bijl, H. A., Jansen, J., Tytgat, G. N., Woody, J. 1995. "Treatment of Crohn's disease with anti-tumor necrosis factor chimeric monoclonal antibody (cA2)", *Gastroenterology*, 109, 129-135.
- von Lampe, B., Barthel, B., Coupland, S. E., Riecken, E. O., Rosewicz, S. 2000. "Differential expression of matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in colon mucosa of patients with inflammatory bowel disease", *Gut*, 47, 63-73.
- Wiercinska-Drapała, A., Flisiak, R., Prokopowicz, D. 2001. "Effect of ulcerative colitis activity on plasma concentration of transforming growth factor beta1", *Cytokine*, 14, 343-346.
- Williams, J. G, Hughes, L. E., Hallet, M. B. 1990. "Toxic oxygen metabolite production by circulating phagocytic cells in inflammatory bowel disease", *Gut*, 31, 187-193.
- Wroblewski, F., La Due, J. S. 1955. "Lactic dehydrogenase activity in blood", *Proceedings of The Society for Experimental Biology and Medicine*, 90, 210-215.
- Yamamoto, M., Yoshizaki, K., Kishimoto, K., Ito, H. 2000. "IL-6 is required for the development of Th1 cell-mediated murine colitis", *The Journal of Immunology*, 164, 4878-4882.
- Yanmaz, T. 2006. "Kolorektal kanserde epidermal büyüme faktörü reseptörü ve nükleer faktör kappa b ekspresyonunun prognoza etkisi", İstanbul Üniversitesi, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, İç Hastalıklar Anabilim Dalı, Yan Dal Uzmanlık Tezi, İstanbul.

- Yang, M., Lin, H-B., Gong, S., Chen, P. Y., Geng, L. L., Zeng, Y. M., Li, D. Y. 2014. "Effect of astragalus polysaccharides on expression of TNF- α , IL-1 β and NFATc4 in a rat model of experimental colitis", *Cytokine*, 70(2), 81-86.
- Yen, D., Cheung, J., Scheerens, H., Poulet, F., McClanahan, T., McKenzie, B. 2006. "IL-23 is essential for T cell-mediated colitis and promotes inflammation via IL-17 and IL-6", *Journal of Clinical Investigation*, 116(5), 1310.
- Yıldız, C., Oruç, N., Kuralay, F., Erkuş, M., Zihnioğlu, F., Özütemiz, Ö. 2008. "Sıçanlarda geliştirilen akut ve kronik kolitte pentoksifilin'in etkisi", *Akademik Gastroenteroloji Dergisi*, 7(3), 129-136.
- Yoh, K., Shibuya, K., Morito, N., Nakano, T., Ishizaki, K., Shimohata, H., Nose, M., Izui, S., Shibuya, A., Koyama, A., Douglas Engel, J., Yamamoto, M., Takahashi, S. 2003. "Transgenic overexpression of GATA-3 in T-lymphocytes improves autoimmune glomerulonephritis in mice with a BXSB/MpJ-Yaa genetic background", *Journals of the American Society of Nephrology*, 14, 2494-2502.
- Youngman, K. R., Simon, P. L., West, G. A., Cominelli, F., Rachmilewitz, D., Klein, J. S., Fiocchi, C. 1993. "Localization of intestinal interleukin 1 activity and protein and gene expression to lamina propria cells" *Gastroenterology*, 104, 749-758.
- Yu, L-Z., Wang, H-Y., Yang, S-P., Yuan, Z. P., Xu, F. Y., Sun, C. Shi, R. H. 2013. "Expression of interleukin-22/STAT3 signaling pathway in ulcerative colitis and related carcinogenesis" *World Journal of Gastroenterology*, 19(17), 2638.
- Yun, J., Xu, C. T., Pan, B. R. 2009. "Epidemiology and gene markers of ulcerative colitis in the Chinese", *World Journal of Gastroenterology*, 15(7), 788-803.
- Zenewicz, L. A., Antov, A., Flavell, R. A. 2009. "CD4 T-cell differentiation and inflammatory bowel disease", *Trends in Molecular Medicine*, 15(5), 199-207.
- Zhang, H-Q., Ding, T. T., Zhao, J-S., Yang, X., Zhang, H. X., Zhang, J. J., Cui, Y. L. 2009. "Therapeutic effects of *Clostridium butyricum* on experimental colitis induced by oxazolone in rats", *World Journal of Gastroenterology*, 15(15), 1821.
- Zhou, Y. H., Yu, J. P., Liu, Y. F., Teng, X. J., Ming, M., Lv, P., An, P., Liu, SQ., Yu, H. G. 2006. "Effects of *Ginkgo biloba* extract on inflammatory mediators (SOD, MDA, TNF- α , NF- κ Bp65, IL-6) in TNBS-induced colitis in rats", *Mediators of Inflammation*, 2006(5), 92642.

TÜBİTAK
PROJE ÖZET BİLGİ FORMU

Proje Yürütücüsü:	Doç. Dr. ASLI SEMİZ
Proje No:	216Z093
Proje Başlığı:	Ülseratif Kolit Modelinde Momordica charantia'nın İyileştirici Etkilerinin Moleküler Mekanizmalarının Araştırılması
Proje Türü:	3001 - Başlangıç AR-GE
Proje Süresi:	18
Araştırmacılar:	HÜLYA ÇETİN
Danışmanlar:	
Projenin Yürütüldüğü Kuruluş ve Adresi:	PAMUKKALE Ü. TEKNOLOJİ F. BİYOMEDİKAL MÜH. B.
Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri:	01/05/2017 - 01/11/2018
Onaylanan Bütçe:	85636.0
Harcanan Bütçe:	71218.11
Öz:	<p>İnflamatuvar bağırsak hastalıkları gastrointestinal sistemin kronik, tekrarlayıcı inflamatuvar hastalıklarıdır. Kronik inflamatuvar bağırsak hastalıklarının, ağızdan rektuma kadar bütün sindirim kanalını tutan Crohn Hastalığı (CH) ile sadece kolonu tutan Ülseratif Kolit (ÜK) olmak üzere başlıca iki tipi vardır. Otoimmün bir hastalık olarak tedavi edilen ÜK'nin tedavisi anti-inflamatuvar ilaçlarla, immünosupresyonla ve immün cevabın özgün bileşenlerini hedefleyen immünoterapi ile yapılır. Ülkemizde, Momordica charantia (kudret narı) bitkisi bu hastalığın tedavisinde ve yan etkilerinin azaltılması için halk arasında çok fazla kullanılmaktadır. Fakat bu bitkinin iyileştirici etkisinin olup olmadığı ve varsa nasıl bu etkiyi gösterdiği hakkında bilimsel literatürde bir bilgi yoktur. Önerilen bu çalışmada ülkemizde geleneksel tedavide kullanılan ve etki mekanizması üzerine yeteri kadar bilgi bulunmayan kudret narının (M. charantia) ülseratif kolit modelinde iyileştirici etkilerinin moleküler yaklaşımlar ile aydınlatılması amaçlanmıştır. Bu kapsamda; projede öncelikle Wistar albino sıçanlarda trinitrobenzen sülfonik asit (TNBS) ile ÜK modeli oluşturuldu. Deneysel ÜK oluşturulan sıçanlara kontrol ile eş zamanlı olarak M. charantia (MC) intragastrik gavaj ile verilerek deneysel ÜK oluşumu, iyileşmeler/değişiklikler histolojik boyamalarla tespit edildi. Çalışılan MC'nin etkilerinin moleküler düzeyde tanımlanması için ÜK patogenezinde rol aldığı bilinen genlerin [IFN-γ, CARD15/NOD2, GATA3, CCL17, MMP9, TNFα, TIMP1, STAT1, STAT3, JAK2, NF-κB1, 18S (normalizasyon geni), IL-1β, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13 ve IL-23R] mRNA ve protein ifade düzeyleri saptandı. Ayrıca serum aspartat ve alanin aminotransferaz ve laktat dehidrogenaz aktivite ölçümleri ile kudret narının olası toksik etkileri araştırıldı. Sonuç olarak, bu çalışmada kudret narı tüketiminin ülseratif kolit hastalığında önemli bir alternatif bitkisel tedavi etmeni olabileceği gösterilmiştir.</p>
Anahtar Kelimeler:	Momordica charantia, ülseratif kolit, mRNA ve protein ekspresyonu, trinitrobenzen sülfonik asit
Fikri Ürün Bildirim Formu Sunuldu Mu?:	Hayır