



**T.C.  
GAZİ ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**DOKTORA  
TEZİ**

**DENEYSEL KOLİT MODELİNDE GLİKAN  
MODİFİKASYONUN MİR466 GEN AİLESİ VE  
TLR/NF- B/IL SİNYAL YOLAKLARI ÜZERİNE  
ETKİSİ**

**KÜBRA GİZEM ESENTÜRK YAYLA**

**TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI**

**MART 2025**



**DENEYSEL KOLİT MODELİNDE GLİKAN MODİFİKASYONUN miR466  
GEN AİLESİ VE TLR/NF- $\kappa$ B/IL SİNYAL YOLAKLARI ÜZERİNE ETKİSİ**

**Kübra Gizem ESENTÜRK YAYLA**

**DOKTORA TEZİ  
TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANA BİLİM DALI**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**MART 2025**



## ETİK BEYAN

Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu,

bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

Kübra Gizem ESENTÜRK YAYLA  
26/03/2025

# DENEYSEL KOLİT MODELİNDE GLİKAN MODİFİKASYONUN miR466 GEN AİLESİ VE TLR/NF- $\kappa$ B/IL SİNYAL YOLAKLARI ÜZERİNE ETKİSİ

(Doktora Tezi)

Kübra Gizem ESENTÜRK YAYLA

GAZİ ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Mart 2025

## ÖZET

Ülseratif kolit (ÜK), inflamatuvar bağırsak hastalıkları arasında yer alır ve kalın bağırsakların kronik inflamasyonu ile karakterizedir. Patogenezi, genetik, çevresel ve immünolojik faktörlerin etkileşimiyle şekillenir. NF- $\kappa$ B, IL-6, IL-10, TLR4 ve miR-466l gibi moleküller, ÜK'nin gelişimi ve ilerlemesinde önemli rol oynar. NF- $\kappa$ B, inflamasyonu ve bağışıklık yanıtlarını düzenleyen bir transkripsiyon faktörü olarak, aşırı aktivasyonu ile inflamasyonu sürdürür. IL-6, inflamasyonun önemli bir mediatörü olup, seviyelerinin yükselmesi hastalığın şiddetini artırabilir. IL-10 ise anti-inflamatuvar bir sitokin olup, eksikliği aşırı inflamasyona yol açabilir. TLR4, bağışıklık sisteminin patojenleri tanıyıp immün yanıt başlatan bir reseptördür ve aşırı aktivasyonu inflamasyonu tetikleyebilir. miR-466l, inflamasyonu ve immün yanıtları düzenleyen bir mikroRNA olarak, hastalık sürecinde önemli bir rol oynar. Bu çalışmada, 80 adet C57/Bl6 farelerine %2,5 DSS ile ülseratif kolit indüklenmiş ve tedavi gruplarında AZA, RBO, AZA+RBO, ve anti-miR466l kullanılmıştır. Tedavi öncesi ve sonrası yapılan analizler, tedavi edilen gruplarda inflamasyonun azaldığını ve gen ekspresyonlarında anlamlı değişiklikler görüldüğünü ortaya koymuştur. Özellikle IL-6, TLR4 ve NF- $\kappa$ B genlerinin ekspresyonunda yapılan değişiklikler, tedavi etkisini açıklamada önemli bulgular sağlamıştır. AZA, RBO ve anti-miR466l tedavilerinin inflamasyonu azaltmada etkili olduğu, miR-466l'nin ise tedaviye güçlü bir etki gösterdiği bulunmuştur. Sonuçlar, bu moleküllerin ülseratif kolit tedavisinde potansiyel hedefler sunduğunu ve tedavi stratejilerinin geliştirilmesine katkı sağlayabileceğini göstermektedir.

Bilim Kodu : 1091

Anahtar Kelimeler : Kolit, Genetik, Pirinç Kepeği Yağı, Glikan modifikasyonu,

Sayfa Adedi : 83

Danışman : Prof. Dr. Ece KONAÇ

EFFECT OF GLYCAN MODIFICATION ON miR466 GENE FAMILY AND TLR/NF-  
κB/IL SIGNALING PATHWAYS IN EXPERIMENTAL COLITIS MODEL

(Ph. D. Thesis)

Kübra Gizem ESENTÜRK YAYLA

GAZİ UNIVERSITY

GRADUATE SCHOOL OF HEALTH SCIENCES

March 2025

ABSTRACT

Ulcerative colitis (UC) is an inflammatory bowel disease characterized by chronic inflammation of the large intestine. Its pathogenesis is shaped by the interaction of genetic, environmental, and immunological factors. Molecules such as NF-κB, IL-6, IL-10, TLR4, and miR-466l play significant roles in the development and progression of UC. NF-κB is a transcription factor that regulates inflammation and immune responses, and its excessive activation sustains inflammation. IL-6 is an important mediator of inflammation, and its elevated levels can increase the severity of the disease. IL-10 is an anti-inflammatory cytokine, and its deficiency can lead to excessive inflammation. TLR4 is a receptor that recognizes pathogens and initiates immune responses, and its overactivation can trigger inflammation. miR-466l, a microRNA that regulates inflammation and immune responses, plays an important role in the disease process. In this study, 80 C57/Bl6 mice were induced with ulcerative colitis using 2.5% DSS, and treatment groups were administered AZA, RBO, AZA+RBO, and anti-miR466l. Pre- and post-treatment analyses showed a reduction in inflammation and significant changes in gene expression in the treated groups. Notably, changes in the expression of IL-6, TLR4, and NF-κB genes provided important insights into the treatment effects. AZA, RBO, and anti-miR466l treatments were found to be effective in reducing inflammation, with miR-466l showing a strong therapeutic effect. The results suggest that these molecules offer potential targets for ulcerative colitis treatment and could contribute to the development of new therapeutic strategies.

Science Code : 1091

Key Words : Colitis, Genetic, Rice Bran Oil, Glycan modification

Page Number : 83

Supervisor : Prof. Dr. Ece KONAC

## TEŞEKKÜR

Doktora sürecimin ders döneminde ve tez çalışmamın gerçekleştirilmesinde, dört yıl boyunca değerli bilgilerini benimle paylaşan, kullandığı her kelimenin hayatıma kattığı önemini asla unutmayacağım, çalışmam boyunca benden bir an olsun yardımlarını esirgemeyen, gelecekteki mesleki hayatımda da bana verdiği değerli bilgilerden faydalanacağım, tüm zorlukları benimle göğüsleyen ve hayatımın her evresinde bana destek olan değerli saygıdeğer danışman hocam Prof. Dr. Ece KONAÇ'a teşekkür ederim.

Doktora tez çalışmam boyunca ayırdıkları zaman ve anlayışları için tez izleme komitesi üyeleri Sayın Prof. Dr. Serhat GÜROCAK'a ve Sayın Prof. Dr. Ödül EĞRİTAŞ GÜRKAN'a teşekkür ederim.

Eğitimim boyunca gösterdikleri sabırla hayatımı kolaylaştıran ve en büyük desteği veren eşim Alper ve kızım Özgü YAYLA başta olmak üzere kıymetli aileme teşekkür ederim.

Bu tez çalışması Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma ve Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından Doktora Tez Projesi (TDK-2024-9312) olarak desteklenmiştir, teşekkürlerimi sunarım.

## İÇİNDEKİLER

|                                                                           | Sayfa |
|---------------------------------------------------------------------------|-------|
| ÖZET .....                                                                | iv    |
| ABSTRACT.....                                                             | v     |
| TEŞEKKÜR.....                                                             | vi    |
| ÇİZELGELERİN LİSTESİ.....                                                 | x     |
| ŞEKİLLERİN LİSTESİ.....                                                   | xi    |
| RESİMLERİN LİSTESİ .....                                                  | xiii  |
| SİMGELER VE KISALTMALAR.....                                              | xiv   |
| 1. GİRİŞ.....                                                             | ..1   |
| 2. GENEL BİLGİLER.....                                                    | 3     |
| 2.1. İBH'nin Etiyolojisi.....                                             | 3     |
| 2.2. Ülseratif Kolit.....                                                 | 4     |
| 2.2.1. Ülseratif kolitte genetik faktörler .....                          | 5     |
| 2.2.2. Çevresel faktörler .....                                           | 8     |
| 2.2.3. İmmünolojik faktörler .....                                        | 8     |
| 2.3. Ülseratif Kolitte <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 'nın Etkisi.....     | 9     |
| 2.4. Glikan Modifikasyonlarının İnflamatuar Yanıtlar Üzerine Etkisi ..... | 10    |
| 2.5. Ülseratif Kolit ve Tedavi Stratejileri .....                         | 11    |
| 3. GEREÇLER VE YÖNTEM .....                                               | 15    |
| 3.1. Gereçler .....                                                       | 15    |
| 3.1.1. Cihazlar .....                                                     | 15    |
| 3.1.2. Sarf malzemeleri .....                                             | 15    |
| 3.1.3. Kimyasallar ve kitler .....                                        | 16    |

|                                                                                    |    |
|------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 3.2. Deneysel Kolit İndüksiyonu ve Çalışma Tasarımı.....                           | 17 |
| 3.3. Kolit İndüklenmesi.....                                                       | 17 |
| 3.4. Glikan ile Etiketlenme.....                                                   | 18 |
| 3.5. Azathioprine ve Pirinç Kepeği Yağı ile Tedavi .....                           | 18 |
| 3.6. miR-466 Mimiklerinin Hazırlanması ve in vivo Tedavisi .....                   | 19 |
| 3.7. Örneklerin Toplanması ve Değerlendirmesi .....                                | 19 |
| 3.8. Histokimyasal İnceleme .....                                                  | 20 |
| 3.9. RNA izolasyonu .....                                                          | 22 |
| 3.9.1. Kan örneklerinden RNA izolasyonu .....                                      | 22 |
| 3.9.2. Doku Örneklerinden RNA izolasyonu .....                                     | 22 |
| 3.10. cDNA sentezi .....                                                           | 23 |
| 3.11. Kantitatif (q)PCR kullanılarak mRNA seviyelerinin miktarının belirlenmesi... | 23 |
| 3.12. <i>Pseudomonas aeuroginosa</i> ‘nın kültürel analizi .....                   | 24 |
| 3.13. Genlerin Primer Tasarımı.....                                                | 24 |
| 3.14. İstatiksel Analiz.....                                                       | 25 |
| 4. BULGULAR .....                                                                  | 27 |
| 4.1. Deney Hayvan Gruplarında DAI puanları ve kolon uzunlukları .....              | 27 |
| 4.2. Dokuların Histokimyasal İncelenmesi .....                                     | 29 |
| 4.3. <i>Pseudomonas aeuroginosa</i> ‘nın Kültürel Analizi .....                    | 30 |
| 4.4. Gen Ekspresyon Sonuçları .....                                                | 31 |
| 4.4.1. Ülseratif kolitte IL6 geninin ekspresyon değerleri.....                     | 35 |
| 4.4.2. Ülseratif kolitte IL10 geninin ekspresyon değerleri.....                    | 37 |
| 4.4.3. Ülseratif kolitte TLR4 geninin ekspresyon değerleri.....                    | 39 |
| 4.4.4. Ülseratif kolitte NF- $\kappa$ B geninin ekspresyon değerleri.....          | 41 |

|                                                                     |    |
|---------------------------------------------------------------------|----|
| 4.4.5. Ülseratif kolitte miR466l geninin ekspresyon değerleri ..... | 43 |
| 5. SONUÇ VE ÖNERİLER .....                                          | 47 |
| KAYNAKLAR .....                                                     | 53 |
| EKLER.....                                                          | 64 |

## ÇİZELGELERİN LİSTESİ

| Çizelge                                                                                                                                                                        | Sayfa |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| Çizelge 3.1: DAI parametreleri .....                                                                                                                                           | 20    |
| Çizelge 3.2. Doku takip cihazı program süreleri.....                                                                                                                           | 21    |
| Çizelge 3.3. Hematoksilen- Eozin boyama yöntemi.....                                                                                                                           | 21    |
| Çizelge 3.4. cDNA Reverse transkriptaz kiti bileşenleri ve miktarları.....                                                                                                     | 23    |
| Çizelge 3.5. RT-qPCR kit bileşenleri ve miktarları.....                                                                                                                        | 24    |
| Çizelge 3.6. Çalışmada incelenen genlere ait forward - reverse primer dizileri.....                                                                                            | 24    |
| Çizelge 3.7. RT-qPCR işlem basamakları.....                                                                                                                                    | 24    |
| Çizelge 4.1. DSS ile kolit indüklenen deney hayvanlarındaki DAI puanı.....                                                                                                     | 27    |
| Çizelge 4.2. Deney hayvanlarında ötenazinin ardından toplanan kolon dokularının<br>uzunluğu.....                                                                               | 28    |
| Çizelge 4.3. KG grubu ile kıyaslandığında glikan etiketlenmesi uyguladığımız<br>gruplar (ÜKG) ile etiketleme yapmadığımız gruplar (ÜK)<br>arasındaki istatistiksel analiz..... | 41    |

## ŞEKİLLERİN LİSTESİ

| Şekil                                                                                                                                            | Sayfa |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| Şekil 2.1. İnflamatuvar bağırsak hastalıklarının etyolojisini etkileyen faktörler.....                                                           | 4     |
| Şekil 2.2. Ülseratif Kolitin Patofizyolojisi.....                                                                                                | 5     |
| Şekil 3.1. Deneysel kolit indüksiyonu ve çalışma tasarımı.....                                                                                   | 17    |
| Şekil 4.1. Örneklerin ekspresyon seviyeleri QRT-PCR tekniği kullanılarak belirlendi.....                                                         | 32    |
| Şekil 4.2. Kan örneklerin Ct değerlerinin dağılımı.....                                                                                          | 32    |
| Şekil 4.3. Doku örneklerin Ct değerlerinin dağılımı.....                                                                                         | 33    |
| Şekil 4.4. Kan örneklerin $\Delta$ Ct değerlerinin dağılımı.....                                                                                 | 33    |
| Şekil 4.5. Doku örneklerin $\Delta$ Ct değerlerinin dağılımı.....                                                                                | 34    |
| Şekil 4.6. Örneklerin fold change ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ) değerleri.....                                                                      | 34    |
| Şekil 4.7. IL6 geninin DSS ile indüklenen ülseratif kolit farelerinin tedavi gruplarına göre karşılaştırılması.....                              | 36    |
| Şekil 4.8. IL6 geninin glikan ile etiketlenen ve DSS ile indüklenen ülseratif kolit farelerinin tedavi gruplarına göre karşılaştırılması.....    | 36    |
| Şekil 4.9. IL10 geninin DSS ile indüklenen ülseratif kolit farelerinin tedavi gruplarına göre karşılaştırılması.....                             | 38    |
| Şekil 4.10. IL10 geninin glikan ile etiketlenen ve DSS ile indüklenen ülseratif kolit farelerinin tedavi gruplarına göre karşılaştırılması.....  | 38    |
| Şekil 4.11. TLR4 geninin DSS ile indüklenen ülseratif kolit farelerinin tedavi gruplarına göre karşılaştırılması.....                            | 40    |
| Şekil 4.12. TLR4 geninin Glikan ile etiketlenen ve DSS ile indüklenen ülseratif kolit farelerinin tedavi gruplarına göre karşılaştırılması.....  | 40    |
| Şekil 4.13. NF-Kb geninin DSS ile indüklenen ülseratif kolit farelerinin tedavi gruplarına göre karşılaştırılması.....                           | 42    |
| Şekil 4.14. NF-kB geninin Glikan ile etiketlenen ve DSS ile indüklenen ülseratif kolit farelerinin tedavi gruplarına göre karşılaştırılması..... | 43    |

**Şekil****Sayfa**

Şekil 4.15. miR466l geninin DSS ile indüklenen ülseratif kolit farelerinin tedavi gruplarına göre karşılaştırılması.....45

Şekil 4.16. miR466l geninin Glikan ile etiketlenen ve DSS ile indüklenen ülseratif kolit farelerinin tedavi gruplarına göre karşılaştırılması.....45

## RESİMLERİN LİSTESİ

| Resim                                                                                                                                                           | Sayfa |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| Resim 3.1. C57/Bl6 farelerine glikan enjeksiyonu introperitoneal olarak uygulandı.....                                                                          | 18    |
| Resim 3.2. C57/Bl6 farelerine antimiRNA enjeksiyonu introperitoneal olarak uygulandı.....                                                                       | 19    |
| Resim 3.3. C57/Bl6 farelerine ketamine ve xylazin kombinasyonu kullanılarak ötenazi yapıldı.....                                                                | 20    |
| Resim 4.1. Deney hayvanlarında farklı gruplara ait kolon uzunlukları.....                                                                                       | 29    |
| Resim 4.2. DSS ile kolit indüklenen deney hayvan gruplarında kolon ve karaciğer dokularının histokimyasal boyama sonucu mikroskop altındaki görüntüsü(40X)..... | 30    |
| Şekil 4.3. Pseudomonas aeruginosa bakterisinin kültür sonucu.....                                                                                               | 31    |
| Şekil 4.4. Petrilere görülen enterik bakteri kolonileri.....                                                                                                    | 31    |

## SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

| <b>Simgeler</b>    | <b>Açıklamalar</b>                                 |
|--------------------|----------------------------------------------------|
| <b>µl</b>          | Mikrolitre                                         |
| <b>ml</b>          | Mililitre                                          |
| <b>mg</b>          | Miligram                                           |
| <b>°</b>           | Santigrat                                          |
| <b>Kısaltmalar</b> | <b>Açıklamalar</b>                                 |
| <b>AZA</b>         | Azathioprine                                       |
| <b>cDNA</b>        | Circular DNA                                       |
| <b>CH</b>          | Crohn hastalığını                                  |
| <b>COX-2</b>       | Siklooksijenaz-2                                   |
| <b>DAI</b>         | Hastalık aktivite indeksi                          |
| <b>DC</b>          | dendritik hücre                                    |
| <b>DMSO</b>        | Dimetil sülfoksit                                  |
| <b>DSS</b>         | Dekstran sülfat sodyum                             |
| <b>EMB</b>         | Eozin metilen mavisi                               |
| <b>FOXP3</b>       | Forkhead kutusu proteini 3                         |
| <b>GATA3</b>       | GATA bağlayıcı protein 3                           |
| <b>IL</b>          | İnterlökin                                         |
| <b>IRF4</b>        | İnterferon düzenleyici faktör 4                    |
| <b>IUA</b>         | Rahim içi yapışıklıkları                           |
| <b>İBH</b>         | İnflamatuvar bağırsak hastalığı                    |
| <b>MAdCAM-1</b>    | Mukozal adressin hücre yapışma molekülü-1          |
| <b>NFκB</b>        | Nükleer faktör kappa B                             |
| <b>NKT</b>         | Doğal öldürücü T                                   |
| <b>NLRP3</b>       | Pyrin alanı içeren NLR ailesi 3                    |
| <b>PBS</b>         | Fosfat buffer serum                                |
| <b>PU.1</b>        | Purin açısından zengin PU-kutusu bağlayıcı protein |

|                                |                                        |
|--------------------------------|----------------------------------------|
| <b>qPCR</b>                    | Kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu |
| <b>RBO</b>                     | Pirinç kepeği yağı                     |
| <b>TGF-<math>\beta</math></b>  | Dönüştürücü büyüme faktörü-beta        |
| <b>Th</b>                      | T yardımcı                             |
| <b>TLR</b>                     | Toll-like reseptörler                  |
| <b>TNF-<math>\alpha</math></b> | Tümör nekroz faktörü-alfa              |
| <b>ÜK</b>                      | Ülseratif kolit                        |



## 1. GİRİŞ

İnflamatuvar bağırsak hastalığı (İBH), ülseratif kolit (ÜK) ve Crohn hastalığını (CH) içeren ve gastrointestinal sistemin kronik inflamasyonu ile karakterize bir hastalıktır. Proinflamatuvar sitokinler yukarı regülasyon da önemli roller oynarken, anti-inflamatuvar sitokinler hastalık ilerlemesinin aşağı regülasyonunda önemli roller oynar. TLR'lerin eksikliği, bağırsak epitelinin yeniden yapılanmasını etkilediği için İBH'nin tedavisinde önemlidir. miR-466'nın, AKT/NF-kB yolunu negatif olarak düzenlemek için NUS1'in 3'UTR bölgesine bağlandığını ve miR-466l, TTP Aracılı IL-10 mRNA bozulmasını antagonize ederek TLR ile tetiklenen makrofajlarda IL-10'un düzenlenmesinde etkili olduğu gösterilmiştir. Fırsatçı bir patojen olarak kabul edilen *Pseudomonas aeruginosa*(*P. Aeruginosa*) İBH olan hastaların bağırsaklarında yüksek oranda bulunduğu tespit edilmiş ve TLR4 yoluyla NFκB sinyalini aktive ederek pro-inflamatuvar sitokin gen ifadesinin artmasına neden olduğu literatürdeki çalışmalarda gösterilmiştir. Çalışmamızda, %2,5 oranında DSS ile indüklenmiş ülseratif kolitli deneysel hayvan modelinde TLR aracılı NFκB sinyal yolağı ile inflamatuvar sitokinlerin aktivitesini qPCR yöntemiyle araştırmayı ve *P. Aeruginosa* bakterisinin tedavi öncesi ve sonrasındaki bağırsakta bulunma oranını kanlı agar ve EMB agar ile belirlemeyi hedefledik. Pirinç kepeği yağı (RBO), antioksidan ve antiinflamatuvar aktivitelere ek olarak hem in vitro hem de in vivo çalışmalarda çeşitli hastalıklara karşı yararlı olduğu ve deneysel olarak indüklenen kolitte oksidatif olayları hafiflettiğini, inflamatuvar mediatörleri baskıladığını ve kolondaki hasarı azalttığını gösterilmiştir. İmmünosupresan olan azathioprine (AZA)'nın çeşitli immün enflamatuvar hücrelerin infiltrasyonunu azalttığı ve nötrofil, monosit ve makrofaj gen ifadelerinin arttığı gözlemlenmiştir. Çalışmamızda, DSS maddesi ile indüklenen kolitin tedavisinde pirinç kepeği yağı(oral), azathioprine(gavaj) ve miRNA mimiklerini uygulayarak, UC'nin negatif etkilerini azaltmayı hedefledik. Glikan etiketlemesi ile RNA üzerindeki bir glikanın, RNA polimerlerinin fonksiyonel yönlerinin değişmesine neden olduğu literatürde gösterilmiştir. Çalışmamızda uygulayacağımız glikan etiketlemesinin (intraperitoneal), DSS ile indüklenen ÜK'nin tedavisinde ilgili genlerin gen ifade seviyelerinde nasıl bir etkisi olduğunu araştırmayı amaçladık. ÜK tedavisinde glikan modifikasyonunu ve miR-466 gen ifadesini inceleyip, pirinç kepeği yağı ve miR466 mimik ile tedaviyi amaçlayan ilk-preklinik çalışma olması ve başarı ile sonuçlanması sonucunda daha sonra gerçekleştirilecek olan çalışmalara öncülük edecektir.



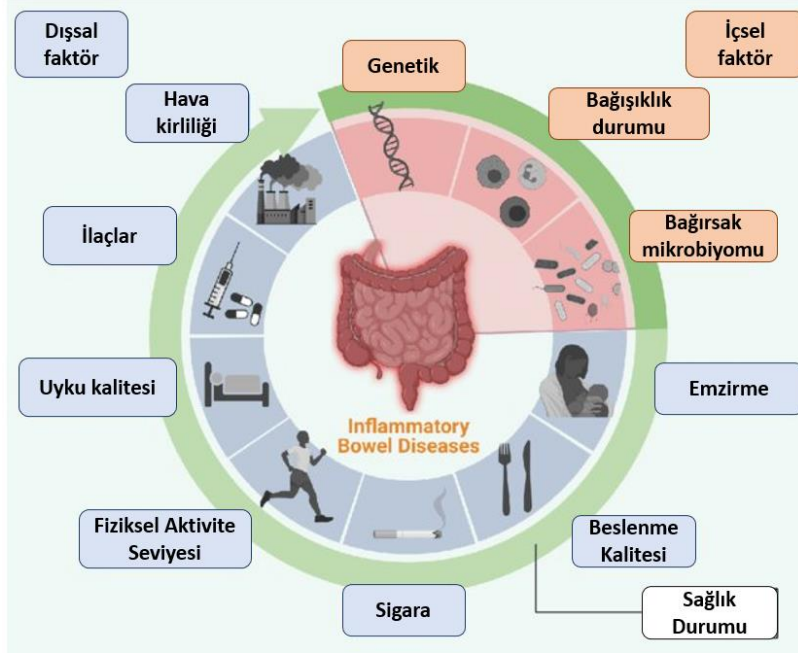
## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. İBH'nin Etiyolojisi

İBH, gastrointestinal sistemin kronik inflamasyonu ile karakterize bir hastalıktır ve ÜK ve CH içerir (Ramos ve Papadakis 2019). Bu hastalıkların her ikisinin de etiyolojisi, genetik ve çevresel faktörler arasındaki etkileşimlerin yanı sıra bağırsak mikrobiyotasının (disbiyoz) profilindeki değişikliklerin sonucu olarak, iltihaplanma gelişimine yol açan immün yanıt mekanizmalarında bozukluklara katkıda bulunduğu çok faktörlü olmasıdır (van der Sloot ve diğerleri 2017).

İBH'nin gelişiminde çevresel faktörler de önemli bir rol oynamaktadır. Batı tarzı yaşam biçimi, özellikle sağlıksız beslenme alışkanlıkları, sigara içme, ve antibiyotik kullanımının hastalık riskini artırdığına dair birçok çalışma bulunmaktadır. Sigara içmenin Crohn hastalığını kötüleştirdiği ve ülseratif kolit riskini artırdığı yönünde kanıtlar vardır (Cosnes ve diğerleri 2001). Ayrıca, batı ülkelerinde daha yaygın olan yüksek yağlı, işlenmiş gıda tüketiminin, bağırsak mikrobiyotasının bozulmasına yol açarak hastalığın ortaya çıkmasına zemin hazırladığı öne sürülmektedir (Sartor, 2006).

İBH, bağışıklık sistemiyle yakından ilişkilidir. İnflamatuvar yanıtların bozulmuş düzeni, hastalıkların patogenezinde önemli bir yer tutmaktadır. Bağışıklık sistemi, genetik yatkınlık ve çevresel etmenlerin etkisiyle, bağırsağın normal mikrobiyotasına karşı aşırı bir immün yanıt geliştirir. Bu durumda, T hücreleri (özellikle Th1 ve Th17 hücreleri) ve pro-inflamatuvar sitokinler (IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$  gibi) önemli rol oynar. Crohn hastalığında, özellikle TNF- $\alpha$  ve IL-12/IL-23 yolaklarının aşırı aktivasyonu belirgindir ve bu da tedavi hedefleri olarak kullanılmıştır (Sartor, 2006).

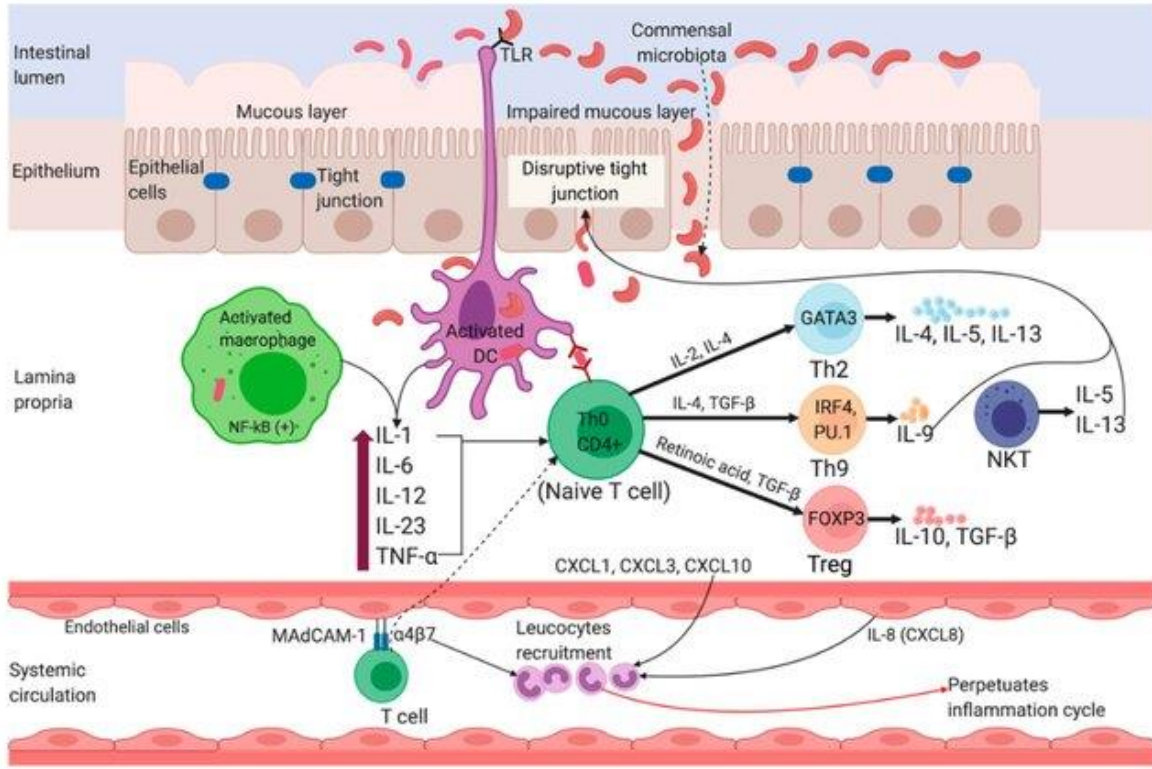


Şekil 2.1. İnflamatuvar bağırsak hastalıklarının etyolojisini etkileyen faktörler (Loubet Filho, P ve diğerleri 2022).

İBH'nin etiyolojisi, genetik, çevresel, immünolojik ve mikrobiyal faktörlerin karmaşık etkileşimiyle şekillenir. Bu faktörlerin birbirini nasıl etkilediğini anlamak, hastalığın daha etkili tedavi yöntemlerinin geliştirilmesine yardımcı olabilir. İBH'nin patogenezi derinlemesine anlamak, yalnızca hastaların yaşam kalitesini iyileştirmek için değil, aynı zamanda gelecekteki tedavi yaklaşımlarını şekillendirmek için de kritik öneme sahiptir.

## 2.2. Ülseratif Kolit

Ülseratif kolit, kolonun inflamasyonu ile karakterize, kronik bir hastalıktır. İBH arasında yer alan ÜK, özellikle 20-40 yaş arası bireylerde daha sık görülür (Baumgart ve Sandborn, 2007). ÜK'nin etiyolojisi tam olarak anlaşılmamış olsa da, genetik faktörlerin, bağışıklık sistemi bozukluklarının ve çevresel faktörlerin etkileşiminin bu hastalığın gelişiminde önemli bir rol oynadığı düşünülmektedir. ÜK'nin patogenezi, bağışıklık sisteminin normal mikrobiota ile anormal etkileşimi ve mukozal savunma sistemindeki bozukluklar üzerinden şekillenmektedir (Sartor, 2006).



Şekil 2.2. Ülseratif kolitin patofizyolojisi. Sıkı bağlantıların ve mukoza tabakasının bozulması bağırsak epitelinin geçirgenliğinin artmasına neden olur ve bu da lümenal antijenlerin daha fazla alınmasıyla sonuçlanır. Antijen sunan hücreler (APC), Toll benzeri reseptörler (TLR'ler) aracılığıyla patojenik olmayan bakterileri (komensal mikrobiyota) tanıdıklarında aktive olurlar. Aktifleştirilmiş APC, naif  $CD4^+$  T hücrelerinin Th-2 efektör hücrelerine (TNF- $\alpha$ , IL-5, IL-6 ve IL-13 gibi proinflatuar sitokinler üreten) farklılaşmasını başlatır. TNF- $\alpha$  ve IL-1, proinflatuar ve hücre sağkalım genlerinin ekspresyonunu kolaylaştıran nükleer faktör  $\kappa B$  (NF- $\kappa B$ ) yolunu aktive eder. İntegrin- $\alpha 4\beta 7$  taşıyan T hücrelerinin mukozal yapışma molekülü MAdCAM-1'e bağlanması, lamina propriaya daha fazla T hücresinin girmesini kolaylaştırır. İnflatuar kemokinlerin (kemokin ligandları: CXCL1, CXCL3, CXCL8 ve CXCL10) yukarı regülasyonuna bağlı olarak dolaşımdaki lökositlerin toplanması inflamatuvar döngüyü sürdürür. MAdCAM-1, mukozal adressin hücre yapışma molekülü-1; IL, interlökin; TNF- $\alpha$ , tümör nekroz faktörü-alfa; TGF- $\beta$ , dönüştürücü büyüme faktörü-beta; NKT, doğal öldürücü T; DC, dendritik hücre; Th, T yardımcı; GATA3, GATA bağlayıcı protein 3; IRF4, interferon düzenleyici faktör 4; PU.1, purin açısından zengin PU-kutusu bağlayıcı protein; FOXP3, Forkhead kutusu proteini 3 (Yeshi ve diğerleri 2020).

### 2.2.1. Ülseratif kolitte genetik faktörler

ÜK kalın bağırsagın mukoza ve submukozasının inflamasyonudur (Kopiasz ve diğerleri 2021). ÜK, kanlı ishal ve karın ağrısı ile karakterize kronik tekrarlayan bir hastalıktır

(Pagano ve diğ erleri 2019).   K'nin patogenezi, epitelyal bariyer, kommensal mikroflora, antijen tanıma, imm unolojik yanıtların düzensizliğı, lökosit alımı ve genetik faktörler dahil olmak üzere bağırsağıın birçok bileşeniyle ilgili immüno-inflamatuar yollardan oluşur (Tatiya-Aphiradee ve diğ erleri 2018). Antijen sunan hücreler (dendritik hücreler ve makrofajlar), T yardımcı hücreleri, düzenleyici T hücreleri ve doğıal  ld r c  T hücreleri dahil olmak üzere çeşitli hücre türleri, inflamasyonun düzenlenmesi, baskılanması ve sürdürülmesi ile   K patogenezinde çok önemli bir rol oynar (Shouval ve diğ erleri 2017). Ayrıca sitokin ağıları, hücre iletişimi için vazgeçilmez olan sinyalleşme işlevi nedeniyle önemli bir parça haline gelir. Proinflamatuvar sitokinler [tümör nekroz faktörü- , interlökin (IL)-1, IL-6, IL-9, IL-13 ve IL-33] yukarı regülasyon da önemli roller oynarken, anti-inflamatuar sitokinler (dönüştürücü büyüme faktörü- , IL-10 ve IL-37) hastalık ilerlemesinin aşağı regülasyonunda önemli roller oynar (Gundersen ve diğ erleri 2016).   K'nin patogenezinin bağırsak mukozal hasar ve bağışıklık sistemi dengesizliğı sebep olmakla beraber (Neurath 2014, Liu ve diğ erleri 2022) halen hastalığın altında yatan moleküler mekanizmalar açıklanamamıştır.   K'nin ana terapötik stratejileri, hasarlı bağırsak mukozasını onarmak ve/veya inflamasyonu baskılamaktır. Mukozal iyileşme ve epitel hücre onarımının   K'nin n ks oranını azaltabileceğıne dikkat çekilmiştir (Boal Carvalho ve Cotter 2017). Bu nedenle iltihabı hafifletmenin ve bağışıklık sistemini düzenlemenin yanı sıra, hasar görmüş bağırsak mukozasını onarmak da   K tedavisinde etkili bir stratejidir (Wang ve diğ erleri 2019).

Son araştırmalar, bağırsak hücrelerinin  oğıalmasını, otofajisini ve apoptozunu düzenleyen faktörler arasında TLR 4, TLR 5 ve TLR 9 gibi membran Toll benzeri reseptörler (TLR'ler) ve Dectin-1 reseptörü yer almaktadır (Lu ve diğ erleri 2018, Kopiasz ve diğ erleri 2021). TLR'lerin ve Dectin-1 reseptörlerinin aktivasyonu, bağışıklık tepkisini uyarır. TLR'lerin eksikliğı, bağırsak epitel hücrelerinin  oğıalmasını ve farklılaşmasını engelleyerek bağırsak epitelinin yeniden yapılanmasını etkileyen apoptozu artırır (Burgue o ve Abreu 2020). Bu durum, İBH'nin tedavisi açısından oldukça önemlidir ve kronik inflamasyon nedeniyle, bağırsak epitel hücreleri yüksek seviyelerde reaktif oksijen türlerinin (ROS) neden olduğı hasara karşı savunmasızdır. Ayrıca, immün hücreler tarafından proinflamatuvar sitokinlerin artan salgılanmasının bir sonucu olarak, bağırsak bariyerinin ge irgenliğı artar (Sussman ve diğ erleri 2014).

Anahtar bir transkripsiyon faktörü olan nükleer faktör-kappa B (NF-kB),   K gelişimi ve patogenezi ile ilişkili olduğı düşünülen TNFa, IL1  ve IL6 gibi proinflamatuvar sitokinleri

kodlayan genlerin transkripsiyonunu destekler (Yadav ve diğerleri 2003; Qp ve Bai 2011). Ayrıca, NF- $\kappa$ B'nin aktivasyonu, NLRP3'ün (Lamkanfi ve Dixit, 2014) transkripsiyonunu indükler. İBH hastalarının mukozal makrofajlarında ve kolonik epitel hücrelerinde bulunan (Grip ve diğerleri 2003) NF- $\kappa$ B'nin aktivasyonu, hem NF- $\kappa$ B hem de NLRP3 aksının, enflamatuvar barsak hastaları için yeni tedavilerin geliştirilmesinde potansiyel hedefler olabileceğini düşündürmektedir.

MikroRNA'lar, hedef mRNA'larının 3' ucuna bağlanarak gen ifadesini post-transkripsiyonel olarak düzenleyen küçük RNA molekülleridir ve genellikle bağışıklık yanıtlarının modülasyonu ile ilişkilendirilir (Saliminejad ve diğerleri 2019, Jung ve diğerleri 2021). Çoğu insan geninin düzenlenmesinde yer alırlar ve ÜK dâhil olmak üzere çeşitli otoimmün hastalıkların patogeneğinde işlevsellik göstermişlerdir (Zhou ve diğerleri 2021). miR466, bağışıklık yanıtlarını düzenleyen bir mikroRNA ailesidir. miR466'nın inflamatuvar süreçleri düzenleme ve bağışıklık hücrelerinin aktivasyonunda rol oynadığı bilinmektedir. Özellikle, miR466'nın TLR ve NF- $\kappa$ B yolakları ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Zhang ve diğerleri 2014). miR466'nın, TLR'leri aktive eden glikan modifikasyonları ile nasıl etkileştiği, inflamatuvar yanıtların düzenlenmesinde önemli bir potansiyele sahip olabilir. miR466 gen ailesinin, glikan modifikasyonları ve inflamatuvar yanıtlarla olan etkileşimi üzerine yapılan çalışmalar sınırlıdır. Ancak, bazı çalışmalar, miR466'nın bu süreçteki potansiyel rolünü vurgulamaktadır.

Literatürdeki çalışmalardan birinde, RAW264.7 fare makrofaj hücre hattında ve C57BL/6 erkek farelerinde yaptıkları çalışmada, miR-466 tarafından indüklenen TIRAP-MyD88-NF $\kappa$ B ekseninin inhibisyonun, makrofaj fenotipik anahtarın altında yatan mekanizmayı kısmen açıklayabilir olduğunu göstermişlerdir (Shi ve diğerleri 2021). Liu M ve diğerleri'nin rahim içi yapışıklıkları (IUA) olan 25 kadın ve normal doku ile dışı sıçanlarda yaptıkları çalışmada, miR-466'nın, AKT/NF- $\kappa$ B yolunu negatif olarak düzenlemek için NUS1'in 3'UTR bölgesine bağlandığını ve sonuçta IUA'ları inhibe ettiğini ortaya koymuşlardır (Liu ve diğerleri 2019). Feng Ma ve diğerleri'nin C57BL/6 farelerinde ve HEK293T, RAW264.7, and 3LL hücre hatlarında yaptıkları çalışmada, miR-466'nın, AUUUA pentamerleri ile karakterize edilen are motifiyle iyi tamamlayıcı dizisine sahip olduğu bulunmuş ve Hek293t'de ve RAW264.7 hücrelerinde IL-10 3'UTR'ye spesifik bir şekilde lusiferaz aktivitesini azaltırken LPS ile uyarılmış RAW264.7 hücrelerinde IL-10 3'UTR lusiferaz aktivitesini arttırdığını göstermişlerdir. Ayrıca miR-466, TTP Aracılı IL-10 mRNA bozulmasını antagonize ettiğini ve TLR ile tetiklenen makrofajlarda IL-10'un

düzenlenmesi miR-466l ve TTP tarafından yapılan düzenlemenin net etkisi olduğunu göstermişlerdir (Feng ve diğerleri 2010).

Proteinlerin ve lipidlerin glikosilasyonu, substrat biyopolimerlerine yeni fonksiyonlar, yapılar ve lokalizasyonlar sağlar. Bu nedenle, RNA üzerindeki bir glikanın, değiştirdikleri RNA polimerlerinin fonksiyonel yönlerini benzer şekilde kontrol edebileceği tahmin edilebilir (Flynn ve diğerleri 2021).

### **2.2.2. Çevresel faktörler**

Çevresel faktörler, ÜK'nin etiyolojisinde genetik yatkınlıkla birlikte önemli bir rol oynar. Çevresel faktörler, sigara içme, beslenme alışkanlıkları, mikroplarla temas ve stres gibi faktörleri içerir. Sigara içmek, ÜK'nin gelişimiyle ters bir ilişkiye sahipken, beslenme alışkanlıkları ve antibiyotik kullanımı gibi diğer çevresel faktörler, hastalığın ortaya çıkmasına katkıda bulunabilir (Ananthakrishnan ve diğerleri 2013).

Özellikle, batı tarzı beslenme, yüksek miktarda işlenmiş gıda, şeker ve doymuş yağ içerdiğinden, bağırsak mikrobiyomunu olumsuz etkileyebilir ve inflamasyonu artırabilir (Varela ve diğerleri 2016). Ayrıca, antimikrobiyal ilaçlar, bağırsak florasının dengesini bozarak bağışıklık sisteminin aşırı tepkisine neden olabilir (Khan ve diğerleri 2011).

### **2.2.3. İmmünolojik faktörler**

Ülseratif kolit, bağışıklık sisteminin bağırsak mukozasında normalde zararsız olan antijenlere aşırı yanıt vermesiyle gelişir. Bağışıklık sisteminin bu aşırı yanıtı, kolonun inflamasyonuna ve mukozal hasara yol açar. ÜK'de, Th2 tipi immün yanıt baskın olup, interlökin-4 (IL-4) ve interlökin-13 (IL-13) gibi sitokinlerin üretimi artar (Sartor 2006). Bu sitokinler, mukozal savunmayı bozar ve kolonun inflamasyonuna neden olur.

Ayrıca, T hücreleri ve dendritik hücreler, bağırsaklarda aşırı immün yanıtın tetiklenmesinde önemli bir rol oynar. Bu hücreler, mikroorganizmaların tanınmasını sağlayan Toll-like

reseptörler (TLR) gibi reseptörlere sahiptir. TLR'lerin aktivasyonu, NF- $\kappa$ B yolaklarını başlatarak inflamatuvar sitokinlerin üretimini artırır. Bu, bağırsak mukozasında uzun süreli inflamasyona yol açar (Akira ve diğerleri 2006).

Ayrıca, bazı çalışmalarda mikroflora ile bağışıklık sistemi arasındaki etkileşimin, ÜK'nin gelişiminde önemli bir rol oynadığı gösterilmiştir. Bağırsak mikrobiyotası, normal bağışıklık fonksiyonları için kritik öneme sahiptir. Mikrobiyomun bozulması, bağışıklık sisteminin aşırı yanıt vermesine neden olabilir ve bu da ÜK'nin gelişimine katkıda bulunur (Frank ve diğerleri 2007).

### 2.3. Ülseratif Kolitte *Pseudomonas aeruginosa*'nın Etkisi

Son yıllarda yapılan çalışmalar, mikrobiyomun İBH'nin gelişimindeki rolünü araştırmaktadır. Bağırsak mikrobiyotasındaki bozukluklar, inflamasyonun tetiklenmesine ve bağışıklık sisteminin aşırı reaksiyonuna yol açabilir. Özellikle, Firmicutes ve Bacteroidetes gibi bakteriyel grupların dengesizlikleri ve probiyotiklerin tedaviye olan etkisi üzerinde araştırmalar yapılmaktadır (Frank ve diğerleri 2007). Mikrobiyom ile ilgili yapılan çalışmalarda, İBH hastalarının bağırsaklarında daha az çeşitliliğe sahip bir mikrobiyom olduğu bulunmuştur. Bu durum, bağışıklık sisteminin bozulmuş tepkisini açıklayabilir (Manichanh ve diğerleri 2006).

*Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*), fırsatçı patojen olarak kabul edilir. Akut nozokomiyal enfeksiyonların en belirgin nedenlerinden birini oluşturur ve bağışıklık sistemi zayıf bireyleri etkiler.

Literatürdeki araştırmalarda, irritabl bağırsak sendromu (Kerckhoffs ve diğerleri 2011) veya ülseratif kolit (Wang M. ve diğerleri 2007) gibi İBH olan hastalarda bağırsak *P. aeruginosa* tespit oranlarının daha yüksek olduğu literatürdeki çalışmalarda gösterilmiştir. Ayrıca lipid A, *Pseudomonas* dahil Gram-negatif bakterilerden türetilen LPS'nin çekirdek kısmını oluşturur ve TLR4 yoluyla NF $\kappa$ B sinyalini aktive ederek pro-inflamatuvar sitokin gen ifadesinin artmasına yol açtığı gösterilmiştir (Korneev ve diğerleri 2015).

Grunau A. ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmalarında, bağırsak mikrobiyota bileşiminin fırsatçı patojenlere karşı konakçı direncini belirlediği göz önüne alındığında (Bereswill ve diğerleri 2011), TLR4 eksikliği olan IL10<sup>-/-</sup> ve IL10<sup>-/-</sup> genotipteki farelerin peroral yüklemeye maruz bırakılmasından önce intestinal bağırsak mikrobiyotasını araştırmayı amaçlamışlardır. Yaptıkları kültürel analizlerin sonucuna göre, saf, geleneksel olarak kolonileştirilmiş TLR4 eksikliği olan IL10<sup>-/-</sup> farelerin, IL10<sup>-/-</sup> kontrollere kıyasla iki kata kadar daha yüksek dışkı enterobakterileri barındırdığını ortaya çıkarmışlardır. Yüksek bağırsak fırsatçı patojenik yüklerinin yanı sıra, yalnızca MDR *P. aeruginosa* ile kolonize edilmiş TLR4 eksikliği olan IL10<sup>-/-</sup> fareleri, adaptif bağışıklık hücresi popülasyonlarının (kalın bağırsak mukozasında ve lamina propriada makrofajlar ve monositlerin yanı sıra T lenfositleri) yanı sıra doğuştan gelen sayıda da artış sergilediğini göstermişlerdir.

Grunau A. ve arkadaşlarının yaptıkları diğer bir çalışmada, TLR4 aracılı *P. aeruginosa*'nın, kolitsiz, sağlıklı sekonder abiyotik IL10<sup>-/-</sup> farelerde inflamatuvar yanıtları indüklediğini ortaya çıkarılmış ve bağışıklık hücrelerindeki bu artışlara, sırasıyla kolon ve MLN'de IFN- $\gamma$  ve TNF gibi pro-inflamatuvar sitokinlerin daha belirgin bağırsak salgısı eşlik ettiğini belirtmişlerdir.

#### 2.4. Glikan Modifikasyonlarının İnflamatuvar Yanıtlar Üzerindeki Etkisi

Glikanlar, hücre yüzeyinde bulunan glikoprotein ve glikolipidlerin yapısal modifikasyonları olarak tanımlanabilir ve bağışıklık yanıtlarını düzenleyen temel moleküller arasında yer alır. Glikan modifikasyonları, hücrelerin yüzey özelliklerini değiştiren ve bağışıklık hücrelerinin aktivasyonunu etkileyen önemli faktörlerdir. Glikanların, TLR ailesi ile etkileşime girerek inflamasyonun başlatılmasında önemli bir rol oynadığı düşünülmektedir. TLR'ler, bağışıklık hücrelerinin patojenleri tanıyan ilk savunma mekanizmalarıdır ve bağışıklık yanıtlarını düzenler (Akira ve diğerleri 2006). TLR'lerin aktive olması, NF- $\kappa$ B yolaklarını tetikler ve bu da inflamatuvar sitokinlerin üretimini artırır. Glikan modifikasyonlarının bu süreçte nasıl bir rol oynadığını anlamak, İBH'nin patogenezi üzerine önemli bilgiler sağlayacaktır.

Bağıışıklık sisteminin glikanlarla aktive edilmesi, NF-κB yolaklarının uyarılmasıyla sonuçlanabilir. NF-κB, hücre içinde bulunan ve inflamasyon süreçlerini düzenleyen bir transkripsiyon faktörüdür. Glikan modifikasyonları, TLR yolaklarını aktive ederek NF-κB'nin hücre çekirdeğine translokasyonunu sağlar ve böylece pro-inflamatuar sitokinlerin (IL-1, IL-6, TNF-α gibi) üretimi artar (Sartor 2006). Bu modifikasyonların, deneysel kolit modeli ile nasıl bir etkileşim gösterdiği, inflamasyon şiddetinin belirlenmesinde önemli bir rol oynayabilir.

## 2.5. Ülseratif Kolit ve Tedavi Stratejileri

ÜK tedavisi için yaygın olarak kullanılan bir immünosupresan olan Azathioprine (AZA)'nın çeşitli immün enflamatuar hücrelerin infiltrasyonunu azalttığı gözlemlenmiştir (Berruyer C ve diğerleri 2006; Wechsler JB ve diğerleri 2018). İn vivo çalışmalar, Tripterygium wilfordii polycoride (TWP) ve AZA'nın bağışıklık hücreleri üzerinde bir etkiye sahip olduğunu, ancak farklı bağışıklık düzenleme mekanizmalarına sahip olduklarını göstermiştir (Lyons DO ve Pullen NA 2020). TWP, VNN1 gibi proinflamatuar genleri hedefler ve AQP8 ve HMGCS2 gibi koruyucu genler üzerinde sınırlı düzenleyici etkiye sahiptir. AZA ise her üç geni de etkiler ve düzenler. Literatürdeki diğer bir çalışmada, ÜK bağırsağında nötrofil, monosit ve makrofaj gen ifadelerinin arttığı gösterilmiş ve uygulanan AZA tedavisi ile nötrofil, monosit ve makrofaj infiltrasyonunun önemli ölçüde azaldığını belirtilmiştir (Zhao ve diğerleri 2023).

Pirinç kepeği yağı (RBO), orizanol, tokotrienoller ve fenolik bileşikler gibi bol miktarda biyoaktif fitokimyasal kaynağıdır (Jariwalla 2001). Pirinç kepeğinden (100 mg/kg vücut ağırlığı) izole edilen fitosteril ferulatların bir karışımı olan γoryzanol'ün, TNF-α, IL-1β ve siklooksijenaz-2 (COX-2) gibi enflamatuar mediatörlerin gen ifadelerini azalttığı bildirilmiştir (Islam MS ve diğerleri 2008). RBO, antioksidan ve antiinflamatuar aktivitelerine ek olarak, hem in vitro hem de in vivo çalışmalarda kardiyovasküler hastalık riskini azaltma, kanseri önleme, kan kolesterolünü düşürme ve trombosit agregasyonunu inhibe etme gibi çeşitli sağlık yararlarına sahiptir (Nagasaka ve diğerleri 2007; Verschoyle ve diğerleri 2007; Saenjum ve diğerleri 2012). RBO özellikle diyet lifleri, γ-orizanol, esansiyel E vitamini kompleksi, tokotrienoller ve β-sitosterol açısından zengindir (Chotimarkorn ve diğerleri 2008). γ-Oryzanol, pirinç kepeği yağında bulunan ve bu sağlık

yararlarının sağlanmasında hayati bir rol oynayan biyoaktif bir bileşiktir (Sirithunyalug ve diğerleri 2018).  $\gamma$ -orizanolün akut toksik dozu, sıçanlarda ve farelerde 25 g/kg vücut ağırlığının üzerindedir (Tsushimoto ve diğerleri 1991). Bununla birlikte, iki yıl boyunca günde 2 g/kg vücut ağırlığı dozunda  $\gamma$ -orizanol tüketiminin sıçanlarda güvenli ve kanserojen olmadığı gösterilmiştir (Tamagawa ve diğerleri 1992). Bu nedenle, RBO birçok ülkede gıda takviyesi olarak ticarileştirilmiştir.

Literatürde bulunan çalışmalarda, pirinç kepeğinden elde edilen ekstraktların, antioksidan, kemopreventif, antiinflamatuvar, antimutajenik ve antikarsinojenik özelliklere sahip biyolojik olarak aktif bileşikler içerdiğini göstermiştir (Hudson ve diğerleri 2000; Nam ve diğerleri 2005; Srisala ve diğerleri 2009). Reddy ve diğerleri (2014) yaptığı çalışmada, dişi wistar sıçanlarından (n=40) kolit olmayan grup, kontrol, RBO ve bahçe tere tohumu yağı (GCO) olmak üzere 4 farklı grupta çalışılmış ve 7 hafta boyunca %10 seviyesinde ilgili yağlarla takviye edilmiş izokalorik standart diyet (AIN-93) ile beslenilmiştir. Sıçanlarda 220±10 g vücut ağırlığına ulaşıldıktan sonra, 5 gün boyunca %5 DSS içme suyuna eklenmiş ve ardından 5 gün daha %2 oranında DSS verilerek ÜK indüklenmiştir. Kolitin seyri sırasındaki hastalık aktivite indeksi (DAI), vücut ağırlığı kaybı, ishal ve büyük rektal kanama gibi üç klinik özellikten oluşan dört noktalı bir ölçek kullanılarak ölçülmüş. RBO grubu, kontrol grubuyla karşılaştırıldığında 3. günden 10. güne kadar DAI skorunda anlamlı düşüş gösterdi (p <0.01). Sonuçları, RBO'nun sıçanlarda deneysel olarak indüklenen kolitte oksidatif olayları hafiflettiğini, inflamatuvar mediatörleri baskıladığını ve kolondaki hasarı azalttığını göstermiştir.

Lo, H ve diğerleri yaptığı çalışmada, pirinç kepeği (RBE) ve tam tahıllı adlay tohumlarının (ADE) etanol ekstraktlarının ÜK'de inflamasyon, oksidatif stres ve kolonik hasar üzerindeki etkilerini araştırmayı amaçlamışlardır. Bu çalışmada erkek C57BL/6JNarl fareleri kullanılmış ve ÜK'yi indüklemek için iki kez rektal olarak 2,4-dinitrobenzen sülfonik asit enjekte edilmiştir. ÜK fareleri, 21 gün boyunca RBE veya ADE ile desteklenen AIN-93M diyetiyle beslenmiş ve sonuçlarında, ÜK grubunun R grubuna kıyasla kolonda hastalık aktivite indeksinin, plazma interlökin (IL)-6 ve glutatyon seviyelerinin, mikroskobik hasar skorlarının ve kolondaki inflamatuvar sitokin ve kemokin seviyelerinin arttığını ve kolonik kladin-4'ün azaldığını göstermişlerdir. RBE ve ADE takviyesi, ÜK'de yükselmiş plazma IL-6'yı, kolonik glutatyonu, proinflamatuvar sitokinleri ve bir kemokin'i önemli ölçüde

azalttığını belirtmişlerdir. Çalışmalarından elde ettikleri bu sonuçlar, RBE ve ADE'nin kolonik inflamasyonu, oksidatif stresi ve ÜK nüksetmesindeki hasarı azaltabileceğini göstermektedir (Lo ve diğerleri 2022).

Miao, S ve diğerleri yaptıkları çalışmada, pirinç kepeğinden ekstrakte edilen bir tür uzun zincirli yağlı alkol olan Octacosanol (Oct), ÜK hafifletilmesi üzerindeki etkilerini incelemeyi amaçlamışlardır. Oct, DSS ile indüklenen farelere oral olarak 10 mg/kg (Oct-L) ve 30 mg/kg (Oct-H) dozlarında uygulanmıştır. Oral uygulamasının kilo kaybını, kolon kısalmasını önemli ölçüde önleyebildiğini ve hastalık aktivite indeksi (DAI) skorunu azaltabildiğini bildirmişlerdir. Sonuç olarak, Oct-H'nin klinik semptomları hafifletebilmesi, bağırsak bakterilerini modüle edebilmesi ve ÜK farelerinde bağırsak bariyerini koruyabilmesi, Oct-H'nin ÜK'yi hafifletmede bir gıda takviyesi olarak potansiyelini ortaya koymakta olduğunu belirtmişlerdir (Miao ve diğerleri 2022).



### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma Gazi Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan alınan izinle (Tarih:19.01.2024, Sayı: 01) ve Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi desteği (TDK 2024-9312) ile yürütüldü. Gazi Üniversitesi Laboratuvar Hayvanları Yetiştirme ve Deneysel Araştırma Merkezinde 80 adet erkek C57Bl/6 farelerinin deneyleri başlatıldı. Ardından alınan örnekler deneylerin yapılması için Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Araştırma Laboratuvarlarına götürüldü. Deneyler, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Araştırma Laboratuvarlarında yapıldı.

#### 3.1. Gereçler

##### 3.1.1. Cihazlar

- Buzdolabı (Altus)
- Derin dondurucu, -86°C (Sanyo)
- Hassas terazi (Precisa)
- Isıtıcı blok (Biosan)
- Etüv (Sanyo)
- Mikropipetler (Dragonlab, Isotherm)
- pHmetre (Isolab)
- Santrifüj (Hettich Mikro 22R)
- Spin vorteks (Biosan)
- Nanodrop (Thermo)
- Qiagen rotor-gene-Q aleti (Qiagen GmbH)

##### 3.1.2. Sarf malzemeleri

- Lamlar
- Mikrosantrifüj tüpleri (2ml, 1,5ml, 0,2ml)
- Pipet
- Pastör pipetler (1,5ml, 3ml)

- Pipet uçları
- Santrifüj tüpleri (15ml)
- Petri kabı
- Öze, Tek Kullanımlık, Plastik PS, 1µl
- Ultrafree MC Santrifüj Filtre birimleri

### 3.1.3. Kimyasallar ve kitler

- **RNA izolasyonu** için kullanılan malzemeler:
  - Zirkon boncuk (İsolab)
  - Trizol (Sigma)
  - Kloroform (Tekkim)
  - İzopropanol (İsolab)
  - Etanol (Tekkim)
  - Elution Buffer (Thermo Scientific)
- **cDNA sentez kiti** (SOLIScript RT cDNA synthesis KIT)
  - oligo primerler (A.B.T)
  - dNTP mix
  - RT reaksiyon buffer
  - reverse transkriptaz(200 U/µl)
  - RNase inhibitörü
- Formaldehit (Tekkim)
- Fosfat Tamponlu Tuz (PBS) (A.B.T)
- Dextran Sülfat Sodyum (DSS)
- Azathioprine (Aspen)
- Mannaz (Merck)
- Dimetil Sülfoksit (DMSO) (A.B.T)
- Eosin methylene blue agar (Merck)
- in vivo-jetPEI® (Polyplus)
- SYBR ana karışımı (Bioline sensiFAST SYBR 2×; Bioline Reagents Ltd.)
- Ketamine (Tekkim)
- Xylazin (Tekkim)
- Eozin (Moslab)

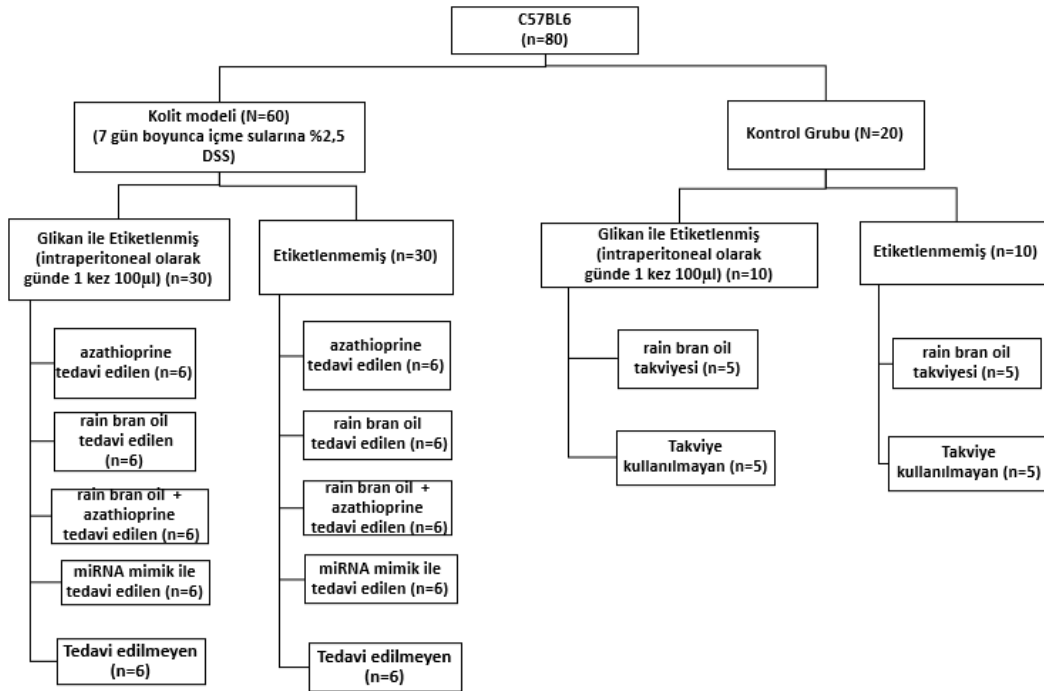
- Hematoksilen (Moslab)
- Parafin (Moslab)
- Ksilol (Moslab)
- Entellan (Moslab)

### 3.2. Deneysel Kolit İndüksiyonu ve Çalışma Tasarımı

8-12 haftalık C57BL/6 erkek fareleri (n=80) kullanıldı. Deneysel kolit indüksiyonu, çalışma tasarımı ve her gruptaki hayvan sayıları Şekil 3.1’de gösterilmiştir.

### 3.3. Kolit İndüklenmesi

Ülseratif kolit fare modeli, DSS ile indüklenmiştir. Akut ülseratif kolit modeli oluşturmak için farelere 7 gün boyunca %2,5 DSS içeren içme suyu, 7 günün ardından 2 gün steril DSS içermeyen su verilmiştir. Kontrol grubunda farelere her gün DSS içermeyen içme suyu verildi (Wu, Y. ve diğerleri 2023).



Şekil 3.1: Deneysel kolit indüksiyonu ve çalışma tasarımı

### 3.4. Glikan ile Etiketlenme

ManNAz, 100 mg ManNAz'ın 830 uL %70 DMSO içinde fosfat tamponlu salin (PBS) içinde çözülmesi, 37°C'de 5 dakika ısıtılması ve ardından 0.22 um Ultrafree MC Santrifüj Filtre birimleri (Fisher Scientific) kullanılarak steril filtreleme yoluyla hazırlandı; bu çözelti -20°C'de saklandı. Erkek C57BL/6 farelerine (8-12 haftalık) intraperitoneal olarak günde bir kez 100 uL ManNAz (300 mg ManNAz/kg/gün dozunda) enjekte edildi. (Flynn, R. A ve diğerleri 2021).



Resim 3.1. C57/Bl6 farelerine glikan enjeksiyonu intraperitoneal olarak uygulandı.

### 3.5. Azathioprine ve Pirinç Kepeği Yağı ile Tedavi

Yedi günlük kolit modelinin oluşumunun ardından, fareler rastgele 6 farklı gruba (n=6) ayrıldı. Bu gruplar; glikan ile etiketlenmiş (günde 1 kez 10 ul glikan intraperitoneal enjeksiyon), Glikan ile etiketlenmiş azathioprine(0,01 mL/g AZA gavaj yoluyla) + RBO (1 ml/kg oral yoluyla) tedavi edilen, Glikan ile etiketlenmiş RBO (oral yoluyla) tedavi edilen, Glikan ile etiketlenmiş azathioprine (0,01 mL/g AZA gavaj yoluyla) tedavi edilen, Etiketlenmemiş azathioprine (0,01 mL/g AZA gavaj yoluyla) + RBO (oral yol ile) ile Tedavi edilen, Etiketlenmemiş RBO (oral yoluyla) ile Tedavi edilen ve Etiketlenmemiş azathioprine (0,01 mL/g AZA gavaj yoluyla) tedavi edilen şeklindedir. Tedavi gruplarına verilen dozalar literatürde yer alan önceki araştırmalardan belirlenmiştir (Tanideh, N. ve diğerleri 2020; Zhao, D. ve diğerleri 2023).

### 3.6. miR-466 Mimiklerinin Hazırlanması ve in vivo Tedavisi

Antisense miR-466l (5'ATGTGTGTTGCGTGTATGTAT3') ve negatif kontrol (5'AAACGTGACACGTTTCGGAGAA3') taklitleri sentezlenerek özel olarak sipariş edilmiştir. Antisense miR-466l ve miR-NC-antisense, transfeksiyon reaktifi olarak kullanılan in vivo-jetPEI® (Polyplus) aracılığı ile üreticinin protokolüne uygun bir şekilde intraperitoneal enjeksiyonla uygulanmıştır (Singh, R. ve diğerleri 2021).



Resim 3.2. C57/Bl6 farelerine antimiRNA enjeksiyonu intraperitoneal olarak uygulandı.

### 3.7. Örneklerin Toplanması ve Değerlendirmesi

Terapötik etkileri değerlendirmek için dışkı, kan ve dokular (kolon-karaciğer) toplanılmıştır. Dışkı kolit indüklenmeden önce, kolit indükledikten sonra ve son olarak tedavinin ardından toplanılmıştır. Vücut ağırlığı günlük olarak kaydedilmiştir.

Son uygulamadan iki gün sonra 20. günde tedavi sonlandırılmıştır ve hayvanlara derin anestezi altında Ketamine (45 mg/kg; im) + Xylazin (5 mg/kg; im) kombinasyonu kullanılarak ötenazi yapıldı (Resim 3.7.1). Dokuların (kolon, karaciğer) bir kısmı, daha fazla moleküler analiz için -80°C'de saklandı. Dokuların kalan kısımları histolojik analiz için %10 formaldehit içinde tutuldu. Toplanan kolon dokularının uzunluğu, kolonun alınmasından hemen sonra anüsten çekuma kadar ölçülmüştür.

Hastalık Aktivite İndeksi (DAI), üç klinik parametreye dayalı olarak hesaplandı: kilo kaybı, dışkı kıvamı ve rektal kanama. Her bir parametre 0 ile 4 arasında bir ölçekte puanlanmıştır. Detaylar çizelge 3.7.1'de belirtilmiştir. Toplam DAI puanı, bu üç parametrenin puanlarının

toplanmasıyla hesaplandı. Bu indeks, kolitin şiddetini ayrıca antimiR-466l ve RBO tedavisinin NF-kB/TLR/IL sinyal yolağındaki etkisini değerlendirmek için kullanıldı.



Resim 3.3. C57/Bl6 farelerine ketamine ve xylazin kombinasyonu kullanılarak ötenazi yapıldı.

Çizelge 3.1. DAI parametreleri

| Parametre            | Puan                           |
|----------------------|--------------------------------|
| <b>Kilo Kaybı</b>    | 0 Kilo kaybı yok               |
|                      | 1 %1-5 kilo kaybı              |
|                      | 2 %5-10 kilo kaybı             |
|                      | 3 %10-15 kilo kaybı            |
|                      | 4 >%15 kilo kaybı              |
| <b>Dışkı Kıvamı</b>  | 0 Normal Dışkı                 |
|                      | 1 Yumuşak Dışkı                |
|                      | 2 Çok yumuşak dışkı            |
|                      | 3 Yarı sıvı dışkı              |
|                      | 4 Sulu ishal                   |
| <b>Rektal Kanama</b> | 0 Kanama yok                   |
|                      | 1 Mikroskobik kanama           |
|                      | 2 Hafif görünen kanama         |
|                      | 3 Orta Derecede görünen kanama |
|                      | 4 Şiddetli görünen kanama      |

### 3.8. Histokimyasal İnceleme

Formaldehit içerisine alınan kolon ve karaciğer dokuların histokimyasal inceleme yapıldı. İlk olarak kasetler içerisine alınan dokular akan suyun altında 5-6 saat beklenilerek yıkanması sağlandı. Ardından doku takip cihazına alındı (Çizelge 3.8.1).

Çizelge 3.2. Doku takip cihazı program süreleri

| <b>Tank Numarası</b> | <b>İçeriği</b> | <b>Süresi</b> |
|----------------------|----------------|---------------|
| <b>1</b>             | Distile su     | 1             |
| <b>2</b>             | %70'lik Etanol | 1             |
| <b>3</b>             | %80'lik Etanol | 1             |
| <b>4</b>             | %96'lik Etanol | 1             |
| <b>5</b>             | %96'lik Etanol | 1             |
| <b>6</b>             | %96'lik Etanol | 1             |
| <b>7</b>             | %96'lik Etanol | 1             |
| <b>8</b>             | Ksilol         | 1             |
| <b>9</b>             | Ksilol         | 1             |
| <b>10</b>            | Ksilol         | 1             |
| <b>11</b>            | Parafin        | 1             |
| <b>12</b>            | Parafin        | 1             |

Süre sonunda cihazdan alınan dokular parafine gömüldü ve 1 gece boyunca donması için bekletildi. Mikrotom cihazı kullanılarak ilk 20 mikron kesimler ile başlandı, dokuya ulaşıldığında 5 mikron kesit alınarak su sıcaklığı 40° derece olan sıcak su banyosuna bırakıldı ve ardından lam üzerine alındı. Tüm dokularda bu işlemler yapıldı ve parafinin erimesi için lamlar 56° derecelik etüvde 1 gece boyunca bekletildi. Ardından hematoksil-eozin boyama yapılarak (Çizelge 3.8.2) mikroskop altında gözlemlendi ve fotoğraflandı.

Çizelge 3.3. Hematoksil-eozin boyama yöntemi

| <b>Sıra</b>                                       | <b>Solüsyon</b>         | <b>Süre</b> | <b>Sıra</b> | <b>Solüsyon</b> | <b>Süre</b> |
|---------------------------------------------------|-------------------------|-------------|-------------|-----------------|-------------|
| <b>1</b>                                          | Ksilol                  | 10 dk       | <b>11</b>   | Akar su         | 10 dk       |
| <b>2</b>                                          | %100 Etanol             | 10 dk       | <b>12</b>   | Eozin           | 10 dk       |
| <b>3</b>                                          | %96 Etanol              | 10 dk       | <b>13</b>   | %50 Etanol      | 30 sn       |
| <b>4</b>                                          | %80 Etanol              | 10 dk       | <b>14</b>   | %70 Etanol      | 30 sn       |
| <b>5</b>                                          | %70 Etanol              | 10 dk       | <b>15</b>   | %80 Etanol      | 30 sn       |
| <b>6</b>                                          | %50 Etanol              | 10 dk       | <b>16</b>   | %96 Etanol      | 30 sn       |
| <b>7</b>                                          | Akar su                 | 10 dk       | <b>17</b>   | %100 Etanol     | 30 sn       |
| <b>8</b>                                          | Harris Hematoksil-eozin | 10 dk       | <b>18</b>   | Ksilol          | 10 dk       |
| <b>9</b>                                          | Akar su                 | 10 dk       | <b>19</b>   | Ksilol          | 10 dk       |
| <b>10</b>                                         | Asit-Alkol              | 30 sn       |             |                 |             |
| <b>Entellan ile lam üzeri lamel ile kapatılır</b> |                         |             |             |                 |             |

### **3.9. RNA izolasyonu**

#### **3.9.1. Kan örneklerinden RNA izolasyonu**

Kan örnekleri +4°C'de saklandı. RNA izolasyonu için manuel izolasyon protokolü uygulandı. Homejenizasyonu hızlandırmak için zirkon boncuklar kullanıldı. Mikrosantrifüj tüp içerisine alınan zirkon boncukların üzerine EDTA'lı tüp içerisinde bulunan kan örneğinden 300 µl eklendi. Üzerine 1000 µl'yi tamamlayacak şekilde trizol ilave edildi. Homojenizatör cihazında 4000 rpm'de 20 sn homojenize edildi. Ardından faz ayrımı oluşması için 200 µl kloroform eklenip vortekslendi ve 3 dk oda sıcaklığında inkübe edildi. İnkübasyonun ardından 12000 g'de 15 dk boyunca santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında 3 ayrı faz oluşumu görüldü. Üst faz yeni tüpe alınırdır ve RNA'nın çökmesi için üzerine -20°C'de bekletilen izopropanolden 500 µl eklendi ve -20°C'de 10 dakika inkübe edildi. İnkübasyonun ardından 12000 g'de 10 dk santrifüj edildi. Santrifüj ardından süpernatant atılarak pelet üzerine %75'lik etanolden 100 µl eklendi. Tekrar 12000 g'de 10 dk santrifüj edildi. Süpernatant atıldı ve pelet kuruması için 5 dk oda sıcaklığında inkübe edildi. Ardından 50 µl elution buffer eklendi. İzolasyon sonunda elde edilen örnekler çalışılncaya kadar -20°C'de saklandı.

#### **3.9.2. Doku Örneklerinden RNA izolasyonu**

Doku örnekleri -20°C 'de saklandı. RNA izolasyonu için manuel izolasyon protokolü uygulandı. Homejenizasyonu hızlandırmak için zirkon boncuklar kullanıldı. Mikrosantrifüj tüp içerisine alınan zirkon boncukların üzerine doku örneğinden bir parça kesildi ve üzerine 1000 µl trizol eklendi. Homojenizatör cihazında 4000 rpm'de 20 sn homojenize edildi. Bu aşama 3 kere tekrar edildi. Ardından faz ayrımı oluşması için 200 µl kloroform eklenip vortekslendi ve 3 dk oda sıcaklığında inkübe edildi. İnkübasyonun ardından 12000 g'de 15 dk boyunca santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında 3 ayrı faz oluşumu görüldü. Üst faz yeni tüpe alınırdır ve DNA'nın çökmesi için üzerine -20°C'de bekletilen izopropanolden 500 µl eklendi ve -20°C'de 10 dakika inkübe edildi. İnkübasyonun ardından 12000 g'de 10 dk santrifüj edildi. Santrifüj ardından süpernatant atılarak pelet üzerine %75'lik etanolden 100 µl eklendi. Tekrar 12000 g'de 10 dk santrifüj edildi. Süpernatant atıldı ve pelet kuruması için

5 dk oda sıcaklığında inkübe edildi. Ardından 50 µl elution buffer eklendi. İzolasyon sonunda elde edilen örnekler çalışılncaya kadar -20°C’de saklandı.

### 3.10. cDNA Sentezi

Elde edilen RNA'ların saflığı ve konsantrasyonları Nanodrop cihazında spektrofotometrik yöntemiyle ölçüldü. cDNA sentez kitinin (SOLIScript RT cDNA synthesis KIT) protokolü izlendi. İçerisinde, 1 µl oligo primer, 0,5 µl dNTP mix, 2 µl RT reaksiyon buffer, 1 µl reverse transkriptaz (200 U/µl) 0,1 ul RNase inhibitörü eklenerek karışım hazırlandı. Nanodrop’ta ölçülen RNA konsantrasyonlarına göre örneklerden alınacak miktar belirlendi ve total hacim 20 µl olacak şekilde distile su ile tamamlandı.

Thermal Cycler’da 3 dakika 25°C’de, 15 dakika 50°C’de ve 5 dakika 85°C’de ayarlanmasıyla sentezlendi. Numuneler çalışılncaya kadar -20°C’de saklanmıştır.

Çizelge 3.4. cDNA Reverse transkriptaz kiti bileşenleri ve miktarları

| Bileşenler                  | Miktar   |
|-----------------------------|----------|
| <b>Total RNA</b>            | Değişken |
| <b>Oligo primer</b>         | 1 µl     |
| <b>dNTP mix</b>             | 0,5 µl   |
| <b>RT reaksiyon buffer,</b> | 2 µl     |
| <b>Reverse transkriptaz</b> | 1 µl     |
| <b>RNase inhibitörü</b>     | 0,1 µl   |
| <b>Total Hacim</b>          | 20 µl    |

### 3.11. Kantitatif (q)PCR kullanılarak mRNA seviyelerinin miktarının belirlenmesi

Bu çalışmada bir referans gen olmak üzere TLR ve IL gen ailesinden seçtiğimiz genler ile NF-κB ve miR466 gen ailesinin gen ifade seviyeleri ölçülmüştür. Üreticinin talimatlarına göre gerekli adımlar takip edilmiştir: Toplam 15 µl karışım hazırlanıp; her numune 4,5 µl su, 0,5 µl primer çifti, 10 µl SYBR ana karışımı (Bioline sensiFAST SYBR 2×; Bioline Reagents Ltd.) içerir. Nihai hacim, 5 ul cDNA eklenerek 20 ul’ye tamamlanmıştır. Daha sonra, Qiagen rotor-gene-Q aleti (Qiagen GmbH) kullanılarak 40 döngü qPCR gerçekleştirildi ve ısı döngü koşulları aşağıdaki çizelge 3.10.3’te belirtilmiştir. Deneyler üç kopya halinde gerçekleştirilmiştir. Referans geni olarak β-aktin geni kullanılmıştır.

Çizelge 3.5. RT-qPCR kit bileşenleri ve miktarları

| Bileşenler          | Derişim                   | Miktar |
|---------------------|---------------------------|--------|
| <b>SYBR</b>         | 2x Mastermix (1,5) buffer | 10 µl  |
| <b>Primer çifti</b> | Forward-Reverse           | 5 µl   |
| <b>cDNA</b>         | 10-50 ng                  | 5 µl   |
| <b>Toplam Hacim</b> |                           | 20 µl  |

Çizelge 3.6. Çalışmada incelenen genlere ait Forward - Reverse primer dizileri

| GEN            | Forward                      | Reverse                                      |
|----------------|------------------------------|----------------------------------------------|
| <b>IL10</b>    | 5' TGTCTAGGTCCTGGAGTCCA      | 5' GGTGAGAAGCTGAAGACCCCT                     |
| <b>IL6</b>     | 5' GGTCTTGGTCCTTAGCCAC       | 5' GCCAGAGTCCTTCAGAGAGA                      |
| <b>NF- kB</b>  | 5' GCTGCCAAAGAAGGACACGACA    | 5' GGCAGGCTATTGCTCATCACAG                    |
| <b>TLR4</b>    | 5' AGCTTCTCCAATTTTTCAGAACTTC | 5' TGAGAGGTGGTGTAAGCCATGC                    |
| <b>miR466l</b> | 5' ACAGCATATAAATACATGCACA    | 5'GTCGTATCCAGTGCAGGGCCGAGGTATTCGCACTGGATACGA |

Çizelge 3.7. RT-qPCR işlem basamakları

| PCR Aşaması           | İşlem        | Sıcaklık/Derece     | Tekrar |
|-----------------------|--------------|---------------------|--------|
| <b>Başlangıç</b>      | Denatürasyon | 95°C -5dk           | 1      |
| <b>PCR Aplikasyon</b> | Denatürasyon | 95°C-10sn           | 40     |
|                       | Bağlanma     | 57-65°C-30sn(Okuma) |        |
| <b>Sonlandırma</b>    | Erime        | 95°C-10sn           | 1      |
|                       |              | 65°C-5sn            | 1      |
|                       |              | 95°C-5sn            | 1      |

### 3.12. *Pseudomonas aeruginosa* 'nın Kültürel Analizi

*P. aeruginosa* kolonizasyon özelliklerinin kantitatif değerlendirmesi için mide, duodenum, ileum ve kolon gibi gastrointestinal sistemin farklı kısımlarından elde edilen dışkı ve luminal numuneler steril PBS içerisinde homojenleştirildi. Seri seyreltmeler, Eosin methylene blue agar üzerine ekilmiştir ve aerobik atmosferde 37 °C'de en az 36 saat boyunca inkübe edilmiştir (Grunau, A. ve diğerleri 2017).

### 3.13. Genlerin Primer Tasarımı

Primer tasarımları tarafımızdan gerçekleştirilmiş olup, Primer Blast (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) kullanılarak oluşturulmuştur.

### **3.14. İstatiksel Analiz**

Gruplar arası mRNA gen ifade seviyeleri, SPSS 22.0 (IBM Corp.) ve GraphPad 8.0.2'nin ücretsiz demo versiyonları kullanılarak Kruskal Wallis-H testi ile analiz edilmiştir. Kruskal Wallis-H analizinden sonra hangi grupların anlamlı farklılığa neden olduğunu belirlemek için tamamlayıcı kıyaslama teknikleri kullanılmıştır.  $P < 0.05$  istatistiksel olarak anlamlı bir fark olarak kabul edilmiştir.



## 4. BULGULAR

### 4.1. Deney Hayvan Gruplarında DAI puanları ve Kolon Uzunlukları

Deney hayvan gruplarında DSS verilerek kolit indüklendikten sonra toplam DAI puanı hesaplanmış ve çizelge 4.1’de verilmiştir. Kolit şiddetinin en yüksek (DAI: 12) görüldüğü deney hayvanı ÜKG6’dır. Kolit şiddetinin en düşük (DAI: 2) görüldüğü deney hayvanları UC5, UC11 ve UC22’dir.

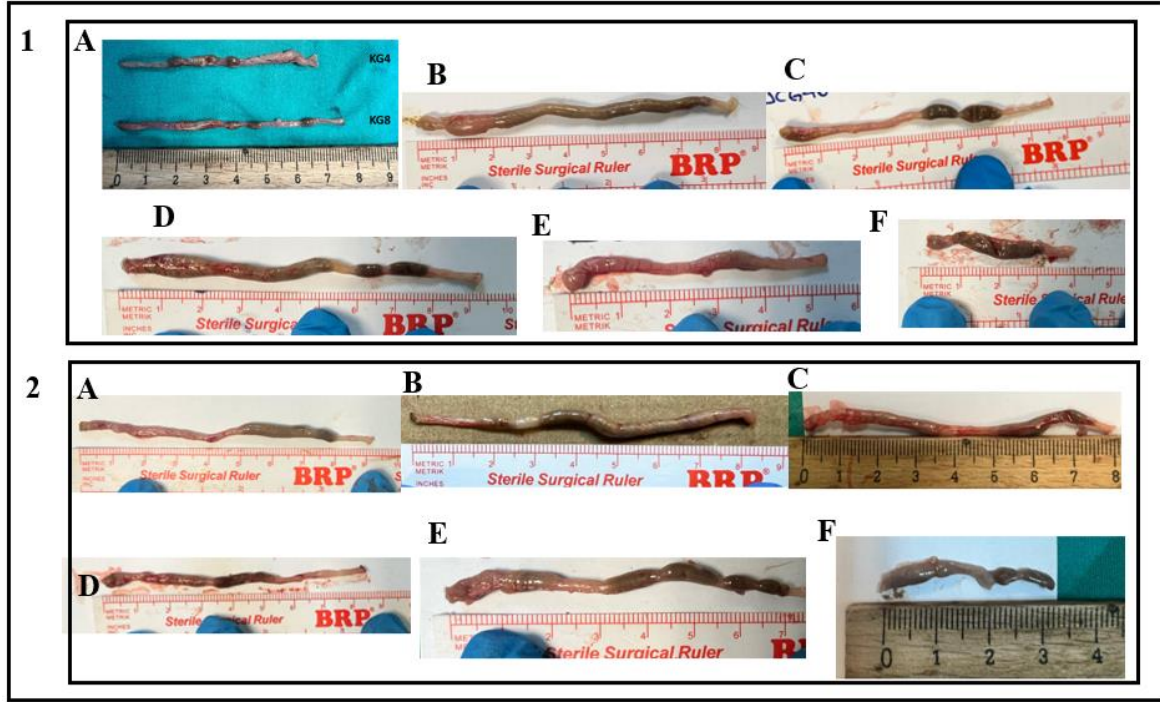
Çizelge 4.1. DSS ile kolit indüklenen deney hayvanlarındaki DAI puanı

|    | Deney Hayvanı | DAI Parametreleri |              |               | Toplam DAI Puanı | Deney Hayvanı | DAI Parametreleri |              |               | Toplam DAI Puanı |
|----|---------------|-------------------|--------------|---------------|------------------|---------------|-------------------|--------------|---------------|------------------|
|    |               | Kilo Kaybı        | Dışkı Kıvamı | Rektal Kanama |                  |               | Kilo Kaybı        | Dışkı Kıvamı | Rektal Kanama |                  |
| 1  | UC1           | 2                 | 2            | 2             | 6                | ÜKG1          | 2                 | 3            | 2             | 7                |
| 2  | UC2           | 1                 | 2            | 2             | 5                | ÜKG2          | 1                 | 1            | 2             | 4                |
| 3  | UC3           | 1                 | 1            | 2             | 4                | ÜKG3          | 2                 | 2            | 2             | 6                |
| 4  | UC4           | 3                 | 3            | 2             | 8                | ÜKG4          | 4                 | 3            | 3             | 10               |
| 5  | UC5           | 0                 | 1            | 1             | 2                | ÜKG5          | 4                 | 3            | 4             | 11               |
| 6  | UC6           | 2                 | 3            | 2             | 7                | ÜKG6          | 4                 | 4            | 4             | 12               |
| 7  | UC7           | 2                 | 3            | 3             | 8                | ÜKG7          | 4                 | 4            | 3             | 11               |
| 8  | UC8           | 0                 | 1            | 2             | 3                | ÜKG8          | 2                 | 2            | 3             | 7                |
| 9  | UC9           | 1                 | 2            | 0             | 3                | ÜKG9          | 2                 | 2            | 3             | 7                |
| 10 | UC10          | 1                 | 2            | 1             | 4                | ÜKG10         | 1                 | 2            | 2             | 5                |
| 11 | UC11          | 1                 | 0            | 1             | 2                | ÜKG11         | 4                 | 4            | 3             | 11               |
| 12 | UC12          | 1                 | 0            | 2             | 3                | ÜKG12         | 1                 | 1            | 1             | 3                |
| 13 | UC13          | 2                 | 2            | 2             | 6                | ÜKG13         | 1                 | 1            | 2             | 4                |
| 14 | UC14          | 2                 | 3            | 2             | 7                | ÜKG14         | 1                 | 2            | 2             | 5                |
| 15 | UC15          | 3                 | 3            | 2             | 8                | ÜKG15         | 3                 | 2            | 3             | 8                |
| 16 | UC16          | 1                 | 0            | 2             | 3                | ÜKG16         | 2                 | 2            | 2             | 6                |
| 17 | UC17          | 3                 | 3            | 2             | 8                | ÜKG17         | 1                 | 1            | 2             | 4                |
| 18 | UC18          | 1                 | 2            | 2             | 5                | ÜKG18         | 2                 | 2            | 2             | 6                |
| 19 | UC19          | 2                 | 2            | 1             | 5                | ÜKG19         | 3                 | 2            | 2             | 7                |
| 20 | UC20          | 3                 | 3            | 2             | 8                | ÜKG20         | 3                 | 2            | 2             | 7                |
| 21 | UC21          | 3                 | 3            | 3             | 9                | ÜKG21         | 3                 | 4            | 3             | 10               |
| 22 | UC22          | 0                 | 1            | 1             | 2                | ÜKG22         | 3                 | 3            | 3             | 9                |
| 23 | UC23          | 3                 | 2            | 3             | 8                | ÜKG23         | 2                 | 3            | 2             | 7                |
| 24 | UC24          | 3                 | 2            | 2             | 7                | ÜKG24         | 2                 | 2            | 2             | 6                |
| 25 | UC25          | 4                 | 3            | 4             | 11               | ÜKG25         | 4                 | 3            | 3             | 10               |
| 26 | UC26          | 4                 | 3            | 4             | 11               | ÜKG26         | 4                 | 4            | 3             | 11               |
| 27 | UC27          | 1                 | 2            | 2             | 5                | ÜKG27         | 4                 | 4            | 3             | 11               |
| 28 | UC28          | 3                 | 4            | 2             | 9                | ÜKG28         | 4                 | 4            | 3             | 11               |
| 29 | UC29          | 3                 | 3            | 2             | 8                | ÜKG29         | 4                 | 4            | 3             | 11               |

Ötenazinin ardından toplanılan kolon dokularının uzunluğu, kolonun alınmasından hemen sonra anüsten çekuma kadar ölçülmüştür (Çizelge 4.2) (Resim 4.1). Tedavi edilmeyen gruptaki kolon dokularının uzunluğu, tedavi edilen gruplardaki kolon dokularının uzunluğuna göre daha kısa olduğu görülmüştür.

Çizelge 4.2. Deney hayvanlarında ötenazinin ardından toplanan kolon dokularının anüsten çekuma kadar olan uzunluğu

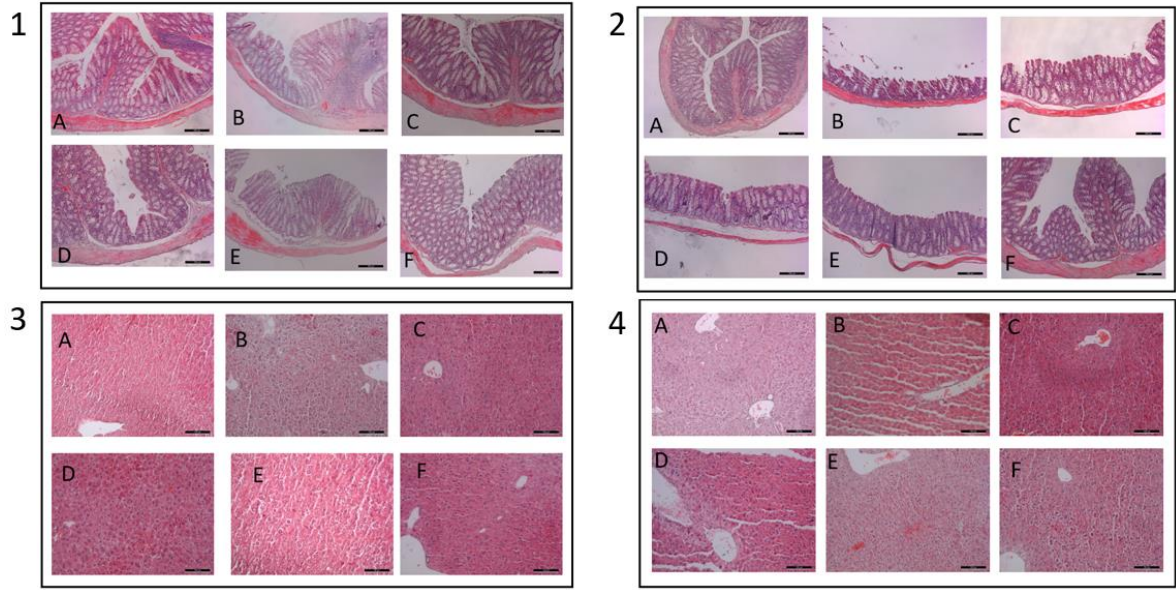
|    | Ülseratif Kolit | Deney Hayvanı | Kolon Uzunluğu (cm) | Ülseratif Kolit/Glikan Etiketli | Deney Hayvanı | Kolon Uzunluğu (cm) | Kontrol Grubu | Deney Hayvanı | Kolon Uzunluğu (cm) |
|----|-----------------|---------------|---------------------|---------------------------------|---------------|---------------------|---------------|---------------|---------------------|
| 1  | RBO             | UC1           | 8,3                 | RBO                             | ÜKG1          | 10,4                | RBO           | KX1           | 7,4                 |
| 2  |                 | UC2           | 8,6                 |                                 | ÜKG2          | 9,1                 |               | KX2           | 6,8                 |
| 3  |                 | UC3           | 8,9                 |                                 | ÜKG3          | 8,8                 |               | KX3           | 7,9                 |
| 4  |                 | UC4           | 9,9                 |                                 | ÜKG4          | 8,4                 |               | KX4           | 9,2                 |
| 5  |                 | UC5           | 9,4                 |                                 | ÜKG5          | 8,3                 | X             | KX5           | 7,4                 |
| 6  |                 | UC6           | 8,9                 |                                 | ÜKG6          | 8,4                 |               | KX6           | 9,2                 |
| 7  | AZA             | UC7           | 8,2                 | AZA                             | ÜKG7          | 7,8                 |               | KX7           | 9,5                 |
| 8  |                 | UC8           | 8,4                 |                                 | ÜKG8          | 8,7                 |               | KX8           | 8,9                 |
| 9  |                 | UC9           | 8,3                 |                                 | ÜKG9          | 9,2                 | Glikan + RBO  | KG2           | 7,9                 |
| 10 |                 | UC10          | 8,1                 |                                 | ÜKG10         | 7,7                 |               | KG3           | 7,1                 |
| 11 |                 | UC11          | 8,3                 |                                 | ÜKG11         | 7,9                 |               | KG4           | 6,8                 |
| 12 |                 | UC12          | 7,6                 |                                 | ÜKG12         | 9,6                 |               | KG5           | 7,5                 |
| 13 | RBO + AZA       | UC13          | 8,8                 | RBO + AZA                       | ÜKG13         | 9,3                 | Glikan        | KG6           | 8                   |
| 14 |                 | UC14          | 9,3                 |                                 | ÜKG14         | 9,2                 |               | KG7           | 8,4                 |
| 15 |                 | UC15          | 8,6                 |                                 | ÜKG15         | 9                   |               | KG8           | 7,6                 |
| 16 |                 | UC16          | 8,7                 |                                 | ÜKG16         | 9,3                 |               |               |                     |
| 17 |                 | UC17          | 9,6                 |                                 | ÜKG17         | 9                   |               |               |                     |
| 18 |                 | UC18          | 8,4                 |                                 | ÜKG18         | 5,3                 |               |               |                     |
| 19 | antimiRNA       | UC19          | 8,4                 | antimiRNA                       | ÜKG19         | 8,7                 |               |               |                     |
| 20 |                 | UC20          | 9,2                 |                                 | ÜKG20         | 8,4                 |               |               |                     |
| 21 |                 | UC21          | 9,7                 |                                 | ÜKG21         | 9,7                 |               |               |                     |
| 22 |                 | UC22          | 8,9                 |                                 | ÜKG22         | 9,7                 |               |               |                     |
| 23 |                 | UC23          | 8,6                 |                                 | ÜKG23         | 8,3                 |               |               |                     |
| 24 |                 | UC24          | 9,9                 |                                 | ÜKG24         | 9,1                 |               |               |                     |
| 25 | Tedavi yok      | UC25          | 3,2                 | Tedavi yok                      | ÜKG25         | 6,4                 |               |               |                     |
| 26 |                 | UC26          | 8,3                 |                                 | ÜKG26         | 6,8                 |               |               |                     |
| 27 |                 | UC27          | 5,4                 |                                 | ÜKG27         | 6,3                 |               |               |                     |
| 28 |                 | UC28          | 7,8                 |                                 | ÜKG28         | 6,3                 |               |               |                     |
| 29 |                 | UC29          | 3,8                 |                                 | ÜKG29         | 6,6                 |               |               |                     |



Resim 4.1. Deney hayvanlarında farklı gruplara ait kolon uzunlukları. A Kontrol grubu, B DSS ile kolit indüklenen RBO ve AZA ile tedavi edilen gruplar, C DSS ile kolit indüklenen tedavi edilmeyen grup

#### 4.2. Dokuların Histokimyasal İncelenmesi

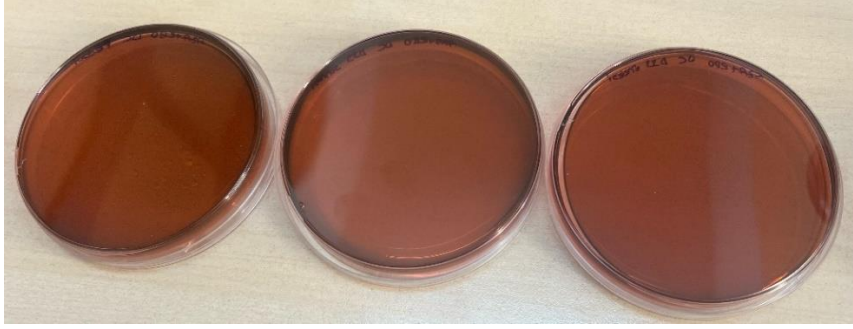
Ötenazinin ardından elde edilen kolon ve karaciğer dokularında yapılan histokimyasal inceleme sonucunda, kullanılan kimyasalların ve uygulanan tedavilerin karaciğer dokularına toksik bir etkisi olmadığı görülmüştür. Diğer bir taraftan kolon dokularını incelediğimizde, tedavi edilmeyen gruptaki kolon yapısının, kontrol ve tedavi gruplarındaki kolon yapısından daha farklı olduğu görülmektedir. RBO ile tedavi edilen gruplardaki kolon yapısı, tedavi edilmeyen gruplardaki kolon yapısı kadar bozulmasa da, kontrol grubuna göre kolon yapısında farklılık olduğu görülmüştür.



Resim 4.2. DSS ile kolit indüklenen deney hayvan gruplarında kolon ve karaciğer dokularının histokimyasal boyama sonucu mikroskop altındaki görüntüsü(40X). 1) Ülseratif kolit modelinde kolon dokularının tedavi gruplarına göre gösterimi. 2) Glikan ile etiketlenmiş ülseratif kolit modelinde kolon dokularının tedavi gruplarına göre gösterimi. 3) Ülseratif kolit modelinde karaciğer dokularının tedavi gruplarına göre gösterimi. 4) Glikan ile etiketlenmiş ülseratif kolit modelinde karaciğer dokularının tedavi gruplarına göre gösterimi. (A. Kontrol. B.RBO ile tedavi edilen C. AZA ile tedavi edilen. D. RBO+AZA ile tedavi edilen E. AntimiR4661 ile tedavi edilen F. Tedavi edilmeyen) (DSS: dextran sülfat sodyum, RBO: pirinç kepeği yağı, AZA: Azathioprine)

#### 4.3. *Pseudomonas aeuroginosa*'nın Kültürel Analizi

*Pseudomonas aeuroginosa*'nın ülseratif kolitteki etkisini araştırmak için kolit indüklenmeden önce, kolit indüklendikten sonra ve son olarak tedavinin ardından toplanılan dışkının ekimi EMB agar'da gerçekleştirilmiştir. Bunun sonucunda EMB agar'da *Pseudomonas aeuroginosa* bakterisinin üremediği görülmüştür (Resim 4.3). Bazı petrilerde ise sağlıklı bağırsakta bulunan enterik bakterinin kolonileri küçük az miktarda görülmüştür (Resim 4.4).



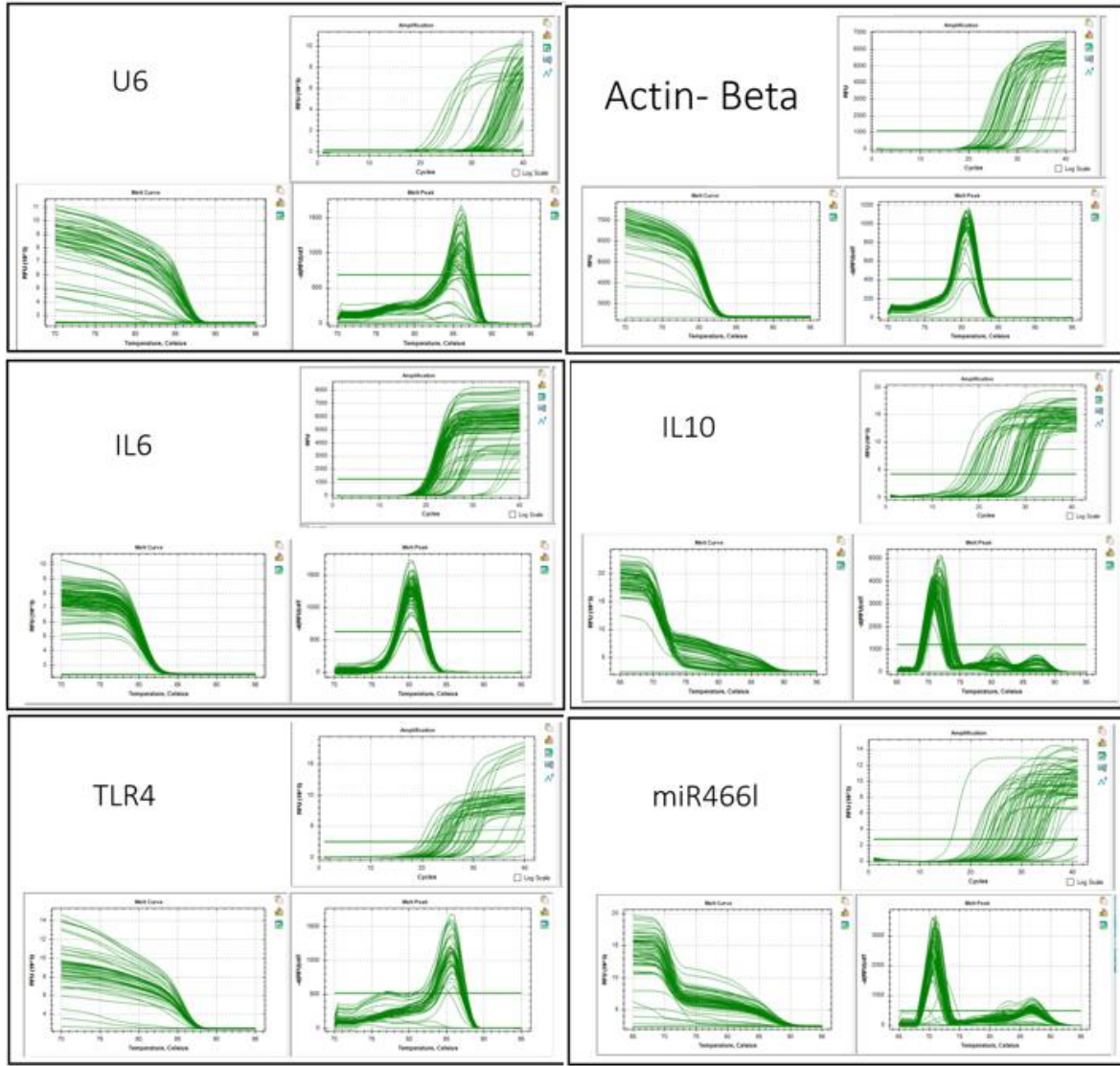
Resim 4.3. *Pseudomonas aeruginosa* bakterisinin kültür sonucu



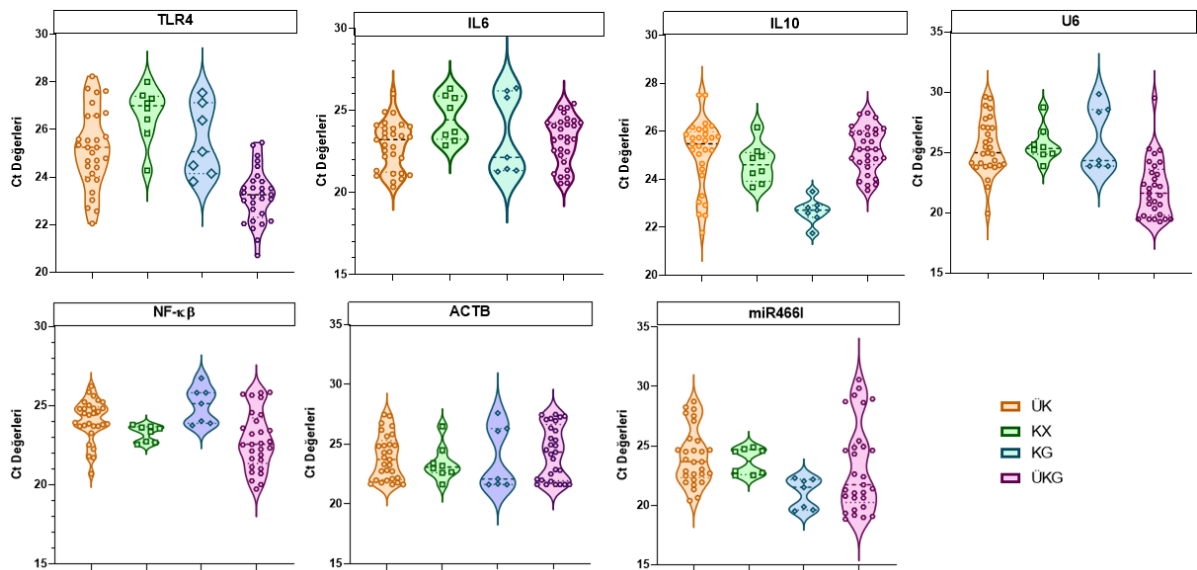
Resim 4.4. Petrilere görülen enterik bakteri kolonileri

#### 4.4. Gen Ekspresyon Sonuçları

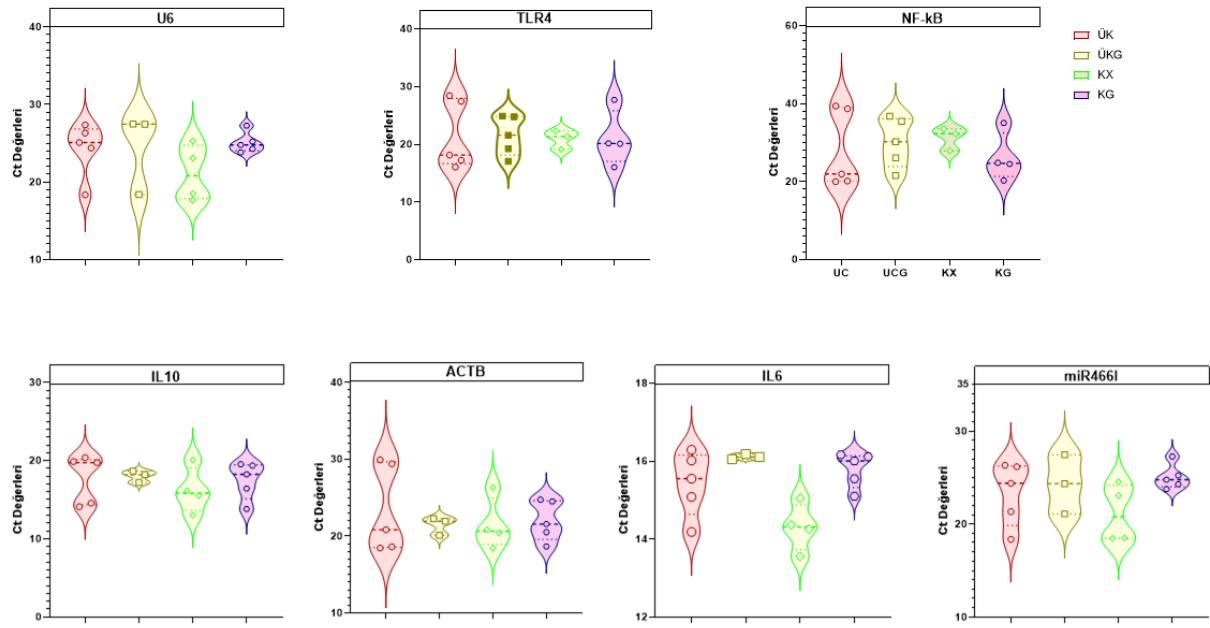
Çalışmamızda DSS ile ülseratif kolit indüklenmiş 60 fareye ait kan ve doku örnekleri ile 20 sağlıklı farelerin kan ve doku örnekleri kullanılmıştır. Örneklerinde ekspresyon seviyeleri, QRT-PCR tekniği kullanılarak incelendi (Şekil 4.1). Sonrasında hedef gen ve referans (*ACTB*) genlerinin ekspresyon sonuçlarından elde edilen Ct değerleri kullanılarak  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  değerleri tüm örnekler için normalize edildi. Sonuçların analizi BioRad yazılımındaki Temel Relatif Ölçüm (Basic Relative Quantification) programı ile yapılmıştır. Örneklerde *IL6*, *IL10*, *NF-kB*, *TLR4* ve *miR466l* genlerinin ekspresyon düzeyleri ile referans genlerin (*ACTB-U6*) ekspresyon düzeylerinin Ct ve  $\Delta C_t$  değerleri hesaplandı (Şekil 4.2-5). DSS ile ÜK indüklenen farelerin  $\Delta C_t$  değerleri ile kontrol grubunun  $\Delta C_t$  değerlerine göre kat değişimleri (fold change)  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  formülü ile hesaplanmıştır (Şekil 4.6). Buna göre 2'nin üzerinde olan değerler ekspresyon artışı, -2'nin altındaki değerler ise ekspresyon azalışı olarak değerlendirildi. Bulunan değerler istatistiksel olarak karşılaştırılması R programı ve IBM SPSS Statistics 20 programı yardımıyla gerçekleştirildi.



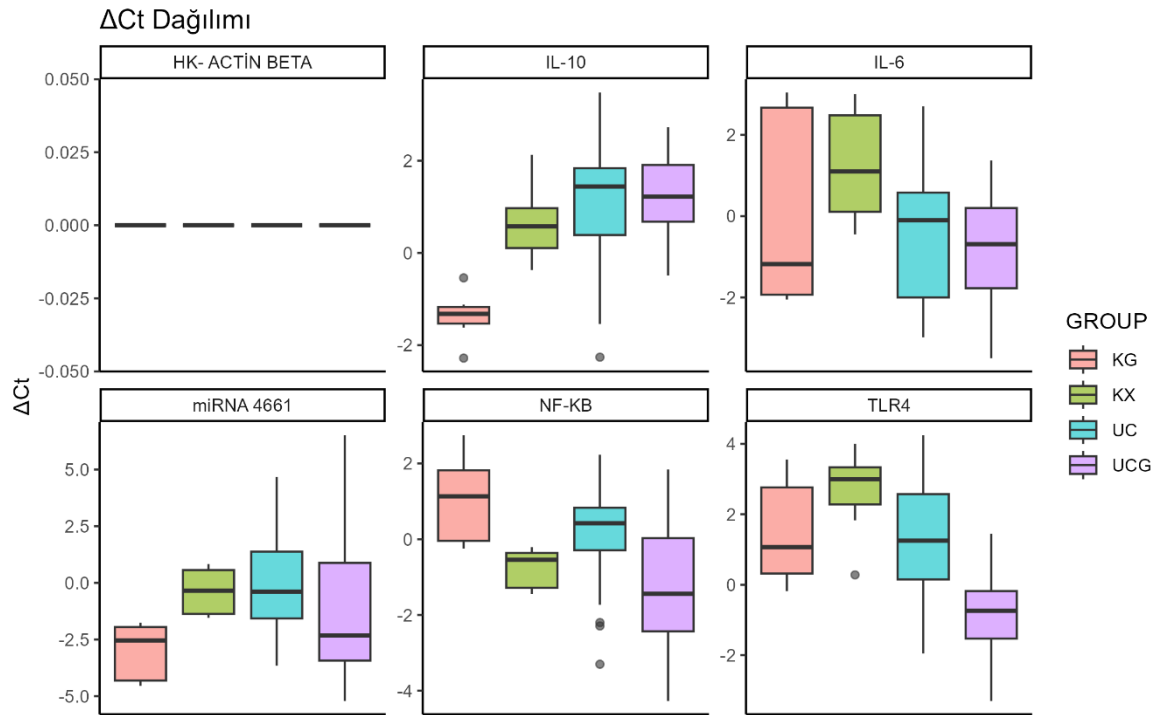
Şekil 4.1. Örneklerin ekspresyon seviyeleri QRT-PCR tekniği kullanılarak belirlendi.



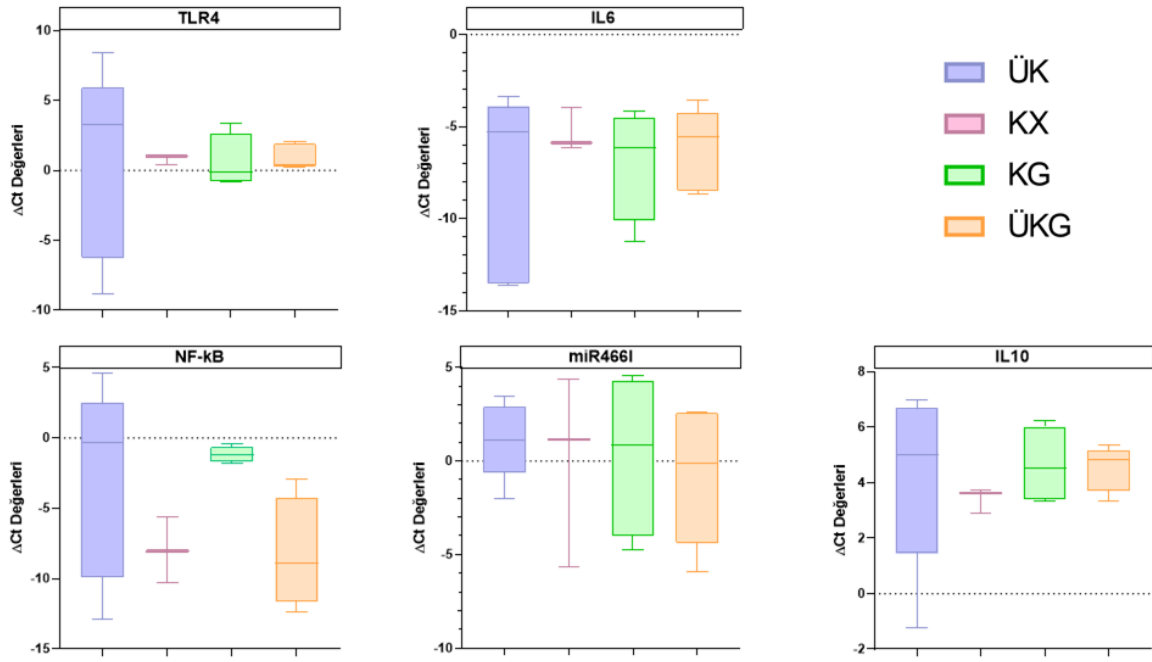
Şekil 4.2. Kan örneklerin Ct değerlerinin dağılımı



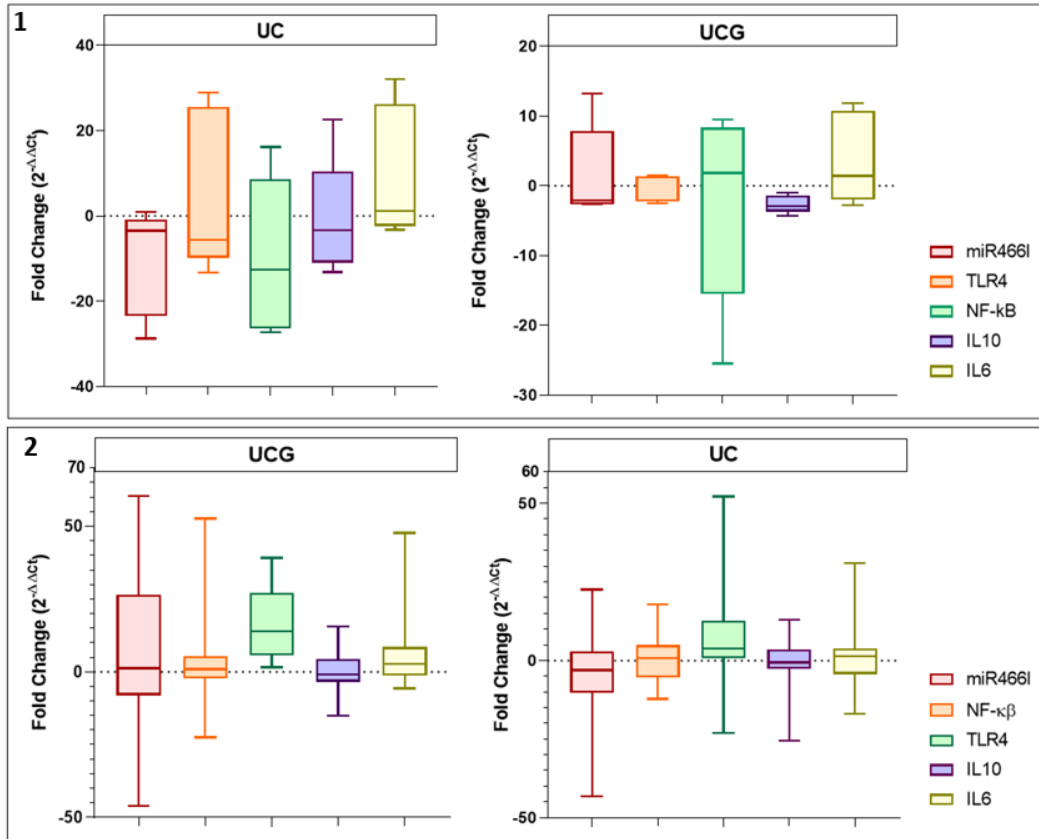
Şekil 4.3. Doku örneklerinin Ct değerlerinin dağılımı



Şekil 4.4. Kan örneklerin  $\Delta C_t$  değerlerinin dağılımı



Şekil 4.5. Doku örneklerin  $\Delta C_t$  değerlerinin dağılımı



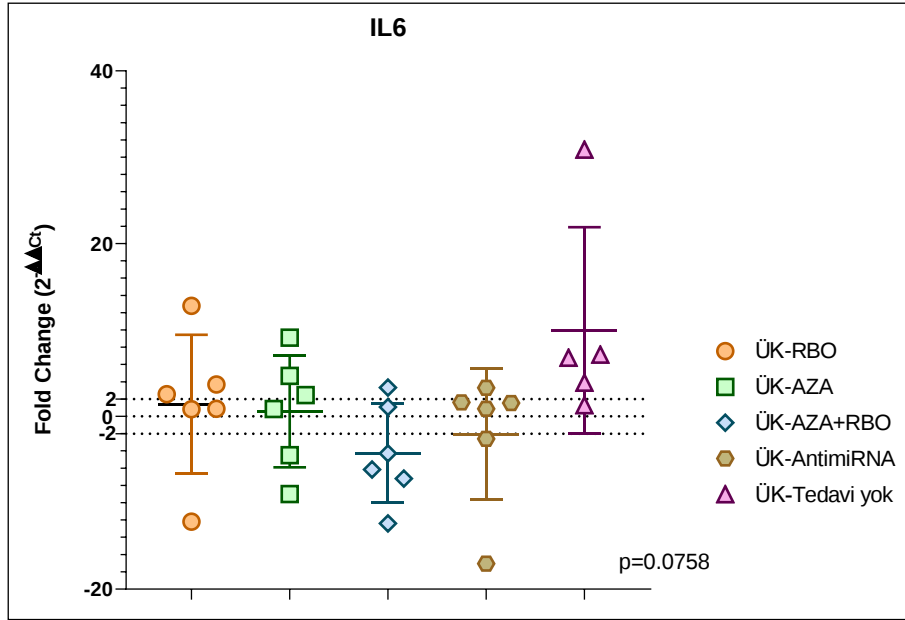
Şekil 4.6. Örneklerin fold change ( $2^{-\Delta\Delta C_t}$ ) değerleri (1; Doku örnekleri, 2; Kan örnekleri)

#### 4.4.1. Ülseratif kolitte IL6 geninin ekspresyon değerleri

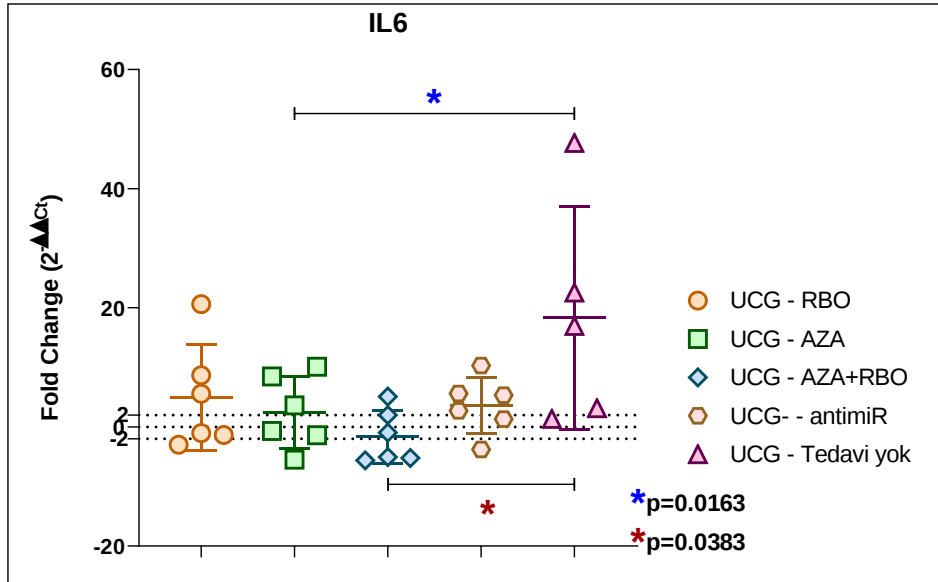
Örneklerden hesaplanan fold change değerlerinden IL6 genine ait değerler, ülseratif kolit indüklediğimiz farelerimizin tedavi gruplarına göre karşılaştırıldı ve anlamlılık görülmedi ( $p=0,0758$ ) (Şekil 4.7). RBO ile tedavi ettiğimiz hayvan grubunda 1 farede IL6 geninin ifadesinin azaldığı gözlenirken, 3 farede IL6 gen ifadesinin arttığı, diğer 2 farede ise gen ifadesinde bir farklılık olmadığı gözlemlenmiştir. AZA ile tedavi ettiğimiz hayvan grubunda 2 farede IL6 geninin ifadesinin azaldığı gözlenirken, 3 farede IL6 gen ifadesinin arttığı, diğer 1 farede ise gen ifadesinde bir farklılık olmadığı gözlemlenmiştir. AZA+RBO ile tedavi ettiğimiz hayvan grubunda 4 farede IL6 geninin ifadesinin azaldığı gözlenirken, 1 farede IL6 gen ifadesinin arttığı, diğer 1 farede ise gen ifadesinde bir farklılık olmadığı gözlemlenmiştir. AntimiR466l ile tedavi ettiğimiz hayvan grubunda 2 farede IL6 geninin ifadesinin azaldığı gözlenirken, 1 farede IL6 gen ifadesinin arttığı, diğer 3 farede ise gen ifadesinde bir farklılık olmadığı gözlemlenmiştir. Son olarak tedavi etmediğimiz hayvan grubunda IL6 geninin ifadesinin azaldığı gözlemlenmezken, 4 farede IL6 gen ifadesinin arttığı, diğer 1 farede ise gen ifadesinde bir farklılık olmadığı gözlemlenmiştir.

Örneklerden hesaplanan fold change değerlerinden IL6 genine ait değerler, ülseratif kolit indüklediğimiz ve glikan ile etiketlediğimiz farelerimizin tedavi gruplarına göre karşılaştırıldı ve anlamlılık görüldü ( $p=0,0277$ ) (Şekil 4.8). RBO ile tedavi ettiğimiz hayvan grubunda 1 farede IL6 geninin ifadesinin azaldığı gözlenirken, 3 farede IL6 gen ifadesinin arttığı, diğer 2 farede ise gen ifadesinde bir farklılık olmadığı gözlemlenmiştir. AZA ile tedavi ettiğimiz hayvan grubunda 1 farede IL6 geninin ifadesinin azaldığı gözlenirken, 3 farede IL6 gen ifadesinin arttığı, diğer 2 farede ise gen ifadesinde bir farklılık olmadığı gözlemlenmiştir. AZA+RBO ile tedavi ettiğimiz hayvan grubunda 3 farede IL6 geninin ifadesinin azaldığı gözlenirken, 1 farede IL6 gen ifadesinin arttığı, diğer 2 farede ise gen ifadesinde bir farklılık olmadığı gözlemlenmiştir. AntimiR466l ile tedavi ettiğimiz hayvan grubunda 1 farede IL6 geninin ifadesinin azaldığı gözlenirken, 4 farede IL6 gen ifadesinin arttığı, diğer 1 farede ise gen ifadesinde bir farklılık olmadığı gözlemlenmiştir. Son olarak tedavi etmediğimiz hayvan grubunda IL6 geninin ifadesinin azaldığı gözlemlenmezken, 4 farede IL6 gen ifadesinin arttığı, diğer 1 farede ise gen ifadesinde bir farklılık olmadığı gözlemlenmiştir. Glikan ile etiketli ülseratif kolit indüklenen farelerde, AZA ile tedavi ettiğimiz grup ile tedavi etmediğimiz grup arasında ( $p=0,0163$ ) ve RBO+AZA ile tedavi

ettiğimiz grup ile tedavi etmediğimiz grup arasında ( $p=0,0383$ ) istatistiksel olarak anlamlılık olduğu görüldü.



Şekil 4.7. IL6 geninin DSS ile indüklenen ülseratif kolit farelerinin tedavi gruplarına göre karşılaştırılması



Şekil 4.8. IL6 geninin glikan ile etiketlenen ve DSS ile indüklenen ülseratif kolit farelerinin tedavi gruplarına göre karşılaştırılması

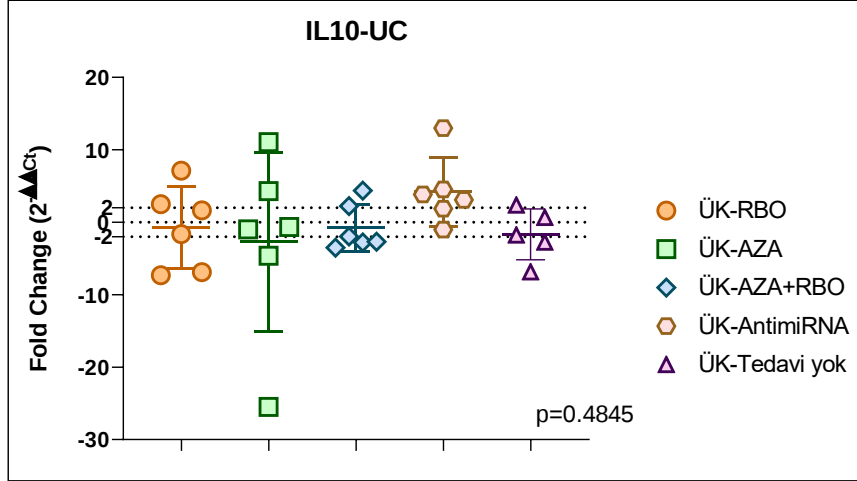
IL6 geninin gen ifadesindeki değişiklikler, glikan etiketlenmesi uyguladığımız gruplar (ÜKG) ile etiketleme yapmadığımız gruplar (ÜK) arasındaki istatistiksel analiz incelendiğinde; tedavi uygulamadığımız ÜKG grubu ile RBO-AZA tedavisi uyguladığımız ÜK grupları arasında ( $p=0,0039^{**}$ ), tedavi uygulamadığımız ÜKG grubu ile antimiR466l tedavisi uyguladığımız ÜK grupları arasında ( $p=0,0132^{*}$ ) istatistiksel anlamlılık bulunmuştur.

#### 4.4.2. Ülseratif kolitte IL10 geninin ekspresyon değerleri

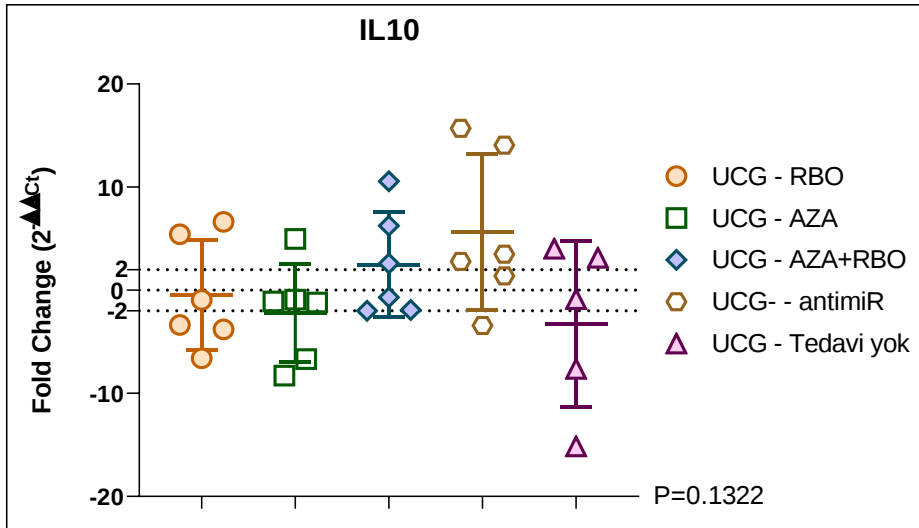
Örneklerden hesaplanan fold change değerlerinden IL10 genine ait değerler, ülseratif kolit indüklediğimiz farelerimizin tedavi gruplarına göre karşılaştırıldı ve anlamlılık görülmedi ( $p=0,4845$ ) (Şekil 4.9). RBO ile tedavi ettiğimiz hayvan grubunda 2 farede IL10 geninin ifadesinin azaldığı gözlenirken, 2 farede IL10 gen ifadesinin arttığı, diğer 2 farede ise gen ifadesinde bir farklılık olmadığı gözlemlenmiştir. AZA ile tedavi ettiğimiz hayvan grubunda 2 farede IL10 geninin ifadesinin azaldığı gözlenirken, 2 farede IL10 gen ifadesinin arttığı, diğer 2 farede ise gen ifadesinde bir farklılık olmadığı gözlemlenmiştir. AZA+RBO ile tedavi ettiğimiz hayvan grubunda 4 farede IL10 geninin ifadesinin azaldığı gözlenirken, 1 farede IL10 gen ifadesinin arttığı, diğer 1 farede ise gen ifadesinde bir farklılık olmadığı gözlemlenmiştir. AntimiR466l ile tedavi ettiğimiz hayvan grubunda IL10 geninin ifadesinin azaldığı gözlemlenmezken, 4 farede IL10 gen ifadesinin arttığı, diğer 2 farede ise gen ifadesinde bir farklılık olmadığı gözlemlenmiştir. Son olarak tedavi etmediğimiz hayvan grubunda 2 farenin IL10 geninin ifadesinin azaldığı gözlemlenirken, 1 farede IL10 gen ifadesinin arttığı, diğer 1 farede ise gen ifadesinde bir farklılık olmadığı gözlemlenmiştir.

Örneklerden hesaplanan fold change değerlerinden IL10 genine ait değerler, ülseratif kolit indüklediğimiz ve glikan ile etiklediğimiz farelerimizin tedavi gruplarına göre karşılaştırıldı ve anlamlılık görülmedi ( $p=0,1322$ ) (Şekil 4.10). RBO ile tedavi ettiğimiz hayvan grubunda 3 farede IL10 geninin ifadesinin azaldığı gözlenirken, 2 farede IL10 gen ifadesinin arttığı, diğer 1 farede ise gen ifadesinde bir farklılık olmadığı gözlemlenmiştir. AZA ile tedavi ettiğimiz hayvan grubunda 2 farede IL10 geninin ifadesinin azaldığı gözlenirken, 1 farede IL10 gen ifadesinin arttığı, diğer 3 farede ise gen ifadesinde bir farklılık olmadığı gözlemlenmiştir. AZA+RBO ile tedavi ettiğimiz hayvan grubunda IL10 geninin ifadesinin azalmadığı gözlenirken, 3 farede IL10 gen ifadesinin arttığı, diğer 3 farede ise gen ifadesinde bir farklılık olmadığı gözlemlenmiştir. AntimiR466l ile tedavi ettiğimiz hayvan grubunda 1 farede IL10 geninin ifadesinin azaldığı gözlenirken, 4 farede IL10 gen

ifadesinin arttığı, diğer 1 farede ise gen ifadesinde bir farklılık olmadığı gözlemlenmiştir. Son olarak tedavi etmediğimiz hayvan grubunda 2 farede IL10 geninin ifadesinin azaldığı gözlemlenirken, 2 farede IL10 gen ifadesinin arttığı, diğer 2 farede ise gen ifadesinde bir farklılık olmadığı gözlemlenmiştir.



Şekil 4.9. IL10 geninin DSS ile indüklenen ülseratif kolit farelerinin tedavi gruplarına göre karşılaştırılması



Şekil 4.10. IL10 geninin glikan ile etiketlenen ve DSS ile indüklenen ülseratif kolit farelerinin tedavi gruplarına göre karşılaştırılması

IL10 geninin gen ifadesindeki değişiklikler, glikan etiketlenmesi uyguladığımız gruplar (ÜKG) ile etiketleme yapmadığımız gruplar (ÜK) arasındaki istatistiksel analiz incelendiğinde istatistiksel anlamlılık bulunmamıştır.

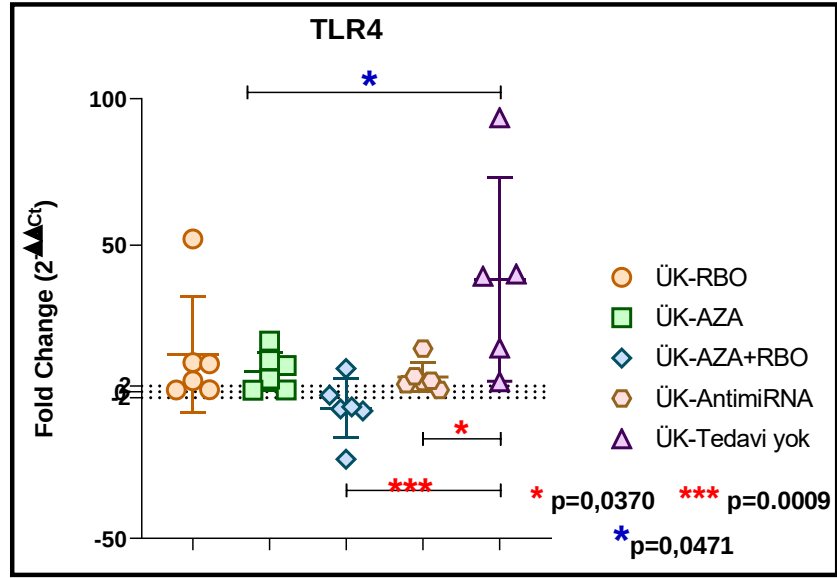
IL10 geninin gen ifadesindeki fold change değerleri, farklı kontrol gruplarına göre hesaplandığında KX kontrol grubunun, KG-RBO kontrol göre ( $p=0,0145$ ) ve KG kontrol grubuna göre ( $p=0,0060$ ) istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülmüştür.

#### 4.4.3. Ülseratif kolitte TLR4 geninin ekspresyon değerleri

Örneklerden hesaplanan fold change değerlerinden TLR4 genine ait değerler, ülseratif kolit indüklediğimiz farelerimizin tedavi gruplarına göre karşılaştırıldı ve anlamlılık görüldü ( $p=0,0370$ ,  $p=0,0036$ ) (Şekil 4.11). RBO ile tedavi ettiğimiz hayvan grubunda TLR4 geninin ifadesinin azaldığı gözlenmezken, 4 farede TLR4 gen ifadesinin arttığı, diğer 2 farede ise gen ifadesinde bir farklılık olmadığı gözlemlenmiştir. AZA ile tedavi ettiğimiz hayvan grubunda TLR4 geninin ifadesinin azaldığı gözlenmezken, 4 farede TLR4 gen ifadesinin arttığı, diğer 2 farede ise gen ifadesinde bir farklılık olmadığı gözlemlenmiştir. AZA+RBO ile tedavi ettiğimiz hayvan grubunda 4 farede TLR4 geninin ifadesinin azaldığı gözlenirken, 1 farede TLR4 gen ifadesinin arttığı, diğer 1 farede ise gen ifadesinde bir farklılık olmadığı gözlemlenmiştir. AntimiR466l ile tedavi ettiğimiz hayvan grubunda TLR4 geninin ifadesinin azaldığı gözlemlenmezken, 2 farede TLR4 gen ifadesinin arttığı, diğer 4 farede ise gen ifadesinde bir farklılık olmadığı gözlemlenmiştir. Son olarak tedavi etmediğimiz hayvan grubunda TLR4 geninin ifadesinin azaldığı gözlemlenmezken, 4 farede TLR4 gen ifadesinin arttığı, diğer 2 farede ise gen ifadesinde bir farklılık olmadığı gözlemlenmiştir.

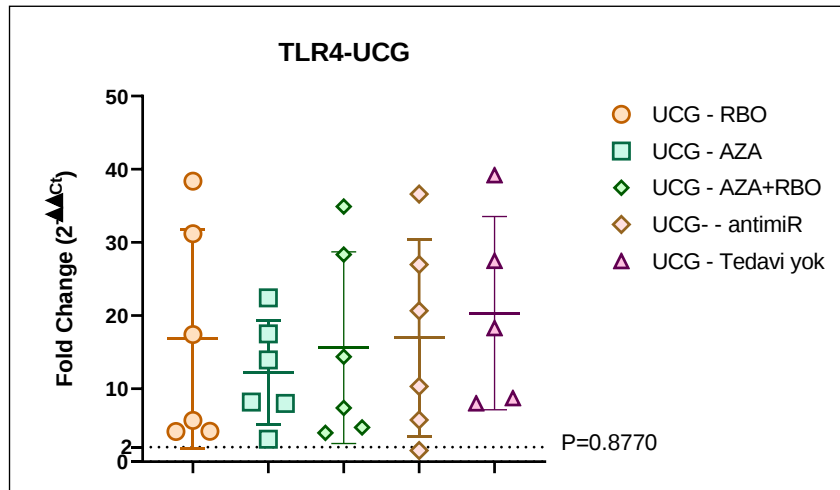
Örneklerden hesaplanan fold change değerlerinden TLR4 genine ait değerler, DSS ile indüklenen ülseratif kolit farelerinde, AZA ile tedavi ettiğimiz grup ile tedavi etmediğimiz grup karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü ( $p=0,0471^*$ ). AZA+RBO ile tedavi ettiğimiz grup ile tedavi etmediğimiz grup karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü ( $p=0,0009^{**}$ ). DSS ile indüklenen ülseratif kolit farelerinde, AntimiR466l ile tedavi ettiğimiz grup ile tedavi etmediğimiz grup karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü ( $p=0,0370^*$ ).

Örneklerden hesaplanan fold change değerlerinden TLR4 genine ait değerler, ülseratif kolit indüklediğimiz ve glikan ile etiketlediğimiz farelerimizin tedavi gruplarına göre karşılaştırıldı ve anlamlılık görülmedi ( $p=0,8770$ ) (Şekil 4.12). RBO – AZA - RBO+AZA - AntimiR466l ve tedavi etmediğimiz gruptaki tüm farelerde TLR4 gen ifadesinin arttığı gözlemlenmiştir.



Şekil 4.11. TLR4 geninin DSS ile indüklenen ülseratif kolit farelerinin tedavi gruplarına göre karşılaştırılması

TLR4 geninin gen ifadesindeki değişiklikler, KX grubu ile kıyaslandığında glikan etiketlenmesi uyguladığımız gruplar (ÜKG) ile etiketleme yapmadığımız gruplar (ÜK) arasındaki istatistiksel analiz incelendiğinde istatistiksel anlamlılık bulunmamıştır.



Şekil 4.12. TLR4 geninin glikan ile etiketlenen ve DSS ile indüklenen ülseratif kolit farelerinin tedavi gruplarına göre karşılaştırılması

TLR4 geninin gen ifadesindeki değişiklikler, KG grubu ile kıyaslandığında glikan etiketlenmesi uyguladığımız gruplar (ÜKG) ile etiketleme yapmadığımız gruplar (ÜK)

arasındaki istatistiksel analiz incelendiğinde bulunan istatistiksel anlamlılıklar çizelge 4.3'te verilmiştir.

Çizelge 4.3. KG grubu ile kıyaslandığında glikan etiketlenmesi uyguladığımız gruplar (ÜKG) ile etiketleme yapmadığımız gruplar (ÜK) arasındaki istatistiksel analiz

| ÜK grubu   | ÜKG Grubu            | P değeri   |
|------------|----------------------|------------|
| ÜK RBO+AZA | ÜKG RBO              | 0.0001**** |
|            | ÜKG AZA              | 0.0002**** |
|            | ÜKG AZA + RBO        | 0.0006**** |
|            | ÜKG antimiR466l      | 0.0046**   |
|            | ÜKG Tedavi edilmeyen | 0.0004**** |

#### 4.4.4. Ülseratif kolitte NF- $\kappa$ B geninin ekspresyon değerleri

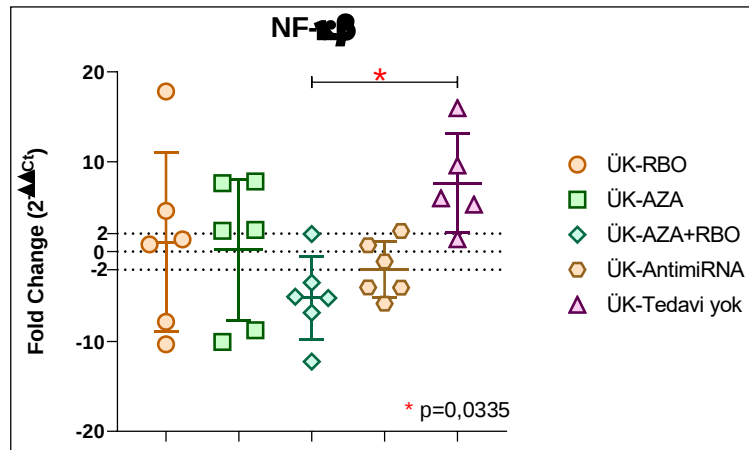
RBO ile tedavi ettiğimiz hayvan grubunda 2 farede NF- $\kappa$ B geninin ifadesinin azaldığı gözlenirken, 2 farede NF- $\kappa$ B gen ifadesinin arttığı, diğer 2 farede ise gen ifadesinde bir farklılık olmadığı gözlemlenmiştir. AZA ile tedavi ettiğimiz hayvan grubunda 2 farede NF- $\kappa$ B geninin ifadesinin azaldığı gözlenirken, 4 farede NF- $\kappa$ B gen ifadesinin arttığı, diğer 2 farede ise gen ifadesinde bir farklılık olmadığı gözlemlenmiştir. AZA+RBO ile tedavi ettiğimiz hayvan grubunda 5 farede NF- $\kappa$ B geninin ifadesinin azaldığı gözlenirken, diğer 1 farede ise gen ifadesinde bir farklılık olmadığı gözlemlenmiştir. AntimiR466l ile tedavi ettiğimiz hayvan grubunda 3 farede NF- $\kappa$ B geninin ifadesinin azaldığı gözlenirken, 1 farede NF- $\kappa$ B gen ifadesinin arttığı, diğer 2 farede ise gen ifadesinde bir farklılık olmadığı gözlemlenmiştir. Son olarak tedavi etmediğimiz hayvan grubunda NF- $\kappa$ B geninin ifadesinin azaldığı gözlemlenmezken, 4 farede NF- $\kappa$ B gen ifadesinin arttığı, diğer 2 farede ise gen ifadesinde bir farklılık olmadığı gözlemlenmiştir.

Örneklerden hesaplanan fold change değerlerinden NF- $\kappa$ B genine ait değerler, ülseratif kolit indüklediğimiz farelerimizin tedavi gruplarına göre karşılaştırıldığında RBO+AZA ile tedavi ettiğimiz grup ile tedavi etmediğimiz grup arasında istatistiksel olarak anlamlılık olduğu görüldü ( $p=0,0335$ ) (Şekil 4.13).

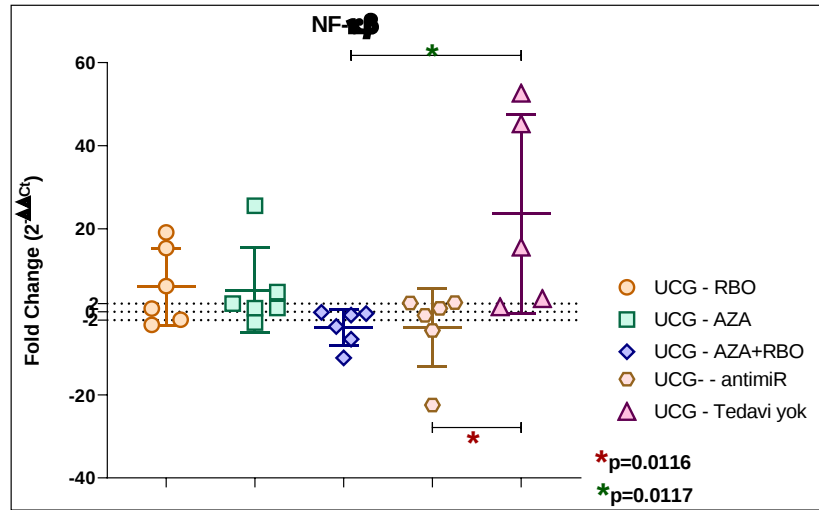
RBO ile tedavi ettiğimiz hayvan grubunda 1 farede NF- $\kappa$ B geninin ifadesinin azaldığı gözlenirken, 3 farede NF- $\kappa$ B gen ifadesinin arttığı, diğer 2 farede ise gen ifadesinde bir farklılık olmadığı gözlemlenmiştir. AZA ile tedavi ettiğimiz hayvan grubunda 1 farede NF- $\kappa$ B geninin ifadesinin azaldığı gözlenirken, 2 farede NF- $\kappa$ B gen ifadesinin arttığı, diğer 3

farede ise gen ifadesinde bir farklılık olmadığı gözlemlenmiştir. AZA+RBO ile tedavi ettiğimiz hayvan grubunda 3 farede NF- $\kappa$ B geninin ifadesinin azaldığı gözlenirken, diğer 3 farede ise gen ifadesinde bir farklılık olmadığı gözlemlenmiştir. AntimiR466l ile tedavi ettiğimiz hayvan grubunda 2 farede NF- $\kappa$ B geninin ifadesinin azaldığı gözlemlenirken, 2 farede NF- $\kappa$ B gen ifadesinin arttığı, diğer 2 farede ise gen ifadesinde bir farklılık olmadığı gözlemlenmiştir. Son olarak tedavi etmediğimiz hayvan grubunda NF- $\kappa$ B geninin ifadesinin azaldığı gözlemlenmezken, 3 farede NF- $\kappa$ B gen ifadesinin arttığı, diğer 3 farede ise gen ifadesinde bir farklılık olmadığı gözlemlenmiştir.

Örneklerden hesaplanan fold change değerlerinden NF- $\kappa$ B genine ait değerler, ülseratif kolit indüklediğimiz ve glikan ile etiketlediğimiz farelerimizin tedavi gruplarına göre karşılaştırıldığında, RBO+AZA ile tedavi ettiğimiz grup ile tedavi etmediğimiz grup arasında ( $p=0,0117^*$ ) ve antimiR466l ile tedavi ettiğimiz grup ile tedavi etmediğimiz grup arasında ( $p=0,0116^*$ ) istatistiksel olarak anlamlılık olduğu görüldü (Şekil 4.14).



Şekil 4.13. NF- $\kappa$ B geninin DSS ile indüklenen ülseratif kolit farelerinin tedavi gruplarına göre karşılaştırılması



Şekil 4.14. NF- $\kappa$ B geninin glikan ile etiketlenen ve DSS ile indüklenen ülseratif kolit farelerinin tedavi gruplarına göre karşılaştırılması

NF- $\kappa$ B geninin gen ifadesindeki değişiklikler, glikan etiketlenmesi uyguladığımız gruplar (ÜKG) ile etiketleme yapmadığımız gruplar (ÜK) arasındaki istatistiksel analiz incelendiğinde; tedavi uygulamadığımız ÜKG grubu ile ÜK-RBO tedavisi uyguladığımız grup arasında ( $p=0,0187^*$ ), ÜK-AZA tedavisi uyguladığımız grup arasında ( $p=0,0127^*$ ), ÜK-RBO-AZA tedavisi uyguladığımız grup arasında ( $p=0,0009^{***}$ ), ÜK-antimiR466l tedavisi uyguladığımız grup arasında ( $p=0,0044^{**}$ ) istatistiksel anlamlılıklar bulunmuştur.

#### 4.4.5. Ülseratif kolitte miR466l geninin ekspresyon değerleri

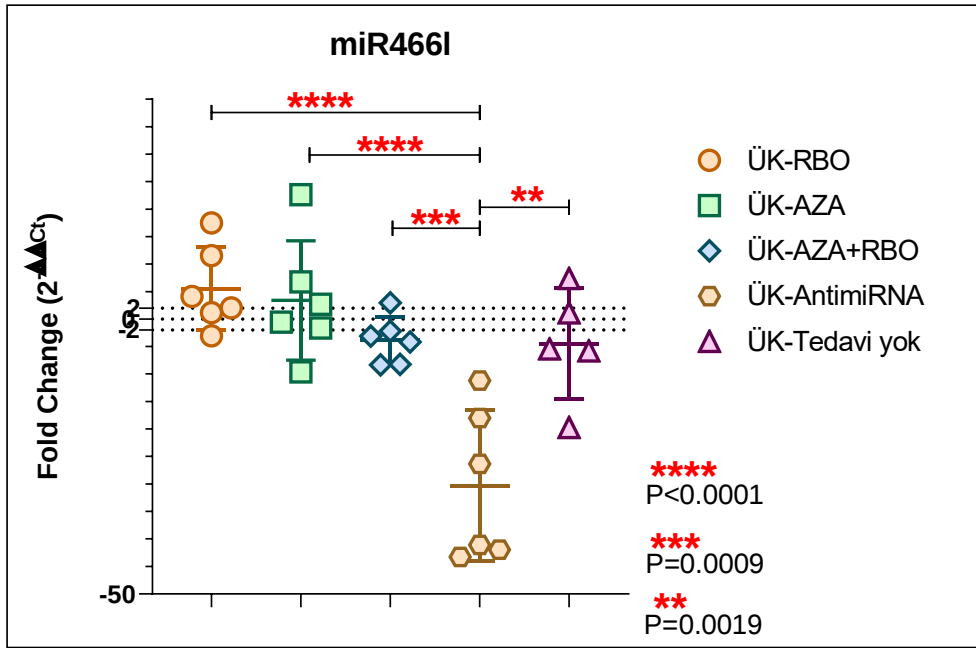
RBO ile tedavi ettiğimiz hayvan grubunda 1 farede miR466l geninin ifadesinin azaldığı gözlenirken, 3 farede miR466l gen ifadesinin arttığı, diğer 2 farede ise gen ifadesinde bir farklılık olmadığı gözlemlenmiştir. AZA ile tedavi ettiğimiz hayvan grubunda 2 farede miR466l geninin ifadesinin azaldığı gözlenirken, 2 farede miR466l gen ifadesinin arttığı, diğer 2 farede ise gen ifadesinde bir farklılık olmadığı gözlemlenmiştir. AZA+RBO ile tedavi ettiğimiz hayvan grubunda 5 farede miR466l geninin ifadesinin azaldığı gözlenirken, diğer 1 farede ise gen ifadesinin arttığı gözlemlenmiştir. AntimiR466l ile tedavi ettiğimiz hayvan grubunda 6 farede miR466l geninin ifadesinin azaldığı gözlemlenmiştir. Son olarak tedavi etmediğimiz hayvan grubunda 3 farede miR466l geninin ifadesinin azaldığı gözlemlenirken, 1 farede NF- $\kappa$ B gen ifadesinin arttığı, diğer 2 farede ise gen ifadesinde bir farklılık olmadığı gözlemlenmiştir.

Örneklerden hesaplanan fold change değerlerinden miR466l genine ait değerler, DSS ile indüklenen ülseratif kolit farelerinde, AntimiR466l ile tedavi ettiğimiz grup, RBO ile tedavi ettiğimiz grupla karşılaştırıldığında ( $p<0.0001$ ), AZA ile tedavi ettiğimiz grupla karşılaştırıldığında ( $p<0.0001$ ), AZA+RBO ile tedavi ettiğimiz grupla karşılaştırıldığında ( $p=0,0009$ ) ve tedavi etmediğimiz grupla karşılaştırıldığında ( $p=0,0019$ ) istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülmüştür (Şekil 4.15).

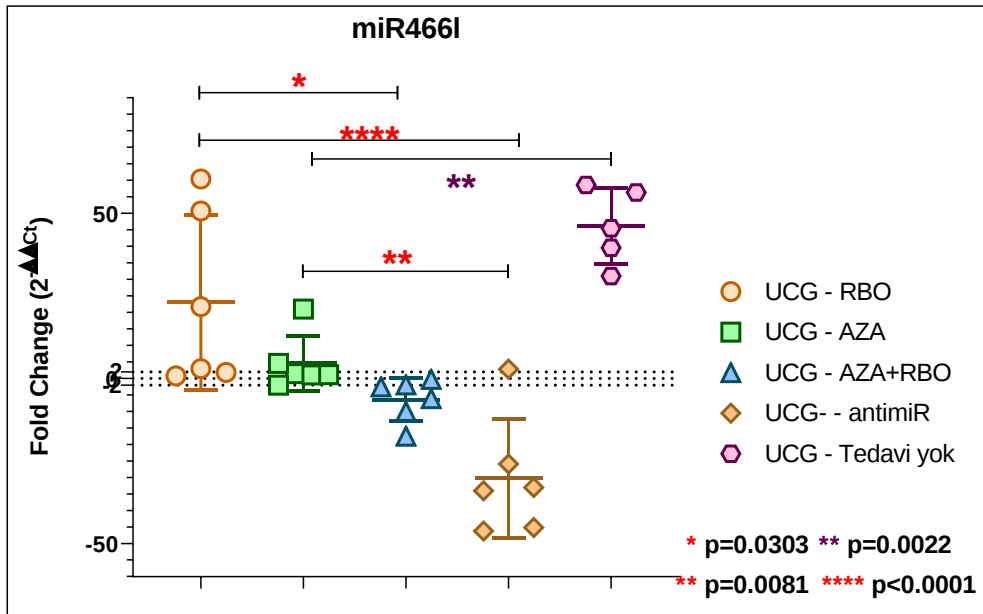
Örneklerden hesaplanan fold change değerlerinden miR466l genine ait değerler, ülseratif kolit indüklediğimiz ve glikan ile etiketlediğimiz farelerimizin tedavi gruplarına göre karşılaştırıldı ve anlamlılık görüldü ( $p<0.0001$ ) (Şekil 4.16).

RBO ile tedavi ettiğimiz hayvan grubunda miR466l geninin ifadesinin azaldığı gözlenmezken, 3 farede miR466l gen ifadesinin arttığı, diğer 3 farede ise gen ifadesinde bir farklılık olmadığı gözlemlenmiştir. AZA ile tedavi ettiğimiz hayvan grubunda NF- $\kappa$ B geninin ifadesinin azaldığı gözlenmezken, 2 farede miR466l gen ifadesinin arttığı, diğer 4 farede ise gen ifadesinde bir farklılık olmadığı gözlemlenmiştir. AZA+RBO ile tedavi ettiğimiz hayvan grubunda 5 farede miR466l geninin ifadesinin azaldığı gözlenirken, diğer 1 farede ise gen ifadesinde bir farklılık olmadığı gözlemlenmiştir. AntimiR466l ile tedavi ettiğimiz hayvan grubunda 5 farede miR466l geninin ifadesinin azaldığı gözlemlenirken, 1 farede miR466l gen ifadesinin arttığı gözlemlenmiştir. Son olarak tedavi etmediğimiz hayvan grubunda miR466l geninin ifadesinin azaldığı gözlemlenmezken, 5 farede NF- $\kappa$ B gen ifadesinin arttığı, diğer 1 farede ise gen ifadesinde bir farklılık olmadığı gözlemlenmiştir.

Glikan ile etiketlediğimiz ve DSS ile indüklenen ülseratif kolit farelerinde, AntimiR466l ile tedavi ettiğimiz grup, RBO ile tedavi ettiğimiz grupla karşılaştırıldığında ( $p<0.0001$ ) ve AZA ile tedavi ettiğimiz grupla karşılaştırıldığında ( $p=0,0081$ ) istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü. RBO ile tedavi ettiğimiz grup, AZA+RBO ile tedavi ettiğimiz grupla karşılaştırıldığında ( $p=0,0303$ ), AZA ile tedavi ettiğimiz grup, tedavi etmediğimiz grupla karşılaştırıldığında ( $p=0,0022$ ) istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü.



Şekil 4.15. miR466l geninin DSS ile indüklenen ülseratif kolit farelerinin tedavi gruplarına göre karşılaştırılması



Şekil 4.16. miR466l geninin glikan ile etiketlenen ve DSS ile indüklenen ülseratif kolit farelerinin tedavi gruplarına göre karşılaştırılması

miR466l geninin gen ifadesindeki değişiklikler, glikan etiketlenmesi uyguladığımız gruplar (ÜKG) ile etiketleme yapmadığımız gruplar (ÜK) arasındaki istatistiksel analiz incelendiğinde; tedavi uygulamadığımız ÜKG grubu ile ÜK-RBO tedavisi uyguladığımız

grup arasında ( $p=0,0003^{***}$ ), ÜK-AZA tedavisi uyguladığımız grup arasında ( $p=0,0001^{****}$ ), ÜK-RBO-AZA tedavisi uyguladığımız grup arasında ( $p=0,0001^{****}$ ), ÜK-antimiR466l tedavisi uyguladığımız grup arasında ( $p=0,0001^{****}$ ) ve ÜK tedavi uygulamadığımız grup arasında ( $p=0,0001^{****}$ ) istatistiksel anlamlılıklar bulunmuştur.

RBO tedavisi uyguladığımız ÜKG grubu ile ÜK tedavi uygulamadığımız grup arasında ( $p=0,0388^*$ ), ÜK-antimiR466l tedavisi uyguladığımız grup arasında ( $p=0,0001^{****}$ ), ÜK-RBO-AZA tedavisi uyguladığımız grup arasında ( $p=0,0312^*$ ) istatistiksel anlamlılıklar bulunmuştur.

AntimiR466l tedavisi uyguladığımız ÜKG grubu ile ÜK-RBO tedavisi uyguladığımız grup arasında ( $p=0,0010^{**}$ ), ÜK-AZA tedavisi uyguladığımız grup arasında ( $p=0,0025^{**}$ ), ÜK-RBO-AZA tedavisi uyguladığımız grup arasında ( $p=0,0376^*$ ) istatistiksel anlamlılıklar bulunmuştur.

## 5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Ülseratif kolit (ÜK), inflamatuvar bağırsak hastalıkları (İBH) arasında yer alan, kalın bağırsakların kronik inflamasyonu ile karakterize bir hastalıktır. Bu hastalığın patogenezi karmaşık olup, genetik, çevresel ve immünolojik faktörlerin etkileşimiyle şekillenir. NF-kB, IL6, IL10, TLR4 ve miR-466l gibi moleküller, ülseratif kolitin gelişiminde ve ilerlemesinde önemli rol oynar. NF-kB, bağırsak iltihaplanmasının merkezi bir düzenleyicisi olarak kabul edilen, bağışıklık yanıtlarını ve inflamasyonu düzenleyen bir transkripsiyon faktörüdür. Ülseratif kolitte, NF-kB'nin aşırı aktivasyonu, inflamasyonun sürdürülmesine ve bağışıklık yanıtının bozulmasına yol açar. Özellikle, NF-kB'nin aktivasyonu, inflamasyonla ilişkili genlerin (örneğin TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6 gibi) transkripsiyonunu artırarak inflamasyonun şiddetini artırır. IL-6, inflamasyonun önemli bir mediatörüdür ve inflamatuvar hücrelerin aktif hale gelmesini sağlar. Ülseratif kolitte, IL-6 seviyeleri genellikle yükselir ve bu, hastalığın şiddetini artırabilir. IL-6'nın, NF-kB ile etkileşerek inflamatuvar yanıtı güçlendirdiği ve bağırsak epitel hücrelerinde hasara yol açtığı gösterilmiştir. IL-10, anti-inflamatuvar bir sitokin olup bağışıklık yanıtını baskılar ve inflamasyonu sınırlayarak bağırsaklardaki inflamasyonu kontrol eder. IL-10'un genetik polimorfizmleri, ülseratif kolit gibi inflamatuvar bağırsak hastalıklarının gelişimine yatkınlık oluşturabilir. IL-10'un eksikliği, bağışıklık düzenlemelerinin bozulmasına ve aşırı inflamasyona neden olabilir. TLR4, bağışıklık sisteminin patojenleri tanıyan ve immün yanıtları başlatan bir reseptördür. Bağırsak mikrobiyotasındaki değişiklikler, TLR4'ün aşırı aktivasyonuna yol açarak inflamasyonu tetikleyebilir. Ülseratif kolitte, TLR4'ün aşırı uyarılması, bağırsakta aşırı inflamasyona ve doku hasarına yol açabilir. TLR4, özellikle bağırsaklardaki bakteri ve patojenlerin tanınmasında önemli bir rol oynar. miR-466l, mikroRNA'lar arasında yer alır ve gen ekspresyonunu düzenleyen küçük RNA molekülleridir. Ülseratif kolitte, miR-466l'nin rolü, inflamasyonun ve immün yanıtların düzenlenmesinde önemli bir yere sahiptir. miR-466l'nin genetik düzenlemeler yoluyla, bağışıklık hücrelerinin aktivasyonunu ve inflamasyonun şiddetini modüle edebileceği öne sürülmektedir. Ülseratif kolitte, NF-kB, IL-6, IL-10, TLR4 ve miR-466l gibi moleküller, inflamasyonun düzenlenmesinde ve hastalığın patogenezinde önemli rol oynar. Bu moleküllerin genetik ve biyokimyasal düzeydeki etkileşimleri, hastalığın şiddetini ve seyrini belirleyebilir. Bu nedenle, bu moleküller üzerine yapılan çalışmalar, ülseratif kolit tedavisinde yeni hedefler sunma potansiyeline sahiptir.

Çalışmamıza, Gazi Üniversitesi GÜDAM tarafından teslim alınan 80 adet farenin 60 adetine %2,5 DSS verilerek ülseratif kolit indükleyerek başlandı. 60 fare içerisinde rastgele seçilen 30 adet fareye glikan etiketlenmesi yapıldı. Diğer 20 fare ise kontrol grupları olarak kullanıldı. 20 farenin 10 adetine glikan ile etiketleme yapıldı. DSS ile kolit indüklenmesinin kesin olduğunu anlamak amacıyla kolit şiddeti DAI puanlaması ile hesaplandı. Kolit şiddetinin en yüksek (DAI: 12) görüldüğü deney hayvanı ÜKG6'dır. Kolit şiddetinin en düşük (DAI: 2) görüldüğü deney hayvanları UC5, UC11 ve UC22'dir. Ardından RBO-AZA-RBO+AZA-AntimiR466l ile tedaviye başlandı. Tedavi sonunda elde edilen örnekler ile moleküler deneyler başlandı. Ötenazinin ardından toplanılan kolon dokularının uzunluğu, kolonun alınmasından hemen sonra anüsten çekuma kadar ölçülmüştür. Tedavi edilmeyen gruptaki kolon dokularının uzunluğu, tedavi edilen gruplardaki kolon dokularının uzunluğuna göre daha kısa olduğu görülmüştür. Elde edilen kolon ve karaciğer dokularında yapılan histokimyasal inceleme sonucunda, kullanılan kimyasalların ve uygulanan tedavilerin karaciğer dokularına toksik bir etkisi olmadığı görülmüştür. Diğer bir taraftan kolon dokularını incelediğimizde, tedavi edilmeyen gruptaki kolon yapısının, kontrol ve tedavi gruplarındaki kolon yapısından daha farklı olduğu görülmektedir. RBO ile tedavi edilen gruplardaki kolon yapısı, tedavi edilmeyen gruplardaki kolon yapısı kadar bozulmasa da, kontrol grubuna göre kolon yapısında farklılık olduğu görülmüştür. Dışkı örneklerinden bakteri kültür ekimi yapıldı. DSS sonrası alınan dışkı örneklerinde *Pseudomonas aeruginosa* bakterisinin üremesi beklenildi fakat hiçbir örnekte üreme görülmedi. Kan ve doku örneklerinden Real time PCR cihazı ile IL6, IL10, TLR4, NF-kB ve miR466l genlerinin ifade düzeyleri belirlendi ve istatistiksel analizleri gerçekleştirildi.

DSS ile indüklenen ülseratif kolit farelerinde, AZA+RBO tedavi grubu ile tedavi edilmeyen grup karşılaştırıldığında ( $p=0,0036$ ) istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmüştür. Bu, AZA+RBO tedavisinin ülseratif kolit üzerine anlamlı bir tedavi etkisi gösterdiğini ve tedavi edilen grubun hastalık şiddetinde belirgin bir iyileşme sağladığını gösterir. Anti-miR466l tedavi grubu ile tedavi edilmemiş grup karşılaştırdığımızda istatistiksel olarak anlamlılık ( $p=0,0370$ ) görüldü. Bu, miR-466l'nin ülseratif kolit tedavisinde önemli bir etken olduğunu ve anti-miR466l tedavisinin hastalığın ilerlemesini yavaşlatma veya iyileştirme potansiyeli taşıdığını göstermektedir. Glikan ile etiketlenen farelerde AZA tedavi grubu ile tedavi edilmeyen grup karşılaştırıldığında ( $p=0,0163$ ) anlamlı bir fark bulduk. AZA tedavisinin

ülseratif kolit üzerindeki etkinliğini destekler, özellikle glikan etiketleme ile yapılan deneyde tedavi edilmemiş grubun daha yüksek inflamasyon seviyeleri gösterir. Azatioprin (AZA), inflamatuvar bağırsak hastalıklarının (İBH) tedavisinde yaygın olarak kullanılan bir immünsüpresan ajandır. AZA'nın, özellikle ülseratif kolit gibi hastalıkların tedavisinde inflamasyonu baskılayıcı etkisi kanıtlanmıştır (Katz 2007; Schreiber ve diğerleri 2005). Çalışmamızdaki bulgular, AZA tedavisinin DSS ile indüklenen ülseratif kolit modelinde etkili bir tedavi seçeneği olduğunu ve inflamasyonu azaltmada başarılı olduğunu göstermektedir.

Yaptığımız istatistiksel analizlere göre IL-6 ve TLR4 genlerine ait fold change değerlerinde tedavi gruplarına göre anlamlı ( $p=0,277$ ,  $p=0,0370$  ve  $p=0,0036$ ) olduğu görüldü. Bu sonuçlar, tedavi edilen gruplarda bu genlerin ekspresyonunun önemli ölçüde değiştiğini ve bu değişikliklerin hastalığın patogenezindeki rolüne işaret ettiğini gösterir. IL-6 ve TLR4 gibi inflamatuvar mediatörlerin düzeylerinin düzenlenmesi, tedavi etkisini açıklayabilir. IL-6, güçlü bir proinflamatuvar sitokin olup, inflamatuvar bağırsak hastalıklarında (İBH) kritik bir rol oynar. IL-6'nın yüksek seviyeleri, inflamasyonu ve bağırsak hasarını artırır. Çalışmalar, IL-6'nın inhibe edilmesinin, ülseratif kolit gibi hastalıkların tedavisinde potansiyel olarak etkili bir strateji olduğunu göstermektedir (Liu ve diğerleri 2009; Yoshimura ve diğerleri 2009; Pawłowska-Kamieniak ve diğerleri 2021). Bu nedenle IL-6'nın fold change değerlerinin anlamlı olması, tedavi gruplarındaki farklılıkları ve tedaviye yanıtı değerlendirmede önemli bir gösterge olabilir.

TLR4, bağışıklık sisteminin patojenleri tanıyan ve inflamasyon yanıtını başlatan bir reseptördür. TLR4'ün aşırı aktivasyonu, inflamatuvar hastalıkların gelişmesine yol açabilir. Ülseratif kolitte, bağırsak mikrobiyotasının TLR4 ile etkileşimi, hastalığın ilerlemesine neden olabilir (Rakoff-Nahoum ve diğerleri 2004). Çalışmamızdaki bulgular, TLR4'ün rolünü ve tedaviye verdiği yanıtı anlamada önemli bir veri sağlayabilir.

NF- $\kappa$ B genine ait fold change değeri ( $p=0,0103$ ), tedavi grupları arasında anlamlı bir fark olduğunu göstermektedir. Bu da tedavi edilen gruplarda NF- $\kappa$ B yolunun modülasyonunun, inflamasyonun azaltılmasında önemli bir faktör olduğunu düşündürmektedir. NF- $\kappa$ B'nin inhibe edilmesi, inflamasyonu kontrol altına alabilir ve hastalığın şiddetini azaltabilir. NF- $\kappa$ B, inflamasyonun temel düzenleyicisidir. Ülseratif kolit gibi hastalıklarda, NF- $\kappa$ B'nin aşırı aktivasyonu, iltihaplanmayı ve doku hasarını artırır. NF- $\kappa$ B yolunun modülasyonu tedavi

stratejileri için kritik bir hedeftir ve yapılan çalışmalar, NF- $\kappa$ B inhibitörlerinin potansiyel tedavi ajanları olabileceğini belirtmektedir (Tripathi ve Aggarwal 2006; D'Mello ve diğerleri 2008).

RBO tedavisi ile ilgili birçok karşılaştırmada ( $p < 0.0001$ ,  $p = 0,0022$ ,  $p = 0,0303$  vb.) anlamlı farklar bulduk. RBO tedavisinin, tedavi edilmeyen gruba göre inflamasyon üzerinde anlamlı bir etkisi olduğu ve RBO'nun, diğer tedavi gruplarına kıyasla da etkili bir tedavi aracı olarak değerlendirilebileceği görülüyor. RBO (muhtemelen bir biyomolekül ya da tedavi ajanı), daha önce yapılan çalışmalarda anti-inflamatuar etkileriyle tanınmaktadır. Bu tür tedavilerin, İBH'yi tedavi etme potansiyeline dair yapılan bazı araştırmalar da özellikle bağırsak mikrobiyotasının modülasyonu ve bağışıklık hücrelerinin aktivitesini düzenlemesi yoluyla etkili olduğunu göstermektedir (Brenchley ve diğerleri 2006). RBO tedavisi de bazı tedavi gruplarına karşı anlamlı farklar göstermekte, özellikle tedavi edilmemiş grup ile karşılaştırıldığında. Bu, RBO'nun inflamasyonu azaltıcı etkisi olduğunu ve bağırsaklarda iyileşme sağladığını gösterir. Çalışmamızda RBO'nun etkisi de anlamlı bulunmuş, uygulanan RBO tedavisinin ülseratif kolit tedavisinde potansiyel bir seçenek olduğunu düşündürmektedir.

AntimiR466l ile tedavi edilen grup ile RBO tedavi edilen grup arasında yapılan karşılaştırmalarda da anlamlı farklar bulduk ( $p < 0.0001$ ). AntimiR466l'nin, RBO tedavisiyle karşılaştırıldığında daha güçlü bir tedavi etkisi gösterdiğini veya belirli moleküler hedeflere daha fazla etki ettiğini ortaya koyuyor. AntimiR466l ile tedavi edilen grup çoğu karşılaştırmada (RBO, AZA, AZA+RBO gibi gruplara karşı) anlamlı farklar gösteriyor. Bu, miR-466l'nin ülseratif kolitin tedavisinde potansiyel bir tedavi seçeneği olabileceğini ve inflamasyonun düzenlenmesinde kritik bir rol oynayabileceğini ima eder. miR-466l, ülseratif kolit gibi inflamatuvar hastalıkların tedavisinde önemli bir mikroRNA hedefi olarak öne çıkmaktadır. Daha önce yapılan çalışmalarda, miR-466l'in inflamatuvar yanıtlar üzerinde düzenleyici bir etkisi olduğu gösterilmiştir (Duan ve diğerleri 2015; Valmiki ve diğerleri 2017). Bulgularımız, miR-466l'in anti-inflamatuar etkiler gösterdiğini ve ülseratif kolit gibi hastalıkların tedavisinde önemli bir moleküler hedef olabileceğini doğrulamaktadır.

Bu bulgular, farklı tedavi stratejilerinin, özellikle AntimiR466l, RBO ve AZA kombinasyonlarının, DSS ile indüklenen ülseratif kolit üzerinde önemli etkiler

yaratabileceğini ve hastalığın şiddetini azaltmaya yönelik anlamlı iyileşmeler sağladığını göstermektedir. Aynı zamanda, gen ekspresyonundaki değişiklikler (özellikle IL-6, TLR4, NF- $\kappa$ B) tedavi grupları arasında anlamlı farklar gösteriyor ve bu moleküllerin, tedavi etkinliğini ve hastalığın patogenezini açıklamada önemli rol oynayabileceği düşünülmektedir. Literatürle karşılaştırıldığında, özellikle miR-466l ve NF- $\kappa$ B gibi hedeflerin, ülseratif kolit gibi hastalıkların tedavisinde önemli rol oynadığı daha önce kanıtlanmıştır. AZA ve RBO'nun inflamasyonu kontrol etme yetenekleri, bu tedavi ajanlarının hastalığın tedavisinde etkili olabileceğini gösteriyor. Sonuçlarımız, bu tedavi yaklaşımlarının moleküler düzeyde inflamasyonu düzenleme potansiyeline sahip olduğunu ve literatürdeki verilerle tutarlı şekilde ülseratif kolit tedavisinde gelecekteki terapötik stratejiler için önemli hedefler sunduğunu düşündürmektedir.



## KAYNAKLAR

- Akira, S., Uematsu, S. (2006). Toll-like receptors and innate immunity. *Journal of Molecular Medicine*, 84, 712-725.
- Ananthakrishnan, A. N. (2013). Environmental triggers for inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*, 144(2), 419-428.
- Baumgart, D. C., ve Sandborn, W. J. (2007). "Inflammatory bowel disease: clinical aspects and established and evolving therapies." *The Lancet*, 369(9573), 1641-1657.
- Bereswill S, Fischer A, Plickert R, Haag LM, Otto B, Kuhl AA, Dasti JI, Zautner AE, Munoz M, Loddenkemper C. (2011). Novel murine infection models provide deep insights into the “menage a trois” of *Campylobacter jejuni*, microbiota and host innate immunity. *PLoS ONE*.6:e20953.
- Berruyer, C., Pouyet, L., Millet, V., Martin, F. M., LeGoffic, A., Canonici, A., ... ve Galland, F. (2006). Vanin-1 licenses inflammatory mediator production by gut epithelial cells and controls colitis by antagonizing peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  activity. *Journal of Experimental Medicine*, 203(13), 2817-2827.
- Boal Carvalho, P., ve Cotter, J. (2017). Mucosal healing in ulcerative colitis: a comprehensive review. *Drugs*, 77, 159-173.
- Brenchley, J. M., Price, D. A., Schacker, T. W., Asher, T. E., Silvestri, G., Rao, S., ... ve Douek, D. C. (2006). Microbial translocation is a cause of systemic immune activation in chronic HIV infection. *Nature Medicine*, 12(12), 1365-1371.
- Burgueño, J. F., ve Abreu, M. T. (2020). Epithelial Toll-like receptors and their role in gut homeostasis and disease. *Nature Reviews Gastroenterology ve Hepatology*, 17(5), 263-278.
- Cosnes, J., Beaugerie, L., Carbonnel, F., ve Gendre, J. P. (2001). Smoking cessation and the course of Crohn's disease: an intervention study. *Gastroenterology*, 120(5), 1093-1099..
- D'Mello, C. (2008). The Role of NF- $\kappa$ B in the Inflammatory Response in Ulcerative Colitis. *Journal of Pathology*, 215(4), 373-380.
- Duan, H. (2015). miR-466l Regulates Inflammatory Response in Inflammatory Bowel Disease and Its Therapeutic Potential. *Journal of Molecular Medicine*, 93(6), 659-670.

- Duerr, R. H., Taylor, K. D., Brant, S. R., Rioux, J. D., Silverberg, M. S., Daly, M. J., ... ve Cho, J. H. (2006). A genome-wide association study identifies IL23R as an inflammatory bowel disease gene. *Science*, 314(5804), 1461-1463.
- Feng Ma; Xingguang Liu; Dong Li; Pin Wang; Nan Li; Liwei Lu; Xuetao Cao. (2010) MicroRNA-466l Upregulates IL-10 Expression in TLR-Triggered Macrophages by Antagonizing RNA-Binding Protein Tristetraprolin-Mediated IL-10 mRNA Degradation. *J Immunol* 184 (11): 6053–6059.
- Flynn, R. A., Pedram, K., Malaker, S. A., Batista, P. J., Smith, B. A., Johnson, A. G., ... ve Bertozzi, C. R. (2021). Small RNAs are modified with N-glycans and displayed on the surface of living cells. *Cell*, 184(12), 3109-3124.
- Frank, D. N., St. Amand, A. L., Feldman, R. A., Boedeker, E. C., Harpaz, N., & Pace, N. R. (2007). "Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases." *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(34), 13780-13785.
- Grip, O., Janciauskiene, S., ve Lindgren, S. (2003). Macrophages in inflammatory bowel disease. *Current Drug Targets-Inflammation ve Allergy*, 2(2), 155-160.
- Grunau, A., Escher, U., Bereswill, S., ve Heimesaat, M. M. (2017). Toll-like receptor-4 dependent inflammatory responses following intestinal colonization of secondary abiotic IL10-deficient mice with multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *European Journal of Microbiology and Immunology*, 7(3), 210-219.
- Grunau, A., Escher, U., Kühl, A. A., Bereswill, S., ve Heimesaat, M. M. (2017). Toll-like receptor-4 differentially mediates intestinal and extra-intestinal immune responses upon multi-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa* association of IL10<sup>-/-</sup> mice with chronic colitis. *Gut Pathogens*, 9, 1-11.
- Gundersen, M. D., Goll, R., Hol, J., Olsen, T., Rismo, R., Sørbye, S. W., ... ve Florholmen, J. (2016). Loss of interleukin 33 expression in colonic crypts-a potential marker for disease remission in ulcerative colitis. *Scientific Reports*, 6(1), 35403.
- Hayden, M. S., ve Ghosh, S. (2008). "NF- $\kappa$ B in immunobiology." *Cell*, 132(3), 344-362.
- Hudson, E. A., Dinh, P. A., Kokubun, T., Simmonds, M. S., ve Gescher, A. (2000). Characterization of potentially chemopreventive phenols in extracts of brown rice that

- inhibit the growth of human breast and colon cancer cells. *Cancer Epidemiology Biomarkers ve Prevention*, 9(11), 1163-1170.
- Hugot, J. P., Chamaillard, M., Zouali, H., Lesage, S., Cézard, J. P., Belaiche, J., ... & Thomas, G. (2001). Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature*, 411(6837), 599-603.
- Islam MS, Murata T, Fujisawa M, Nagasaka R et al (2008) Antiinflammatory effects of phytosterylferulates in colitis induced by dextran sulphate sodium in mice. *Br J Pharmacol* 154:812–882
- J. Zhou, J. Liu, Y. Gao, L. Shen, S. Li, S. Chen. (2021) miRNA-Based Potential Biomarkers and New Molecular Insights in Ulcerative Colitis Front. *Pharmacol.*, 12
- Jariwalla RJ (2001) Rice-bran products: phytonutrients with potential applications in preventive and clinical medicine. *Drugs Exp Clin Res* 27:17–26
- Jung, H., Kim, J. S., Lee, K. H., Tizaoui, K., Terrazzino, S., Cargnin, S., ... ve Kronbichler, A. (2021). Roles of microRNAs in inflammatory bowel disease. *International Journal of Biological Sciences*, 17(8), 2112.
- K. Saliminejad, H.R. Khorram Khorshid, S. Soleymani Fard, S.H. Ghaffari (2019), An overview of microRNAs: Biology, functions, therapeutics, and analysis methods *J. Cell. Physiol.*, 234 (5) pp. 5451-5465
- Kamada, N., Hisamatsu, T., Okamoto, S., Sato, T., Matsuoka, K., Arai, K., ... ve Hibi, T. (2005). Abnormally differentiated subsets of intestinal macrophage play a key role in Th1-dominant chronic colitis through excess production of IL-12 and IL-23 in response to bacteria. *The Journal of Immunology*, 175(10), 6900-6908.
- Katz, J. A. (2007). Management of inflammatory bowel disease in adults. *Journal of digestive diseases*, 8(2), 65-71.
- Kerckhoffs, A. P., Ben-Amor, K., Samsom, M., van der Rest, M. E., de Vogel, J., Knol, J., ve Akkermans, L. M. (2011). Molecular analysis of faecal and duodenal samples reveals significantly higher prevalence and numbers of *Pseudomonas aeruginosa* in irritable bowel syndrome. *Journal of Medical Microbiology*, 60(2), 236-245..
- Khan, K. J., Ullman, T. A., Ford, A. C., Abreu, M. T., Abadir, A., Marshall, J. K., ... & Moayyedi, P. (2011). Antibiotic therapy in inflammatory bowel disease: a systematic

- review and meta-analysis. *Official journal of the American College of Gastroenterology| ACG*, 106(4), 661-673.
- Kiecolt-Glaser, J. K., & Glaser, R. (2002). Depression and immune function: central pathways to morbidity and mortality. *Journal of psychosomatic research*, 53(4), 873-876.
- Kopiasz, Ł., Dziendzikowska, K., Gajewska, M., Oczkowski, M., Majchrzak-Kuligowska, K., Królikowski, T., ve Gromadzka-Ostrowska, J. (2021). Effects of dietary oat beta-glucans on colon apoptosis and autophagy through tlr5 and dectin-1 signaling pathways—crohn's disease model study. *Nutrients*, 13(2), 321.
- Korneev, K. V., Arbatsky, N. P., Molinaro, A., Palmigiano, A., Shaikhutdinova, R. Z., Shneider, M. M., ... ve Kuprash, D. V. (2015). Structural relationship of the lipid A acyl groups to activation of murine toll-like receptor 4 by lipopolysaccharides from pathogenic strains of *Burkholderia mallei*, *Acinetobacter baumannii*, and *Pseudomonas aeruginosa*. *Frontiers in Immunology*, 6, 595.
- Laferriere, C. A., Leung, V. S., ve Pang, D. S. (2020). Evaluating intrahepatic and intraperitoneal sodium pentobarbital or ethanol for mouse euthanasia. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*, 59(3), 264-268.
- Lamkanfi, M., ve Dixit, V. M. (2014). Mechanisms and functions of inflammasomes. *Cell*, 157(5), 1013-1022.
- Liu, C., Yan, X., Zhang, Y., Yang, M., Ma, Y., Zhang, Y., ... ve Zhang, M. (2022). Oral administration of turmeric-derived exosome-like nanovesicles with anti-inflammatory and pro-resolving bioactions for murine colitis therapy. *Journal of Nanobiotechnology*, 20(1), 206.
- Liu, M., Zhao, D., Wu, X., Guo, S., Yan, L., Zhao, S., ... ve Rong, F. (2019). miR-466 and NUS1 regulate the AKT/nuclear factor kappa B (NFκB) signaling pathway in intrauterine adhesions in a rat model. *Medical Science Monitor: International Medical Journal of Experimental and Clinical Research*, 25, 4094.
- Liu, Z. J., Yadav, P. K., Su, J. L., Wang, J. S., & Fei, K. E. (2009). Potential role of Th17 cells in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *World journal of gastroenterology: WJG*, 15(46), 5784.

- Lo, H. C., Chen, Y. H., ve Wu, W. T. (2022). Ethanol Extracts of Rice Bran and Whole Grain Adlay Seeds Mitigate Colonic Inflammation and Damage in Mice with Colitis. *Nutrients*, 14(18), 3877.
- Loubet Filho, P. S., Dias, T. O., Reis, V. H. D. O. T., Moya, A. M. T. M., dos Santos, E. F., ve Cazarin, C. B. B. (2022). Feed your gut: Functional food to improve the pathophysiology of inflammatory bowel disease. *Journal of Functional Foods*, 93, 105073.
- Lu, Y., Li, X., Liu, S., Zhang, Y., ve Zhang, D. (2018). Toll-like receptors and inflammatory bowel disease. *Frontiers in immunology*, 9, 72.
- Lyons, D. O., ve Pullen, N. A. (2020). Beyond IgE: alternative mast cell activation across different disease states. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(4), 1498.
- Miao, S. T., Lu, Q. S., Zhou, Y. J., Chang, Y. N., Xu, T., ve Zhu, M. Y. (2022). Oral administration of octacosanol modulates the gut bacteria and protects the intestinal barrier in ulcerative colitis mice. *Journal of Food Biochemistry*, 46(10), e14284.
- Mowat, C. (2011). "Inflammatory bowel disease in the UK: an epidemiological overview." *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 26(4), 41-47.
- Nagasaka, R., Chotimarkorn, C., Shafiqul, I. M., Hori, M., Ozaki, H., ve Ushio, H. (2007). Anti-inflammatory effects of hydroxycinnamic acid derivatives. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 358(2), 615-619.
- Neurath MF. Cytokines in inflammatory bowel disease. *Nat Rev Immunol*. 2014;14(5):329–342.
- Pagano, E., Romano, B., Iannotti, F. A., Parisi, O. A., D’armiento, M., Pignatiello, S., ... ve Borrelli, F. (2019). The non-euphoric phytocannabinoid cannabidivarin counteracts intestinal inflammation in mice and cytokine expression in biopsies from UC pediatric patients. *Pharmacological Research*, 149, 104464.
- Pagano, E., Romano, B., Iannotti, F. A., Parisi, O. A., D’armiento, M., Pignatiello, S., ... ve Borrelli, F. (2019). The non-euphoric phytocannabinoid cannabidivarin counteracts intestinal inflammation in mice and cytokine expression in biopsies from UC pediatric patients. *Pharmacological Research*, 149, 104464.

- Pawłowska-Kamieniak, A., Krawiec, P., ve Pac-Kożuchowska, E. (2021). Interleukin 6: biological significance and role in inflammatory bowel diseases. *Advances in Clinical and Experimental Medicine*, 30(4), 465-469.
- QP, G., ve BAI, A. (2011). Interleukin-10 and inflammatory bowel disease. *World Chin J Dig*, 19(1), 57-61.
- Rakoff-Nahoum, S., Paglino, J., Eslami-Varzaneh, F., Edberg, S., & Medzhitov, R. (2004). Recognition of commensal microflora by toll-like receptors is required for intestinal homeostasis. *Cell*, 118(2), 229-241.
- Ramos, G. P., ve Papadakis, K. A. (2019). Mechanisms of disease: inflammatory bowel diseases. In *Mayo Clinic Proceedings*. Vol. 94, No. 1, pp. 155-165. Elsevier.
- Reddy, K. V. K., Maheswaraiyah, A., ve Naidu, K. A. (2014). Rice bran oil and n-3 fatty acid-rich garden cress (*Lepidium sativum*) seed oil attenuate murine model of ulcerative colitis. *International Journal of Colorectal Disease*, 29, 267-269.
- Saenjum, C., Chaivasut, C., Chansakaow, S., Suttajit, M., ve Sirithunyalug, B. (2012). Antioxidant and anti-inflammatory activities of gamma-oryzanol rich extracts from Thai purple rice bran. *J. Med. Plants Res*, 6(6), 1070-1077.
- Sartor, R. B. (2006). "Mechanisms of disease: pathogenesis of Crohn's disease and ulcerative colitis." *Nature Clinical Practice Gastroenterology ve Hepatology*, 3(7), 390-407.
- Schreiber, S. (2005). "Azathioprine for the Treatment of Ulcerative Colitis: A Systematic Review and Meta-Analysis." *Alimentary Pharmacology ve Therapeutics*, 21(8), 1049-1058.
- Severi, E., et al. (2015). "Antibiotics, gut microbiota, and inflammatory bowel disease: a review of the literature." *Digestive Diseases and Sciences*, 60(7), 2091-2102.
- Shi, M. M., Zhu, Y. G., Yan, J. Y., Roubay, J. J., Summah, H., Monsel, A., ve Qu, J. M. (2021). Role of miR-466 in mesenchymal stromal cell derived extracellular vesicles treating inoculation pneumonia caused by multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Clinical and Translational Medicine*, 11(1), e287.
- Shouval, D. S., ve Rufo, P. A. (2017). The role of environmental factors in the pathogenesis of inflammatory bowel diseases: a review. *JAMA Pediatrics*, 171(10), 999-1005.
- Singh, R., Ha, S. E., Wei, L., Jin, B., Zogg, H., Poudrier, S. M., ... ve Ro, S. (2021). miR-10b-5p rescues diabetes and gastrointestinal dysmotility. *Gastroenterology*, 160(5), 1662-1678.

- Sirithunyalug, B., Saenjum, C., Charumanee, S., Sivamaruthi, B. S., Chaiyasut, C., Sirithunyalug, J., ve Tipduangta, P. (2018). Development of colorectal-targeted dietary supplement tablets containing natural purple rice bran oil as a colorectal chemopreventive. *Nutrients*, 10(4), 444.
- Srisala, S., Chunhabundit, R., Kongkachuichai, R., Jittorntrum, B., ve Visetpanit, Y. (2009). Effects of bran extracts from Thai molecular breeding rices on growth and apoptosis in human promyelocytic leukemia cells. *Thai Journal of Toxicology*, 24(2), 81-81.
- Sussman, D. A., Santaolalla, R., Bejarano, P. A., Garcia-Buitrago, M. T., Perez, M. T., Abreu, M. T., ve Clarke, J. (2014). In silico and Ex vivo approaches identify a role for toll-like receptor 4 in colorectal cancer. *Journal of Experimental ve Clinical Cancer Research*, 33, 1-13.
- Tamagawa, M., Shimizu, Y., Takahashi, T., Otaka, T., Kimura, S., Kadowaki, H., ... ve Miwa, T. (1992). Carcinogenicity study of  $\gamma$ -oryzanol in F344 rats. *Food and Chemical Toxicology*, 30(1), 41-48.
- Tanideh, N., Sadeghi, F., Amanat, S., Firoozi, D., Noorafshan, A., Iraj, A., ve Koohi-Hosseinabadi, O. (2020). Protection by pure and genistein fortified extra virgin olive oil, canola oil, and rice bran oil against acetic acid-induced ulcerative colitis in rats. *Food ve Function*, 11(1), 860-870.
- Tatiya-Aphiradee, N., Chatuphonprasert, W., ve Jarukamjorn, K. (2018). Immune response and inflammatory pathway of ulcerative colitis. *Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology*, 30(1), 1-10.
- Tripathi, P., & Aggarwal, A. (2006). NF-kB transcription factor: a key player in the generation of immune response. *Current science*, 519-531.
- Tsushimoto, G., Shibahara, T., Awogi, T., Kaneko, E., Sutou, S., Yamamoto, K., ve Shirakawa, H. (1991). DNA-damaging, mutagenic, clastogenic and cell-cell communication inhibitory properties of  $\gamma$ -oryzanol. *The Journal of Toxicological Sciences*, 16(4), 191-202.
- Valmiki, S., Ahuja, V., & Paul, J. (2017). MicroRNA exhibit altered expression in the inflamed colonic mucosa of ulcerative colitis patients. *World Journal of Gastroenterology*, 23(29), 5324.

- van der Sloot, K. W., Amini, M., Peters, V., Dijkstra, G., ve Alizadeh, B. Z. (2017). Inflammatory bowel diseases: review of known environmental protective and risk factors involved. *Inflammatory Bowel Diseases*, 23(9), 1499-1509.
- Varela, E., et al. (2016). "Diet and gut microbiome in inflammatory bowel disease." *Current Opinion in Gastroenterology*, 32(6), 411-416.
- Verschoye, R. D., Greaves, P., Cai, H., Edwards, R. E., Steward, W. P., ve Gescher, A. J. (2007). Evaluation of the cancer chemopreventive efficacy of rice bran in genetic mouse models of breast, prostate and intestinal carcinogenesis. *British Journal of Cancer*, 96(2), 248-254.
- von Klitzing, E., Ekmekciu, I., Bereswill, S., ve Heimesaat, M. M. (2017). Acute ileitis facilitates infection with multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa* in human microbiota-associated mice. *Gut Pathogens*, 9, 1-16.
- Wang, F., Cui, Y., Shen, X., Wang, S., ve Yang, G. B. (2019). IL-17A and IL-17F repair HIV-1 gp140 damaged Caco-2 cell barriers by upregulating tight junction genes. *Microbes and Infection*, 21(8-9), 393-400.
- Wang, M., Molin, G., Ahrné, S., Adawi, D., ve Jeppsson, B. (2007). High proportions of proinflammatory bacteria on the colonic mucosa in a young patient with ulcerative colitis as revealed by cloning and sequencing of 16S rRNA genes. *Digestive Diseases and Sciences*, 52, 620-627.
- Wechsler JB, Szabo A, Hsu CL, et al. Histamine drives severity of innate inflammation via histamine 4 receptor in murine experimental colitis. *Mucosal Immunol.* 2018;11(3):861–870.
- Wu, Y., Ran, L., Yang, Y., Gao, X., Peng, M., Liu, S., ... ve Chunyu, W. (2023). Deferasirox alleviates DSS-induced ulcerative colitis in mice by inhibiting ferroptosis and improving intestinal microbiota. *Life Sciences*, 314, 121312.
- Yadav, P. N., Liu, Z., ve Rafi, M. M. (2003). A diarylheptanoid from lesser galangal (*Alpinia officinarum*) inhibits proinflammatory mediators via inhibition of mitogen-activated protein kinase, p44/42, and transcription factor nuclear factor- $\kappa$ B. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 305(3), 925-931
- Yeshi, K., Ruscher, R., Hunter, L., Daly, N. L., Loukas, A., ve Wangchuk, P. (2020). Revisiting inflammatory bowel disease: pathology, treatments, challenges and emerging

- therapeutics including drug leads from natural products. *Journal of Clinical Medicine*, 9(5), 1273.
- Yoshimura, T., Sonoda, K. H., Ohguro, N., Ohsugi, Y., Ishibashi, T., Cua, D. J., ... & Yoshimura, A. (2009). Involvement of Th17 cells and the effect of anti-IL-6 therapy in autoimmune uveitis. *Rheumatology*, 48(4), 347-354.
- Zhang, Y. Z., & Li, Y. Y. (2014). Inflammatory bowel disease: pathogenesis. *World journal of gastroenterology: WJG*, 20(1), 91.
- Zhao, D., Qin, D., Yin, L., ve Yang, Q. (2023). Integrated Bioinformatics Analysis and Experimental Verification of Immune Cell Infiltration and the Related Core Genes in Ulcerative Colitis. *Pharmacogenomics and Personalized Medicine*, 629-643.

## EKLER

### EK-1. Etik Kurul Onay Belgesi

Evrak Tarih ve Sayısı: 30.01.2024-E.866742



T.C.  
GAZİ ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ  
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanlığı



Sayı : E-66332047-604.01-866742  
Konu : Değerlendirme ve Onay

30.01.2024

Sayın Prof. Dr. Ece KONAC  
Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Başkanlığı - Öğretim Üyesi

Daha önce 10.10.2023 tarih ve E.770285 sayılı yazımız ile onay alan G.Ü.ET-23.100 kod numaralı *"Deneyisel Kolid Modelinde Glükon Modifikasyonunun miR548 gen ailesi ve TLR/NF-κB/IL Sinyal Yolakları Üzerine Etkisi"* başlıklı çalışmanız ile ilgili vermiş olduğunuz 10.01.2024 tarihli dilekçeniz 19.01.2024 tarih ve 01 sayılı Kurul toplantısında incelenmiş olup,

Dilekçede; çalışmanın başlığının Tez İzleme Komitesi tarafından miR466 gen ailesinin, araştırılacak olan TLR/NF-KB/İL sinyal yolları üzerinde miR548 gen ailesinden daha etkili olduğu anlaşıldığı için *"Deneyisel Kolid Modelinde Glükon Modifikasyonunun miR466 gen ailesi ve TLR/NF-κB/IL Sinyal Yolakları Üzerine Etkisi"* olarak değiştirilmesi ile miRNA mimiclerin önemli olduğu çalışmada deney hayvanlarının tedavisinde miR466 mimic'lerin de inceleneceği 1 grup daha eklenmesi ile ilgili talebinizin uygun bulunduğuna oybirliği ile karar verilmiş olup, karar ilişkin imza listesi ekte gönderilmiştir.

Bilgilerinizi rica ederim.

Prof. Dr. Mustafa ARSLAN  
Kurul Başkanı

Ek:1 Liste

Belge Değerlendirme Kodu :BGAH154873

Bu belge, güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.

Belge Takip Adresi : <https://www.miktyo.gov.tr/gazi-universitesi-etky>

Enayyet Mahallesi Baranma Caddesi No:61 06560 Yenimahalle/ANKARA  
Tel:0 (312) 202 20 57 - F: (312) 2... Faks:0 (312) 202 18 76  
e-Posta: [bahelek@gazi.edu.tr](mailto:bahelek@gazi.edu.tr) İnternet Adresi: <http://bahelek.gazi.edu.tr>  
Kay Adresi: [gazunivresnet@bft1.kap.tr](mailto:gazunivresnet@bft1.kap.tr)

Belge için Nispeti Tınaz  
Genel Evrak Sorumlusu  
Tелефон No:202 20 57



Bu belge, güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.

## EK-1. (devam) Etik Kurul Onay Belgesi

| E-İmza Tarih ve Sayısı: 30.01.2024 13:56:57                 |                      |
|-------------------------------------------------------------|----------------------|
| GAZİ ÜNİVERSİTESİ                                           |                      |
| HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU TOPLANTI KATILIM LİSTESİ |                      |
| TOPLANTI TARİHİ : 19/01/2024                                | TOPLANTI SAYISI : 01 |
| ADI-SOYADI                                                  | İMZA                 |
| Prof.Dr.Mustafa ARSLAN<br>(Başkan)                          |                      |
| Prof.Dr.Mürşide Ayşe DEMİREL<br>(Başkan Yrd.)               |                      |
| Prof.Dr.Mustafa KAVUTÇU                                     |                      |
| Prof.Dr.Emin Ümit BAĞRIACIK                                 |                      |
| Prof.Dr.İpek SÜNTAR                                         |                      |
| Prof.Dr.Serkan YAVUZ                                        |                      |
| Prof.Dr.Şule COŞKUN CEVHER                                  |                      |
| Prof.Dr.Fatma Gökçe APAYDIN                                 |                      |
| Prof.Dr.Elvan ANADOL                                        |                      |
| Doç.Dr.Yeliz KILINÇ                                         |                      |
| Doç.Dr.Zeliha Aycan ÖZDEMİRKAN                              |                      |
| Doç.Dr. Duygu AĞAGÜNDÜZ                                     |                      |
| Doç.Dr. Abdullah ÖZER                                       |                      |
| Dr.Öğr.Üyesi Şevki Mustafa DEMİRÖZ                          |                      |
| Dr.Öğr.Üyesi Sühan GÜRBÜZ                                   |                      |
| Dr.Öğr.Üyesi Zeynep YIGMAN                                  |                      |
| Dr.Öğr.Üyesi Nur Banu BAL                                   |                      |
| Öğr.Gör.Dr.Burcu EKİM                                       |                      |
| Öğr.Gör.Dr. Beyza AYDOĞAN                                   |                      |
| Vet.Hek.Burcu AVCI                                          |                      |
| Osman İÇ                                                    |                      |

Bu belge,güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.



*GAZİLİ OLMAK AYRICALIKTIR..*

