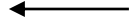


Adınızı soyadınızı giriniz

Tez kabul edildikten sonra yapılan **sabit ciltte sırt yazısı** bu şablona göre yazılacak. Yazılar tek satır olacak
Cilt sırtı yazıların yönü yukarıdan aşağıya
(sol yandaki gibi) olacak .



Tez, Yüksek Lisans'sa, YÜKSEK LİSANS TEZİ;
Doktora ise DOKTORA TEZİ ifadesi kalacak



Tez Sınavının yapılacağı yılı yazınız

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

(DOKTORA TEZİ)

**COTINUS COGGYGRİA SULU İNFÜZYONUNUN FARELERDE
DEKSTRAN SÜLFAT SODYUM İLE İNDÜKLENMİŞ ÜLSEATİF
KOLİT ÜZERİNE ETKİSİNİN İNCELENMESİ**

SEVİNÇ ÖZGÜR

**DANIŞMAN
PROF. DR. NURTEN ÖZSOY**

**TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI
BİYOKİMYA PROGRAMI**

İSTANBUL-2020

TEZ ONAYI

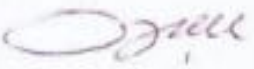
Istanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Eczacılık Fakültesi, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Biyokimya Programında Doktora öğrencisi Sevinç ÖZGÜR tarafından Prof.Dr. Nürten ÖZSOY'un danışmanlığında hazırlanan "Cotinus Coggygia Sulu İnfüzyonunun Farelerde Dekstran Sülfat Sodyum ile İndüklenmiş Ülseratif Kolit Üzerine Etkisinin İncelenmesi" başlıklı tez aşağıdaki jüri üyeleri tarafından 23/10/2020 tarihinde yapılan Tez Savunma Sınavında başarılı bulunmuş ve Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.


Jüri Başkanı

Prof.Dr. Nuriye AKEV
Istanbul Üniversitesi
Eczacılık Fakültesi
Biyokimya Anabilim Dalı


Jüri-Danışman

Prof.Dr. Nürten ÖZSOY
Istanbul Üniversitesi
Eczacılık Fakültesi
Biyokimya Anabilim Dalı


Jüri

Prof.Dr. Ayşen YARAT
Marmara Üniversitesi
Dış Hekimliği Fakültesi
Biyokimya Anabilim Dalı


Jüri

Prof.Dr. Özlem SAÇAN
Istanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa
Mühendislik Fakültesi
Biyokimya Anabilim Dalı


Jüri

Prof.Dr. Pervin VURAL
Istanbul Üniversitesi
Istanbul Tıp Fakültesi
Biyokimya Anabilim Dalı

BEYAN

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

Sevinç ÖZGÖR

İTHAF

Her zaman ve her koşulda benimle olan aileme ithaf ediyorum.

TEŞEKKÜR

Çalışma konusunun belirlenmesinde ve çalışmanın her aşamasında bilgilerini, tecrübelerini ve değerli zamanını esirgemeyen değerli Tez Danışmanım Prof. Dr. Nurten ÖZSOY'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım, yönlendirme ve bilgilendirmeleriyle çalışmamı bilimsel temeller ışığında şekillendiren Tez İzleme Komitesi'ndeki saygıdeğer hocalarım Prof. Dr. Ayşe CAN'a ve Prof. Dr. Pervin VURAL'a teşekkür ve saygılarımı sunarım.

Tezimin araştırma kısmında yer alan deney hayvan uygulamalarında bana yardımcı olan Eczacılık Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Dr. Narin ÖZTÜRK'e, histopatolojik değerlendirmeleri yapan Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Pelin ARDA'ya ve Uzm. Biyolog Cansu ÖZAL-COŞKUN'a, Western Blot analizlerini yapmamda büyük desteği olan değerli hocam Prof. Dr. Pınar AKSOY SAĞIRLI'ya, Arş. Gör. Gülsüm ALTIPARMAK ÜLBEGİ'ye ve Arş. Gör. Gülşah Gamze ARCAN'a teşekkürü bir borç bilirim.

Doktora eğitimim boyunca yardım, bilgi ve tecrübeleri ile bana sürekli destek olan başta Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Nuriye AKEV olmak üzere Doç. Dr. Özlem KURT ŞİRİN, Doç. Dr. Tuğba YILMAZ ÖZDEN ve arkadaşım Dr. Gözde HASBAL ÇELİKKOL'a teşekkür ve minnetimi özellikle belirtmek istiyorum.

Her daim yanımda olan, beni koşulsuz destekleyen ve bu yolda yürümemde bana özgüven veren Prof. Dr. Göksel ÇEVİKBAŞ AKÇİN'e teşekkür ederim.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: TDK-2018-28983

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	ii
BEYAN.....	iii
İTHAF.....	iv
TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER	vi
TABLolar LİSTESİ.....	ix
ŞEKİLLER LİSTESİ	x
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	xiii
ÖZET	xvii
ABSTRACT.....	xviii
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Ülseratif Kolit	3
2.1.1. Epidemiyoloji.....	3
2.1.2. Etiyoloji.....	4
2.1.3. Patogenez	6
2.1.3.1. Ülseratif Kolit ve Sitokinler	6
2.1.3.2. İmmünopatogenez	11
2.1.3.3. UK'ın Patolojik Bulguları	20
2.1.3.4. Gastrointestinal Mukozal Sistem	21
2.1.3.5. Ülseratif Kolit ve Oksidatif Stres	29
2.1.3.6. Ülseratif Kolit Modelleri.....	34
2.1.3.7. Dekstran Sülfat Sodyum ile Oluşturulmuş Kolit Modeli	35
2.1.3.8. İBH ve UK Tedavisinde Kullanılan İlaçlar.....	36
2.1.3.9. Gıda Takviyeleri ve Bitkiler ile Tedavi	42
2.1.3.10. Cotinus Coggygia	43
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	57
3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Kitler	57
3.2. Kullanılan Araç ve Gereçler	59
3.3. Etik Kurul Onayı.....	60

3.4. Bitki Materyali	60
3.5. İnfüzyonun Hazırlanması	60
3.6. Farelerde Kolit Oluşumu.....	60
3.7. Kullanılan Deney Hayvanları ve Oluşturulan Gruplar	60
3.8. Farelerdeki % Vücut Ağırlık Değişiminin Tespit Edilmesi.....	62
3.9. Farelerin Kolon Uzunluklarının Ölçülmesi	62
3.10. Hastalık Aktivite İndekslerinin Belirlenmesi.....	62
3.11. Biyokimyasal Yöntemler	63
3.11.1. Doku Homojenizasyonu.....	63
3.11.2. Plazmanın Elde Edilmesi	63
3.11.3. Plazmada Aspartat Aminotransferaz (AST) Aktivitesinin Tayini	63
3.11.4. Plazmada Alanin Aminotransferaz (ALT) Aktivitesinin Tayini.....	64
3.11.5. Protein Miktar Tayini.....	65
3.11.6. Kolon Dokusunda Lipid Peroksidasyonu (MDA) Analizi.....	66
3.11.7. Kolon Dokusunda Glutasyon (GSH) Tayini	68
3.11.8. Kolon Dokusunda Nitrik Oksit (NO) Miktar Tayini	70
3.11.9. Kolon Dokusunda Süperoksit Dismutaz (SOD) Aktivitesi Tayini	72
3.11.10. Kolon Dokusunda Katalaz (CAT) Aktivitesinin Tayini	72
3.11.11. Kolon Dokusunda Glutasyon Redüktaz (GR) Aktivitesinin Tayini.....	73
3.11.12. Kolon Dokusunda Glutasyon Peroksidaz (GPx) Aktivitesinin Tayini.....	74
3.11.13. Kolon Dokusunda Glutasyon-S-Transferaz (GST) Aktivitesinin Tayini.....	75
3.11.14. Kolon Dokusunda Miyeloperoksidaz (MPO) Aktivitesinin Tayini.....	75
3.12. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA).....	76
3.12.1. TNF- α , IL-1, IL-6, IL-10 ve INF- γ Miktar Tayini.....	76
3.12.2. Prostaglandin Miktar Tayini	81
3.13. Western Blot Analizi.....	83
3.14. Histopatolojik Değerlendirme.....	86
3.15. İstatistiksel Değerlendirme	86
4. BULGULAR.....	87
4.1. Makroskopik Bulgular	87
4.1.1. Farelerde Ağırlık Değişimlerine Ait Bulgular	87
4.1.2. Farelerde Kolon Uzunluğunun Ölçümüne Ait Bulgular	91

4.1.3. Hastalık Aktivite İndekslerinin Değerlendirilmesine Ait Bulgular	92
4.2. BİYOKİMYASAL BULGULAR.....	94
4.2.1. Plazmada AST ve ALT Aktivitelerine Ait Bulgular.....	94
4.2.2. Kolon Dokusu Protein Seviyelerine Ait Bulgular.....	94
4.2.3. Kolon Dokusu MDA Seviyelerine Ait Bulgular	95
4.2.4. Kolon Dokusu Süperoksit Dismutaz Aktivitesine Ait Bulgular	96
4.2.5. Kolon Dokusu Katalaz Aktivitesine Ait Bulgular	97
4.2.6. Kolon Dokusu Glutasyon Redüktaz Aktivitesine Ait Bulgular	98
4.2.7. Kolon Dokusu Glutasyon Peroksidaz Aktivitesine Ait Bulgular	99
4.2.8. Kolon Dokusu Glutasyon-S-Transferaz Aktivitesine Ait Bulgular.....	100
4.2.9. Kolon Dokusu Glutasyon Seviyelerine Ait Bulgular	101
4.2.10. Kolon Dokusu Nitrik Oksit Seviyelerine Ait Bulgular	102
4.2.11. Kolon Dokusu Miyeloperoksizaz Aktivitesine Ait Bulgular.....	103
4.3. Fare Kolon Dokularının ELISA Analiz Sonuçları.....	106
4.3.1. Kolon Dokusu Prostaglandin E2 Seviyelerine Ait Bulgular.....	106
4.3.2. Kolon Dokusu Tümör Nekroz Faktör- α Seviyelerine Ait Bulgular.....	107
4.3.3. Kolon Dokusu İnterlökin-1 β Seviyelerine Ait Bulgular	108
4.3.4. Kolon Dokusu İnterlökin-6 Seviyelerine Ait Bulgular	109
4.3.5. Kolon Dokusu İnterlökin-10 Seviyelerine Ait Bulgular	110
4.3.6. İnterferon- γ Seviyelerine Ait Bulgular	111
4.4. Fare Kolon Dokularının Western Blot Analiz Sonuçları	114
4.5. Histopatolojik Bulgular.....	117
4.5.1. Histolojik Kolit Skorlamasına Ait Bulgular.....	121
5. TARTIŞMA	123
6. KAYNAKLAR	137
ETİK KURUL KARARI	158
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI.....	159
ÖZGEÇMİŞ	160

TABLÖLER LİSTESİ

Tablo 2-1: <i>C. coggygia</i> ekstrelerinden izole edilen maddeler.....	45
Tablo 2-2: <i>C. coggygia</i> bitkisinden elde edilen ekstrelerinin içerdikleri fenolik ve flavonoid miktarları.	47
Tablo 3-1: Hastalık aktivite indeksi skorlama sistemi.....	62
Tablo 4-1: Gruplara göre deney süresince farelerin vücut ağırlık değişimleri.	89
Tablo 4-2: Gruplara göre deney süresince farelerin vücut ağırlıklarındaki yüzde değişimler.....	90
Tablo 4-3: Gruplara göre kolon uzunluğu ölçüm değerleri.	92
Tablo 4-4: Gruplara göre kolit oluşturduktan sonraki günlerde hastalık aktivite indeksleri.....	93
Tablo 4-5: Gruplara göre ALT ve AST aktivitelerine ait bulgular.....	94
Tablo 4-6: DSS ile oluşturulan ülseratif kolite <i>C. coggygia</i> sulu infüzyonunun ve mesalaminin MPO ve antioksidan parametrelerine etkisi.	105
Tablo 4-7: DSS ile oluşturulan ülseratif kolite <i>C. coggygia</i> sulu infüzyonunun ve mesalaminin PGE2 ve sitokin parametrelerine etkisi.	113

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: Ülseratif kolitin klinik ve histolojik bulguları ve etkileyen faktörleri	6
Şekil 2-2: Th-17 hücrelerinin farklılaşmasında sitokinlerin rolü.....	18
Şekil 2-3: Naif T hücrelerinin farklılaşması	19
Şekil 2-4: Th17 ve Treg hücrelerin farklılaşmasında sitokinlerin ve transkripsiyon faktörlerin rolü.	20
Şekil 2-5: Montreal sınıflandırılmasına göre ülseratif kolit kolon tutulumu	21
Şekil 2-6: Bağırsakların histolojik yapısı.....	22
Şekil 2-7: İntestinal bariyerin anatomisi ve bileşenleri.	25
Şekil 2-8: İntestinal immün sistemi	26
Şekil 2-9: İnflamatuvar bağırsak sendromu ile ilişkin immün bozuklukları	27
Şekil 2-10: Hücrelerarası bağlantılar.	29
Şekil 2-11: İskemik reperfüzyonu sonucunda intestinal mukozada meydana gelen reaktif oksijen türleri, nötrofil infiltrasyonu ve mukozal hasar	30
Şekil 2-12: Oksidatif stres ile indüklenen DNA hasarı mekanizmaları.....	33
Şekil 2-13: İBH tedavisindeki terapötik hedefler	40
Şekil 2-14: İBH tedavisinde kullanılan ilaçlar.....	41
Şekil 2-15: Doğal takviyelerin, UK belirtileri, inflamasyon ve oksidatif stres üzerindeki etkileri.	42
Şekil 2-16: <i>C. coggygia</i> 'nın sürgün ve yaprakları.....	43
Şekil 2-17: <i>C. coggygia</i> 'nın farklı kısımlarından izole edilen bazı biyoaktif maddelerin kimyasal formülleri.....	46
Şekil 3-1: Sığır serum albumini standart eğrisi ve regresyon denklemi.	66
Şekil 3-2: MDA standart eğrisi ve regresyon denklemi.	67
Şekil 3-3: GSH standart eğrisi ve regresyon denklemi.....	69
Şekil 3-4: NaNO ₂ standart eğrisi ve regresyon denklemi.	71
Şekil 3-5: TNF- α standart eğrisi ve regresyon denklemi.....	78
Şekil 3-6: IL-1 β standart eğrisi ve regresyon denklemi.....	79
Şekil 3-7: IL-6 standart eğrisi ve regresyon denklemi.....	80
Şekil 3-8: IL-10 standart eğrisi ve regresyon denklemi.....	80
Şekil 3-9: INF- γ standart eğrisi ve regresyon denklemi	81

Şekil 3-10: PGE2 standart eğrisi.....	82
Şekil 4-1: Gruplara göre farelerin vücut ağırlık değişimleri.....	88
Şekil 4-2: Gruplara göre farelerin % vücut ağırlık değişimleri	88
Şekil 4-3: Gruplara göre kolon uzunluğu ölçüm değerleri	91
Şekil 4-4: Gruplara göre günlük hastalık aktivite indeksleri	93
Şekil 4-5: Gruplara göre kolon homojenizatlarında ölçülen protein seviyeleri.....	95
Şekil 4-6: Gruplara göre kolon doku homojenizatlarında ölçülen MDA seviyeleri.....	96
Şekil 4-7: Gruplara göre kolon doku homojenizatlarında ölçülen SOD seviyeleri	97
Şekil 4-8: Gruplara göre kolon doku homojenizatlarında ölçülen Katalaz seviyeleri....	98
Şekil 4-9: Gruplara göre kolon doku homojenizatlarında ölçülen GR seviyeleri.....	99
Şekil 4-10: Gruplara göre kolon doku homojenizatlarında ölçülen GPx seviyeleri	100
Şekil 4-11: Gruplara göre kolon doku homojenizatlarında ölçülen GST seviyeleri.....	101
Şekil 4-12: Gruplara göre kolon doku homojenizatlarında ölçülen GSH seviyeleri	102
Şekil 4-13: Gruplara göre kolon doku homojenizatlarında ölçülen NO seviyeleri	103
Şekil 4-14: Gruplara göre kolon doku homojenizatlarında ölçülen MPO seviyeleri ...	104
Şekil 4-15: Gruplara göre kolon doku homojenizatlarında ölçülen PGE2 seviyeleri...	107
Şekil 4-16: Gruplara göre kolon doku homojenizatlarında ölçülen TNF- α seviyeleri .	108
Şekil 4-17: Gruplara göre kolon doku homojenizatlarında ölçülen IL-1 β seviyeleri..	109
Şekil 4-18: Gruplara göre kolon doku homojenizatlarında ölçülen IL-6 seviyeleri	110
Şekil 4-19: Gruplara göre kolon doku homojenizatlarında ölçülen IL-10 seviyeleri ...	111
Şekil 4-20: Gruplara göre kolon doku homojenizatlarında ölçülen INF- γ seviyeleri...	112
Şekil 4-21: DSS ile oluşturulan ülseratif kolite, CCYSI6, CCYSI9 ve mesalaminin, COX-2 immünoreaktif protein düzeyleri üzerine etkileri.....	115
Şekil 4-22: DSS ile oluşturulan ülseratif kolite, CCYSI6, CCYSI9 ve mesalaminin, iNOS immünoreaktif protein düzeyleri üzerine etkileri.	116
Şekil 4-23: DSS ile oluşturulan ülseratif kolite, CCYSI6, CCYSI9 ve mesalaminin COX-2 ve iNOS immünoreaktif protein bantları üzerine etkileri.	116
Şekil 4-24: Kontrol grubuna ait kolon dokusunun genel histolojik görünümü.	118
Şekil 4-25: % 6 bitki ekstresi verilen kontrol grubuna ait farenin kolon kesiti.	118
Şekil 4-26: % 9 bitki ekstresi verilen kontrol gruba ait farenin distal kolon kesiti.	119
Şekil 4-27: DSS verilen kolit grubuna ait bireyin kolon kesidinin genel histolojik görünümü.	119

Şekil 4-28: DSS ile birlikte CCYSI6 uygulanmış grubuna ait farenin kolon kesidinin genel görünümü.	120
Şekil 4-29: DSS ile birlikte CCYSI9 uygulanmış gruba ait farenin kolon kesiti.	120
Şekil 4-30: Mesalamin + DSS grubuna ait bireyin kolon dokusunun histolojik görünümü.	121
Şekil 4-31: Gruplara göre histolojik kolit hasar skoru.....	122
Şekil 5-1: Glutatyon antioksidan sistemi	127



SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

5-ASA:	5-Aminosalisilik Asit
Akt:	Protein Kinaz B
ALT:	Alanin Aminotransferaz
APC:	Antigen Presenting Cell (Antijen Sunan Hücre)
APRIL:	A Proliferation-inducing Ligand (Proliferasyonu İndükleyeci Ligand)
ARE:	Antioksidan Yanıt Elementi
AST:	Aspartat Aminotransferaz
BAFF:	B-cell Activating Factor (B Hücreleri Aktive Eden Faktör)
BCDF:	B-cell Differentiation Factor (B Hücre Farklılaşma Faktör)
BCGF:	B-cell Growth Faktör (B Hücre Büyüme Faktör)
CARD15:	Caspase-activating and Recruitment Domain 15 Gen
CAT:	Katalaz
CCYSI:	<i>Cotinus coggygria</i> Yapraklarının Sulu İnfüzyonu
CDH1:	Bariyer Fonksiyonu ile İlişkili Gen
CDNB:	1-Kloro-2,4-dinitrobenzen
CH:	Crohn Hastalığı
COX-2:	Siklooksijenaz
DPPH:	2,2,-diphenyl-1-picrylhydrazyl
DSS:	Dekstran Sülfat Sodyum
DUOX2:	Dual Oksidaz-2
FOXP3:	Forkhead BoxP3
FRAP:	Ferric İon Reducing Antioxidant Power
GALT:	Gut-associated Lymphoid Tissue
GATA-3:	GATA Bağlayıcı Protein-3
GPx:	Glutasyon Peroksidaz
GR:	Glutasyon Redüktaz
GSH:	Glutasyon
GST:	Glutasyon-S-Transferaz
GWAS:	Genom Boyu İlişkilendirme Çalışmalar

H ₂ O ₂ :	Hidrojen Peroksit
HAİ	Hastalık Aktivite İndeksi
hBD:	Human Beta Defensin
HD:	Human Defensin
HLA:	Human Leukocyte Antigens (İnsan Lökosit Antijenleri)
HNE:	4-Hidroksinonenal
Hnf4a:	Hepatocyte Nuclear Factor Alpha 4 (Hepatosit Çekirdek Faktörü Alfa 4)
HO:	Hem Oksijenaz
HPNE:	4-Hidroperoksinonenal
HTAB:	Heksadesiltrimetilamonyum Bromür
İBH:	İnflamatuvar Bağırsak Hastalığı
IER3:	Immediate-early Response 3 Gene
IFN:	İnterferon
IL	İnterlökin
iNOS:	İndüklenen Nitrik Oksit Sentaz
iTreg:	Edinsel Düzenleyici Treg
JAK/STAT:	Janus Kinase/Signal Transducers and Activators of Transcription
JAM:	Junctional Adhesion Molecule
Keap1:	Kelch-like ECH-associated Protein 1
LDH:	Laktat Dehidrojenaz
L-NAME:	N ^G -nitro-L-arginin Metil Ester
L-NMMA:	N ^G -monometil-L-arginin
LOX:	Lipooksijenaz
MAdCAM:	Hücre Adezyon Molekülü
MDH:	Malat Dehidrojenaz
MDP:	Muramil Dipeptidi
MHC II:	Major Histocompatibility Complex (Temel Doku Uyuşmazlık Antijenleri)
MIC:	Minimum İnhibitör Konsantrasyonu
MIP-1:	Makrofaj İnflamatuvar Protein-1
MPO:	Miyeloperoksidaz

MyD88:	Miyeloid Diferansiyasyon Faktör 88
NADH:	Nikotin Adenin Dinukleotid Redüklenmiş Şekli
NaN ₃ :	Sodyum Azit
NF-κB:	Nükleer Faktör-κB
NK:	Natural Killer Cells (Doğal Öldürücü Hücreler)
NLR:	Nucleotide-binding Oligomerization-domain Protein" Like Receptors (NOD Benzeri Reseptörleri)
NO:	Nitrik Oksit
NOD-2:	Nukleotid Bağlayıcı Oligomerizasyon Bölgesi-2
NOS:	Nitrik Oksit Sentaz
NOX:	NADPH Oksidaz
NOXO1:	NADPH Oksidase Organizör1
Nrf2:	Nükleer Faktör Eritroid 2 İlişkili Faktör 2
nTreg:	Doğal Treg
O ₂ ^{•-} :	Süperoksit Radikali
PAF:	Trombosit Aktive Edici Faktör
PAMPs:	Pathogen-associated Molecular Patterns (Patojenle İlişkili Moleküller
PARP:	Poly ADP-Ribose-Polymerase
PGE ₂ :	Prostaglandin E ₂
PI3K	Fosfatidilinozitol 3-kinaz
PPARγ:	Peroksizom Proliferasyonunu Aktive Edici Reseptör Gama
PRR:	Pattern Recognition Receptors (Yapı Tanıyan Reseptörler)
PUMA:	p53 Up-regulated Modulator of Apoptosis
RIPK2:	Receptor Interacting Serine/threonine Kinase 2
RNT:	Reaktif Nitrojen Türleri
RORγt:	RAR-bağımlı Orphan Reseptör Gama t
ROT:	Reaktif Oksijen Türleri
RT-PCR:	Real-Time Polimeraz Zincir Reaksiyonu
SDS:	Sodyum Dodesil Sülfat
SLRL:	Sex-linked Recessive Lethal

SOD:	Süperoksit Dismutaz
STAT:	Signal Transducers and Activators of Transcription (Sinyal İletici ve Transkripsiyon Aktivatörü)
TBA:	Tiyobarbitürik Asit
TBARS:	Tiyobarbitürik Asitle Reaksiyona Giren Maddeler
TCA:	Trikloroasetik Asit
TEAC:	Trolox Equivalent Antioxidant Capacity
TEP:	1,1,3,3-Tetraetoksipropan



ÖZET

Özgür, S. (2020). *Cotinus coggygia* sulu infüzyonunun farelerde dekstran sülfat sodyum ile indüklenmiş ülseratif kolit üzerine etkisinin incelenmesi. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyokimya ABD. Doktora Tezi. İstanbul.

Bu çalışmada *Cotinus coggygia* Scop. yapraklarından hazırlanan sulu infüzyonun (CCYSI), kolon mukozasının kronik inflammatuar hastalığı olan ve kolon kanser riskini arttıran ülseratif kolit (UK) üzerine terapötik etkilerinin araştırılması amaçlandı. 7 gün süre ile C57BL/6 erkek farelere, iki farklı dozda hazırlanan CCYSI (%6 ve %9) veya mesalamin (250 mg/kg vücut ağırlığı) oral olarak uygulandı. UK, deney süresince musluk suyu verilen normal ve bitki kontrol grupların dışındaki diğer gruplardaki farelere 5 gün boyunca musluk suyu içinde çözündürülen %3'lük dekstran sülfat sodyum (DSS) verilmesiyle indüklendi. Çalışma sonunda, CCYSI6 ve CYSI9'nin DSS uygulanması ile farelerin kolon uzunluğunda görülen azalmayı inhibe ettiği, hastalık aktivite indeksini arttırdığı görüldü. DSS ile birlikte CCYSI verilen deney grubunun nötrofil infiltrasyon indeksi olan miyeloperoksidaz (MPO) ve oksidatif stres parametrelerin düzeylerinde, DSS uygulanmış kontrol deney grubuna göre anlamlı azalma görüldü. Bunun yanı sıra, CCYSI'nin 7 günlük uygulanmasının DSS uygulanmış kolon dokusunda TNF- α , IL-1 β , IL-6 ve INF- γ gibi proinflammatuar sitokin düzeylerini baskıladığı görüldü. Western blot analizi ile inflammatuar cevabın daha ileri aşamada incelenmesinde, 7 günlük uygulamanın kolondaki iNOS ve COX-2 ekspresyonunu inhibe ettiği ve dolayısıyla NO ve PGE2 düzeylerinde azalmaya neden olduğu saptandı. CCYSI'nin kolon mukozasındaki inflammatuar değişiklikler gibi histolojik hasarı anlamlı derecede azalttığı gözlemlendi. Bu çalışmada UK tedavisinde ve önlenmesinde CCYSI'nin terapötik bir ajan olarak kullanılabileceği deneysel olarak kanısına varıldı.

Anahtar Kelimeler: *Cotinus coggygia*, Dekstran sülfat sodyum, Ülseratif kolit, Antioksidan sistemi, Sitokinler

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: TDK-2018-28983

ABSTRACT

Özgür, S. (2020). Investigation of The Effect of an Aqueous Infusion of *Cotinus coggygria* Leaves on Dextran Sulphate Sodium-Induced Ulcerative Colitis in Mice. Istanbul University, Institute of Health Science, Department of Medical Biochemistry. Doctorate Thesis. Istanbul.

The aim of this study was to investigate the therapeutic effect of *C. coggygria* Scop. leaf aqueous infusion (CCLAI) in the treatment of ulcerative colitis (UK), a chronic inflammatory disease of the colonic mucosa that can increase the risk of colon cancers. C57BL/6 male mice were treated orally with two different doses of CCLAI (6% and 9%) or mesasalamine (250 mg/kg body weight) for 7 consecutive days. UK were induced in rats by administering 3% dextran sulphate sodium (DSS) in the drinking water for 5 days, except for the normal and plant control groups that had access to tap water only. The results showed that CCLAI6 and CCLAI9 inhibit the DSS-induced shortening of colon and increase Disease Activity Index (DAI) score. There was also significant reduction in the levels of neutrophil infiltration index, myeloperoxidase (MPO) and oxidative stress parameters in the groups treated with CCLAI in comparison with those observed in the control DSS treated group. Additionally, we observed that treatment for 7 days suppressed tissue levels of several key pro-inflammatory cytokines, including TNF- α , IL-1 β , IL-6 and INF- γ in DSS-treated colon tissues. Further examination of the inflammatory response by Western blot analysis revealed that 7 days treatment reduced the colonic iNOS and COX-2 expression with a concomitant decrease in the NO and PGE2 levels, respectively. CCLAI significantly attenuated histological injury including marked inflammatory changes in the colonic mucosal lining. These findings provide experimental evidence that CCLAI may be used as therapeutic agent for the treatment and prevention of UC.

Key Words: *Cotinus coggygria*, Dextran sulphate sodium, Ulcerative colitis, Antioxidant system, Cytokines

The present work was supported by the Research Fund of Istanbul University. Project No. TDK-2018-28983

1. GİRİŞ VE AMAÇ

İnflamatuvar bağırsak hastalığı (İBH) türleri olan Crohn hastalığı (CH) ve ülseratif kolit (UK), ABD ve Avrupa’da yaygın olarak görülmektedir, düşük insidanslı bölge olarak kabul edilen Asya’da ise endişe verici şekilde artış gözlenmektedir. Ülseratif kolit, aktivasyon ve remisyonlarla seyreden kronik inflamatuvar bir hastalıktır. Ülseratif kolitin etiopatogenezinde yer alan mekanizmalar tam olarak açıklığa kavuşturulamamış olmakla birlikte immünolojik, infeksiyöz, genetik ve alerjik faktörlerin rolleri olduğuna dair bulgular mevcuttur (Engel ve Neurath, 2010). Hastalığın aktif döneminde, mukozanın lamina propria bölgesinde akut ve kronik inflamatuvar hücrelerin infiltrasyonu görülmesi ve kompleman sistemin aktivasyonunun bir göstergesi olarak mukozal immünoglobulin G üretimi ile makrofajların ve T hücrelerin aktivasyonu hastalığın patogenezinde mukozal inflamasyonun ve immünolojik reaksiyonların rol oynayabilecekleri ileri sürülmüştür. Artmış immünolojik aktivite, özellikle sitokinlerin, kininlerin, lökotrienlerin, trombosit aktive edici faktör (PAF) ve reaktif oksijen metabolitlerin artmış salınımı ile ilişkilendirilmiştir. Lamina propriadaki makrofajlar tarafından salgılanan pro-inflamatuvar mediatörler sadece immün ve inflamatuvar cevabın artmasına yol açmamaktadır, aynı zamanda direkt olarak epitel ve endotel fonksiyonu (iskemiye yol açan artmış permeabilite) ve tamir mekanizmaları üzerine etki ederek kolonik mukozada subepitelyel kollajen sentezini arttırmaktadırlar. Özetle söylemek gerekirse ülseratif kolitte çeşitli ve değişik tipte immünolojik bozukluklara rastlanmasına rağmen bunların çoğu hastalığın sebebi olmaktan ziyade sonucudur. Bugün için henüz idyopatik diye ifade ettiğimiz İBH etiopatogenezinde hem immün cevapları değişik genetik bir yapı bozukluğu, hem de bakteri, virüs veya besinlere karışan maddeler gibi dış etkenlerin rolü düşünülmektedir.

Ülseratif kolit patogenezinin anlamaya yönelik çalışmalar sürekli olarak yapılmaktadır. Böylece, ülseratif kolit patogenezinin anlamak hem gelecekteki sağlık gelişimi için çok önemlidir, hem de ilaç geliştirme yöntemleri için yeni ufuklar açabilir.

Ülseratif kolitin, dünyada ve ülkemizde yaygın olarak görülen ve ölüm ile sonuçlanabilen kolon kanseri riskini artırması nedeniyle, erken teşhis ve tedavisi önem taşımaktadır. Günümüzde kolit tedavisinde kullanılan ilaçlar kolite sebep olan etkenleri ortadan kaldırmaya yönelik olmayıp, inflamasyonun geriletilmesini sağlayan anti-

inflatuar tipte ilaçlar ve immün sistemi baskılayıcı ajanlardır (Lewis ve ark., 1999; Pohl ve ark., 2000; Ozkan, 2003). Kolit etiyolojisi henüz tam olarak bilinmediğinden, halen mevcut tedavi yöntemleri hastalığın iyileşmesi ya da önlenmesinde tam etkili olamamaktadır. Bunun yanı sıra, mevcut tedavi yöntemleri enfeksiyon riski, hipertansiyon, diyabet, pankreatit, hepatit, böbrek hasarı, sinir hücrelerinde iletim bozukluğu gibi ciddi yan etkilere de sahiptir (Duvnjak ve ark., 2013). Bu nedenle günümüzde, ülseratif kolit hastalığı için yeni ve etkin tedavi yöntemleri geliştirilmeye çalışılmaktadır.

Ülseratif kolitin etiopatogenezinde ilerlemeler kaydedilmesine rağmen tedavisinde kullanılan salisilatlar, kortikosteroidler, immünosupresan ve immünomodülatörlerin dışında gerçek anlamda yeni bir tedavi şekli henüz yoktur. Bu preparatlar genellikle yan etkilere ve komplikasyonlara yol açmaktadır. Günümüzde birçok hastalığın tedavisinde bitkiler ve bitkisel ilaç hammaddelerinden yararlanılmaktadır.

Bu çalışmada, *C. coccylria* sulu infüzyonunun farelerde DSS (dekstran sülfat sodyum) ile indüklenmiş ülseratif kolit üzerine etkisinin incelenmesi amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

Ülseratif kolit (UK) ve Crohn hastalığı (CH) benzer remisyon ve relapslarla seyreden kronik inflamatuvar sürece sahip olmalarından ve bilinmeyen nedenlerinden dolayı inflamatuvar bağırsak hastalığı (İBH) olarak tanımlanmaktadır. Benzerliklerine rağmen her iki hastalık birbirinden tutulan kolonun uzunluğu ve lokalizasyonu, inflamasyonun farklı histolojik bulguları ve komplikasyonları bakımından ayırt edilebilir (Bamias ve ark., 2005). Ülseratif kolitte inflamasyon rektumdan başlayarak kolonun proksimal segmentine doğru yayılım gösterir, CH tüm gastrointestinal sistemi etkilemekle birlikte, özellikle terminal ileum, çekum, perianal bölge ve kolonu tutmaktadır. Her iki hastalıkta genetik olarak yatkın kişilerin bağırsak lümeni içindeki bakterileri antijenlerine karşı gelişen bağırsak mukozal immün cevabın regülasyonundaki bozuklukların etkili olduğu ileri sürülmüştür (Bamias ve ark., 2005).

2.1. Ülseratif Kolit

Ülseratif kolit özellikle 30-40 yaşları arasındaki bireyleri etkileyen kolonun kronik ve idiyopatik inflamatuvar hastalığıdır. Ülseratif kolit, rektumdan başlayıp proksimale doğru tüm kolon mukoza ve submukozasına yayılan, akut ve kronik inflamatuvar değişikliklerle karakterize, kişilerde genetik ve çevresel faktörlerin etkisiyle, kolon mukozasında bakteriler ve antijenler ile immün yanıtın uyarılması sonucu meydana gelen bir inflamatuvar bağırsak hastalığıdır. Aslında ülseratif kolit sadece sindirim kanalına özgü değil, bağırsak dışı tutulumları da olan sistemik bir hastalıktır.

2.1.1. Epidemiyoloji

Ülseratif kolitin insidans ve prevalansı giderek bütün dünyada artmaktadır ve coğrafi bölgeler, ırklar ve etnik gruplara göre önemli farklılıklar göstermektedir. İnsidansı, 2-10/100,000, prevalansı 35-100/100,000 olarak bildirilmiştir. En yüksek insidansı Kuzey Avrupa (100 000 de 24,3), Kanada (100 000 de 19,2) ve Avustralya (100 000 de 17,4)'da, en yüksek prevalans hızı ise Avrupa (100 000 de 505), Kanada (100 000 de 248) ve Amerika Birleşik Devletlerinde (100 000 de 214) rapor edilmiştir. Hastalık coğrafi bölge olarak Amerika Birleşik Devletleri ve Kuzey Avrupa ülkelerinde, ırk olarak beyaz ırkta ve etnik köken olarak Yahudilerde daha fazla

görülmektedir. Bu hastalığa, kadın ve erkekler arasında benzer sıklıkta rastlanmaktadır (Pietro ve Friedman, 1999; Ungaro ve ark., 2017) (Geremia ve ark., 2014; Ungaro ve ark., 2017).

2.1.2. Etiyoloji

Ülseratif kolit, etiyojisi hala tam olarak bilinmeyen ve kolorektal kanser riskini arttıran bir hastalıktır. Ülseratif kolit gelişimini tek bir mekanizma ile açıklamak mümkün değildir. Etiyolojide, genetik yatkınlık, çevresel ve immünolojik faktörlerin rol oynadığı düşünülmektedir (Hibi ve Ogata, 2006).

Yapılan klinik araştırmalarda, ülseratif kolit gelişiminde genetik yatkınlığın rol oynadığı görülmüştür. Hastaların % 8-14'ünde ailesinde inflamatuvar bağırsak hastalığı olan birinci derecedeki akrabalarının yakalanma riskinin dört kez daha fazla olduğu bildirilmiştir. Genom boyu ilişkilendirme çalışmaları bugüne kadar İBH ilişkili 200 risk lokusu belirlemiştir. Bunlardan insan lökosit antijeni (HNF4A) ve bariyer fonksiyonu ile ilişkili gen (CDH1) ülseratif kolit ile ilişkilendirilmiştir. Doğal mukozal korumada ve antijen sunumunda görevli olan DLG5, MDR1, NOD2 ve PPAR- γ genlerinin UK patogenezi rolleri vurgulanmıştır (Geremia ve ark., 2014).

Kolit hastalarının %10 kadarında otozomal dominant geçiş vardır. Genetik çalışmalar, hastalık lokuslarının 12. ve 16. kromozomlarda tanımlanmış olduğunu, ayrıca 1., 3., 6., 7., 14. ve 19. kromozomlardaki değişikliklerin de hastalıktan sorumlu olduğunu göstermektedir (Farrell ve Peppercorn, 2002). Hastalıkta, 6. kromozom üzerinde bulunan insan lökosit antijen sınıf II lokusundaki insan lökosit antijen-DR2, insan lökosit antijen-DRB1*0103, insan lökosit antijen-DR9 ve insan lökosit antijen-DRB1*1502 alellerinin etkili olduğu kabul edilmektedir. Ayrıca “nükleotid bağlayıcı oligomerizasyon bölgesi-2” (NOD-2) geni hastalık ile ilişkili bulunmuştur (Cho, 2003). Çoklu ilaç direnç geni-1 varyantlarının da hastalık ile ilgili olduğu bulunmuştur. Çoklu ilaç direnç geni-1, UK tedavisinde direnç göstermektedir ve bu geni eksik olan farelerde kolit geliştiği görülmüştür (Ho ve ark., 2005). Peroksizom proliferasyonunu aktive edici reseptör gama (PPAR γ) geni de nuklear faktör- κ B (NF- κ B) aktivitesini engelleyen önemli bir nuklear reseptördür ve ekspresyonu UK hastalarda azalmaktadır (Dubuquoy ve ark., 2003). Ülseratif kolit patogeneziyle ilgili tüm bu genler doğal immün cevabı, mukozal bariyer fonksiyonlarını ve bakteriyal ölümü düzenleyerek etkilerini göstermektedir.

Dünyadaki artmış UK insidansı çevresel faktörlerin de etkili olabileceklerini düşündürmektedir. Çevresel faktörler arasında ise sigara içimi, diyet, non-steroidal anti-inflamatuar ilaçlar, stres ve enfeksiyöz ajanlar sayılabilir.

Sigara içmeyi bırakmış veya sigara içmeyenlerde, aktif sigara içenlere göre UK gelişme riski daha yüksektir. Sigaranın ülseratif kolitte koruyucu etkisi olduğu görülmüştür. Yapılan çalışmalarda, sigara içiminin kolon mukozasındaki musinin yapısını bozması sonucunda ülseratif koliti tetiklediği düşünülmektedir (Blumberg ve Strober, 2001).

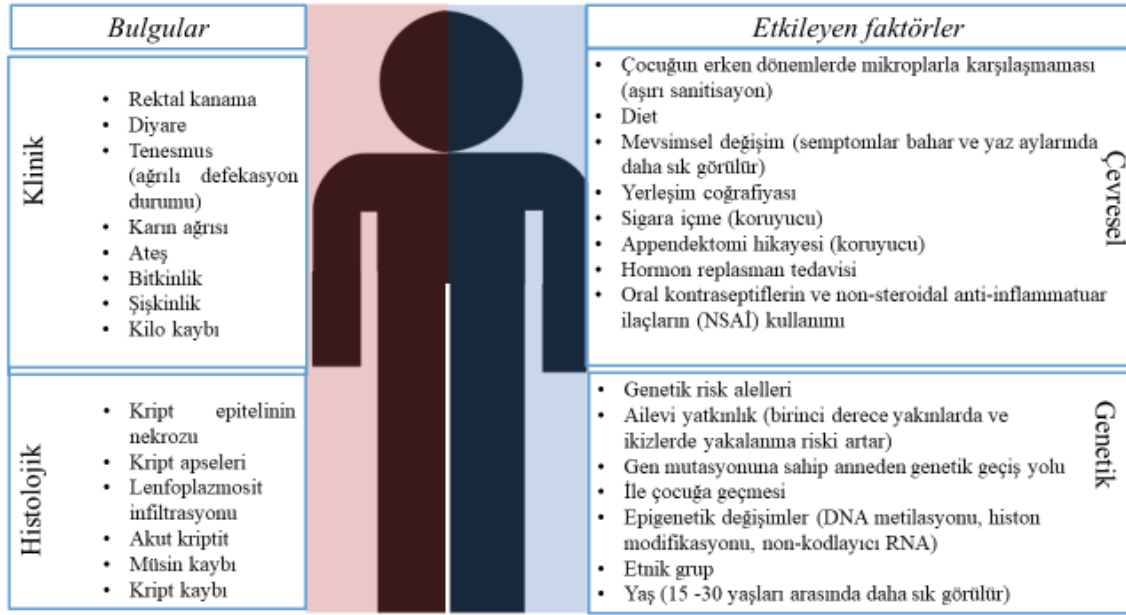
Karbohidrat, rafine şeker ve protein tüketiminin yüksek olması ve yüksek miktarda yağ asidi içeren besinlerin tüketilmesi ülseratif kolite yatkınlığı arttırmaktadır. Oral kontraseptif ve non-steroidal anti-inflamatuar ilaçlar, hormon replasman tedavisi ülseratif kolitin gelişme riskini arttırmaktadır (Low ve ark., 2016; Ungaro ve ark., 2017). Non-steroidal anti-inflamatuar ilaçlar, nonspesifik olarak inflamasyonu başlatır ve mukozal bariyeri yıkarak doğal immün cevabı aktifleştirir. Genetik olarak hastalığa yatkın bireylerde kommensal bakteri ve diğer antijenlerin enterositlere fazla girişi sonucu uzun süreli T hücre aracılı inflamasyon uyarılır. Örneğin 2 hafta boyunca non-steroidal anti-inflamatuar ilaçlardan proksikam'a maruz kalan IL10-/- farelerde kronik kolit gelişmiştir (Berg ve ark., 2002). Streste mukozal bariyer geçirgenliğini, immün yanıtı ve lümenal mikroçevreyi değiştirerek inflamasyona duyarlılığı artırmaktadır.

Appendektominin, özellikle genç yaşta apandisitinin alınması, ülseratif kolite karşı koruyucu etkisinin olduğu ileri sürülmektedir (Low ve ark., 2013; Ungaro ve ark., 2017).

Yapılan araştırmalarla ülseratif kolitin bağırsak bakteri florası ile ilişkili olduğu kanıtlanmıştır. Özellikle son yıllarda yararlı, koruyucu bakteriler ile zarar verici, patojenik bakteriler arasındaki dengesizliklerin (disbiyosis) ülseratif kolite yol açabileceği ortaya konulmuştur. Bağırsak lümenindeki enterik kommensal bakterilerin sayısı 10¹¹~10¹⁴ civarındadır. Bağırsak kommensal bakterilerin çoğunu Bacteroidetes gibi gram-negatif bakteriler ile Firmicutes gibi gram-pozitif bakteriler oluşturmaktadır (Kim ve Cheon, 2017). CH ve UK gruplarında Enterobacteriaceae ailesinde yer alan *Escherichia coli* türleri bol ve aktif olarak tespit edilmiştir. UK hastalarında azalmış biyoçeşitlilik, azalmış Firmicutes ve artmış Gamaproteobakteri ve Enterobakteriler rapor edilmiştir. UK hastalarının kolonunda sülfid-redükleyici Deltaproteobakteriler

tespit edilmiştir (Ungaro ve ark., 2017). Bakteriler arasında son zamanlarda üzerinde en çok durulan *Mycobacterium paratuberculosis*'dir.

Ülseratif kolitin klinik ve histolojik bulguları ve etkileyen faktörleri Şekil 2-1'de özetlenmiştir.



Şekil 2-1: Ülseratif kolitin klinik ve histolojik bulguları ve etkileyen faktörleri (Low ve ark., 2016).

2.1.3. Patogenez

UK'in patogenezi bilinmemektedir. Genetik olarak yatkın kişilerde çevresel faktörlerin etkisiyle iltihabi reaksiyona karşı oluşan aşırı ve kontrol edilemeyen immün cevabın veya immün cevabın regülasyonunun bozulması sonucunda görüldüğü ileri sürülmüştür (Roda ve ark., 2011; Geremia ve ark., 2014).

2.1.3.1. Ülseratif Kolit ve Sitokinler

Ülseratif kolit hastalığında sitokinler, inflammatuar mediyatörlerin, nitrik oksit, lökotrienlerin, trombosit aktive edici faktörün salgılanmasında, NF-kB yolun aktivasyonunda, apoptozun inhibisyonunda görev alırlar ve mukoza harabiyetinden sorumludurlar (Roda ve ark., 2011).

Sitokinler immün cevabın oluşması sırasında ve sonrasında hem immün hücreler hem de glia hücreleri gibi diğer vücut hücreleri arasında haberleşmeyi sağlayan geniş

bir protein grubunu oluştururlar (Roda ve ark., 2011). Görev bakımından bazı gruplara ayrılırlar (Ferreira ve ark., 2018):

Tümör Nekroz Faktör (TNF)

Antijen sunan hücreler (Antigen Presenting Cell-APC) ve makrofajlar tarafından salgılanan tipik bir proinflatuar sitokindir (Roda ve ark., 2011). Salgılanması organizmada bir antijenin devreye girmesini gerektirmediğinden, doğal bir immünite mediyatörü gibi etki etmektedir. TNF, T hücreler tarafından $INF-\gamma$, $IL-1\beta$ ve $IL-6$ sitokinlerin serbestlenmesiyle doğrudan ya da dolaylı proinflatuar, lökositlerin fagositer aktivitesinin uyarılmasıyla anti-tümöral, lökositlerin yapışmasını kolaylaştıran adeziv moleküllerin vasküler endotelyumda sentezini uyaran, prokoagülan, serbest radikallerin oluşumu üzerine kompleks, apoptozu inhibe edici gibi birbirinden ayırteilmesi zor olan doğrudan ya da dolaylı etkiler gösterir. $TNF-\alpha$ 'nın bağırsaklarda damar permeabilitesini arttırdığı ve histolojik olarak dokulara hasar verdiğı bildirilmiştir (Roda ve ark., 2011).

İnterlökin-1 β (IL-1 β)

$IL-1\beta$ özellikle monosit/makrofajlar tarafından serbestlenmesinin yanında, B lenfositler ve endotel hücreler tarafından da serbestlenmektedir. Çok sayıda mikroorganizma, değışik maddeler, sitokinler ve mediyatörler, $IL-1\beta$ salgılanmasına yol açarlar. $IL-1\beta$ 'in etkileri TNF 'n etkilerine oldukça benzerlik göstermektedir. $IL-1\beta$ 'de $TNF-\alpha$ gibi akut faz yanıtın önemli bir mediyatrdr (Rogler ve Andus, 1998).

İnterlökin 2 (IL-2)

Lenfositler tarafından sentezlenen ve "T hücresi büyüme faktörü" olarak adlandırılan $IL-2$, T lenfositlerin olgunlaşmasını ve proliferasyonunu sağlamaktadır. UK hastalarında $IL-2$ seviyelerinin azaldığı (Rogler ve Andus, 1998), CH hastaların inflame mukozalarında ise arttığı (Breese ve ark., 1993) bildirilmiştir.

İnterlökin 4 (IL-4) ve transforme edici büyüme faktörü ($TGF-\beta$) anti-inflatuar sitokinlerdir. $CD4^+$ tipi T lenfositler ($Th-2$) tarafından, özellikle alerjik reaksiyonlar sırasında salgılanır. Önceden aktive olmuş B lenfositlerin büyüme ve değışimini artırır, hipersensibilite reaksiyonlarında önemli rolü olan IgE oluşumunu kolaylaştırır. Makrofajların koloni oluşumunu, monositler tarafından H_2O_2 'in salgılanmasını ve $IL-1\beta$ ve $TNF-\alpha$ gibi proinflatuar mediyatörlerin salgılanmasını

inhibe eder. İBH hastaların kanında IL-4 seviyesi ve IL-4'ün mRNA miktarı düşük bulunması pro-inflamatuar ve anti-inflamatuar sitokinlerin arasında dengenin bozulduğunu ve proinflatuar sitokinlerin yönüne doğru kaydığını göstermektedir (Rogler ve Andus, 1998; Roda ve ark., 2011). IL-4'nün inflamasyonu azaltıcı etkisi Griga ve ark. (2000) tarafından bildirilmiştir. IL-4'nün verilmesiyle Crohn ve UK hastaların periferik kan mononükleer hücreleri tarafından salgılanan vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) düzeylerinde anlamlı bir azalma tespit edilmiştir.

TGF- β hücre proliferasyonunda inhibitör ya da stimülatör etkilidir. TGF- β , epitel hücreleri, endotel hücreleri, fibroblastlar, T ve B lenfositleri üzerine hücre proliferasyonunu inhibe edici etki gösterir. TGF- β , UK hastalarında normal kontrollere göre lamina propria'nın mononükleer hücreleri tarafından aşırı sentezlendiği görülmüş ve TGF- β 'nin sistemik immün cevapta anti-inflamatuar olarak, lokal immün cevapta ise pro-inflamatuar olarak etki ettiği sonucuna varılmıştır (Roda ve ark., 2011).

İnterlökin-5 (IL-5)

"Eosinophil colony stimulating factor" olarak adlandırılan IL-5, CD4⁺T tipi lenfositlerden (Th2) ve bazı monositlerden salgılanır. IL-5, B lenfositlerin proliferasyonunu ve immünoglobulinlerin salgılanmalarını uyarır, sitotoksik T lenfositlerini de aktive eder. IL-5'nin artmış düzeyleri UK hastalarında tespit edilmiştir, bu nedenle UK Th2 tipi inflamasyon hastalığı olarak kabul edilmektedir (Rogler ve Andus, 1998). Paraziter enfeksiyonlara karşı mücadelede önemli rol oynayan eozinofillerin büyüme, değişim ve aktivitesini uyarması nedeniyle büyüme faktörü olarak kabul edilmektedir.

İnterlökin 6 (IL-6)

Akut faz yanıtına cevap olarak indüklenen proinflatuar sitokindir. Bağırsaklarda makrofajlar tarafından salgılanır. Proinflatuar etkilerini çözünebilen reseptörlerine bağlanarak gösterir. Bağlanma sonucunda gp130'u eksprese eden hücreler uyarılır. UK hastaların biyopsi örneklerinde yüksek düzeyde bulunmuştur (Rogler ve Andus, 1998a; Roda ve ark., 2011).

İnterlökin-8 (IL-8)

"Neutrophil activating peptide" olarak adlandırılan IL-8, nötrofilleri aktive ederek proinflatuar mediyatörlerin serbestlenmesini uyarır. Bağırsak mukozasındaki

makrofajlar, epitel hücreleri ve fibroblastlar tarafından salgılanır. UK hastalarında yükselmiş kolon IL-8 seviyeleri, makroskopik akut iltihabi değişimleri ile özellikle kript apselerinde nötrofil hücrelerinin sayısındaki belirgin artışı ile paralellik gösterir (Rogler ve Andus, 1998).

İnterlökin-9 (IL-9)

PU.1 transkripsiyon faktörü ile belirlenen yeni CD4⁺ Th hücre popülasyonun salgıladığı IL-9, UK ile ilişkilendirilmiştir. Bu hücre tipi, farklılaşmamış (Th0) hücrelerinin TGF- β ve IL-4 varlığında MHC Tip II antijen kompleksleri ile karşılaştığında gelişir. Th9 hücreleri tarafından salgılanan IL-9'nin hücre proliferasyonunu ve tamirini inhibe ettiği ve bağırsak epitel bariyer üzerinde negatif etkisi bulunduğu, TNF- α konsantrasyonunu anlamlı bir şekilde arttırdığı bildirilmiştir (Ungaro ve ark., 2017).

İnterlökin-10 (IL-10)

T hücreler, B hücreler ve monositler tarafından salgılanan anti-inflamatuar bir sitokindir. Antijenik uyarının varlığında, APC hücrelerinin yüzeyinde bulunan ve T hücrelerine çeşitli antijenik peptidleri sunmaya yarayan MHC II (Major Histocompatibility Complex-Temel Doku Uyuşmazlık Antijenleri) moleküllerinin azaltıcı (down) düzenlenmesi ile monositlerin antijen sunma kapasitesi azalır ve IL-1 β , IL-6 ve TNF- α 'nın salgılanması inhibe olur. UK hastaların T lenfositlerindeki IL-10'a ait mRNA'nın Real-Time Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR) ile ekstraksiyonu sonucunda yüksek bulunmuştur, oysa normal lamina propria da tespit edilememiştir (Rogler ve Andus, 1998; Roda ve ark., 2011). Melgar ve ark. (2003), UK hastaların T lenfositlerinde IL-10'a ait mRNA'nın miktarının arttığını bildirmişlerdir. Artmış IL-10'a ait mRNA miktarı inflamasyon olmayan ileumun T lenfositlerinde de görülmüştür.

İnterlökin 11 (IL-11)

Pleiotropik bir sitokin olan IL-11, hematopoetik stem hücreleri, hepatositler ve progenitör hücreleri üzerinde birçok etki göstermektedir. Bağırsak epitel hücreleri üzerinde koruyucu etkisi vardır. C3H/HeJ farelere 5-fluorourasil verildikten ve öldürücü dozun altında radyasyon uygulanmasından sonra, belirgin intestinal villus yapılarının bozulması gözlenmiş ve fareler 10. günde ölmüştür. Rekombinant insan IL-11 verilen

farelerin intestinal mukozası artmış mitotik indeksi göstererek kısa sürede iyileşmiştir (Rogler ve Andus, 1998).

İnterlökin-12 (IL-12)

IL-12 ailesi doğal immün sistemi ile ilişkilidir. Lamina propriada aktive edilmiş makrofajlar ve dendritik hücreleri tarafından salgılanmaktadır. IFN- γ üretimini ve Th hücrelerin Th1 hücrelere farklılaşmasını uyarmaktadır (Rogler ve Andus, 1998).

İnterlökin-13 (IL-13)

IL-13, tipik bir Th-2 sitokinidir ve epitel hücrelerinin bariyer fonksiyonunun bozulmasından, mukozanın tamir hızından, epitel hücrelerinin geçirgenliğinin artmasına neden olan sıkı bağlantıların değişiminden sorumludur. IL-13, Cd-1 reaktif doğal öldürücü T hücreleri tarafından üretildikten sonra epitel hücrelerine etki ederek bu hücrelerin disfonksiyonuna neden olduğu bildirilmiştir (Roda ve ark., 2011). UK hastalarında lamina propria lenfositlerinde IL-5 ve IL-13 seviyeleri yüksek bulunmuştur. Bu bulgu UK patogenezinde Th-2 immün cevabın önemini vurgulamaktadır (Roda ve ark., 2011). Heller ve ark. (2005), IL-13'ün UK hastaların üzerinde etkisini incelemek amacıyla yaptığı çalışmalarda, IL-13'ün hücre nekrozu indüklemeyen, apoptozu indüklemek suretiyle etki ettiği sonucuna varmışlardır. Epitel hücre permeabilitesini de inceleyerek, hücre kültürüne IL-13'ün ilave edilmesiyle iyonların ve mannitol ile laktoz gibi büyük moleküllerin epitel hücrelerinden geçişlerinin arttığını gözlemişlerdir. Sıkı bağlantıların yapısının değiştiği, UK hastalarının kolonundan alınan biyopsi örneklerinde, normal kontrollere göre claudin-2 proteinin 10 misli arttığı, occludin, claudin-1, ve claudin-4 ekspresyonunun azaldığı görülmüştür.

İnterferonlar

Tip I ve Tip II olmak üzere iki tip interferon ayırt edilir.

Tip I interferonlar (IFN- α ve IFN- β), özellikle viral replikasyonunu inhibe eden enzimlerin sentezini indükleyerek viral enfeksiyonlara karşı hücreleri korurlar. DNA replikasyonunu inhibe ederek normal ve tümöral hücre proliferasyonunu baskırlar. Makrofajların ve doğal öldürücü (NK) hücrelerinin aktivitelerini uyarırlar ve sınıf I MHC antijenlerinin ekspresyonunu arttırırlar (Rogler ve Andus, 1998).

Tip II ya da IFN- γ , CD4+ tipi lenfositler, CD8 tipi T lenfositler ve NK hücreler tarafından salgılandığından "immün interferon" olarak da adlandırılır. Viral enfeksiyonlara karşı hücreleri korur, mononükleer fagositlerin aktivitesini uyarak tümöral hücrelerinin ölümünü kolaylaştırır, sınıf I ve II MHC moleküllerinin ekspresyonunu artırır, nötrofilleri, NK hücreleri ve endotel hücrelerini aktive ederek onların lenfositlere yapışmasını kolaylaştırır, T ve B hücrelerinin farklılaşmasını artırır. CH hastalarda, IFN- α ve IFN- γ seviyelerinin intestinal mukozada arttığı gözlenmiştir (Rogler ve Andus, 1998).

2.1.3.2. İmmünopatogeneze

Mikroorganizmaların vücuda girişlerinin engellenmesi ve girenlerin genel yollarla birkaç saatin içinde etkisizleştirilmesi doğal (innate) immünite yolu ile gerçekleşir. Deri ve bağırsak mukozası ile fagositoz olayları ilk spesifik olmayan savunma cevabını oluştururlar (Bamias ve ark., 2005). Doğal immün yanıtında görevli olan hücreler nötrofil ve diğer granülositler, makrofajlar, doğal öldürücü hücreleri (NK) ve mast hücreleridir. Uyarlanmış (adaptif) immünite ise her mikroorganizma için özgüldür ve lenfositler aracılığıyla oluşturulur. Özgüllük lenfositlerin yüzeyindeki reseptörlerin mikroorganizmaların antijenlerine bağlanması ile sağlanır. Adaptif immüitenin başka önemli bir özelliği ise hafıza'sının (memory) olmasıdır (Huang ve Chen, 2016). Bu herhangi bir antijenle karşılaşmış bir lenfositin çoğalarak oluşturduğu hücre topluluğunda (lenfosit proliferasyonu), bazı hücreler (hafıza hücreleri) söz konusu antijene karşı bağlanma özelliğini kaybetmeden uzun süreli yaşaması ve o antijenle tekrar karşılaşması durumlarında çok daha kısa bir sürede mikroorganizmaları tanıyıp etkisiz hale getirilmesi anlamına gelir.

Adaptif immünite humoral ve hücresele olmak üzere iki tiptir. Hücresele immünite T hücreleri tarafından oluşturulur. Etki mekanizmalarına göre bu T hücreleri iki gruba ayrılır. Enfekte olmuş veya anormal hücrelerin ölmelerini sağlayan sitotoksik veya öldürücü T lenfositler ve diğer hücrelerin aktifleşip enfeksiyon bölgesine gelmelerini ve immün cevabın daha da yoğunlaşmasını sağlayan efektör T hücreleridir.

T hücreleri hem hücre içi hem de hücre dışı patojenlerin kontrolünde görev alır. Uyarılmış CD4+ yüzey molekülleri taşıyan T hücreleri sitokin salınımını uyarak hücre dışı patojenleri, CD8+ yüzey molekülleri taşıyan T hücreleri hücre içi patojenleri kontrol eder. T hücreleri timusu terk ettiğinde ikincil lenfoid organlarda dolaşır. Antijen

ile henüz etkileşime girmemiş bu hücrelere naif T hücreleri denir (Matricon ve ark., 2010). T hücreleri, antijeni tanıyıp, antijen sunan hücrelerin yardımı ile bağlanıp aktifleştğinde klonal seleksiyona uğrayarak efektör ve hafıza lenfositlerini oluşturur. APC grubu olarak makrofaj, dendritik ve B hücreleri görev alır. APC hücrelerinin yüzeyinde bulunan ve CD4+ veya CD8+ T hücrelerine antijenik peptidi sunan MHC proteinleridir (Matricon ve ark., 2010). Efektör lenfositler ortamdaki mikroorganizmaları etkisizleştirmekle uğraşırken, hafıza lenfositler vücutta uzun süre yaşayarak aynı mikroorganizmanın daha sonraki olası bir enfeksiyonuna karşı hazırlıklı olmasını sağlar. Hafıza hücreleri, yoğun ve aktif bir immün cevabı çok daha kısa bir sürede başlatabildiklerinden, vücuda giren mikroorganizmalar henüz çoğalmadan etkisizleştirilirler.

2.1.3.2.1. Doğal İmmüitenin İBH Patogenezindeki Rolü

Doğal immün yanıt, patojenlerin hızlı bir şekilde tanınmasını sağlayarak enfeksiyonlara karşı korunmanın ilk basamağını oluşturur.

2.1.3.2.1.1. Doğal İmmün Sistem Hücrelerinin İBH Patogenezindeki Rolü

Makrofajlar

İmmünojen (antijen) vücutta önce makrofajlar tarafından alınarak işlenir. Makrofajlar, proteazların ve serbest radikallerin etkisiyle patojenleri peptidler ve lipopolisakkaritler gibi spesifik antijenik determinantlara parçalarlar. Patojen antijen-major histokompatibilite kompleksi, hücre zarındaki major histokompatibilite antijenlerin, patojen antijenik determinantları ile birleşmesi sonucunda meydana gelir. Bu kompleksin T hücrelerindeki T hücresi reseptörüne (TCR) bağlanması ile T hücrelerine antijen hakkında bilgi verilir. İnflamatuvar bağırsak hastalığının akut fazında, intestinal mukozadaki makrofajların sayısı aşırı derecede artar. Makrofajlar, T hücreyi ko-stimülatör çok sayıda molekül (CD40, CD80, CD 86 vs.) eksprese eder ve miyeloid hücre-1 üzerinde eksprese olan reseptörleri (TREM-1: Triggering receptor expressed on myeloid cells) tetikler. TREM-1, makrofajlar tarafından pro-inflamatuvar faktörlerin salgılanmasını arttırır. Normal intestinal dokularda TREM-1'in ekspresyonu normal seviyesinde iken deneysel olarak oluşturulmuş kolit modelinde ve İBH hastalarında yüksek olduğu görülmüştür (Huang ve Chen, 2016).

Dendritik Hücreleri (DH)

Olgunlaşmış dendritik hücrelerin yüzeyinde antijen sunan molekülleri bulunmaktadır. Bu moleküller ko-stimüle edici faktörleri, T hücreleri ile etkileşen alanları, kemokin reseptörlerin ekspresyonunu, lenfoid organlara doğru dendritik hücrelerin hareketlerini ve T lenfositlerini aktive ederek sitokin salgılanmasını arttıırırlar ve primer immün yanıtın oluşmasına yol açarlar (Huang ve Chen, 2016). Retinoik asit, timik stromal limfopoietin (TSLP) ve TGF- β üreten epitel hücreleri, IL-10 üreten dendritik hücrelerinin gelişimini hızlandırarak anti-inflamatuar cevabın meydana gelmesini uyarır. İBH'da TGF- β ve TSLP'in düşük seviyede ifade edildiği ve retinoik asit yolağı azaltıcı (down) şekilde düzenlenlendiği bildirilmiştir (Ahluwalia ve ark., 2018).

Doğal Öldürücü Hücreler (Natural Killer Cells; NK)

NK hücreleri, viral ve bakteriyel enfeksiyonları kontrol eden, sitokinleri salgılayan ve doğal ile adaptif immünite arasındaki dengeyi sağlayan hücrelerdir. Uyarıldıkları zaman T hücrelerin antijen reseptörlerine bağlanmadan hasara yol açan sitotoksik etki gösterirler. İki reseptör sistemi aracılığı ile cevap verirler; biri insan lökosit antijenleri (human leukocyte antigens, HLA) sınıf I molekülleri aracılığı ile antijenleri tanırlar ve immün cevabı inhibe ederler, diğeri ise HLA olmayan moleküller aracılığı ile hedef hücreleri öldürürler (Huang ve Chen, 2016).

2.1.3.2.1.2. Doğal İmmün Yanıtı Uyaran Moleküller

Defensinler:

α ve β olmak üzere iki gruba ayrılan defensinler, geniş spektrumlu antimikrobiyal aktivitesi ve kemotaktik fonksiyonu olan, T hücreleri, monositleri ve dendritik hücrelerini hızlı inflamatuvar cevabın oluşumu için toplayan ve bu şekilde doğal ve adaptif immünite arasında bir köprü oluşturan proteinlerdir. Bu nedenle defensinlerin azalması doğal immüniteyi zayıflatırken adaptif immünitenin başlamasını ve düzenlenmesini etkilemektedirler (Huang ve Chen, 2016).

“Human defensin (HD)” olarak adlandırılan iki α -defensin (HD5 ve HD6) başlıca Paneth hücrelerinden salgılanır. α -Defensinin azalması NOD2/CARD15 mutasyonları ile ilişkilidir. İleum tipi Crohn hastalarında, HD-5 ve HD-6 ekspresyonu sağlıklı ve non-ileum Crohn hastalarına göre anlamlı bir şekilde azalmıştır. NOD2 gen mutasyonu olmayan Crohn hastalarında ise HD-5 ve HD-6 ekspresyonu artmıştır.

Ülseratif kolit hastaların kolon epitel hücrelerindeki HD-5 ve HD-6'ya ait mRNA ekspresyon seviyelerinin arttıkları bildirilmiştir. Crohn hastalığı defensin eksikliği sendromu olarak düşünülmüştür. Mukozal defensinlerin kaybı, intestinal mukozaya daha çok bakteri invazyonuna yol açarak inflamasyonun ilerlemesine yol açtığı bildirilmiştir (Huang ve Chen, 2016).

Human beta defensin (hBD) olarak adlandırılan β -defensin-1 (HBD1) normal intestinal mukoza epitel hücrelerinde bulunmaktadır ve inflamasyon veya bakteriyel enfeksiyonlardan etkilenmemektedir. hBD-2, hBD-3 ve hBD-4'ün ekspresyonu ise çeşitli bakteriyel ürünler ve sitokinlerle uyarılır. Kolon tipi Crohn hastalığında arttığı bildirilmiştir (Huang ve Chen, 2016).

2.1.3.2.1.3. Yapı Taniyan Reseptörler (PRR: Pattern Recognition Receptors).

Makrofajlar ve dendritik hücreler tarafından eksprese edilen PRR reseptörleri, mikroorganizmanın patojenle ilişkili moleküler yapıları (PAMPs: pathojen-associated molecular patterns) tanırlar ve bu reseptörlerin uyarılması ile hücre içi MAP kinazlar, NF κ B gibi transkripsiyon faktörlerin aktive edilmesiyle sitokin üretimini sağlayan genlerin transkripsiyonunun başlamasına yol açarlar ve patojenlere karşı savaşır. PRR'ler Sirke sineğinin Toll reseptörlerine benzer reseptörler (Toll-like receptors: TLR) ile intraselüler NLR (NOD "nucleotide-binding oligomerization-domain protein" like receptors) reseptörleri kapsar. PRR'lerin aktivasyonu antijen sunan hücrelerin olgunlaşmasını hızlandırır ve adaptif immünitinin aktivasyonuna yol açarak doğal ve adaptif immünitinin arasında bir köprü görevi görür. TLR ve NLR kodlayan genlerin mutasyonu İBH ile ilişkilendirilmiştir, örneğin CH tanısı bulunan olgularda NOD2 gen mutasyonu saptanmıştır (Huang ve Chen, 2016; Ahluwalia ve ark., 2018).

PRR'lerin en önemli bileşeni olan TLR'ler intestinal epitel hücrelerinde eksprese edilir. Günümüzde insanlarda 12 fonksiyonel TLR tanımlanmıştır. TLR2 ve TLR4 ince bağırsakların periferik lenfatik epitel hücrelerinde bulunur. TLR tarafından miyeloid diferansiyasyon faktör 88 (MyD88) bağımlı veya bağımsız sinyal yolağı ile NF- κ B ve MAPK indüklenmesi, adaptif immün cevapların aktivasyonuna ve lümendeki patojenlerin temizlenmesine yol açar. TLR3'ün ekspresyonu sürekli iken, TLR5, TLR2 ve TLR4 sadece normal intestinal epitel hücrelerinde eksprese edilir.

İBH'da mukozal dendritik hücreleri ve makrofajlarda, TLR2, TLR4, CD40 ve kemokin reseptör CCR7 yüksek seviyede ifade edilir ve TNF- α , IL-1 β , IL-6 ve interlökin-18 (IL-18) gibi pro-inflamatuar sitokinlerin üretimini uyarmak suretiyle inflamasyonun artmasına yol açar. TLR'lerin çoğu pro-inflamatuar cevapları ile ilişkilendirilirken, TLR9'un, IL-10 ve INF salınımını uyararak anti-inflamatuar cevabın oluşumuna ve mukozanın iyileşmesine yol açtığı bildirilmiştir (Ahluwalia ve ark., 2018). Akut UK hastalarının lamina propria ve kolonositlerinde TLR2 ve TLR4 artmış ekspresyonu bildirilmiştir (Ungaro ve ark., 2017).

Caspase-activating and recruitment domain 15 gen (CARD15: CARD protein-protein etkileşim bölgesi içerir) tarafından kodlanan ve sitoplazmik bir protein olan NOD2, gram pozitif ve gram-negatif bakterilerin hücre duvarındaki peptidoglikanın temel bileşeni olan muramil dipeptidi (MDP) tanıyan sitoplazmik bir NLR'dir (Bamias ve ark., 2005; Huang ve Chen, 2016). NOD2, serin/treonin kinaz2 reseptör (RIPK2) bağlayan protein ile oligomer oluşturarak ubiquitinasyonu indükler, NF- κ B aktive olur ve proinflamatuar sitokinlerin üretimi uyarılır. NOD2 gen mutasyonu Crohn hastalarının intestinal mukozal immün cevabı ile ilişkilidir (Siegmund ve Zeitz, 2011; Huang ve Chen, 2016).

2.1.3.2.2. Adaptif İmmüitenin İBH Patogenezindeki Rolü

Doğal immün sistem, inflammatuar cevapları indüklemektedir, adaptif immün sistem ise İBH'da görülen kronik inflammatuar olayların ilerlemesinde merkezi rol oynamaktadır (Ahluwalia ve ark., 2018).

2.1.3.2.2.1. Th1/Th2 Dengesi

Makrofajlar tarafından IL-1'in salgılanması ve makrofajların dinlenme durumundaki T yardımcı hücreleri (T helper, Th) ile kenetlenmesi (makrofaj-Th) sonucunda Th hücreleri aktive olur ve IL-2, B hücre büyüme faktörleri (β cell growth faktör) (BCGF) ve B hücre farklılaşma faktörlerini (β cell differentiation factors) (BCDF) salgılanmasına neden olur. T-lenfositleri, IL-2, IL-4, interlökin-7 (IL-7) etkisi altında proliferasyon ve farklılaşma geçirerek lenfokin (sitokin) salgılayan sitotoksik T hücresi (Tcytotoxic, Tc), T supresör (Ts) hücreye dönüşür. Supresör T hücreleri olarak bilinen hücrelerin günümüzde T-regülatör hücreler (Treg) olduğu anlaşılmıştır. Treg hücreleri kendi antijenlerine karşı toleransın devamlılığını sağlamaktadır. T-regülatör hücreler hem farelerde hem de insanlarda Th ve B lenfositleri baskılamaktadır (Huang

ve Chen, 2016; Ahluwalia ve ark., 2018). Ts hücreleri aktif Th ve T/B lenfositlerin proliferasyon ve farklılaşmasını inhibe etmektedir.

Salgılanan IL-12 ve interlökin-27 (IL-27), CD4⁺ T-hücrelerinin reseptörleri ile etkileşerek, Th-1 farklılaşmasında önemli rolü olan sinyal iletilici ve transkripsiyon 1 aktivatörü (STAT1) aktiveleştirir. Translokasyon ile nükleusa giren STAT1, spesifik transkripsiyon faktörü T-bet'i aktive eder ve Th hücrelerinin Th1 hücrelerine farklılaşmasını sağlar. Th-1 hücreleri IFN- γ , THF- α ve IL-2 gibi proinflamatuvar sitokinleri salgırlar (Ahluwalia ve ark., 2018).

Th-2 hücreler hücre dışı parazitlere karşı immün cevapta kritik role sahiptir. IL-4, IL-5 ve IL-13 gibi sitokinler Th-2 hücreleri tarafından salgılanır. Antijen sunan hücreler tarafından salgılanan IL-4, Th hücrelerinin yüzeyindeki reseptörü ile etkileşerek Th-2 farklılaşmasında önemli role sahip olan STAT6'yı aktiveleştirir. Translokasyon ile nükleusa giren STAT6, GATA bağlayıcı protein-3 (GATA-3) transkripsiyon faktörünü aktive eder ve Th hücrelerinin Th-2 hücrelerine farklılaşmasını sağlar (Huang ve Chen, 2016). IL-13, TNF- α ile beraber, Th-2 hücrelerin yüzeyinde bulunan IL-13 R β 2 reseptörüne bağlanarak STAT6'yı aktive eder ve Th-2 hücrelerin proliferasyonunu artırır. IL-5 ve IL-13'ün ekspresyonu UK hastalarının bağırsaklarındaki inflamasyon bölgelerinde arttığı gözlenmiştir, bu nedenle UK patogeneğinde Th-2 hücrelerin önemli rolü olduğu ileri sürülmüştür (Huang ve Chen, 2016). IL-4 ve IL-13 mRNA seviyeleri UK hastalarının rektal biyopsilerinde anlamlı derecede yüksek bulunmuş ve IL-13'ün UK patogeneğinde epitel sitotoksitesi ve bariyer disfonksiyonunda önemli bir mediyatör olduğu ileri sürülmüştür (Ungaro ve ark., 2017). Bağırsak villuslarını örten absorbe edici epitelin farklılaştığı yerlerin altındaki lenfoid doku nodülleri olan Peyer plaklardaki dendritik hücreler vitamin A'yı metabolize ederek oluşan retinoik asit, T ve B lenfositlerdeki sırasıyla integrin α 4 β 7 ve CCR9'un ekspresyonunu indükler. Daha sonra sistemik dolaşıma giren bu hücreler yeniden bağırsağa döner ve ilgili ligandlarına sırasıyla MAdCAM-1 ve CCL25'e bağlanırlar (Ungaro ve ark., 2017).

Th-1 ve Th-2 hücre grupları ürettikleri sitokinlerle karşılıklı birbirlerini kontrol altında tutarlar. Bu iki hücre grubu arasında dengenin bozulması bazı patolojilerin gelişmesine yol açar. Th-1 hücreleri tarafından salgılanan INF- γ , Th-2 hücrelerin proliferasyonunu inhibe ederken, Th-2 hücreleri tarafından salgılanan IL-4, IL-10 ve IL-13, Th-1 hücrelerinin proliferasyonunu inhibe eder. Th1 hücreleri tarafından salgılanan

IL-1, IL-2, IL-6 ve IL-8, hücrel immün cevapta rol alırken, Th-2 hücreleri tarafından salgılanan IL-4, IL-10 ve IL-13 gibi anti-inflamatuar sitokinler humoral immün cevapta görev alırlar. Bu nedenle Th-1 ve Th-2 hücreler arasındaki denge pro-inflamatuar ve anti-inflamatuar sitokinler arasındaki dengeyi ve immün cevabını belirler (Huang ve Chen, 2016).

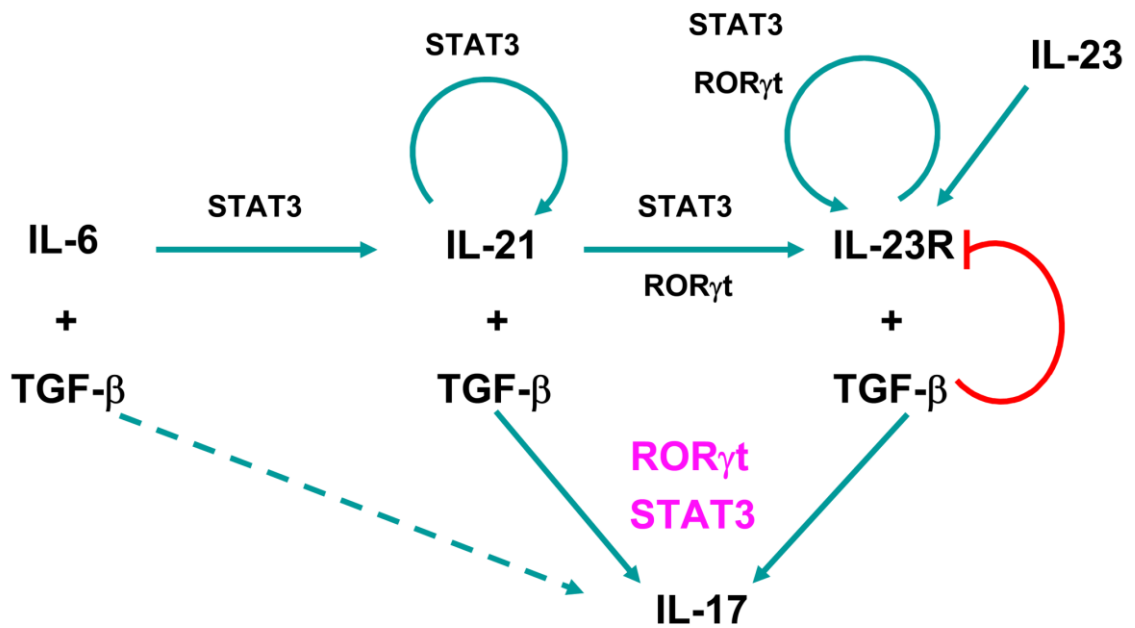
Th-1 tipi hücrelerin uyarılması ile IL-1, IL-2, TNF- α , INF- γ gibi Th-1 tipi sitokinler daha çok salgılanır ve Crohn hastalığının gelişmesine yol açar (Bamias ve ark., 2005). Ülseratif kolitte ise IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 ve IL-13 gibi Th-2 tipi sitokinler, Th-1 tipi sitokinlerden daha fazla salgılanır (Roda ve ark., 2011). Th1 hücreleri tarafından salgılanan INF- γ , Th-2 hücrelerinin proliferasyonunu baskılamak, Th-2 tarafından salgılanan IL-4 Th-1 hücrelerin farklılaşmasını bloke eder (Ahluwalia ve ark., 2018). İmmün dengesizliğinin İBH gelişiminde önemli rol oynadığı gösterilmiştir. Yüksek IL-2 ve INF- γ seviyeleri ile seyreden Th-1 aracılı immün cevabın baskın olarak CH'da görüldüğü bildirilmiştir. Pro-inflamatuar sitokin olan INF- γ 'nın yüksek seviyeleri, TNF salgılayan bağırsak makrofajları gibi diğer immün hücrelerini de etkileyerek hastalığın kronikleşmesine yol açabilmektedir. CH ve kontrol gruplarına göre, UK hasta grubunda mukozal T-hücrelerinin IL-5 ve IL-13 seviyeleri daha yüksek bulunmuştur (Ahluwalia ve ark., 2018).

UK hastalarının sitokin profilleri incelendiğinde özellikle IL-5 seviyelerinin arttığı görülmüş, fakat INF- γ veya Th-1'in aşırı aktivasyonuna cevap olarak salgılanan sitokinlerin seviyelerinde anlamlı bir artış gözlenmemiştir (Head ve Jurenka, 2007). IL-4 ve IL-13, IgE antikor üretimini uyarırlar. IL-5 ile eozinofiller aktive edilerek parazitlerin öldürülmesi sağlanır. Böylece Th-2 hücreler, hücre dışı patojenlere karşı konakçı savunmasında ve alerjik durumlarda önemli rol oynar. Crohn hastalığında Th-1 immün yanıtı, UK hastalığında ise Th-2 immün yanıtı aşırı aktif hale gelir.

2.1.3.2.2.2. Th17 Hücreleri ve Salgıladıkları Sitokinler

Son yıllarda CD4+T lenfositlerinden gelişen ve interlökin-17 (IL-17), interlökin-21 (IL-21) ve interlökin-22 (IL-22) salgılayan üçüncü bir efektör Th hücresi (Th-17) keşfedilmiştir. Th17 hücreleri IL-6 ve TGF- β ile aktive edilir, olgun IL-17 salgılayan hücrelere farklılaşmaları ise interlökin-23 (IL-23) ile indüklenir (Siegmund ve Zeitz, 2011). IL-17 ve IL-23 Crohn hastaların intestinal mukozasında yüksek miktarda bulunmuş, bu sitokinlerin Crohn hastalığının patogeneğinde önemli rol oynadıkları ileri

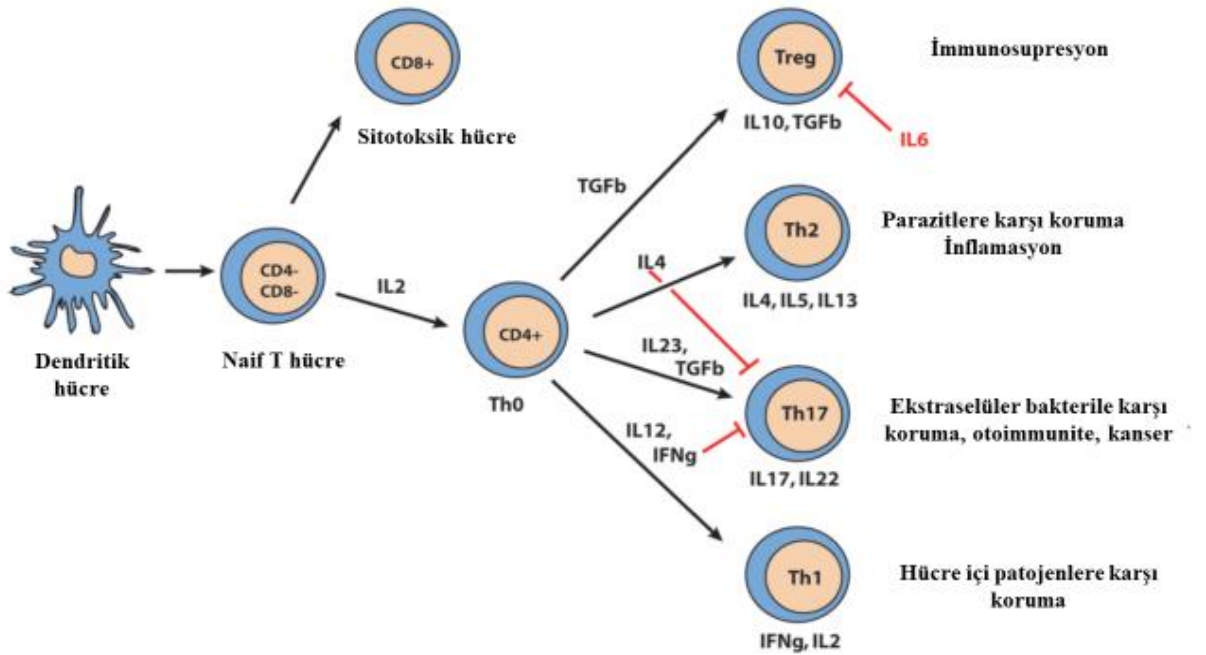
sürülmüştür (Siegmund ve Zeitz, 2011). IL-23, Th hücrelerinin yüzeyindeki reseptörü ile etkileşerek TGF- β , IL-6 veya IL-21 varlığında sitoplazmik sinyal transdüksiyon ve transkripsiyon STAT3 faktörü aktive eder. STAT3 nükleusa girer ve RAR-bağımlı orphan reseptör gama t (ROR γ t) transkripsiyon faktörünü aktive ederek Th hücrelerinin Th17 hücrelerine farklılaşmasına yol açar (Şekil 2-2) (Ivanov ve ark., 2007; Huang ve Chen, 2016). Bu hücrenin başlıca fonksiyonu Th1 ve Th2 tarafından tam olarak kontrol altına alınamamış patojenlerin yok edilmesini sağlamaktır (Huang ve Chen, 2016).



Şekil 2-2: Th-17 hücrelerinin farklılaşmasında sitokinlerin rolü (Ivanov ve ark., 2007).

Aktive olan Th17 hücreleri, IL-17, IL-21 ve IL-22 sitokinleri salgılayarak immün hücrelerin periferik dokulara geçmelerini uyarır, IL-17 reseptörlerine bağlanmaları takiben NF- κ B aktivasyonu sonucunda birçok pro-inflamatuar faktörlerin serbestlenmesine neden olurlar (Huang ve Chen, 2016). Birçok klinik çalışmada Crohn hastalığı ve UK hastaların inflamatuvar bağırsak mukozalarında IL-17 hücrelerin ve IL-17, IL-21 ve IL-22 miktarları sağlıklı kişilere göre çok daha yüksek bulunmuştur (Huang ve Chen, 2016). Th-17 hücrelerin akut fazındaki UK hastaların intestinal mukozanın lamina propria kısmında dağıldıkları görülmüştür (Huang ve Chen; 2016).

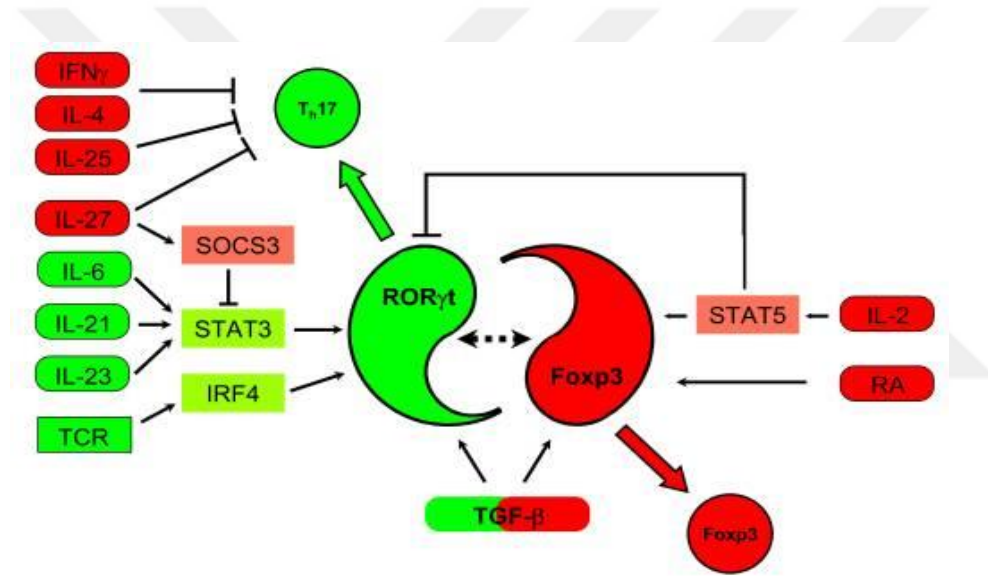
Treg hücreleri, Th-1, Th-2 ve T-17 T hücrelerinin çoğalmasını ve proinflatuar sitokin üretimini baskılar. Treg hücreleri güçlü bir anti-inflatuar sitokin olan IL-10'u ve TGF- β salgırlar. IL-10 eksikliğinde farelerde spontan olarak inflamasyon geliştiği görülmüştür (Siegmund ve Zeitz, 2011). Treg hücrelerin gelişimi ve fonksiyonu üzerinde FOXP3 (forkhead boxP3) transkripsiyon faktörü Treg hücrelerin spesifik yüzey belirteçidir. İki Treg hücre tipi bildirilmiştir: doğal (nTreg) ve edinsel düzenleyici (iTreg). nTreg otoimmün yanıtlarını baskılar, immün toleransı uyarır ve otoimmün hastalıklarının gelişimini baskılar. Treg hücrelerin UK ile ilişkisi birçok çalışmada araştırılmıştır (Huang ve Chen, 2016). Th17 hücrelerinin aktivasyonu ve Th17/Treg hücre dengesinin bozulması intestinal inflamasyonun gelişiminde önemli rolü olduğu bildirilmiştir (Kim ve Cheon, 2017). Naif T hücrelerinin farklılaşması Şekil 2-3'te gösterilmiştir.



Şekil 2-3: Naif T hücrelerinin farklılaşması (Matricon ve ark., 2010).

Th17 ve Treg hücreleri dinamik bir denge altında bulunmaktadır. Mukozal hasara yol açan Th-17 hücrelerinin artması, Treg hücrelerinin normal fonksiyonunun bozulması ile bu denge bozulmaktadır. IL-6 varlığında TGF- β konsantrasyonunun düşük olduğu zaman T hücreleri T17 hücrelerine farklılaşır ve Treg hücrelerinin

oluşumu inhibe olur. TGF- β konsantrasyonu yüksek olduğu zaman Th17 hücrelerinin üretimi baskılanır ve Treg hücrelerinin meydana gelmesi güçlendirilir. IBD hastalarının inflamatuvar intestinal mukozalarını tamir etme etkileri olan Treg hücreleri, IL-6 ve/veya IL-23 varlığında patojenik T17 hücrelerine dönüşürler. T17 hücrelerinin Treg hücrelerine dönüşümü ile ilgili herhangi bir rapor olmadığı göz önünde bulundurularak, bu dönüşümün irreversibl olduğu sonucuna varılmıştır. İBH hastaların periferel kanında Treg hücrelerin azalması ile T17 hücrelerin artışı görülmüştür (Huang ve Chen, 2016). Tc hücreleri ve aktif Th hücreleri sitokin salgılayarak immün sistemde modülasyon ve hücrel toksisiteye neden olur. Th17 ve Treg hücrelerin farklılaşmasında sitokinlerin ve transkripsiyon faktörlerin rolü Şekil 2-4'te gösterilmiştir.

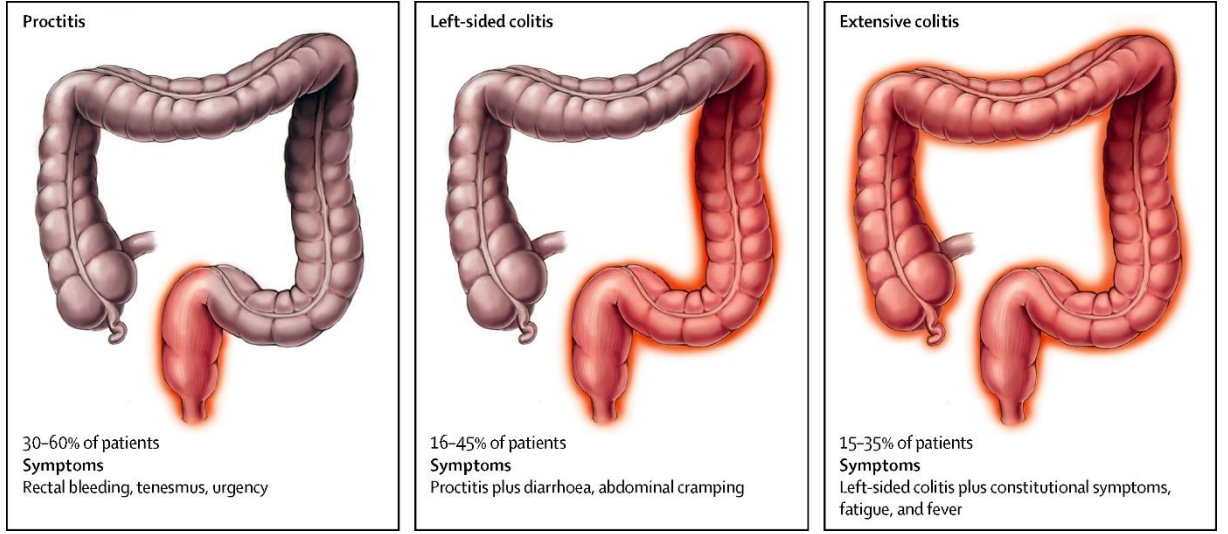


Şekil 2-4: Th17 ve Treg hücrelerin farklılaşmasında sitokinlerin ve transkripsiyon faktörlerin rolü (Ivanov ve ark., 2007).

Aktive olan Th17 hücreleri TGF- β varlığında IL-6, IL-21 ve IL-22 sitokinleri salgılayarak STAT3 ve TCR aktivasyonu ile IRF4 yolu ile ROR γ t'i (yeşil) indüklerler. Th17 hücrelerini baskılayan sitokinlerden IL-2 STAT5 yolu ile, IL-27 ise SOCS3 ve STAT3 yolu ile ROR γ t'nin arttırıcı düzenlenmesini baskırlar. Treg gelişimini arttıran retinoik asit ile Fxp3 ekspresyonunu indükleyen TGF- β , Th17 farklılaşmasını azaltırlar. IL-4, IFN- γ ve IL-25 gibi Th1 ve Th2'in indükledikleri sitokinler Th17 farklılaşmasını inhibe ederler (kırmızı). TGF- β , hem Th-17 farklılaşması hem de Treg hücre gelişimi için gereklidir.

2.1.3.3. UK'in Patolojik Bulguları

Hastaların yaklaşık % 14-35'inde ülseratif kolit tüm kolonu tutar (pankolit), % 16-45'nde sigmoid kolonun ötesine uzanır, ancak tüm kolonu tutmaz (sol kolon tutulumu). Hastaların % 30-60'ında ise hastalık rektum (proktit) veya rektosigmoid (proktosigmoidit) bölgeye sınırlıdır (Ungaro, 2017) (Şekil 2-5).



Şekil 2-5: Montreal sınıflandırılmasına göre ülseratif kolit kolon tutulumu (Ungaro, 2017).

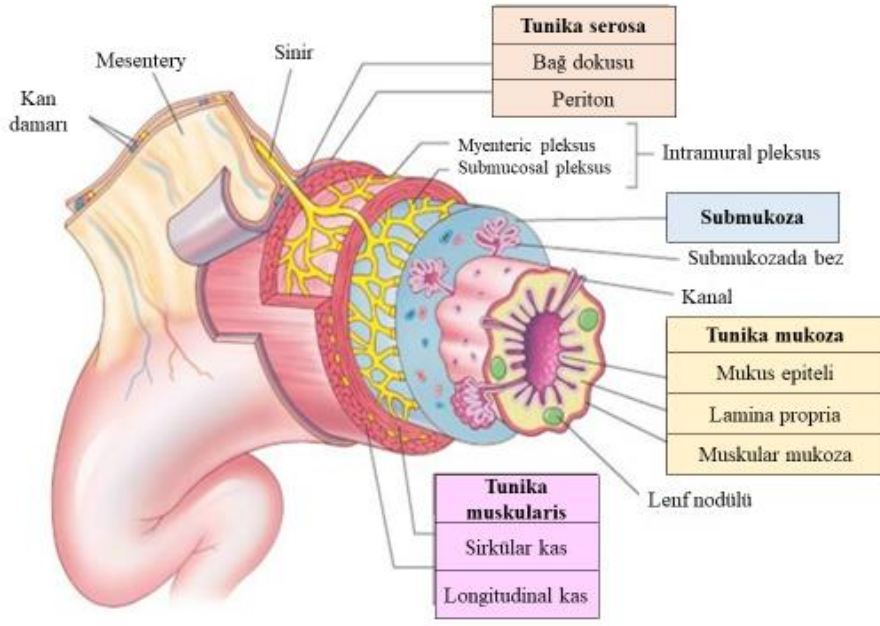
2.1.3.4. Gastrointestinal Mukozal Sistem

İnsan vücudu sürekli enfeksiyon ve zarar verici maddelere maruz kalarak, sağlık ve hastalık arasındaki dengenin bozulması riski altındadır. Gastrointestinal sistem, dış ortamı ile temasta olan yaklaşık 250 m² gibi geniş bir yüzey alanına sahip olması nedeniyle en fazla antijen yüküne maruz kalan bölgelerden biridir. Bir lenfoid organ olarak bağırsaklarda mevcut olan immün sistem vücudu dışarıdan gelen bakteri, virus ve parazitlere karşı koruduğu gibi organizmanın çevresel antijenlerle olan etkileşimini de organizma lehine düzenler (Salvo-Romero ve ark., 2015).

Genom boyu ilişkilendirme (genom-wide association studies/GWAS) ve immünolojik çalışmalarındaki gelişmeler, İBH patogenezinde epitel bariyer bütünlüğü, doğal mikrobiyal duyarlılık, otofaji ve katlanmamış protein cevabı gibi mukozal doğal immün cevapların İBH patogenezinde merkezi rol oynadığını göstermiştir (Geremia ve ark., 2014).

Gastrointestinal mukozal sistem bütünlüğünün veya immünitesinin bozulması İBH hastalığının temelini oluşturmaktadır. Bağırsak immün sistemi mikroorganizmalara ve çevresel antijenlere karşı organizmanın korunmasında ilk basamaktır.

İnce bağırsaklar içten dışa doğru; tunika mukoza, tunika muskularis ve tunika seroza olmak üzere üç tabakadan meydana gelir (Şekil 2-6).



Şekil 2-6: Bağırsakların histolojik yapısı (<http://basicchemicalkey.com>).

Tunika mukoza ise lamina epiteliyalis, lamina propria, lamina muskularis ve submukoza olmak üzere dört tabakadan oluşur. Tek katlı yüksek prizmatik hücrelerden oluşan lamina epiteliyalis'te emilim yapan hücreler (enterositler), goblet hücreleri, enteroendokrin hücreler, kök hücreler, M-hücreleri ve Paneth hücreleri olmak üzere altı tip hücre vardır (Salvo-Romero ve ark., 2015).

Özellikle bağırsaktaki lokal lenfoid dokuların oluşturduğu mukozal immün sistem, anatomik, morfolojik ve fonksiyonel özelliklerine göre dört gruba ayrılarak incelenebilir:

1. Peyer plakları
2. Lamina propria lenfoid hücreleri
3. Bağırsak epitel hücreleri
4. Epitel içi mononükleer hücreler veya intraepitelyal lenfositler

Bağırsak mukozasının yüzeyinde intestinal bakterilere ve besin antijenlerine karşı ilk bariyeri mukus oluşturur. Mukus iki tabaka halinde epitel bariyerin üzerinde yer alır; maddelerin absorpsiyonunu kolaylaştıran, epitel hidrasyonunu sağlayan ve yüzeyini döşeyen epitel hücrelerini luminal shear stress'e ve sindirim enzimlerine karşı koruyan viskoz bir yapıda olan mukus tabakası (türbulan; stirred) ile mikrobiyotayı,

IgA, musin ve antimikrobiyal peptid salgılayan türbılan hareketlerden uzak, dış etkiler ile karışmayan mukus tabakası (non-stirred). Musinin MUC1, MUC2, MUC3, MUC 6 gibi değişik alt grupları tanımlanmıştır. Mukusun bağırsak inflamasyonun önlenmesinde önemini göstermek amacıyla yapılan çalışmalarda, MUC2^{-/-} geni çıkartılmış farelerde kolit gelişmiştir ve bağırsak epitel dokusu ile direkt temasta olan bakterilerin etkisine bağlı olarak, kolorektal kanser riskinin arttığı gözlenmiştir (Geremia ve ark., 2014).

İç mukus tabakası ile temasta olan epitel hücreleri patojenlere karşı ikinci koruma hattını oluşturmaktadır. İnce bağırsakların yüzeyinde Lieberkühn kriptaları olarak isimlendirilen küçük kriptalarının derininde bulunan epitel pluripotent stem hücreleri devamlı olarak mitozla uğrarlar ve yeni hücreler bağırsak sekresyonlarının döküldükleri yer olan villusların uçlarına doğru yavaş yavaş göç ederler. Kök hücreler; Goblet, Paneth ve epitel hücrelerine farklılaşarak onların yenilenmesini sağlarlar. Sağlık durumunda bir bağırsak epitel hücresinin yaşama süresi yaklaşık olarak bir haftadır. Yeni hücrelerin süratle büyümeleri, mukozada herhangi bir hasar meydana geldiği zaman tamir imkanı verir (Salvo-Romero ve ark., 2015).

Bağırsak mukozasının emilim yüzeyini arttıran birçok kıvrımlar, villuslar ve mikrovilluslar mevcuttur. Mikrovilluslar emilim alanını genişletmekte ve sekresyona yardımcı olmaktadır. Her mikrovillusta tek tabakalı uzun, prizmatik, absorptif özellikte epitel hücre (enterosit) bulunmaktadır. Bağırsak villuslarını örten absorbe edici epitelin farklılaştığı yerlerin altındaki lenfoid doku nodülleri olan Peyer plakları, duodenumdan ileoçekal bölgeye doğru gittikçe sayıları artan bir şekilde yerleşmişlerdir. Önemli bir B ve T lenfositler kaynağı olup mukozal immün cevabın uyarılmasında önemli bir role sahiptirler. İntestinal tek tabakalı epiteldeki hücrelerin % 80'ini oluşturan enterosit hücrelerin yanı sıra, musin sentezleyen ve salgılayan Goblet hücreleri, antimikrobiyal peptidleri sentezleyen Paneth hücreleri, hormon ve bazı maddeleri salgılayan enterokromafin hücreleri ve M hücreleri bulunmaktadır. Paneth hücreleri, Lieberkühn kriptalarının altında yerleşik olan piramit şeklindeki ekzokrin hücrelerdir, ince bağırsak florasının denetlenmesinde ve düzenlenmesinde rol oynar. Farklılaşmamış kript hücrelerden oluştuğu düşünülen ve üzerlerinde birkaç adet mikrovillus şeklinde mikrokıvrımlar içeren M hücrelerin görevi antijenleri bağırsak boşluğundan aktif taşıma ile alttaki lenfoid dokuya taşımaktır. Gerçek anlamda bağırsak epiteli ve özellikle enterositler, makromoleküllere geçirgen olmayan, sadece su ve bazı elektrolitler gibi küçük moleküllerin sızmasına olanak veren seçici ve koruyucu bir

bariyer olarak görev görür (Salvo-Romero ve ark., 2015; Kim ve Cheon, 2017). Ayrıca enterositler, doğal immün yanıtında rolü olan reseptörlerin ekspresyonunda görev alırlar, profesyonel olmayan antijen sunum hücreleri gibi davranırlar, timik stromal limfopoietin, TGF- β 1, interlökin-25 (IL-25), proliferasyonu indükleyici ligand (APRIL) ve B hücreleri aktive eden faktör (BAFF) gibi sitokin ve kemokinleri salgılayarak lökositlerin aktivasyonu ve göçü yanı sıra lokal immün cevapların düzenlenmesinde de görev alırlar.

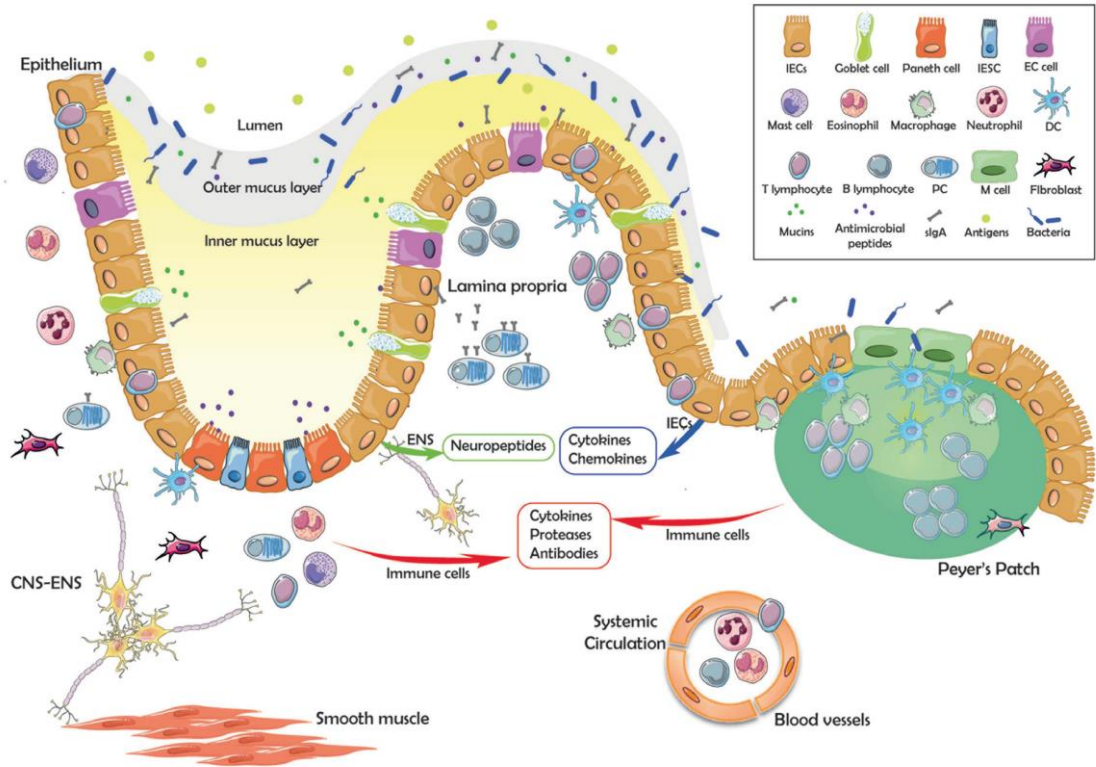
CH ve UK hastalarında epitel bariyerin bozulması ve intestinal permeabilitenin artması gözlenmiştir. İBH'da, goblet hücrelerin sayısı ve musin kodlayan genlerin ekspresyonu azalmıştır (Matricon ve ark., 2010).

İBH'da, vücudun mikroplardan ve diğer toksik etkenlerden korunmasında önemli görevi olan epitel bariyerin bütünlüğü ile doğal ve adaptif immün yanıtı bozulur. Histolojik olarak remisyonda bile kolonun epitel hücrelerinin proliferasyonu artmış bulunmuştur. Akut devrede mukozada akut iltihabi değişiklik görülür. Damarlanmada belirgin artma mevcuttur. Kapillerlerde konjestiyon görülmüştür. Kript apseleri, kript epitelinin nekrozu ile beraber lümene dolan iltihabi eksüda ile karakterizedir. Goblet hücrelerinin sayısında ve mukus sekresyonunda belirgin azalma, lamina propria'da belirgin mononükleer iltihabi infiltrasyon mevcuttur. Mukozada erozyon ve ülserasyon görülür. Muskularis mukozada da kronik iltihabi infiltrasyon görülmüştür (Matricon ve ark., 2010).

Lamina propria'da yer alan lenfoid hücreler ve makrofajlar; antijenlere, mikroorganizmalara ve diğer yabancı maddelere karşı immünolojik bir bariyer oluşturdıklarından lamina propria immünolojik açıdan önemlidir. Lamina propria içerisinde plazma hücreleri, T-lenfositler, makrofajlar, dendritik hücreler, eozinofiller ve mast hücreleri bulunmaktadır. Lenfositler epitel hücrelerinin arasında bulunurlar. Mononükleer tipteki bu hücrelerin çoğunluğunu T lenfositler teşkil eder (Salvo-Romero ve ark., 2015). İmmün hücrelerinden oluşan GALT (Gut-associated lymphoid tissue) iki kompartmanı kapsamaktadır.

- Lenfoid folikülleri, Peyer patch ve mezenterik nodları içeren organize GALT.
- Büyük bir çoğunluğu CD8+ T hücreleri olan intraepitelyal lenfositleri içeren diffüz GALT.

İnsan ince bağırsağındaki intraepitelyal lenfositlerin büyük bir çoğunluğu T hücreleridir (CD3+) ve bunların büyük bir oranı da CD8 hücreleridir. UK’de T hücrelerin mutlak sayısı normal veya azalmıştır. İBH patogenezindeki bağırsak inflamasyonu, uyarlanmış immün sistemi hücrelerinin aracı olduğu görüşü günümüzde kabul görmektedir. Kronik inflamasyon, T lenfositlerinin aracı olduğu proinflamatuvar sitokinlerin anormal üretimi veya antiinflamatuvar IL-10 ve TGF- β ’nın az salgılanması sonucu geliştiği ileri sürülmüştür (Bamias ve ark., 2005). İntestinal bariyerin anatomisi ve bileşenleri Şekil 2-7’de gösterilmiştir.



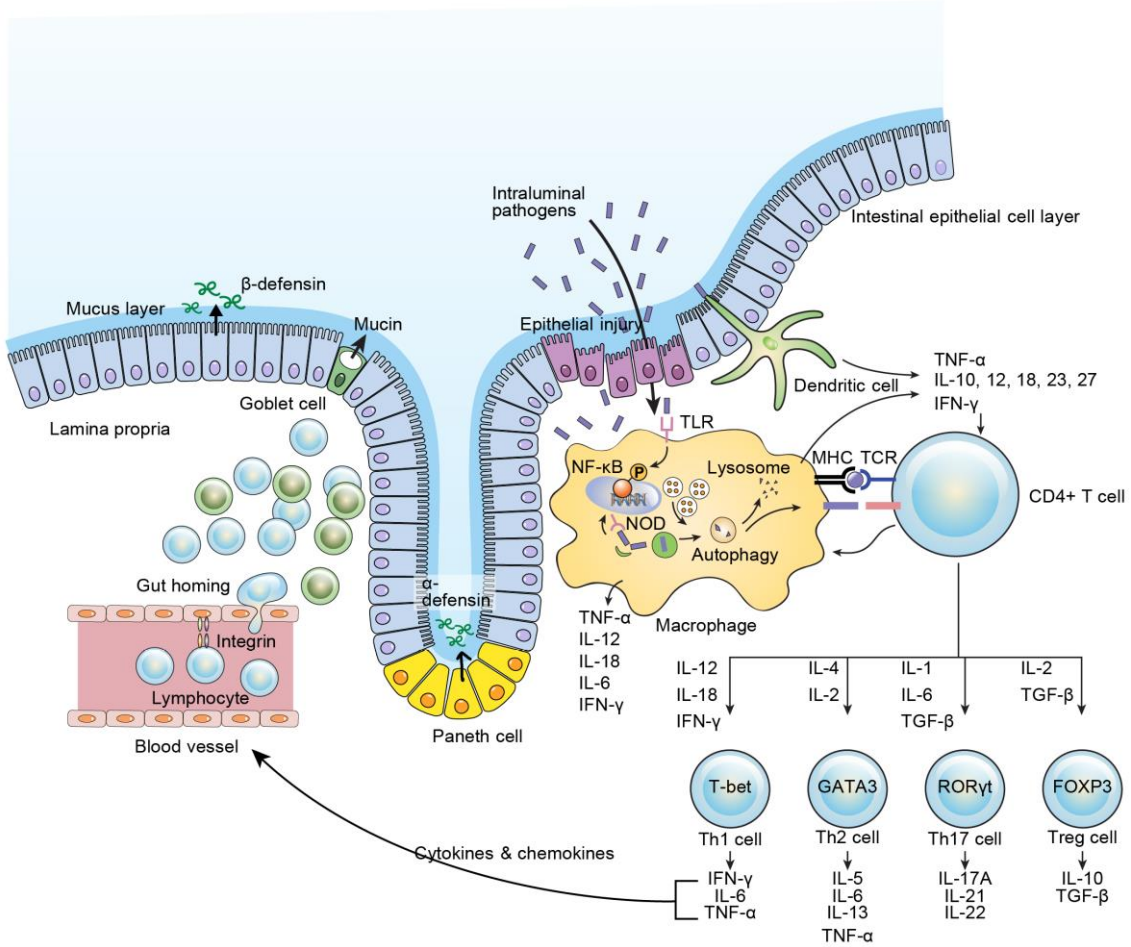
Şekil 2-7: İntestinal bariyerin anatomisi ve bileşenleri (Salvo-Romero ve ark., 2015).

İntestinal mukoza, polarize, kolumnar epitel hücrelerinden oluşan tabakadan ve lamina propria, enterik sinir sistemi, bağ dokusu ve kas tabakasını içeren subepitelyal bölgesinden oluşur.

2.1.3.4.1. İntestinal İmmün Sistemi ve Bozuklukları

İntralüminal flora ile devamlı temasta olan epitel hücreleri patojenik bakteri ürünlerinin üzerindeki ekstraselüler TLR ile intraselüler NLR benzeri reseptörlerin aktivasyonu sonucunda bağırsak epitelindeki Paneth hücreleri tarafından defensin benzeri kriptin denen antimikrobiyal özellikli bazı antimikrobiyal peptidler

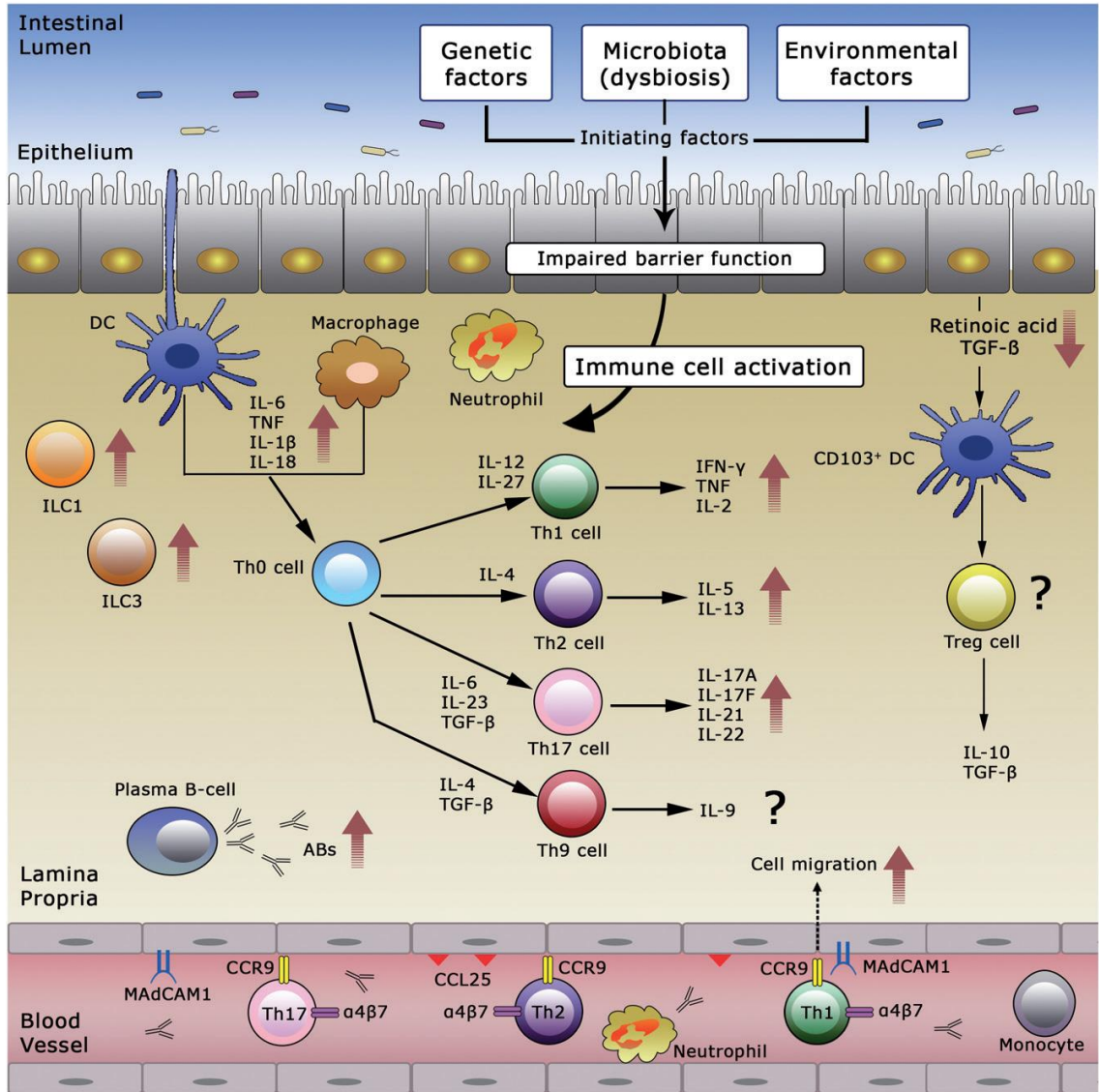
salgılamaktadır (human β -defensins). MHC moleküllerin ekspresyonunu arttırarak mukozal adaptif immün yanıtını uyarmaktadır (Matricon ve ark., 2010). Halen NOD2 mutasyonlarının Crohn hastalığı etiyopatogenezindeki rolü tam olarak bilinmemekte ancak, bariyer özelliği taşıyan bağırsak hücrelerindeki β defensin gibi çeşitli bakterisidal aktivite gösteren moleküllerin üretiminin bozulabileceği üzerinde durulmaktadır (Huang ve Chen 2016). İntestinal immün sistemi Şekil 2-8’de gösterilmiştir.



Şekil 2-8: İntestinal immün sistemi (Kim ve Cheon, 2017).

İnflamatuar immün yanıt, kısmen immün yanıtı katılan hücreleri (reaktif helper T4 ve supresör T lenfositler, T8), kısmen de çok hızlı elimine ya da inhibe edilemeyen hücresel mediyatörlerin (sitokinler) oluşumunu kapsamaktadır. Sitokinlerin çoğu immün cevabı arttırır ve daha çok iltihaba sebep olur. UK’te de olduğu gibi inflamatuvar faz sırasında önemli bir basamak, promonosit’in monosit’e, daha sonra da makrofaj’a diferansiyasyonudur. Makrofajlar tarafından IL-1 β , TNF- α ve IL-6 salgılanır. UK’in

tüm bulguları sitokinlerin açığa çıkması ile açıklanabilir. γ -INF ile epitel hücrelerinin permeabilitesi artar. UK'te TNF- α ve IFN- γ proinflatuar sitokinler, kaspaz-1 gibi epitel hücrelerin apoptozu ile ilişkili proteinin ekspresyonunu uyararak, Bcl-2 gibi antiapoptik proteinin ekspresyonunu ise inhibe ederek, epitel hücrelerin apoptozu uyarılır ve bağırsak mukozasının geçirgenliği artar (Huang ve Chen,2016). İnflatuar bağırsak sendromu ile ilişkin immün bozuklukları Şekil 2-9'da gösterilmiştir.

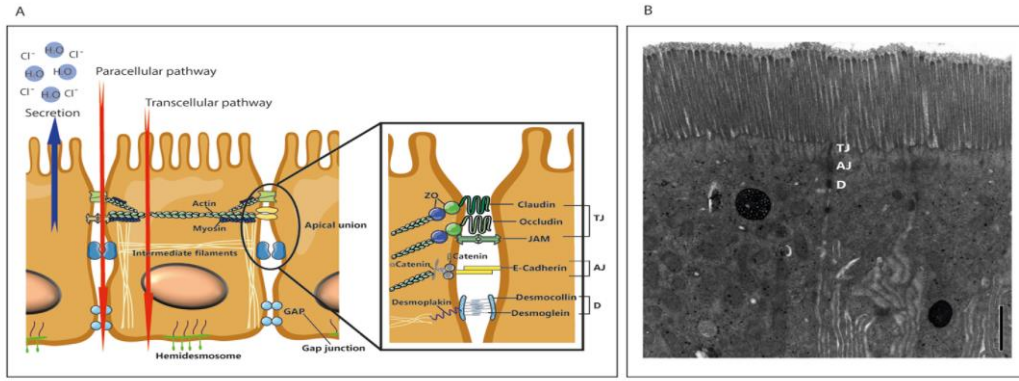


Şekil 2-9: İnflatuar bağırsak sendromu ile ilişkin immün bozuklukları (Ahluwalia ve ark., 2018).

2.1.3.3.2. İntestinal Bariyer Fonksiyon Bozukluğu

İntestinal epitelden maddelerin geçişleri ile su ve iyonların diffüzyonu intestinal lümen ve mukoza arasındaki transselüler yol adı verilen aktif taşıma (taşıyıcılar aracılığı ile) ve paraselüler yol adı verilen hücrelerarası boşluklardan pasif difüzyon olayları ile gerçekleşir. Paraselüler geçiş “tight junctions” (sıkı bağlantı) tarafından kontrol edilir (Salvo-Romero ve ark., 2015) (Şekil 2-10). Bu bağlantıların yapısında okludin, klaudin, hücre adezyon molekülleri (junctional adhesion molecules; JAC) ve triselülin olmak üzere dört transmembran protein görev almaktadır. Bu proteinler sitoskeletal aktomiyozin liflere zonula occludens ailesine ait olan proteinler aracılığı ile bağlanır. Uzun süreli zonulinin arttırıcı düzenlenmesi, bağırsak epitel hücrelerinin geçirgenliğinin artmasına ve bağırsaktaki antijenlerin submukozaya geçmesine ve bağırsak mukozasının hasarına yol açar. Yapılan birçok çalışmada CH ve UK’da inflame ve non-inflame mukozada permeabilite artışı ve azalmış epitelyel direnç bildirilmiştir (Salvo-Romero ve ark., 2015).

İBH’nin aktif fazında bağırsak epitel dokusundaki zar geçiş bağlantı proteinlerinin ve onlara ait mRNA’ların miktarının azaldığı, inaktif fazında ise bu azalmanın görünmemesi, epitel hücrelerindeki değişim geçiren sıkı bağlantılarının bağırsak inflamasyonu ile ilişkili olabileceği sonucuna varılmıştır (Huang ve Chen, 2016). İBH’nin aktif fazında, bağırsak boşluğundaki patojenler lamina propria’ya göç ederler, lamina propria’da bulunan makrofajlar, antijenleri T-hücrelerine sunarak sıkı bağlantı proteinlerinin ekspresyonunu kontrol eden sitokin salınımını uyarırlar. Bunun neticesinde epitel hücrelerinin bariyer fonksiyonu bozulur ve epitel hücrelerinin geçirgenliği artar (Huang ve Chen, 2016). UK hastalığı, apikal bağlantı kompleksinin oluşumunu düzenleyen Hnf4a (Hepatocyte nuclear factor alpha 4, hepatosit çekirdek faktörü alfa 4) transkripsiyon faktöründe tek nükleotid polimorfizmi ile ilişkilendirilmiştir. Ayrıca zonula adherens bağlantısının yapısında bulunan E-kadherini kodlayan ve epitel hücreler arasındaki iletişimde önemli rol oynayan *CDH1 geni*, intestinal epitel dokusundaki bazal membranının bileşeni olan laminini kodlayan *LAMB1 geni*, sıkı bağlantının oluşumunda görev alan bir GTPazı kodlayan *GNA12 gen* polimorfizmi UK hastalarında tespit edilmiştir (Kim ve Cheon, 2017).



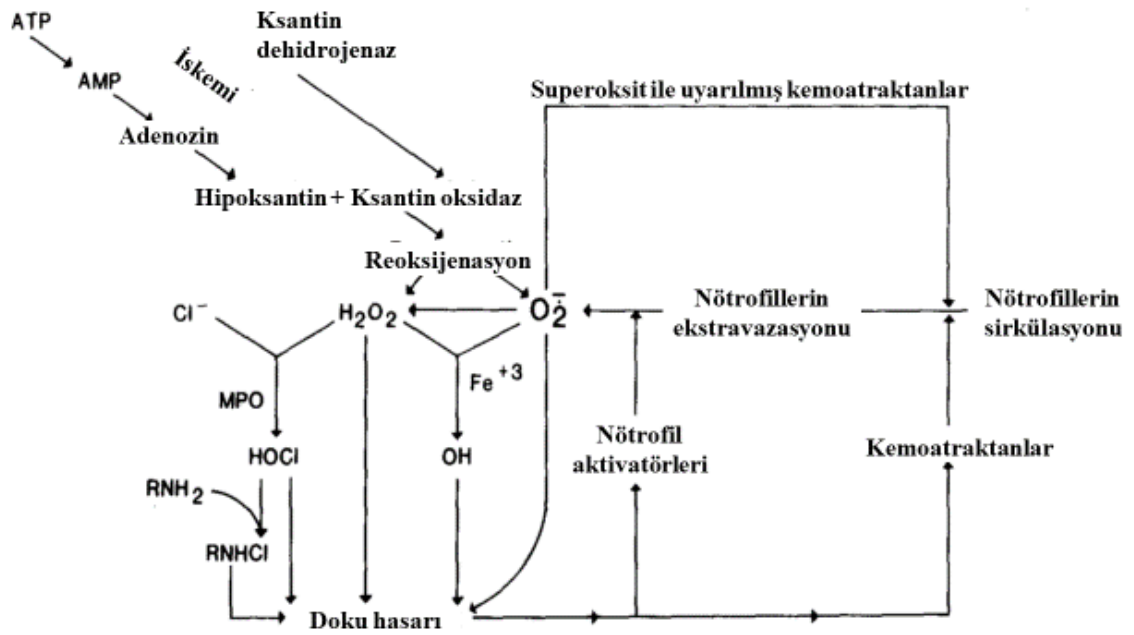
Şekil 2-10. Hücrelerarası bağlantılar (Salvo-Romero ve ark., 2015).

TJ: Tight junction; AJ: Adherens junction, D: Desmosome.

2.1.3.5. Ülseratif Kolit ve Oksidatif Stres

İnflamasyonun gelişiminde reaktif oksijen ve azot türlerinin artmış üretimi önemli patofizyolojik rolü olduğu bildirilmiştir (Keshavarzian ve ark., 1990; Keshavarzian ve ark., 1992). Ülseratif kolitin patogenezinde ilk olarak doku iskemisinin rol oynadığı ileri sürülmüştür. Kolonun mikrovasküler endoteli, mukoza epiteli ve kolondaki fagositik lökositler (makrofaj, nötrofil ve eozinofil), ksantin oksidaz, hücre NADPH oksidaz (NOX), lipooksijenaz, glukoz oksidaz, miyeloperoksidaz, nitrik oksit sentaz (NOS) ve siklooksijenaz (COX) gibi direkt olarak serbest oksijen radikallerinin üretimine yol açan enzimleri salgılamaktadırlar (Grisham ve Granger, 1988). Bu enzimlerin arasında NOX1, NOX2 kompleksi ve dual oksidaz-2 (DUOX2) gibi mukozal NADPH oksidazlar İBH’da yeni risk faktörleri olarak bildirilmiştir ve redoks homeostazdaki dengesizliklerinin İBH patogenezinde kritik oldukları vurgulanmıştır (Tian ve ark., 2017). Stres ile sempatik sinir sisteminin aktivasyonu sonucunda kolon kan akımının azalmasına bağlı olarak kolon dokusunun yetersiz perfüzyonu sonucu oksijenden yoksun kalması ile meydana gelen iske mi, ATP’nin hipoksantine katabolize edilmesine ve dokuda hipoksantin birikimine yol açar. Proteazların etkisiyle ksantin dehidrojenaz, ksantin oksidaza dönüşür. Normal şartlarda hipoksantin ürik asite metabolize olur ve bu reaksiyonda elektron alıcı NAD^{+} dir. Ancak hipoksi ya da iske mi nedeniyle ksantin dehidrojenazın ksantin oksidaza dönüştüğünden hipoksantin ürik asite dönüşümü ksantin oksidaz tarafından gerçekleşir ve bu reaksiyonda ise elektron alıcı olarak moleküler oksijen kullanılır. İske mik ince bağırsak dokusunun reperfüzyonu döneminde gözlenen hasarda, hücre içine moleküler oksijen girişi ile hızla serbest

oksijen radikal türevleri oluşur. İskemi yerinde ksantin oksidazın etkisiyle fazla miktarda oluşan hidrojen peroksit (H_2O_2) ve süperoksit radikali ($O_2^{\bullet-}$), demir varlığında Haber-Weiss reaksiyonu sonucu en reaktif ve zarar verici serbest oksijen radikali olan hidroksil radikalini oluştururlar ve iskemi/reperfüzyon hasarı denilen durumun ortaya çıkmasına sebep olurlar (Şekil 2-11).



Şekil 2-11: İskemik reperfüzyonu sonucunda intestinal mukozada meydana gelen reaktif oksijen türleri, nötrofil infiltrasyonu ve mukozal hasar (Grisham ve Granger, 1988).

Süperoksit radikalinin dismutasyonu sonucu oluşan hidrojen peroksit miyeloperoksidaz enzimi aracılığıyla, klorür iyonu ile reaksiyona girerek hipoklorik asiti oluşturur. MPO aktivitesinin artması UK hastalarının inflamme mukozasında görülmüştür ve malignite gelişimine katkıda bulunduğu ileri sürülmüştür. COX-2 ise *Helicobacter pylori* ile indüklenmiş gastrit ve inflamme kolon mukozasında kanserojen değişiklikleri ile ilişkilendirilmiştir (Tian ve ark., 2017). ROT (reaktif oksijen türleri) miktarının artması, intestinal membranlarının ve kapiler permeabilitenin artmasına, kolon epitelinin apikal kısmındaki koruyucu musin tabakasının parçalanmasına ve mukozal bariyerinin ortadan kalkmasına yol açarak birçok bakteri ürünü (endotoksin)

lamina propria'ya diffüze ederek fagositik lökositlerin aktivasyonuna yol açar (Grisham ve Granger, 1988).

Bağırsak inflamasyonu (Miller ve ark., 1995; Rachmilewitz ve diğ., 1995) ve inflamatuvar bağırsak hastalığı (Lundberg ve ark., 1994; Rachmilewitz ve ark., 1995a; Singer ve ark., 1996; Kimura ve ark., 1997) oluşturulan deneysel hayvan modellerinde nitrik oksit (NO) miktarının ve indüklenebilir nitrik oksit sentaz (iNOS) enziminin ekspresyonunun arttığı gözlenmiştir (Miller ve ark., 1992; Mei ve ark., 2005). Proinflamatuvar mediyatörlere cevap olarak kolon epitel hücrelerinde iNOS sentezi indüklendiği, nitrik oksitin superoksit radikaliyle etkileşmesi sonucu güçlü bir oksidan olan peroksinitritin oluştuğu bildirilmiştir.

2.1.3.5.1. İBH'de Redoks Sinyal Yolaklarının Rolü

2.1.3.5.1.1. NF-κB Sinyal Yolağı

Sitokinler ve prooksidanlar, bir proinflamatuvar redoks-sensitif transkripsiyon faktörü olan ve UK gelişmesinde önemli rol oynayan NF-κB'yı aktive ederler. Ülseratif kolitte, makrofajlarda ve epitel hücrelerinde NF-κB aktivasyonu bildirilmiştir (Rogler ve ark., 1998; Andresen ve ark., 2005). Crohn ve UK hastalarının intestinal lamina propria makrofajlarındaki NF-κB'nin artmış olan DNA-bağlama aktivitesi IL-1, IL-6 ve TNF-α'nın artmış üretimine yol açtığı bildirilmiştir (Jena ve ark., 2012). TNF-α kolon hücrelerinde süperoksit üretimini NOX1 ve NOXO1 (NADPH oksidase organizier1) enzimlerini aktive ederek kolon hücrelerinde süperoksit üretimini kolaylaştırır (Kuwano ve ark., 2008).

NF-κB aktivasyonu İBH patogenezinde önem taşıyan beş tip genin transkripsiyonunu arttırabilir, birincisi IL-6, IL-8, interlökin-16 (IL-16) ve TNF-α gibi proinflamatuvar sitokinleri kodlayan genler, ikincisi normal hücre büyüme ve gelişmesini düzenleyen genler, örneğin p53'ün ekspresyonunu arttırdığı apoptozis düzenleyicisinin (PUMA: p53 up-regulated modulator of apoptosis) NF-κB tarafından arttırıcı düzenlenmesi (up-regülasyonu) epitel hücrelerinin apoptozuna yol açar ve UK gelişimine katkıda bulunur (Qiu ve ark., 2011), üçüncü tip gen ise epitel bariyerin geçirgenliği ile ilişkilidir; örneğin TNF-α ile indüklenen NF-κB aktivasyonu ile miyozin hafif zincir kinaz'ın up-regülasyonu epitel bariyerindeki miyozinin parçalanmasına yol açar (Qiu ve ark., 2011), dördüncü tip gen TNF-α tarafından uyarılan ve mukozal hücreleri sindirebilen metaloproteinazların geni'dir; beşinci tip gen ise NF-κB'yı aktive

eden ve ROT metabolizması aracılığı ile bariyer stabilitesini etkileyen COX ve iNOS enzimleri kodlayan genlerdir.

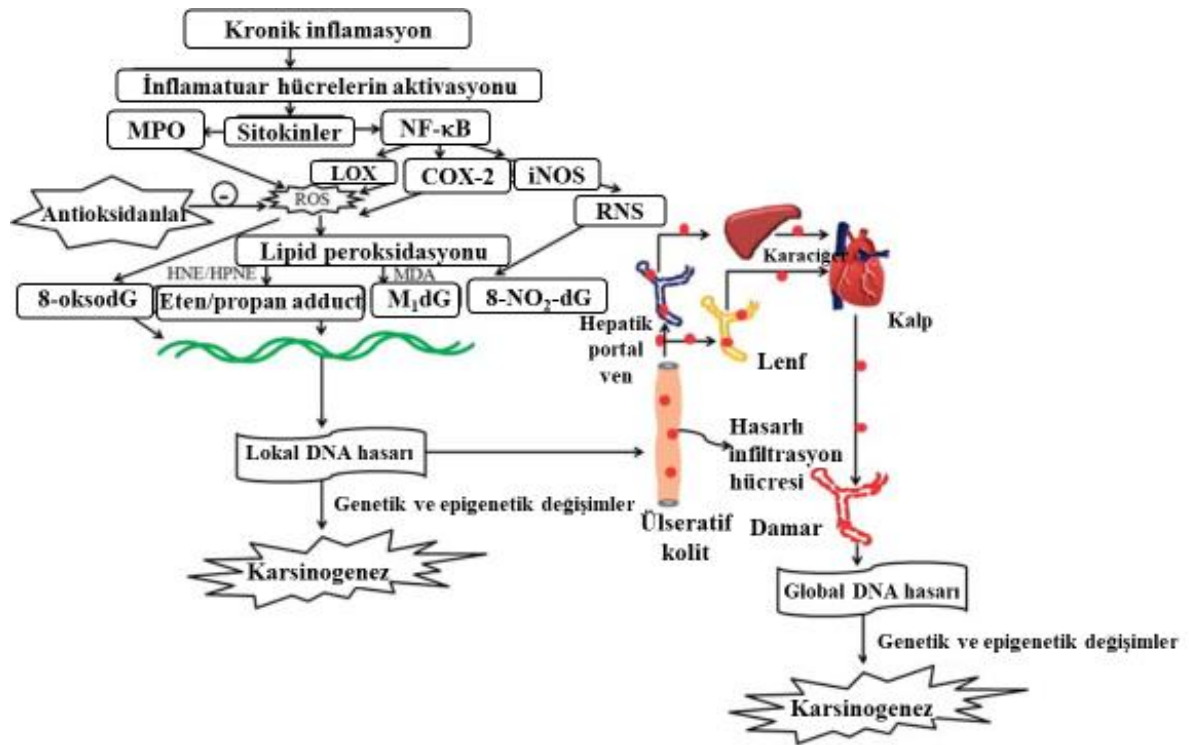
NF- κ B'nın inflamasyon ile ilişkili genlerin ekspresyonunu kontrol ederek kronik inflamasyonun düzenlenmesinde görevi olabileceği ileri sürülmüştür. NF- κ B'nın aktivasyonu, lipooksijenaz (LOX), siklooksijenaz-2 (COX-2) ve indüklenen nitrik oksit sentaz (i-NOS) enzimlerinin ekspresyonunun artmasına ve oksidatif stresin meydana gelmesine yol açar (Jena ve ark., 2012).

2.1.3.5.1.2. Nükleer Faktör Eritroid 2 İlişkili Faktör 2 (Nrf2) Sinyal Yolağı

Nrf2, İBH'da reaktif oksijen türlerinin (ROT) aşırı üretimini baskılayarak mukoza homeostazını düzenleyen bir transkripsiyon faktörü'dür. Normal şartlarda sitoplazmada Keap1 (Kelch-like ECH-associated protein 1) proteini ile bağlı bulunan Nrf2 oksidatif stres koşullarında Keap1'den ayrılarak çekirdek içine transloke olur, küçük Maf (sMaf) proteini ile heterodimer oluşturarak ve hedef genin promotör bölgesinde bulunan antioksidan yanıt elementine (ARE) bağlanarak genin transkripsiyonunu uyarır (Ma ve ark., 2018). Keap1/Nrf2/ARE sinyal yolağın aktivasyonu glutatyon peroksidaz (GPx), GST, NADPH oksidaz gibi antioksidan enzimlerin ekspresyonunu artırır. Nrf2, negatif düzenleme ile proinflamatuvar cevabı ve mukoza harabiyetine karşı hücrel antioksidan mekanizmalarından biridir. Nrf2-knockout farelerde IL-1 β , IL-6, IL-8, iNOS, ve COX-2'i kodlayan proinflamatuvar genlerin ekspresyonunun arttığı, hem oksijenaz (HO), GST Mu-1 gibi antioksidan enzimlerin ekspresyonunun azaldığı görülmüştür (Khor ve ark., 2006; Khor ve ark., 2008). Immediate-early response gene 3 (IER3), fosfatidilinozitol 3-kinaz (PI3K)/protein kinaz B (PI3K/Akt) yolu ile Nrf2 aktivasyonunu negatif modüle eder. UK modelinde IER3 eksikliği, Akt ve Nrf2 stimüle edilmesine yol açar ve ROT üretiminde azalma ve apoptoz görülür. Bu nedenle, İBH'da mukozada IER3 aktivasyonu nedeniyle Nrf2 düşük seviyelerde tutulur.

Reaktif oksijen veya nitrojen türleri (RNT) mitokondriyal ve nükleer DNA hasarına yol açabilirler. DNA'nın, 4-hidroksinonenal (HNE) ve 4-hidroperoksinonenal (HPNE) gibi lipid peroksidasyon ürünleri ile reaksiyona girmesi sonucunda kansere yol açan modifiye bazları oluşur. ROT ve RNT, genomik DNA ile etkileşerek 8-okso-7,8-dihidro-2'-deoksiguanozin (8-oksodG) ve 8-nitro-2'-deoksiguanozin (8-NO₂-dG) gibi promutajenik potansiyeli olan hasarlı bazların oluşmasına sebep olurlar. 2-

Deoksiguanozinin, lipid peroksidasyon ürünü olan MDA (malondialdehit) ile reaksiyona girmesi sonucunda ise oksidatif stresin belirteci olan M1dG oluşumuna yol açar (Jena ve ark., 2017). Mitokondriyal DNA stabilitesinin bozulması UK'in kolorektal kansere dönüşümünü hızlandıran sürece katkıda bulunabilir (Nishikawa ve ark., 2005; Novak ve Mollen, 2015) (Şekil 2-12).



Şekil 2-12: Oksidatif stres ile indüklenen DNA hasarı mekanizmaları. (Jena ve ark., 2012)

İBH'da akut inflammatuar fazında bağırsak mukozadaki makrofajların sayısı artar. Aktive makrofajlardan T hücrelerin salınımını stimüle eden CD40, CD80, CD86 gibi yüzey antijenlerinin ve miyeloid hücreler üzerinden salınan TREM-1 ekspresyonu artar. Normal bağırsak dokularında TREM-1 ekspresyonu normaldir, fakat deneysel olarak oluşturulmuş kolit modelinde ve İBH'da yüksek bulunmuştur (Huang ve Chen, 2016). Kollajen sentezi IL-1 ve IL-6'nın etkisiyle artar. Endotel hücre yüzeyinin değişiklikleri, trombositlerin ve lökositlerin (polimorfonükleer ve monositler) trombin ve kalsiyum aracılığı ile kapilerlere yapışmasını sağlar. Trombositlerin agregasyonunu kolaylaştıran maddelerin serbestlenmesi izler. Endotel hücrelerinden yüksek konsantrasyonda PGE2

salgılanır. Yapılan çok sayıdaki araştırmalar monositler ve makrofajlar tarafından oluşturulan endojen PGE2'nin, poliklonal immün globulinlerin ve otoantiklorların oluşumunu arttırdığını göstermektedir. Normalde T helper lenfositleri inhibe eden PGE2, supresör T lenfositlerini de inhibe etmektedir. Bu iki yönlü inhibisyon, B hücreleri tarafından immünoglobulinlerin oluşumundaki artışı tetiklemektedir. Bu durumda monositlerden PGE2 oluşumunda bir artış olduğu UK'te gösterilmiştir. Siklik endoperoksitlerin (PGG2, PGH2), dönüşümü sırasında aktif oksijen radikalleri (süperoksit ve serbest hidroksil) de oluşur. Oldukça sitotoksik olan aktif oksijen radikallerinin inflamasyon reaksiyonlarında rolü vardır. Özellikle makrofajlar ve PMNL'le aktif oksijen radikalleri üretirler. Birçok non-steroidal antiinflamatuvar ilaçlar (indometasin, salisilatlar) bunları inhibe ederek antiinflamatuvar etki oluştururlar. Bu mediyatörlerin mukozada yoğunlaşması aktif hastalıkta görülür. Bu durum yalnız doku harabiyeti ve iltihabı değil aynı zamanda epitel permeabilitesini de artırır.

Kolon epiteli süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), glutatyon redüktaz (GR) ve glutatyon peroksidaz (GSH-Px) gibi çeşitli enzimatik antioksidan savunma sistemleri ile indirgenmiş glutatyon (GSH) içermektedir (Jena ve diğ., 2012).

2.1.3.6. Ülseratif Kolit Modelleri

İnflamatuvar bağırsak hastalıkları, çeşitli fenotipik alt tipleri ve klinik görünimleri olan, multifaktöriyel bir etiyopatogeneze sahip çok heterojen bir bozukluktur. Bu sebeple İBH tablosunu oluşturan çok sayıda hayvan modeli bulunmaktadır. Bunlar; spontan kolit modelleri, genetik olarak modifiye modeller (transgenik veya gen hedefli fare suşları), adoptif hücre transferi ve kimyasallar yoluyla oluşturulan modelleridir (Wirtz ve Neurath, 2007; Wirtz ve ark., 2007). Bu modeller, insan hastalıklarının karmaşıklığını tam olarak yansıtmamasına rağmen, UK patogeneze neden olan faktörleri ve farklı terapötik ajanların etkilerini araştırmak açısından önemlidir. Kimyasallar yoluyla oluşturulan hayvan modelleri arasında en yaygın olarak kullanılanlar asetik asit (Murad ve ark., 2016; Anzoice ve ark., 2016), trinitrobenzen sülfonik asit (TNBS) (Mei ve ark., 2005; Su ve ark., 2016) ve dekstran sülfat sodyum (DSS) (Montrose ve ark., 2011; Trivedi ve Jena, 2013, Aldini ve ark., 2014; Jeon ve ark., 2016) uygulanması yolu ile oluşturulan inflamasyon modelleridir (Low ve ark., 2016).

Transgenik ve genetiği değiştirilmiş mutant (knockout) fare kullanılarak hastalık modelleri geliştirilmiştir. T-hücre aracılı UK araştırılmasında IL-7 transgen, TCR α KO, WASP KO, Gai2 KO, ve IL-2 KO fare modelleri, B-hücre biyolojisinin araştırılmasında Gai2 KO fare modeli, intestinal bariyer disfonksiyonunun araştırılmasında Mdr1a KO fare modeli, ve sinyal yollarının disregülasyonunun incelenmesinde Gai2 KO fare modeli kullanılmıştır (Low ve ark., 2013).

2.1.3.7. Dekstran Sülfat Sodyum ile Oluşturulmuş Kolit Modeli

Dekstran sülfat sodyum ile indüklenen kolit, intestinal inflamasyonun gelişiminde doğal immün sistemin rolünün araştırılmasında kullanılmaktadır (Kiesler ve ark., 2015). İlk defa Okayasu ve ark. (1990) tarafından bildirilen DSS modeli, kolit gelişimindeki lökositlerin rolünü araştırmak amacıyla kullanılmış ve bugün kolay uygulanması ve tekrarlanabilirliği açısından geniş çapta kullanılmaktadır (Eichele ve Kharbanda, 2017).

DSS, molekül ağırlığı 5-1400 kDa arasında değişen, suda çözünen, negatif yüklü, sülfatlanmış bir polisakkarittir. 40-50 kDa molekül ağırlığındaki DSS'nin içme suyuna ilave edilmesiyle hazırlanan çözeltinin farelere verilmesiyle indüklenen intestinal inflamasyon, intestinal epitel tabaka bütünlüğünün bozulmasına ve luminal bakterilerinin ve antijenlerin mukozaya geçerek mukozanın tahribine yol açtığı ileri sürülmüştür (Eichele ve Kharbanda, 2017).

DSS ile indüklenen kolit modelinin etkinliği birçok faktörlerden etkilenmektedir. Bunların arasında DSS konsantrasyonu (genellikle % 1-5 arasındadır), DSS'nin molekül ağırlığı (40-50 kDa DSS'nin bağırsak epitel hücre membranlarından nüfuz ettiği gösterilmiştir ve akut kolit oluşturulmasında kullanılmaktadır), fare suşları (C3H/HeJ, C57BL/6 ve BALB/c fare suşları daha duyarlıdır), deneğin cinsiyeti (erkek fareler daha duyarlıdır) ve hayvanların mikrobiyolojik ortamı ile ilişkilidir (Perše ve Cerar, 2012; Low ve ark., 2013; Eichele ve Kharbanda, 2017). Akut kolit genellikle C57BL/6 veya BALB/c farelere % 2-5'lik DSS'nin sürekli olarak genellikle 6-10 gün (ortalama 7 gün) süreyle uygulanmasıyla oluşturulur. Akut fazda DSS ile indüklenen kolitte en sık görülen klinik belirtileri ağırlık kaybı, diyare, dışkıda gizli kan, piloereksiyon ve anemidir (Perše ve Cerar, 2012). Tipik histolojik değişiklikler ise mukus sekresyonunda belirgin azalma, epitel dejenerasyonu, kript epitelinin nekrozu ile beraber lamina propria ve submukozada belirgin nötrofil infiltrasyonu, kript abseleri ve

kriptitisi kapsamaktadır. Birinci günden itibaren kolondaki sıkı bağlantılarda bulunan proteinlerden olan zonula ocludens-1 (ZO-1)'in azalması ve proinflamatuvar sitokinlerin ekspresyonunun artması gözlenmiştir. Evans Blue metodu ile vasküler permeabilite değişiklikleri incelenmiş ve 3. günden itibaren kolon mukoza permeabilitesinin belirgin olarak arttığı bulunmuştur. Epitel hücrelerinin apoptozu ve proliferasyonu arasındaki dengesizlik epitel bariyer geçirgenliğinin artmasına yol açması, DSS ile indüklenen akut kolitte epitelin azalmış proliferasyonu ve artmış apoptoz bulgusu ile desteklenmektedir. Sıkı bağlantı proteinlerinin ekspresyonundaki değişimler ve epitel hücrelerde apoptozun artışı İBH'da bildirilmiştir (Perše ve Cerar, 2012).

Uzun süren ülseratif kolitin kanser için bir risk faktörü olduğu tespit edilmiş ve bu nedenle DSS, kolit ile ilişkili karsinogenezin araştırılmasında da kullanılmaya başlanmıştır. DSS'nin uzun süre, belirli aralıklarla uygulanması ile kemirgenlerde displaziye yol açan kronik ülseratif kolitin indüklendiği modelde, inflamasyon derecesinin kolon dispazisi ile orantılı olarak değiştiği gözlenmiş ve nükleer translokasyonu ve mutasyona bağlı olarak β -kateninin aktivasyonu sonucunda Wnt sinyal yolunun aktivasyonu ile ilişkilendirilmiştir. Wnt sinyal yolunun aktivasyonu artmış immün yanıtına ve c-myc proteinin transkripsiyonal disregülasyonuna yol açan IL-6 ve TNF- α gibi proinflamatuvar proteinlerinin aşırı salgılanmasına yol açmaktadır (Eichele ve Kharbanda, 2017).

2.1.3.8. İBH ve UK Tedavisinde Kullanılan İlaçlar

UK güncel tedavisinde 5-aminosalisilik asit (5-ASA), kortikosteroidler, tiyopurinler ve TNF- α karşı monoklonal antikorları kullanılmaktadır. 5-ASA dışındaki terapilerin temel amacı immünosupresyon ile inflamasyonu kontrol altında tutmaktır. Fakat bu ilaçların uygulanması ile uzun süreli etkinlik sadece orta şiddetli ve şiddetli UK hastaların üçte birinde görülür. Bu ilaçların kullanımları yan etkileri, enfeksiyon riski, lenfoma ve nonmelanoma deri kanseri gibi yan etkilerinden dolayı sınırlıdır (Low ve ark., 2013).

Sülfasalazin kuvvetli sistein taşıyıcısı inhibitörü'dür. Sülfasalazin ve amino salisilatlar hafif ve orta şiddette UK'te etkili olup remisyonu sürdürmede etkilidir. Fosfolipaz A2'yi inhibe ederek lökotrien ve PG (prostaglandin) sentezini azaltır, bakteriyel peptidlerin kemotaktik aktivitelerini bloke eder. Sülfasalazinin antiinflamatuvar potansiyeli, oksidatif stresi kontrol eden adenozin salgılanmasının yanı

sıra, proinflatuar sitokinlerin ve serbest radikallerin üretimi üzerindeki etkilerinden ileri gelmektedir (Piechota-Polanczyk ve Fichna, 2014).

Sülfasalazin 5-aminosalisilik asit (5-ASA)'ın diğer adı ile mesalazin'in azo bağı ile sülfapiridine bağlanması ile elde edilir. İlaç gastrointestinal traktüsün üst bölümünden çok az absorbe olur, kolona ulaştığı zaman bakteriyel azoredüktaz'ın etkisiyle, süratle absorbe olan ve karaciğerde metabolize edildikten sonra idrarla atılan sülfapiridin ve kolondan % 25'i absorbe edilen 5-ASA'e parçalanır. 5-ASA hastalığın aktif durumunda kortikosteroidlerle sağlanan remisyona devamını sağlamaktadır, fakat baş ağrısı, bulantı, kusma gibi yan etkileri mevcuttur. İlacın tedavi edici etkisinin salisilatlardan ileri geldiği anlaşıncı 5-ASA'yı kolonlara taşıyan, fakat sülfapiridin içermeyen ilaçlar geliştirilmiştir. Sülfasalazini tolere edemeyen birçok hastanın bu ilaçları tolere ettiği görülmüştür. 5-ASA'in peroksizom proliferatör aktive edici reseptör ekspresyonunu artırarak etkili olduğu ileri sürülmüştür (Ford ve ark., 2011).

Kortikosteroidler hastalığın aktif devresinde remisyona sağlamada kullanılırlar. Kortikosteroidlerin antioksidan ve antiinflatuar etkileri, intestinal NF-κB aktivasyonunu inhibe etme özelliklerinden ileri geldiği bildirilmiştir (Piechota-Polanczyk ve Fichna, 2014).

Azotiyopirin ve 6-merkaptopurin immünosupresyonda en çok kullanılan ilaçlardır. Başlıca kullanımı ülseratif kolitin kronik şeklinin tedavisinde remisyona sağlamaktadır. Bu tedavi kortizon tedavisi kesildikten sonra sık sık hastalığı alevlenen hastalarda kullanılmaktadır (Piechota-Polanczyk ve Fichna, 2014).

2.1.3.8.1. Hedefe Yönelik İlaç Tedavisi

2.1.3.8.1.1. Adaptif İmmün Sistemini Hedef Alan İlaçlar

Th1/Th17-Anti-Sitokin- IL 12/23 inhibitörleri

Ustekinumab, IL-12 ve IL-23 sitokinlerinin ortak p40 alt birimine yüksek afinite ile bağlanan tamamen insan immünoglobulin G1k (IgG1) rekombinant monoklonal antikoru'dur. Diğer bir insan anti-IL-12/23 monoklonal antikoru olan ABT-874, UK tedavisindeki etkinliği hala araştırılmaktadır. Th1/Th17 yolağını hedefleyen fakat Ustekinumab'dan daha az etkili olan diğer monoklonal antikolar: IL-23p40 alt birim inhibitörü olan Briakinumab, IL23p19 alt birim inhibitörü olan MED12070 ve IL-23 inhibitörü olan Risankizumab'dır (Holleran ve ark., 2017).

Anti-SMAD7: Mongersen

Bir intraselüler protein olan SMAD7, TGF β 1 reseptörüne bağlanarak, TGF- β 1-bağlı ve SMAD-bağlı sinyal iletimini engeller. İnflamatuvar bağırsak hastalığında SMAD7 seviyelerinde artış, TGF β 1 aktivite eksikliğine yol açar. Mongersen terminal ileumda SMAD7 aktivitesini azaltır.

JAK1/JAK3 inhibitörleri

Proinflamatuvar sitokinlerin reseptörüne bağlanması ile aktifleşen JAK/STAT (Janus kinase/Signal transducers and activators of transcription) sinyal yolu bir başka potansiyel terapötik hedeftir. JAK ailesi JAK1, JAK2, JAK3 ve tirozin kinaz (TYK)2 olmak üzere dört hücre içi proteinleri içermektedir. IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15, IL-12, IL-21, IL-22 ve IL-23 JAK sinyal yolağını tetikledikleri için, bu yolağın inhibisyonu proinflamatuvar sitokinlerin azalması ile sonuçlanır (Kim ve Cheon, 2017). Tofacitinib özellikle JAK1 ve JAK3'ü inhibe eden, Th1 ve Th2 hücre farklılaşmasını inhibe ederek hem doğal hem de adaptif immün cevaplarını etkileyen ve UK tedavisinde umut vaat eden bir moleküldür (Holleran ve ark., 2017).

IL-13: Tralokinumab

Th immün yanıtta görevi olan, IL-13'i bağlayarak nötralize eden spesifik insan immüno globulin G4 monoklonal antikorudur.

2.1.3.8.1.2. Doğal ve Adaptif İmmün Sistem Arasındaki Pleiotropik Faktörleri Hedef Alan İlaçlar

Anti-TNF- α : İnfliksimumab (IFX), Adalimumab (ADA), Golimumab (GOL) ve Sertolizumab (CZP) TNF- α inhibisyonu yapan biyolojik tedavi ajanlarıdır.

TNF- α 'nın çözünür (sTNF) ve membrana bağlı (trans-membran; tmTNF) olmak üzere iki farklı formu vardır. TNF- α 'nın her iki formu da, etkilerini p55 ve p75 olarak bilinen iki farklı TNF reseptörüne bağlanarak gösterir. Anti-TNF ajanlar da, TNF- α 'nın bu reseptörlerine bağlanmasını önleyerek TNF- α etkilerini inhibe ederler.

TNF'ün etkinliğini azaltmak için iki farklı yaklaşım vardır. Bunlardan birisi anti-TNF α antikorlarla (infliksimumab) tedavi, diğeri de çözünebilir TNF reseptörlerinin (etanersept) uygulanmasıdır (Fc kısmı TNF reseptör 2'nin hücre dışı parçası füzyon proteini olarak eklenmiştir).

Kimerik yapıda bir monoklonal antikor olan infliximab Crohn hastalığının tedavisinde kullanılması ilk teklif edilen ilaçtır, ayrıca glukokortikosteroid tedavisine cevap vermeyen UK hastalarda, mukozal TNF- α seviyelerinin artmamış olmalarına rağmen etkin olduğu görülmüştür (Roda ve ark., 2011). Ülseratif kolitli hastalarda infliximab'ın etkisi, proinflamatuvar sitokin salgılayan APC ve T hücrelerin üzerindeki apoptik etkisine bağlı olabileceği ileri sürülmüştür. (Sands ve ark., 2001; Ochsenkuhn ve ark., 2004).

Adalimumab, TNF- α 'ya karşı tamamı insan monoklonal antikoru'dur.

TNF- α 'ya spesifik IgG1 κ monoklonal antikoru olan Golimumab UK tedavisinde kullanılmaya başlanmıştır.

Sertolizumab pegol (CZP) % 95 insan kaynaklı IgG monoklonal anti-TNF- α antikorunun Fab parçasının pegilasyon (polietilen glikol ile bağlanması) ile elde edilmiştir. Diğer monoklonal anti-TNF- α antikorlarından farklı olarak IgG1 Fc parçası içermemektedir ve kompleman aracılı sitotoksiste göstermemektedir (Holleran ve ark., 2017). Bu ilaçlar, TNF- α 'nın biyolojik aktivitesini bloke ederek, endotel hücrelerin apoptozuna yol açarlar, sıkı bağlantılarının permeabilitesini azaltırlar, Treg lenfosit hücrelerin aktivitesini arttırırlar, T hücrelerin ve inflamatuvar mediyatörlerin aktivitesini azaltırlar, intestinal fibroblastlar tarafından VEGF A'nın üretimini engelleyerek inflamasyon aracılı mukozal anjiyogenezi baskırlar (Holleran ve ark., 2017).

Ozanimod: Sfingozin-1-Fosfat Reseptör-1 Selektif Agonisti

Sfingozin-1-fosfat, limfosit, dendritik ve epitel hücreler ve mezenterik lenf düğümleri tarafından eksprese edilir (Holleran ve ark., 2017).

Anti-IL-6

Tocilizumab (TCZ) IL6 reseptörü (IL-6R) üzerinden IL-6 inhibisyonu yaparak etkili olan bir biyolojik ajandır. IL-6 reseptörüne karşı oluşturulan bir monoklonal antikor olan Tocilizumabın, IFN- γ , TNF- α ve IL-1 β mRNA ekspresyonunu azaltarak etkili olduğu görülmüştür (Yamamoto ve ark., 2000).

2.1.3.8.1.3. Doğal İmmün Sistemini Hedef Alan İlaçlar

Adezyon moleküllerine yönelmiş monoklonal antikorların kullanımı diğer hedefe yönelik tedavi seçeneklerinden biridir.

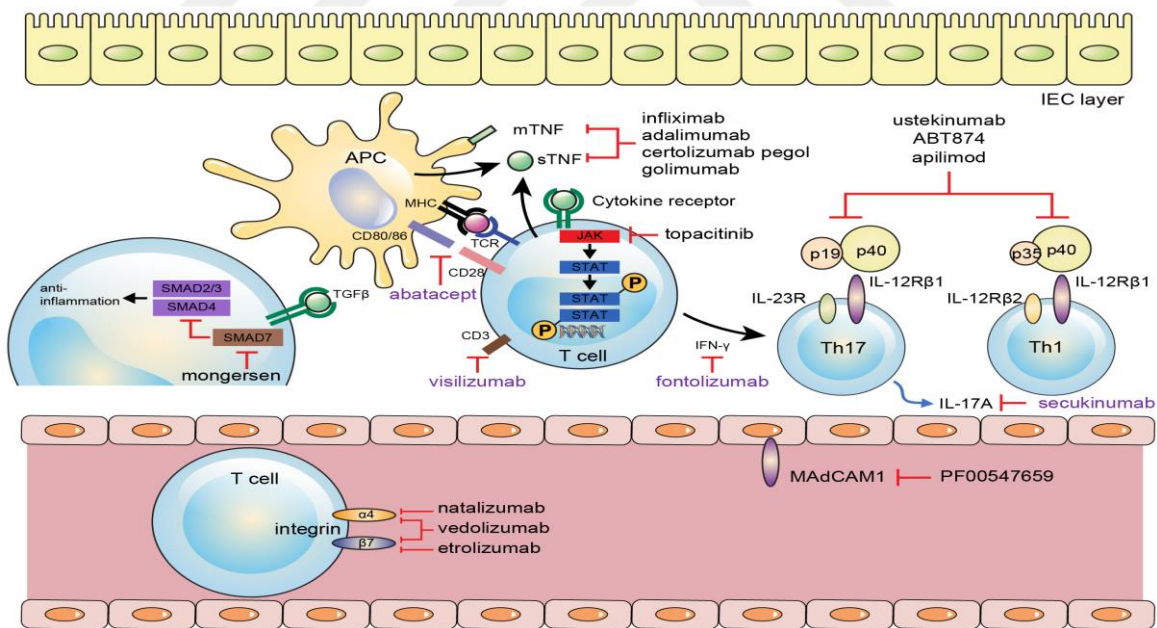
Humanize Fc bağlamayan IG-2 anti-CD3 monoklonal antikor olan visilizumab glukokortikosteroid tedavisine cevap vermeyen UK hastalarda aktif T hücrelerine bağlanarak apoptozu indükler.

Vedolizumab, $\alpha 4\beta 7$ integrin heterodimere karşı etki gösteren ve $\alpha 4\beta 7$ integrin ile adressin adı verilen MAdCAM-1 (venlerin endotel hücrelerinde eksprese edilir) arasındaki etkileşimi bloke eden bir humanize monoklonal antikordur (Holleran ve ark., 2017).

Etrolizumab, $\alpha 4\beta 7$ 'nin $\beta 7$ altbirimine bağlanmasını veya $\alpha E\beta 7$ ve E-kadherin arasındaki etkileşimi etkileyen humanize edilmiş IgG1 monoklonal antikorudur.

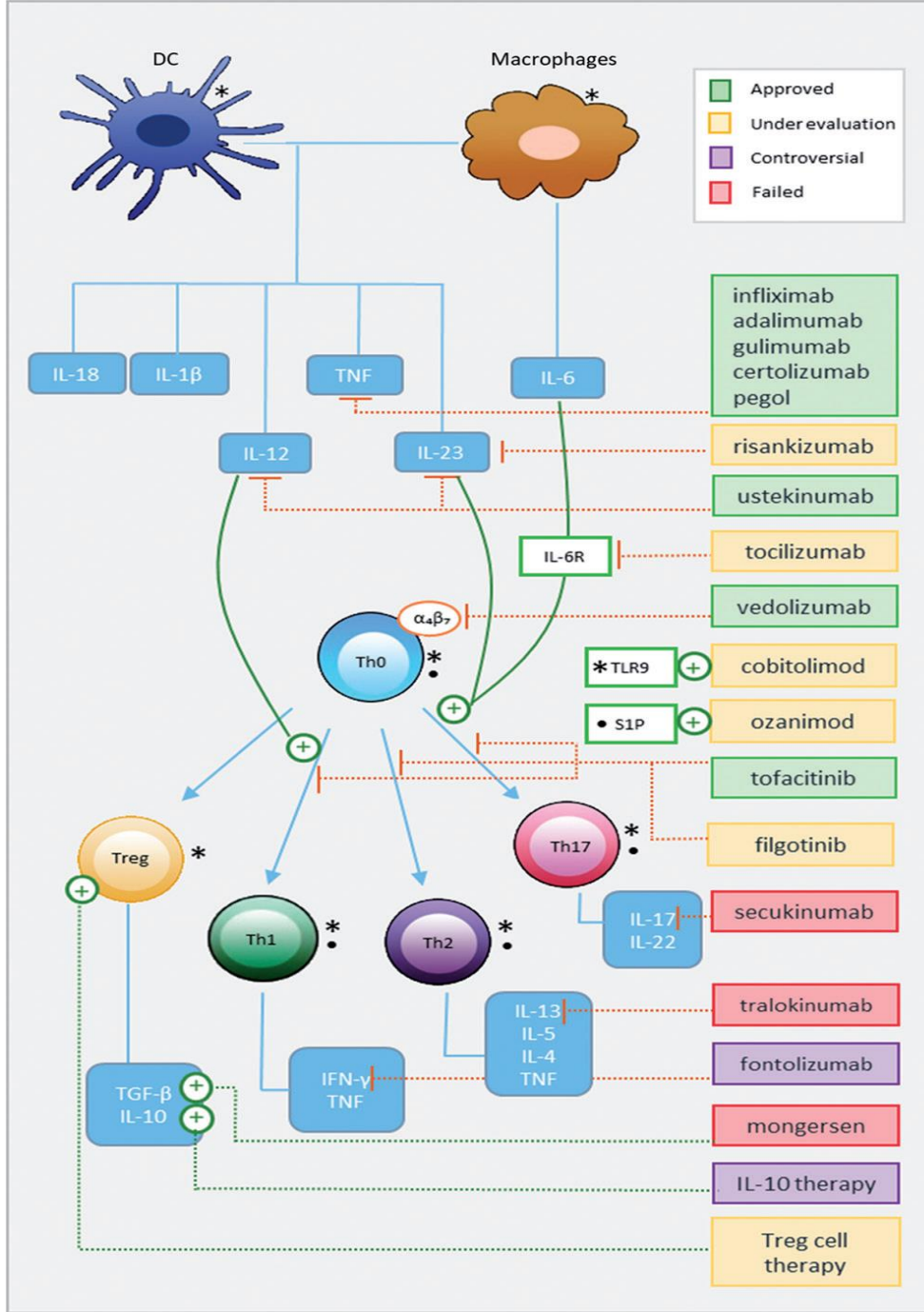
Alicaforsen, mRNA'nın hedef geni ile komplementer hibridizasyonu ile ICAM-1 üretimini ve dolayısıyla protein translasyonunu bloke eden insan ICAM-1 antisens oligopeptidi'dir (Holleran ve ark., 2017).

İBH tedavisindeki terapötik hedefler Şekil 2-13'de; kullanılan ilaçlar ise Şekil 2-14'de gösterilmiştir.



Şekil 2-13: İBH tedavisindeki terapötik hedefler (yararlı etki – siyah ile; etkisiz - mor renk ile gösterilmiştir) (Kim ve Cheon, 2017).

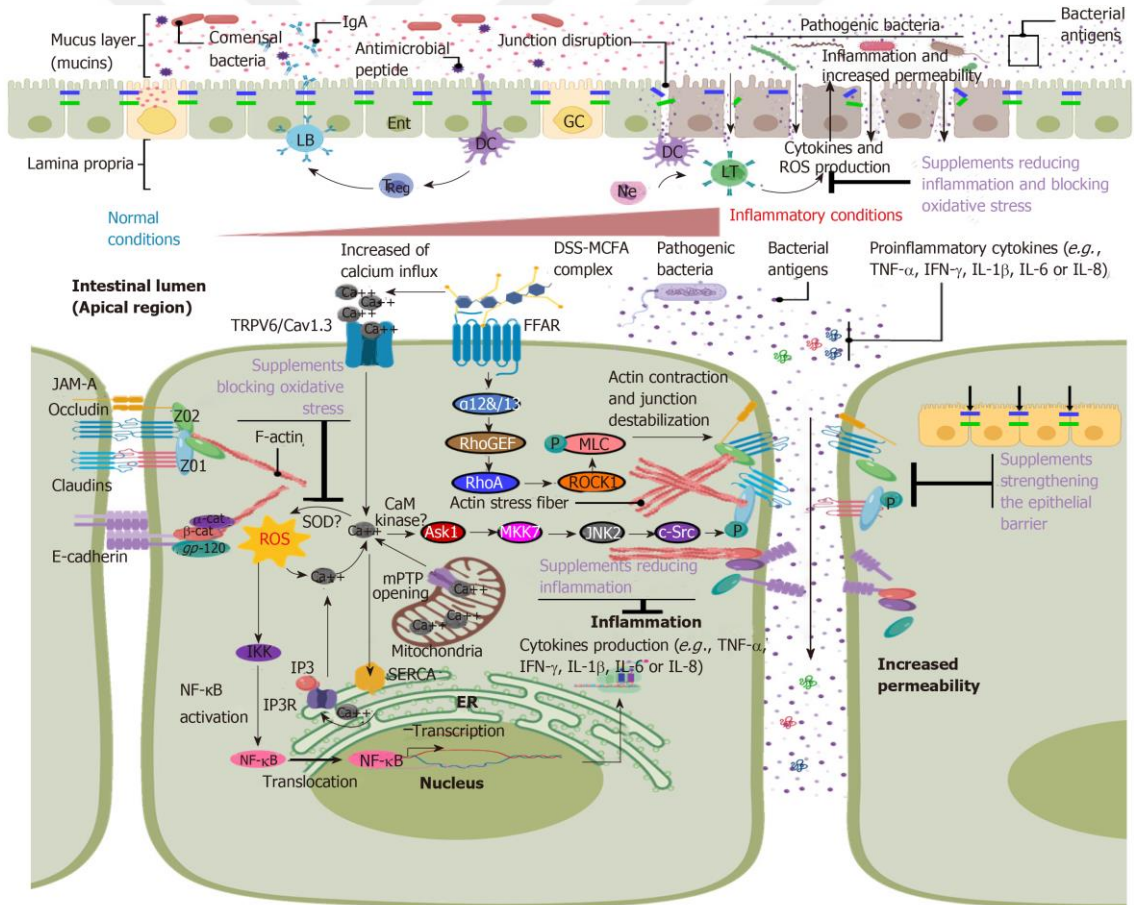
APC, antijen sunan hücreler; IEC, intestinal epitel hücresi; TNF, tümör nekroz faktör; MHC, major histokompatibilite kompleksi; TCR, T hücre reseptörü; JAK, Janus kinaz; TGF, transforme edici büyüme faktörü; IL, interlökin; MAdCAM, hücre adezyon molekülü.



Şekil 2-14: İBH tedavisinde kullanılan ilaçlar (Ahluwalia ve ark., 2018).

2.1.3.8.1. Gıda Takviyeleri ve Bitkiler ile Tedavi

Son yıllarda doğal beslenmenin yanında bitkilerle tedavi de önem kazanmıştır. Bu amaçla halk arasında kullanılabilen bitkilerin biyokimyasal etkileri incelenerek bu kullanımlarının bilimsel dayanağı olup olmadığı araştırılmaktadır. Bitkilerin bazı hastalıkları iyileştirici etkilerinin doğal antioksidanlardan ileri geldiğine dair bilgiler mevcuttur. Bu nedenle halk arasında yaygın olarak çeşitli amaçlarla kullanılan bitki ekstraktlarının biyolojik aktivitelerinin ve bu aktiviteden sorumlu bileşiklerin yapılarının aydınlatılması ile ilgili çalışmalar hız kazanmıştır. Doğal takviyeler UK belirtilerini, inflamasyonu ve oksidatif stresi azaltarak ve hücrelerarası bağlantıların düzenlenmesinin bozulmasına engel olarak hafifletebilir (Şekil 2-15). UK tedavisinde kullanılabilen doğal takviyeler Triantafillidis ve ark. (2016) ve Vargas-Robles ve ark. (2019) tarafından özetlenmiştir.



Şekil 2-15: Doğal takviyelerin, UK belirtileri, inflamasyon ve oksidatif stres üzerindeki etkileri (Vargas-Robles ve ark., 2019).

2.1.3.9. *Cotinus coggygia*

C. coggygia'nın kimyasal bileşenleri, farmakolojik ve toksikolojik potansiyeli hakkındaki araştırmalar Matić ve ark. (2016) tarafından derlenmiştir.

2.1.3.10.1. *C. coggygia* Üzerinde Yapılmış Etnobotanik Araştırmalar

Anacardiaceae familyasına ait olan *Cotinus* cinsi iki türü kapsamaktadır: *Cotinus coggygia* Scop. (Avrasya duman ağacı) (syn.: *Rhus cotinus* L.) ve *Cotinus obovatus* Raf. (Amerikan duman ağacı) (Novaković ve ark., 2007). Ülkemizde tetra otu, boyacı somağı, sarıboya ağacı, sarıcan, sarı yaprak, pamuklu sumak, duman ağacı olarak bilinmektedir (Baytop, 1999; Demirci ve ark., 2003). Balkanlarda yaygın olarak bulununan ve bir çalı türü olan *C. coggygia* orman açıklarında, kayalık ve yamaçlarda bulunmakta, 1300 m'ye kadar yayılış göstermektedir (Davis, 1972). Avrupa'nın güneyi, Akdeniz, Moldova, Kafkaslar, Çin'in merkez bölgesi, Doğu Asya, Himalayalar ve Balkanlar'da yetişmektedir (Novaković ve ark., 2007).

Duman ağacı önceleri süs amaçlı olarak kullanılmıştır. Daha sonra ise Amerika'da bu ağaçlardan ele geçirilen tahtalar dayanıklı bağ yapımında ve sivil savaşın yapıldığı zamanlarda sarı renk boyanın elde edilmesinde kullanılmıştır. Yaprakları yuvarlak, rengi mavimsiye veya koyu yeşil gittikçe parlak sarı, turuncu, kırmızı ve mora dönüşen bitkilerdir (Pijut, 2008) (Şekil 2-16). Yaprakları kuş tüyü şeklindedir. İlkbaharda yeşil renkteyken yaz sonuna doğru kırmızıya döner. Çiçekleri ise küçük pamuk gibi olup gösterişsizdir. Çiçekleri belirli bir sürenin sonunda saç görünümünü alır, ismi de buradan gelmektedir. Balkanlarda genel olarak rujevina veya dudak boyası diye de adlandırılmaktadır. Hazanda yapraklarının kırmızı rengini almasından dolayı böyle isimlendirilmektedir (Novaković ve ark., 2007).



Şekil 2-16: *C. coggygia*'nın sürgün ve yaprakları.

2.1.3.10.2. *C. coggygia*'nın Kullanım Alanları

İçerdiği yüksek miktardaki gallotaninlerden (> % 25) dolayı toksik olarak kabul edilen bitkinin halk tarafından antiseptik, antiinflamatuvar, antimikrobiyal (Matić ve ark., 2011a), antihemorajik ve yara iyileştirici (Seiberg ve ark., 2006; Demirci ve ark., 2003; Aksoy ve ark., 2016) olarak haricen kullanımı yanı sıra, Bulgaristan'da gastrik ülser ve diyare'nin tedavisinde odumsu kısmından hazırlanan etanol infüzyonun (Ivanova ve ark., 2013), Sırbistan halkı tarafından ise kabuk kısmından hazırlanan dekoksasyonun kanser tedavisinde dahilen kullanıldığı bildirilmiştir (Marčetić ve ark., 2013). Bitkinin nefrit, antraks (şarbon), astım, kalp ve üriner hastalıkların tedavisinde ve antidiabetik (Kültür, 2007), mide koruyucu (Pavlov ve ark., 2013a; Pavlov ve ark., 2013b) kullanıldığı hakkında kayıtlar bulunmaktadır. Geleneksel Çin tıbbında, bitki ekstresinin safra kesesinin boşaltılmasını düzenleyici (kolagog) ve ateş düşürücü (antipiretik) etkisi bildirilmiştir (Sieberg ve ark., 2008). Bitki şurubunun kimyasal hasara karşı karaciğeri koruduğu, koledok sfinkterdeki basıncı azaltarak, safranin keseye dolmasını kolaylaştırdığı ve bağışıklığı güçlendirdiği bildirilmiştir (Shen ve ark., 1991). Bitkinin yapraklarından hazırlanan sulu ekstrenin diğer bazı ekstreleri ile birlikte hemoroid oluşumunun önlenmesinde, ağrının dindirilmesinde ve tedavisinde kullanıldığı rapor edilmiştir ve patentli alınmıştır (Seiberg ve ark., 2008).

Bitkinin yaprakları ve genç dallarından elde edilen terpen kokulu uçucu yağlar parfümlerde katkı madde olarak (Demirci ve ark., 2003; Tsankova ve ark., 1993), kökleri ise, sarımsı bir renk içerdiği için deri ve kumaşları boyamada kullanıldıkları (Baytop, 1999) bildirilmiştir.

2.1.3.10.3. *C. coggygia* Üzerinde Yapılan Fitokimyasal Çalışmalar

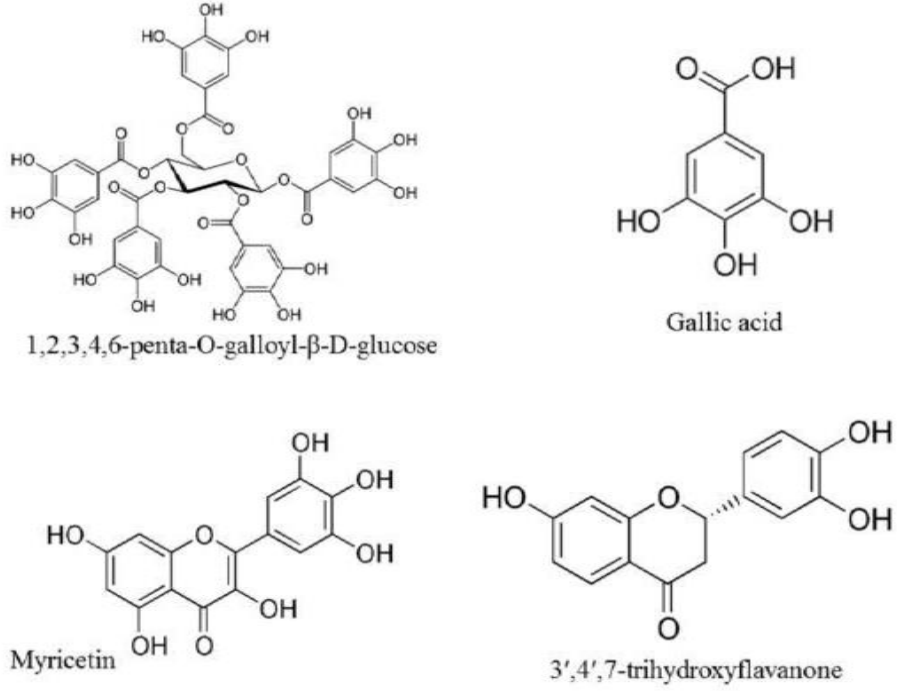
Yapılan çalışmalarda *C. coggygia*'nın farklı kısımlarından hazırlanan etil asetat ve metanol ekstrelerinde fenolik bileşikler (sulfuretin, sulfuretin dimeri, sulfurein, fisetin, fustin, taksifolin, butin, butein, liquiretinenin, izoliquiretinenin), hidroliz olabilen tanenler (gallik asit, gallik asit türevleri: metil gallat, pentagalloil glukoz, kateşin ve prosiyanidler), antosiyaninler (delfinidin-3-galaktozit, siyanidin-3-galaktozit, petunidin-3-glikozit, delfinidin 7-glikozit, siyanidin 3-glikozit-7-ramnozit (Tanchev ve Timberlake, 1969) ve uçucu yağlar tespit edilmiştir. HPLC profillerine göre yaprak ve çiçeklerde en fazla gallik asit ve türevleri bulunmuştur (Šavikin ve ark., 2009).

Bugüne kadar *C. coggygia* ekstrelerinden izole edilen maddeler Tablo 2-1 ve Tablo 2-2’de özetlenmiştir.

Tablo 2-1: *C. coggygia* ekstrelerinden izole edilen maddeler.

Solvent	Kullanılan kısım	Bileşiğin adı	Kaynak
Etanol	Dallar	1,2,3,4,6-penta-O-galloyl- β -D glucose 1,2,3,6-tetra-O-galloyl- β -D-glucose; gallic acid	Cha ve ark., 2009
Metanol	Gövdenin merkezine yakın odunsu kısmı	sulfuretin; fisetin; fustin; quercetin; taxifolin; butin; butein; liquiritigenin; isoliquiritigenin	Valianou ve ark., 2009
Metanol	Gövdenin merkezine yakın odunsu kısmı	C-3/C-3'' dimer of butin (3',4',7-trihydroxyflavanone); gallik asit ve metil esteri; kateşin; profisetinidinler: fisetinidol-(4 α →8)- (+)-kateşin ve epifisetinidol-(4 β →8)-(+)-kateşin; flavanonoller: fustin ve dihidroquercetagenin; flavanonlar: butin ve eriodiktol; flavonoller: fisetin ve quercetin; chalcone butein and the aurone sulfuretin.	Bilen ve ark., 2010
Metanol	Çiçek; yaprak	gallic acid	Šavikin ve ark., 2009
Etil asetat	Bütün bitki	disulfuretin; sulfuretin; sulfurein; gallik asit; metil gallat; pentagalloil glukoz	Westenburg ve ark., 2000
Metanol	Gövde	myricetin; sinnamik asidin hidroksillenmiş türevleri (klorojenik, kafeik, kumarik, ferulik ve rozmarik asid); quercetin; rutin; kemferol; resveratrol;	Matić ve ark., 2013
Etil asetat	Genç sürgün	gallik asit, apigenin, luteolin ve türevleri	Simić ve ark., 2008

C. coggygia'nın farklı kısımlarından izole edilen bazı biyoaktif maddelerin kimyasal formülleri Şekil 2-17'de gösterilmiştir.



Şekil 2-17: *C. coggygia*'nın farklı kısımlarından izole edilen bazı biyoaktif maddelerin kimyasal formülleri.

Tablo 2-2: *C. coggygria* bitkisinden elde edilen ekstralarının içerdikleri fenolik ve flavonoit miktarları.

Kullanılan çözelti	Kullanılan kısım	Total fenol	Flavonoit	Tanin	Kaynak
Etil asetat	Genç Sürgün	% 97,9	% 3,5	% 83,4	Simić ve ark., 2008
Metanol	Yaprak	-	76,5 GAE/g	13,7 GAE/g	Šavikin ve ark.,
	Çiçek	-	515,5 GAE/g	18,5 GAE/g	2009
Metanol	Gövde	410 GAE/g kuru ağırlık	98 RU/g kuru ağırlık	-	Nićiforović ve ark., 2010
Metanol	Sürgün	62,50 PK/g	46,70 PK/g	-	Matić ve ark., 2011a
Metanol ekstresinin fraksiyonlandırılması ile elde edilen:	Tüm bitki	-	-	-	
n-Hekzan		39,41 GAE/g	-	-	
Kloroform		147,24 GAE/g	-	-	Riaz ve ark.,
Etil asetat		229,34 GAE/g	-	-	2012
Butanol		174,83 GAE/g	-	-	
Su		96,62 GAE/g	-	-	
Metanol	Gövde	3,78 GAE/g kuru ağırlık	8,2 RU/g kuru ağırlık	-	Matić ve ark., 2013
Aseton ekstresinin fraksiyonlandırılması ile elde edilen:		518,4 GAE/g	23,2 RU/g	-	Marčetić ve ark., 2013
Kloroform		171,7 GAE/g	25,6 RU/g	-	
Etil asetat		929,8 GAE/g	35,5 RU/g	-	
Su		77,5 GAE/g	2,6 RU/g	-	
Etil asetat	Sürgün ve	435,6 GAE/g	29,0 CA/g	-	Ozsoy ve ark.,
Metanol	yapraklar	402,7 GAE/g	118,1 CA/g	-	2017
Diklorometan		35,3 GAE/g	23,0 CA/g	-	
Su		327,5 GAE/g	48,2 CA/g	-	

GAE/g- ekstrenin her gramı için gallik asit ekivalanları

PK/g- ekstrenin her gramı için pirokatekol ekivalanları

RU/g- ekstrenin her gramı için rutin ekivalanları

CA/g- ekstrenin her gramı için kateşin ekivalanları

C. coggygia yüksek oranda uçucu yağ taşıdığı için bu yönde birçok çalışma yapılmıştır. Türkiye’de yetişen *C. coggygia* bitkinin yanısıra Bulgaristan, Sırbistan, Yunanistan gibi Balkan yarımadasına ait bitkinin uçucu yağ bileşenlerinin de aydınlatıldığı çalışmalar mevcuttur.

Bulgaristan’da *C. coggygia* bitkisinin yapraklarından elde edilen uçucu yağ örneklerinde alfa-pinen (% 44,0), limonen (% 20,0) ve beta-pinen (% 11,4) tespit edilmiştir (Tsankova ve ark., 1993).

Ülkemizde yapılan bir araştırmada, bitki yapraklarından elde edilen uçucu yağın başlıca bileşiklerinin limonen (% 48,5), (Z)- β -osimen (% 27,9) ve (E)- β -osimen (% 9,7) olduğu (Demirci ve ark., 2003) bulunmuştur.

Yunanistan’da Mt Pilio’da yetişen bitkinin yapraklarından elde edilen uçucu yağları ile yapılan bir araştırmada, uçucu yağ miktarının % 1,2-3,4 ve ana bileşiklerin limonen (% 67,4), alfa-pinen (% 14,7), terpinolen (% 8,6). Mt Elikon’dan toplanan bitki yapraklarından elde edilen uçucu yağın başlıca bileşiklerinin mirsen (% 32), sabinen (% 18) ve alfa-pinen (% 15,9), Evvoia adasından toplananların uçucu yağında ise sabinen (% 24,2, myrsen (% 14,0), limonen (% 10,9) ve terpin-4-ol (% 10,9) (Tzakou ve ark., 2005) olduğu bildirilmiştir.

Sırbistan’da bitkinin çiçek, yaprak ve gövdelerden elde edilen uçucu yağın limonen (39,5, 6,5 ve 3,39%) ve α -pinene (16,0, 15,1 ve 21,9%) monoterpenler olduğu bildirilmiştir (Milošević ve ark., 2008). Sırbistanın iki bölgesinden (Deliblatska peščara ve Zemun) toplanan *C. coggygia* yaprakları ile yapılan bir başka uçucu yağ araştırmasında ise uçucu yağın ana bileşikleri limonen (% 47,0-39,2), (Z)-beta-osimen (% 16,4-26,3), alfa-pinen (% 8,2-8,4), (E)-beta-osimen (% 4,6-9,0) ve terpinolen (% 6,8-5,3) olduğu (Novaković ve ark., 2007) bulunmuştur.

İtalya’da yetişen bitkinin yapraklı sürgünlerinden elde edilen ve limonen (% 47,1), (Z)- β -osimen (% 15,2), α -pinen (% 8,5) ve (E)- β -osimen (% 5,3) içeren uçucu yağın Gram (+) bakterilere karşı antimikrobiyal aktivite gösterdiği bildirilmiştir (Fraternali ve Ricci, 2014).

2.1.3.10.4. *C. coggygia*'nın Farmakolojik Aktiviteleri

2.1.3.10.4.1. Antioksidan Etki

C. coggygia yapraklarından hazırlanan sulu infüzyonunun antioksidan kapasitesi TEAC değeri olarak 7.05 mM/kersetin ekivalanı olarak bildirilmiştir, bu değerin rooibos (*Aspalathus linearis*) ve honeybush (*Cyclopia intermedia*) çayından iki veya üç kez daha yüksek olduğu tespit edilmiştir (Ivanova ve ark., 2005).

Simić ve ark. (2008) *C. coggygia*'nın kurutulmuş genç sürgünlerinden hazırlanan aseton ekstresinin fraksiyonlandırılması ile elde edilen kloroform, etil asetat ve su fraksiyonlarını, total fenol bileşik ve flavonoid miktarları, lipozomlarda lipid peroksidasyonunu inhibe edici aktiviteleri, DPPH• serbest radikali giderici aktiviteleri ile ferri iyonu redükleme antioksidan potansiyeli (FRAP) bakımından incelemiş ve ekstrelerin her biri TBARS oluşumunu doza bağımlı olarak inhibe edici etkiye sahip oldukları, DPPH• radikali giderici ve ferri iyonunu redükleyici etkisine sahip oldukları sonucuna varmışlardır. En yüksek total fenolik bileşik miktarının ve antioksidan aktivitenin etil asetat ekstrelerinde olduğu bildirilmiştir.

Šavikin ve ark. (2009) *C. coggygia*'nın çiçek ve yapraklarından hazırlanan metanol ekstrenin antioksidan aktivitesinin, içerdiği fenolik bileşiklerinin peroksit radikallerini oluşumunu engelleme ve DPPH serbest radikalleri giderme etkisinden kaynaklanabileceği sonucuna varmışlardır.

Diğer bir çalışmada (Matić ve ark., 2011c), kurutulmuş ağaç gövdesinden hazırlanan metanol ekstrenin antioksidan etkisini, indirgeme gücü ve metal kelatlama gibi özelliklerinden kaynaklandığı öne sürülmüştür. Ekstrenin 60 µg/ml konsantrasyonunda sisteyinin gösterdiği redükleyici aktivitesinden iki kez daha güçlü bir aktivite gösterdiği, 20 µg/ml konsantrasyonunda ise % 78 kelatlama özelliğine sahip olduğu bildirilmiştir.

C. coggygia yapraklarından hazırlanan su, metanol ve etilasetat ekstrelerinin total fenol bileşik ve flavonoid miktarları, DPPH• serbest radikali ve ABTS•+ radikal katyonu giderici aktiviteleri ile ferri iyonu redükleme gücü bakımından incelenmiş ve ekstrelerin her biri DPPH• ve ABTS•+ radikallerini gidererek ve ferri iyonunu redükleyerek antioksidan etkisi gösterdikleri sonucuna varılmıştır. En yüksek total fenolik bileşik miktarının, en yüksek antioksidan aktiviteyi gösteren etil asetat ekstresinde olduğu saptanmıştır (Tunalı ve ark., 2011). Ekstreler, elastaz ve α-glukozidazı inhibe edici etkileri bakımından incelendiğinde, sulu ekstrenin güçlü

elastazı inhibe edici etkisine, metanol ekstrenin ise güçlü α -glukozidazı inhibe edici etkisine sahip olduğu sonucuna varılmıştır (Tunalı ve ark., 2011).

Riaz ve ark. (2012) tarafından yapılan başka bir çalışmada, bütün bitki, oda ısısında metanol (MeOH) ile masere edilerek solvent alçak basınç altında rota evaporatorda uçurulmuştur. Bakiye metanol/su (1:2) karışımında çözülüp sırasıyla n-heksan, kloroform, etil asetat ve en sonunda n-bütanol ile tüketilerek fraksiyonlandırılmıştır. Elde edilen dört fraksiyonun DPPH^{*} serbest radikali giderici ve lipid peroksidasyonu inhibe edici aktivitesi ile total radikal antioksidan potansiyeli (TRAP) ve ferri iyonu redükleme antioksidan potansiyeli (FRAP) bakımından incelenmiştir ve etil asetat ekstresinin en yüksek aktiviteye sahip olduğu sonucuna varılmıştır.

Diğer bir çalışmada 30 gün süre ile sazan balıklara (*Cyprinus carpio*) *C. coggyria* metanol ekstresinin 0,5, 1 ve 1,5 g/kg vücut ağırlığı konsantrasyonunda balık yemine katılarak verilmesinin ardından alınan kan örneklerinde SOD (NTB), lizozim, miyeloperoksidaz ve fagositik aktivite gibi parametrelerin kontrol deney grubuna göre anlamlı şekilde arttığı gözlenmiş ve tetranin bağışıklık cevabını arttırıcı etkisi olduğu sonucuna varılmıştır (Bilen ve ark., 2014).

Yarat ve ark. (2013), *C. coggyria* bitkisinin sağlıklı kişilerin salya örneklerindeki glutatyon ve SOD düzeyleri üzerindeki etkisini incelemişler ve ekstre ile inkübe edilen salyadaki glutatyon seviyesi kontrol gruba göre anlamlı derecede yüksek olduğu, SOD aktivitesinin ise düşük olduğu tespit edilmiştir.

Ozsoy ve ark. (2017), çoğunluğu Kırklareli bölgesinde, halk arasında kanser tedavisinde kullanılan 9 bitki türlerinden hazırlanan etanolik total ekstrelerin antioksidan, asetilkolinesteraz, siklooksijenaz ve tiyoredoksin redüktaz enzimleri üzerinde inhibe edici etkileri incelenerek inflamasyon, Alzheimer hastalığı ve kanser tedavisine yönelik olarak potansiyel kullanılışları ve yöresel kullanılışları ile ilişkileri bilimsel veriler ışığında değerlendirmişlerdir. İncelenen bitkilerden *C. coggyria Scop.*'nın en güçlü asetilkolinesteraz, tiyoredoksin redüktaz, COX-1 ve COX-2 inhibitör etkisi ile en yüksek antioksidan aktivite gösterdiği belirlenmiştir.

2.1.3.10.4.2. Anti-inflamatuar Etki

Carregeenan ile indüklenen sıçan pençe ödemi deneysel modelinde *C. coggygria* ekstrelerinin antiinflammatuar etkisi gösterilmiştir. Ekstrelerin 50 mg ve 100 mg/kg konsantrasyonlarında sıçan pençelerinde oluşan inflamasyonu kontrol grubuna göre sırasıyla % 46,5 ve % 76,5 oranında istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalttığı görülmüş ve ekstrenin doza bağlı antiinfamatuar aktiviteye sahip olduğu sonucuna varılmıştır. Etil asetat ekstresinin 100 mg/ml konsantrasyonunda gösterdiği etkinin, indometazinin 8 mg/kg konsantrasyonunda gösterdiği inhibe edici etkisinden daha yüksek olduğu bildirilmiştir (Simić ve ark., 2008).

C. coggygria bitkisinin yapraklarından hazırlanan infüzyonun wistar sıçanlarında indometazin ile oluşturulmuş mide ülserlerinde önleyici etkisi belirlenmiş, bu etkinin lipid peroksidasyonunu önleyici antioksidan etkisinden kaynaklanabileceği belirtilmiştir (Pavlov ve ark., 2013a).

2.1.3.10.4.3. Antimikrobiyal Etki

Bitkilerle tedavi olarak adlandırılan tamamlayıcı tıbbı doğru yönelimin artmasının en büyük sebebi bakterilerin son zamanlarda kullanılan antibiyotiklere karşı gösterdiği dayanma direncinin artmasıdır. Yapılan çalışmalarda, halk arasında kullanılan *C. coggygria* bitkisinin yapraklarından ele edilen ekstraktların antimikrobiyal etkisi birçok çalışmada incelenmiştir ve bitkinin yeni antimikrobiyal bileşiklerin potansiyel bir kaynağı olarak kullanılabileceği vurgulanmıştır. Bitkinin antibakteriyel etkisi içerdiği uçucu yağlardan ileri geldiği rapor edilmiştir (Antal ve ark., 2010). Ayrıca içerdiği taninlerin hidrolizi sonucunda meydana gelen pirogallol, katekol ve ellajik asid gibi fenol yapısındaki bileşiklerin de antibakteriyel aktiviteleri bilinmektedir (Ferrazzano ve ark., 2013).

Sırbistan'ın iki bölgesinden toplanan *C. coggygria*'nın yaprakları ve genç dallarından elde edilen uçucu yağların antimikrobiyal aktivitesi, agar disk difüzyon, mikrodilüsyon yöntemleri ve minimum inhibitör konsantrasyonu (MIC) tayini ile çalışılmıştır. Her iki yağın, disk difüzyon yöntemiyle çalışıldığında, streptomisine kıyasla, Gram+ bakterilere karşı daha etkili oldukları gözlenmiştir. Uçucu yağların bifonazol ticari preparata göre daha yüksek antifungal potansiyeli bildirilmiştir (Novaković ve ark., 2007).

C. coggygia'nın çiçek, yaprak ve sürgünlerinden elde edilen uçucu yağın antibakteriyel aktiviteleri agar difüzyon metodu kullanılarak 6 çeşit bakteri üzerinde çalışılmış ve sürgünlerden elde edilen uçucu yağın *S. aureus* gelişmesini güçlü bir şekilde inhibe ettiği (35 mm inhibisyon zonu), çiçek ve yapraklardan elde edilen uçucu yağın ise *K. pneumoniae* gelişmesini inhibe ettiği bildirilmiştir (Milošević ve ark., 2008).

C. coggygia yaprak ekstresinin *S. aureus* ve *Pseudomonas aeruginosa* gelişmesini inhibe ettiği (13 ve 10 mm inhibisyon zonu) bildirilmiştir (Borchardt ve ark., 2008).

C. coggygia sürgünlerinden hazırlanan metanol ekstresinin antibakteriyel aktivitesi disk difüzyon ve broth makrodilüsyon yöntemleri kullanılarak *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* ve *Micrococcus lysodeikticus*'ye karşı antibakteriyel ve *Candida albicans*'a karşı antifungal aktivitesi gözlenmiştir (Matić ve diğ., 2011a).

Disk difüzyon yöntemi kullanılarak *C. coggygia* yapraklarından elde edilen metanol ekstresinin *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus vulgaris* and *Pseudomonas aeruginosa* karşı orta antibakteriyel aktivitesi gözlenmiştir (Singh ve ark., 2012).

Türkiye'de yapılan bir çalışmada, disk difüzyon yöntemiyle çeşitli solventlerle hazırlanmış *C. coggygia* yaprak ekstralarının antibakteriyel aktivitesi incelendiğinde, distile su ile hazırlanan ekstrenin *Enterococcus faecalis*'e karşı (20 mm inhibisyonu) en etkili olduğu, metanol ekstresinin ise *S. aureus*, *S. epidermidis* ve *E. faecalis*'e karşı etkili olduğu bildirilmiştir (Tunç ve ark., 2013).

C. coggygia genç sürgünlerinden elde edilen aseton ekstresinin ve fraksiyonlarının, minimum inhibitör konsantrasyon değeri (MIK) olarak ifade edilen antibakteriyel aktiviteleri 3,1 mg/ml ve 200 mg/ml arasında değiştiği gözlenmiştir (Marcetić ve ark., 2013). Aseton ekstresi, Gram-pozitif bakterilere (*S. epidermidis* ve *S. aureus*) karşı yüksek etkili bulunmuştur, etil asetat fraksiyonunun ise *B. subtilis*, *K. pneumoniae* ve *E. coli* bakterilere karşı yüksek antibakteriyel aktivitesi gözlenmiştir. Kloroform fraksiyonu, bir antifungal ilacı olan nystatinden *C. albicans*'a karşı daha yüksek antifungal aktivite gösterdiği bulunmuştur.

Ferrazzano ve ark. (2013), *C. coggygia*'nın su ve etanol ekstrelerinin *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus*, *Lactobacillus casei* ve *Actinomyces viscosus*'a karşı güçlü bir antibakteriyel aktivitesi gösterdikleri bildirmişlerdir.

Bitkinin antibakteriyel ve antifungal özelliklerinden başka antiviral aktiviteleri de ilgi çekmiş ve ayrıca rapor edilmiştir (Fan ve ark., 2005). Antiviral etkinin iki yolu vardır; bunlardan biri enfeksiyonun önlenmesi ve diğeri viral replikasyonun inhibisyonudur. *C. coggygia* yapraklarından hazırlanan etanol ekstresinin Tobacco mosaic virus (TMV) replikasyonunu inhibe ederek güçlü bir antiviral etki gösterdiği bildirilmiştir (Jing ve ark., 2012).

2.1.3.10.4.4. Antitümör Etki

C. coggygia ekstrelerinin anti-tümör etkileri incelenmiştir. Šavikin ve ark., (2009) *C. coggygia*'nın yaprak ve çiçeklerinden elde edilen metanol ekstrelerinin insan servikal (HeLa) ve kolon karsinom (LS174) hücre hatları üzerindeki güçlü sitotoksik etkileri, antioksidan etkileri ile iyi bir korelasyon gösterdikleri bildirmişlerdir.

C. coggygia'nın hekzan, etanol ve su ekstrelerinin iki ökaryotik hücre hattı (insan gingival fibroblast-HGF-1 ve keratinosit-HaCaT) üzerindeki sitotoksik etkisi Ferrazzano ve ark. (2013) tarafından incelenmiş, sulu ekstrenin hücre canlılığı üzerinde hafif inhibitör etki gösterdiği, etanol ekstresinin ise toksik etkili olduğu bildirilmiştir.

C. coggygia flavonoidlerinin, fosfatidilinositol 3-kinaz (PI3K)/protein kinaz B (AKT) sinyal yolağını düzenleyerek glioblastoma kanser hücrelerinin inhibisyonuna yol açtıkları Wang (2010) tarafından bildirilmiştir.

C. coggygia'nın toprak üstü kısmından hazırlanan metanol ekstrenin dört insan kanser hücre hatları üzerindeki (akciğer - A549; meme - MCF7; histiocytic lymphoma - U937 ve human B lymphoblastoid cells - TK6) sitotoksik etkisi Polio ve ark. (2016) tarafından incelenmiştir. Ekstrenin A549 ve MCF7 karşı sitotoksik etki gösterdiği ve hücre döngüsünün G1 fazındaki hücrelerinin anlamlı bir artışına yol açtığı bildirmişlerdir.

Artun ve ark. (2016) Türkiyede yetişen *C. coggygia* yapraklarından elde edilen methanol ekstresinin HeLa hücreleri üzerindeki antiproliferatif etkisini rapor etmişlerdir.

Romanya'da yetişen *C. coggygia*'nın odumsu kısmından elde edilen ve dietil eterde çözünen fraksiyonu, sulfuretin ile butein bileşenleri ve bunların hidrofilik β -

siklodekstrin ile oluşturdukları siklodekstrin komplekslerinin servikal (HeLa), over (A2780), meme (MCF7 ve MDA-MB231) kanser hücreleri üzerindeki etkileri incelemişler ve ekstrenin, over kanser hücrelerinin büyümesini mikromolar düzeylerde inhibe ettiğini, betainin serbest formu veya rastgele metillenmiş β -siklodekstrin kompleksi HeLA hücrelerinin % 82'nin büyümesini güçlü bir şekilde inhibe ettikleri, sulfuretinin serbest formunun veya siklodekstrin kompleksinin ise daha düşük sitotoksik etki gösterdikleri bildirilmiştir (Antal ve diğ., 2016).

Gospodinova ve ark. (2017) Bulgaristan'da yetişen *C. coggyria*'nın yapraklarından hazırlanan etanol ekstresinin meme, servikal ve over kanser hücre hatlarına karşı antiproliferatif ve antioksidan etkilerini bildirmişlerdir.

C. coggyria bitkisinin antitümör etkisi içerdği gallik asit (Kawada ve ark., 2001), mirsetin (Zhang ve ark. 2010), apigenin (Ruela-de-Sousa ve ark., 2010) ve kersitin'den (Duo ve ark. 2012) ileri gelebileceği rapor edilmiştir.

2.1.3.10.4.5. Anti-Genotoksik ve Karaciğeri Koruyucu Etkisi

SLRL (sex-linked recessive lethal) testi kullanılarak *C. coggyria*'nın % 5'lik metanol ekstresinin, spermatogenezin her üç safhasında erkek *Drosophila melanogaster* X-kromozomunda sekse-bağlı resesif letal mutasyonlarını uyardığı ve % 5'lik konsantrasyonunun mutant sıklıklığını arttırdığı ve genotoksik olduğu sonucuna varılmıştır (Stanić ve ark., 2009).

Wistar sıçanlarına intraperitoneal olarak sırasıyla 500, 1000 and 2000 mg/kg vücut ağırlığı dozlarında *C. coggyria*'nın genç sürgünlerinden hazırlanan sulu çözeltisinin verilmesinden sonraki 24. ve 72. saatte alınan karaciğer ile beyin omuriliğine Comet testi uygulanmış ve *C. coggyria* ekstresinin 1000 ve 2000 mg/kg dozunda verildiğinde düşük genotoksik etkisi olduğu, 500 mg/kg dozunda verildiğinde ise genotoksik olmadığı bildirilmiştir (Matić ve ark., 2011b).

C. coggyria ağaç gövdesinden hazırlanan metanol ekstresinin, pirogallol ile deneysel olarak oluşturulmuş karaciğer hasarı nedeniyle artmış olan serum AST ve ALT enzim düzeylerini ve lipid peroksidasyon ürünlerini azalttığı, antioksidan enzimlerini stimüle edici bir etkisi olduğu, DNA hasarı tamirine yol açtığı, antiapoptotik mekanizmada rol oynayan protein kinaz B (Akt) aktivitesini arttırdığı ve NF-kB'nin aşırı ekspresyonunu azalttığı, dolayısıyla karaciğer harabiyetine karşı koruyucu etkisinin bulunduğu bildirilmiştir (Matić ve ark., 2011c).

C. coggygia methanol ekstresinin pirogallol tarafından uyarılan genotoksisiteyi ve hepatotoksisiteyi modüle ederek, antigenotoksik ve antihepatotoksik etki gösterdiği ve bu etkilerin içerdiği mirisetin flavonoitten ileri geldiği bildirilmiştir (Matić ve diğ., 2013).

2013 yılında yapılan bir çalışmada *C. coggygia* bitkisinden elde edilen infüzyon erkek wistar sıçanlarda araştırılmıştır. Hayvanlara % 1, % 2 ve % 4 konsantrasyonlarda bitki infüzyonu sonda ile mideye gönderilerek tedavi edilmiştir. Sonuçlar sulu infüzyon tedavisi ile karaciğer subkronik toksisite olmadığını göstermiştir (Pavlov ve ark., 2013c).

Diğer bir çalışmada *C. coggygia* sulu ekstresinin Sprague Dawley sıçanlarda etanol ile deneysel olarak oluşturulmuş karaciğer hasarına olan etkisi ve antioksidan savunma sistemindeki değişiklikleri incelenmiştir. Karaciğer dokusunda lipid peroksidasyonunun göstergesi olan malondialdehid ile indirgenmiş (GSH) düzeyleri ve katalaz aktivitesi, serumda ise aspartat aminotransferaz (AST), alanin aminotransferaz (ALT) ve alkalen fosfataz aktiviteleri tayin edilmiştir. Çalışma sonucunda etanol uygulanmış kontrol grubunun, karaciğer hasarı nedeniyle serum ALT, AST ve ALP düzeyleri, kontrol grubu sıçanlarına göre anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur ($p<0.05$). Bunun yanı sıra karaciğer MDA düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı olmayan bir artış, GSH ve katalaz, düzeylerinde ise, normal kontrol deney grubuna bir azalma görülmüştür ($p<0.05$). Etanol ile birlikte *C.coggygia* ekstresi (59 mg/kg) verilmiş sıçanlarda LPO düzeylerinin etanol uygulanmış kontrol deney grubuna göre anlamlı şekilde azaldığı, GSH düzeyleri ise anlamlı şekilde arttığı, katalaz aktivitesi ise arttığı gözlenmiş ve *C.coggygia* ekstresinin etanol ile indüklenmiş hasarına karşı karaciğeri koruyucu aktivite gösterdiği sonucuna varılmıştır (Sancar-Bas ve ark., 2015).

Başka bir çalışmada 30 gün süre ile wistar sıçanlara gavajla verilen *C. coggygia*'nın sulu ve etanol infüzyonunun karaciğer, böbrek veya beyine herhangi bir subtoksik etkisi olmadığı bildirilmiştir (Ivanova ve ark., 2013).

"Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi (EFSA) tarafından 2012 yılında yayımlanan gıda veya takviye edici gıdalarda kullanıldığında insan sağlığı endişesi doğurması muhtemel maddeleri doğal olarak içerdiği bildirilen bitkiler kompendiyumu başlıklı bilimsel görüşte Avrupa Birliği ülkelerinde gıda uygulamalarında kullanılan bitkilerle ilgili bilgiler derlenmiştir. Söz konusu kompendiyumda *C. coggygia* bitkisine yer verilmemiştir" (EFSA, 2012).

"Avrupa Bitkisel ay Birliği (EHIA) tarafından yayımlanan Gıda Olarak Kabul Edilen Bitki Envanter Listesi' nde de *C. coggygia* bitkisi yer almamaktadır (EHIA, 2013)".

Türkiyede *C. coggygia Scop.* bitkisinin yaprak ve genç sürgün kısımlarının güvenilirlik değeriendirme güncel bilimsel çalışmalar ışığında Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı, Gıda ve Kontrol Genel Müdürlüğü (GKGM) Risk Değerlendirme Daire Başkanlığı tarafından 2014 yılında yapılmıştır. "*C. coggygia Scop.* bitkisinin yaprak ve genç sürgün kısımları hakkında toksisite çalışmaları değeriendirilip, herhangi bir olumsuz etkinin görölmediği tespit edilmiştir. *C. coggygia scop.*'un yaprak ve genç sürgünlerinin ve bu kısımlardan elde edilen ekstrelerin gıdalarda kullanılabileceği ve Bitki Listesindeki durumun yaprak ve genç sürgün kısımları için pozitif (P) olarak devam etmesi yönünde tavsiye kararı alınmıştır".

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Kitler

Absolü alkol [Fluka 32 221]

L-Alanin [Merck 101007]

Anti-beta actin rabbit monoclonal antibody [Baster MO1263]

L-Aspartat [Merck 100129]

Anti-iNOS antibody [ABCAM ab15323]

Albumin (BSA) [Fluka 05479]

Amonyum hidroksit [Sigma 320145]

Bakır kaplı kadmiyum granülleri [Merck 102004]

Bradford [Bio-Rad; 500-0006]

COX-2 Antibody [NOVUS NB100-689SS]

Çinko sülfat.7H₂O [Merck 108883.1000]

Dekstran sülfat sodium tuzu (MW: 36000-50000 Da) [Bio Medicals ICN16011080]

o-Dianizidin dihidroklorür [Sigma D 3252]

Dipotasyum hidrojen fosfat (K₂HPO₄) [Merck105101]

Disodyum hidrojen fosfat (Na₂HPO₄) [Riedel de Haën 4272]

5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoik asid) (DTNB) [Sigma D 8130]

Etilendiamintetraasetik asit (EDTA) [Sigma E5134]

Glisin [Sigma G8898]

Goat Anti-Rabbit IgG H&L (HRP) [ABCAM ab205718]

Glutasyon redüktaz (GR) [Sigma G3664]

Glutasyon (redüklenmiş) (GSH) [Sigma G4251]

Glutasyon (okside) (GSSG) [Sigma G 4376]

Heksadesiltrimetilamonyum bromür (HTAB) [Sigma H9151]

Hidrojen peroksit (H₂O₂) [Riedel de Haën 18312]

Hidroklorik asit (HCl) [Merck 109057]

Ksantin [Fluka 95490]

Ksantin oksidaz [Sigma X1875]
Kemilüminesans Substrat [Thermo Scientific 34075]
1-Kloro-2,4-dinitrobenzen (CDNB) [Aldrich 13863-0]
Laktat dehidrojenaz (LDH) [Sigma 12500]
Laemmlı Örnek Tamponu [Bio-Rad 1610747]
Malat dehidrojenaz (MDH) [Sigma M2634]
 β -Merkaptoetanol [Merck 805740]
Mouse TNF-alpha Platinum ELISA Kit [THERMO-INVITROGEN BMS607/3]
Mouse IL-1beta Platinum ELISA Kit [THERMO-INVITROGEN BMS6002]
Mouse IL-6 Platinum ELISA Kit [THERMO-INVITROGEN BMS603/2]
Mouse IL-10 Platinum ELISA Kit [THERMO-INVITROGEN BMS614/2]
Mouse IFN-gamma Platinum ELISA Kit [THERMO-INVITROGEN BMS606]
N-1-Naftiletildiamin dihidroklorür [Sigma N 9125]
 β -Nikotinamid adenin dinukleotid redüklenmiş, disodium tuzu hidrat ($\text{NADH } 2\text{H}_2\text{O}$) [Sigma 43420]
 β -Nikotinamid adenin dinukleotid 2'-fosfat, redüklenmiş (β -NADPH) tetrasodium tuzu [Sigma N 1630]
Nitroblue tetrazolium klorür (NTB) [Fluka 74032]
NP40 Cell Lysis Buffer [THERMO FNN0021]
Penisilin-Streptomisin 10000 U/mL [WISSENT, 450-201-EL]
PGE2 (Prostaglandin E2) ELISA Kit [ELABSCIENCE E-EL-0034]
Piridoksal fosfat [Fluka 82870]
Potasyum dihidrojen fosfat (KH_2PO_4) [Merck 104871]
Potasyum hidroksit (KOH) [Merck 105022.1000]
Sodyum azid [Merck 106688]
Sodyum dodesil sülfat (SDS) [Fluka 71725]
Sodyum klorür [Merck 106404]
Sodyum nitrit (NaNO_2) [Merck 106544]
Sülfanilamid [Sigma S 9251]
Sülfosalisilik asid [Merck 247006]
1,1,3,3,-Tetraetoksipropan (TEP; Fluka 86570]
Tiyobarbitürik asit (TBA) [Sigma T 5500]

Trikloroasetik asit (TCA) [Merck 100810]
Tris(hidroksimetil)aminometan [Merck 108387]
Yağsız Süt Tozu [Sigma M7409]

3.2. Kullanılan Araç ve Gereçler

37°C'lik Su Banyosu (Memmert)
-80°C Dondurucu (Nuaire)
Buz Makinesi (Eurfrigor)
Buzdolabı (Ariston)
Çalkalayıcı (IKA)
Çalkalamalı İnkübatör (N-Biotek)
Hassas Terazı (AND HM 200)
Homojenizatör
Isı Bloğu (Lab Line)
Jel Görüntüleme Cihazı (Vilber Lourmat, Fusion FX5)
Mikro-plaka Okuyucu (Eon Biotek)
Otomatik Pipetler (Eppendorf)
pH Metre (WTW)
PVDF Membran (Bio-Rad 170-4156)
SDS-PAGE Jeli (Bio-Rad 456-9031)
Şırınga (Set Inject)
Soğutmalı Santrifüj (Gyrozen)
Sonikatör
Spektrofotometre (Shimadzu UV-1208)
Steril 15 mL'lik Santrifüj Tüpü (NEST 601052)
Steril 50 mL'lik Santrifüj Tüpü (NEST 602052)
Steril 96 Kuyucuklu Plaka (NEST 701001)
Turbo Transfer Sistemi (BioRad)
Ultra Saf Su Cihazı (Elga)
Vorteks (Velp Scientifica)

3.3. Etik Kurul Onayı

Bu deneysel çalışma, İstanbul Üniversitesi Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü (DETAE) Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun 26.10.2017 tarihli ve 35980450-050.01.04 sayılı karar yazısı ile Etik Kurul ilkelerine uygun bulunmuştur.

3.4. Bitki Materyali

Bartın ilinden Prof. Dr. Ayşe Can tarafından temin edilen *C. coggia Scop.* bitkisinin yaprakları su ile yıkandıktan sonra ufak parçalara kesildi ve gölgede kurutularak toz edildi. Bitkinin teşhisi İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Botanik Anabilim Dalı Öğretim üyesi Prof. Dr. Şükran Kültür tarafından yapıldı ve bitki İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Herbaryumunda saklanmaktadır (ISTE 93133).

3.5. İnfüzyonun Hazırlanması

Toz edilmiş *C. coggia Scop.* bitkisinin yaprakları üzerine (% 6'lık infüzyonun hazırlanmasında 6 g, % 9'luk infüzyonun hazırlanmasında ise 9 g) 100 ml kaynar su ilave edildi ve oda ısısına gelene kadar bekletildi. Her gün taze hazırlandı.

3.6. Farelerde Kolit Oluşumu

Kolit oluşumunun sağlanması amacıyla % 3 DSS (w/v) solüsyonu kullanıldı.

3.7. Kullanılan Deney Hayvanları ve Oluşturulan Gruplar

Çalışmada, İstanbul Üniversitesi Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü (DETAE)'den sağlanan 8-10 haftalık kolite hassas fare soyu olan C57BL/6 56 adet erkek fare kullanıldı. Çalışma, standart deneysel hayvan çalışmaları etik kurallarına uygun olarak yapıldı. Sıçanların beslenmesinde özel fare yemi kullanıldı. Çalışma boyunca her gün aynı saatte, ağırlık değişimlerinin belirlenmesi amacıyla, farelerin ağırlıkları tartıldı ve içtikleri su/DSS'li su miktarları kaydedildi. İnfüzyon ve mesalamin gavajla verildi.

Rastgele seçilen fareler 7 gruba ayrıldı:

Grup I (Kontrol Grubu; K_{normal}) (n=8): 7 gün boyunca steril musluk suyu verilen ve 8. günde sakrifiye edilen hayvanlar.

Grup II (% 3'lük DSS Verilen Kolit Grubu; K_{DSS}) (n=8): Deneyin ilk 2 günü steril musluk suyu verilip, 3. günden itibaren 5 gün boyunca steril musluk suyu içinde çözündürülmüş % 3 DSS verilen ve 8. günde sakrifiye edilen hayvanlar.

Grup III (Sadece % 6'lık İnfüzyonu Verilen Grup; K_{CCYSI6}) (n=8): 7 gün boyunca günde 1 kez gavajla 10 ml/kg % 6'lık bitki infüzyonu verilen ve 8. günde sakrifiye edilen hayvanlar.

Grup IV (Sadece % 9'luk İnfüzyonu Verilen Grup; K_{CCYSI9}) (n=8): 7 gün boyunca günde 1 kez gavajla 10 ml/kg % 9'luk bitki infüzyonu verilen ve 8. günde sakrifiye edilen hayvanlar.

Grup V (% 3 DSS + % 6'lık İnfüzyonu Verilen Grup; DSS+CCYSI6) (n=8): 7 gün boyunca günde 1 kez gavajla 10 ml/kg % 6'lık infüzyonu, 3. günden itibaren 5 gün boyunca steril musluk suyu içinde çözündürülmüş % 3 DSS verilen ve 8. günde sakrifiye edilen hayvanlar.

Grup VI (% 3 DSS + % 9'luk İnfüzyonu Verilen Grup; DSS+CCYSI9) (n=8): 7 gün boyunca günde 1 kez gavajla 10 ml/kg % 9'luk infüzyonu, 3. günden itibaren 5 gün boyunca steril musluk suyu içinde çözündürülmüş % 3 DSS verilen ve 8. günde sakrifiye edilen hayvanlar.

Grup VII (% 3 DSS + Mesalamin Verilen Grup; DSS+M) (n=8): 7 gün boyunca günde 1 kez gavajla 250 mg/kg, 3. günden itibaren 5 gün boyunca steril musluk suyu içinde çözündürülmüş % 3 DSS verilen ve 8. günde sakrifiye edilen hayvanlar.

Uygulamalar ilgili deney gününde ve aynı saatte yapıldı. Deneyden bir gece önce (12 saat) aç bırakılan fareler verilen son dozdan 24 saat sonra 8. gün saat 9.00'da izofluran inhalasyonu ile anestezi edildiler. Anestezi öncesi farelerin ağırlıkları ölçüldü. Farelerin tümüyle çıkarılan kolon dokularında, distal kolonda anüsün proksimalindeki 1 cm'lik segment ikiye ayrılarak histolojik incelemede kullanılmak üzere fiksatifler içine alındı. Biyokimyasal incelemeler için ise geriye kalan kolon dokusu ELISA yöntemlerinde kullanılmak üzere buz soğukluğunda PBS (pH 7.4) içinde,

spektrofotometrik tayinlerinde kullanılmak üzere ise buz soğukluğunda % 0.9'luk fizyolojik tuzlu su (FTS) içinde deneyin yapılacağı güne kadar -80°C'deki derin dondurucuda saklandı.

3.8. Farelerdeki % Vücut Ağırlık Değişiminin Tespit Edilmesi

Tüm gruptaki farelerin % vücut ağırlığı değişimlerinin tespit edilmesi amacıyla deney süresince her gün aynı saatte farelerin ağırlıkları kaydedildi. Farelerin o günkü vücut ağırlıkları ile deney başlamadan önceki ağırlıkları arasındaki fark alınarak, % değişim günlük olarak hesaplandı. Deney boyunca her gün tüm gruptaki fareler arasında % vücut ağırlık değişimi istatistiksel olarak değerlendirilerek, gruplara göre farelerin % vücut ağırlık değişim grafiği çizildi.

3.9. Farelerin Kolon Uzunluklarının Ölçülmesi

Deneyin son günü anestezi altındaki farelerin orta hat kesitleri yapıldı. Hayvanların kolon dokuları tümüyle (çekumdan anüse kadar) çıkarıldı ve fekal içerik dikkatlice temizlendi. Tüm kolon dokusunun uzunluğu ölçüldü. Tüm farelerin kolon uzunluklarına ait değerler istatistiksel olarak değerlendirilerek, gruplara göre kolon uzunluklarına dair ölçüm grafiği çizildi.

3.10. Hastalık Aktivite İndekslerinin Belirlenmesi

Hastalık Aktivite İndeksi (HAI), her gün vücut ağırlığı, dışkı kıvamı ve rektal kanama skorların belirlenmesi ve üç parametrenin aritmetik ortalamaların alınmasıyla hesaplandı. Her bir parametre 0 (hasarsız) - 4 (şiddetli hasar) arasında skorlandırıldı. Maksimum skor 4 kabul edildi. HAI skorlandırılması Tablo 3-1'de gösterilmiştir.

Tablo 3-1: Hastalık aktivite indeksi skorum sistemi (Cooper ve ark.,1993)

Skor	Ağırlık kaybı (%)	Dışkı kıvamı	Gizli/görünür rektal kanama
0	Yok	Normal	Yok
1	1-5	Normal	++ (Gizli)
2	6-10	Yumuşak	+++ (Gizli)
3	11-15	Diyare	+++ (Gizli)
4	15>	Diyare	Görünür kanama

Hayvanların dışkılarında gizli kanın varlığı, Hemocult Gizli Kan Testi Kiti (Hema-Screen Occult Blood Test, Stanbio Laboratory) kullanılarak saptandı.

3.11. Biyokimyasal Yöntemler

3.11.1. Doku Homojenizasyonu

Alınan kolon dokusu örnekleri soğuk 0.15 M NaCl ve bunu takiben 0.15 M potasyum fosfat tamponu, pH 7.4 ile yıkandıktan sonra ıslaklığı alınarak tartımı yapıldı, % 10'luk homojenizat hazırlandı (0,15 M fosfat tamponu içinde) ve 13 000'de 10 dakika santrifüje edildi. Deneyler yapılmaya kadar -80°C'de derin dondurucuda saklandı.

3.11.2. Plazmanın Elde Edilmesi

EDTA tetrasodyum içeren tüplere alınmış olan kan örnekleri 3000 devirde 10 dakika santrifüje edildi.

3.11.3. Plazmada Aspartat Aminotransferaz (AST) Aktivitesinin Tayini

Kullanılan çözeltiler:

- 97 mM Tris, pH 7,8 (30°C'de); 302 mM L-Aspartik asit: 1,18 g Tris ve 4,02 g L-aspartik asit 80 ml distile suda çözündü, çözeltinin pH'sı 5 M NaOH'in ilave edilmesiyle 7,8'e ayarlandı ve 100 ml'ye distile su ile tamamlandı.
- 6,3 mM piridoksal fosfat'ın 97 mM Tris tamponu (30°C'de pH=7,8)'ndaki çözeltisi
- 11,3 mM Nikotin adenine dinukleotid (NADH)'in redüklenmiş formunun 97 mM Tris tamponun (30°C'de pH=7,8)'daki çözeltisi
- 144 mM α -Ketoglutarik asit çözeltisi
- 882 000 U/L Malat dehidrojenaz/126 000 Laktat dehidrojenaz çözeltisi: 1/1

Deneyin prensibi

International Federation of Clinical Chemistry'ye göre tayin edildi (Bergmeyer, 1980; Bergmeyer ve ark., 1986). Serumda AST enzimi, reaksiyon sonunda meydana gelen oksalasetatın NADH varlığında L-malata dönüşmesi esnasında, NADH'ın NAD⁺'ye okside olması ile absorbansta meydana gelen azalmanın ölçümüne dayanan metoda göre tayin edildi.

Deneyin yapılışı

100 ml 97 mM Tris/aspartat çözeltisi (pH 7,8), 2 ml 6,3 mM piridoksal fosfat, 2 ml 11,3 mM NADH karıştırılarak reaksiyon karışımı hazırlandı (reaksiyon karışımındaki maddelerin son konsantrasyonları: 80 mmol/L Tris, 240 mmol/L L-aspartat, 12 mmol/L 2-oksoglutarat, 0,10 mmol/L piridoksal fosfat, 0,18 mmol/L NADH, 700 U/L Malat dehidrojenaz ve 1000 U/L laktat dehidrojenaz). 200 µl reaksiyon karışımına 20 µl plazma ilave edildi ve karıştırıldı. Karışımın absorbansı 340 nm’de sabit bir değere ulaştığında 20 µl α-ketoglutarat çözeltisi ilave edildi ve absorbanslar 60 saniye’de bir olmak üzere 300 saniye boyunca ölçüldü. Her bir örnek için AST aktiviteleri, bu deneyde NADPH için $6,22 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ olarak belirlenmiş absorpsiyon katsayısını kullanarak ve yapılan seyreltmeler göz önüne alınarak, U/L olarak hesaplandı.

3.11.4. Plazmada Alanin Aminotransferaz (ALT) Aktivitesinin Tayini

Kullanılan çözeltiler:

- 110 mM Tris, pH 7,5 (30°C’de); 330 mM L-Alanin: 1,33 g Tris ve 5,61 g L-alanin 80 ml distile suda çözündü, çözeltinin pH’sı 1 M HCl’in ilave edilmesiyle 7,5’e ayarlandı ve 100 ml’ye distile su ile tamamlandı.
- 6,3 mM Piridoksal fosfat’ın 110 mM Tris tamponun (30°C’de pH=7,5)’daki çözeltisi
- 11,3 mM NADH’ın redüklenmiş formunun 110 mM Tris tamponu (30°C’de pH=7,5)’daki çözeltisi
- 180 mM α-Ketoglutarik asit çözeltisi
- 252 000 U/L Laktat dehidrojenaz çözeltisi

Deneyin prensibi

International Federation of Clinical Chemistry’ye göre tayin edildi (Bergmeyer, 1980; Bergmeyer ve ark., 1986). Serumda ALT enzimi, reaksiyon sonunda meydana gelen piruvatın NADH varlığında laktata dönüşmesi esnasında, NADH’ın NAD⁺’ye okside olması ile absorbansta meydana gelen azalmanın ölçümüne dayanan metoda göre tayin edildi.

Deneyin yapılışı

100 ml 110 mM Tris/aspartat çözeltisi (pH 7,5), 2 ml 6,3 mM piridoksal fosfat, 2 ml 11,3 mM NADH karıştırılarak reaksiyon karışımı hazırlandı (reaksiyon karışımındaki maddelerin son konsantrasyonları: 100 mmol/L Tris, 500 mmol/L L-aspartat, 15 mmol/L 2-oksoglutarat, 0,10 mmol/L piridoksal fosfat, 0,18 mmol/L NADH ve 2000 U/L laktat dehidrojenaz). 200 µl reaksiyon karışımına 20 µl serum ilave edildi ve karıştırıldı. Karışımın absorbanı 340 nm’de sabit bir değere ulaştığında 20 µl α-ketoglutarat çözeltisi ilave edildi ve absorbanlar 60 saniye’de bir olmak üzere 300 saniye boyunca ölçüldü. Her bir örnek için ALT aktiviteleri, bu deneyde NADPH için $6,22 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ olarak belirlenmiş absorpsiyon katsayısını kullanarak ve yapılan seyreltmeler göz önüne alınarak, U/L olarak hesaplandı.

3.11.5. Protein Miktar Tayini

Kullanılan çözeltiler

- **Çalışma Bradford Ayıracı:** Konsantre boya ayıracının dört kez distile su ile seyreltilmesiyle hazırlandı.

Deneyin prensibi

Protein miktar tayinleri 96 kuyucuklu mikrolakalarda mikro-Bradford (Bradford 1976) yöntemi ile belirlendi. Yöntem, Coomassie Brilliant Blue G-250 boyasının proteinlere bağlanması sonucunda oluşturduğu rengin absorbanının 595 nm’de ölçülmesi esasına dayanmaktadır.

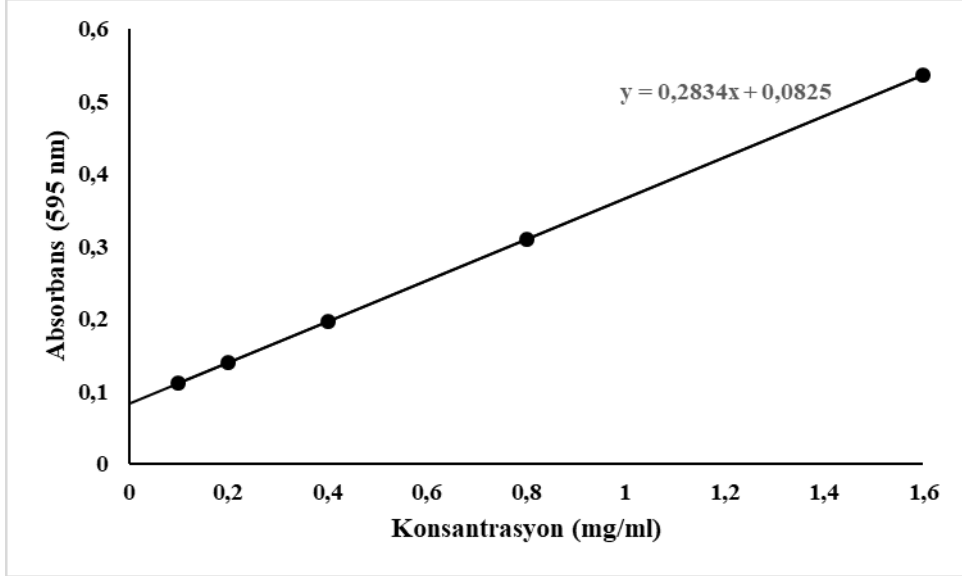
Deneyin yapılışı

Kuyucuklara 5 µl örnek ve 95 µl protein boyası konuldu. Örneğin boyayla reaksiyona girmesi için 10 dk. oda sıcaklığında bekledikten sonra mikrolaka okuyucuda 595 nm’deki absorbanı, ayrıca körüne karşı okundu. Bu absorban değerinin, sığır serum albumini standart eğrisine uygulanmasıyla, protein miktarı mg/ml olarak belirlendi.

Sığır Serum Albumini Standart Eğri Denkleminin Elde Edilmesi

Sığır serum albuminin distile sudaki 1 mg/ml’lik çözeltisi hazırlandı. Daha sonra bu çözeltinin distile su ile seyreltilmesiyle konsantrasyonları 1,6 mg/ml; 0,8 mg/ml; 0,4 mg/ml, 0,2 ve 0,1 mg/ml olan çözeltiler elde edildi. Çözeltilere, ayrı ayrı, mikro-

Bradford deneyi uygulandı. Ölçülen absorbans değerlerine en küçük kareler yönteminin uygulanması ile sığır serum albumini standart eğrisi çizildi ve regresyon denklemi elde edildi (Şekil 3-1).



Şekil 3-1: Sığır serum albumini standart eğrisi ve regresyon denklemi.

3.11.6. Kolon Dokusunda Lipid Peroksidasyonu Analizi

MDA tayininde kullanılan çözeltiler:

- **TCA/TBA Ayracı**

6 g Trikloroasetik asit ve 0,15 g tiyobarbitürik asidin 40 ml 0,25 N HCl'de (1 N HCl'in 4 kez seyreltilmesiyle hazırlandı) hafif ısıtılarak (60 - 70°C'de) çözünmesi ile hazırlandı.

- **1 mM Stok 1,1,3,3,-Tetraetoksipropan (TEP) Solüsyonu**

24 µl TEP, 1 ml 1N HCl ve 90 ml distile su balon jojeye alındı, 100 ml işaretine kadar su ile tamamlandı. Kapağı kapatıldı ve 50°C'lik su banyosunda 60 dakika ısıtılıp, soğutuldu. Taze hazırlandı.

- **32 µM TEP Çalışma Solüsyonu**

32 µl 1 mM TEP'e 0,968 ml distile su ilave edildi.

Deneyin prensibi

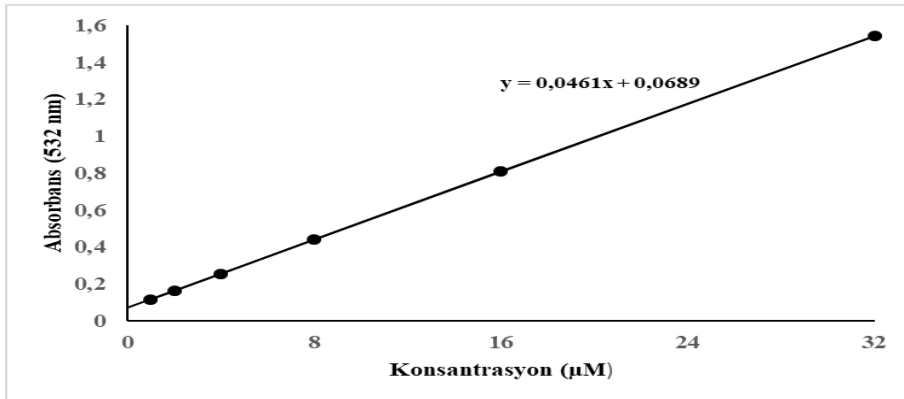
Tiyobarbiturik asitle reaksiyona giren maddelerin (TBARS) ölçümü Buege ve Aust'un (1978) geliştirdiği metoda göre yapıldı. Metod, lipid peroksidasyonunun aldehit ürünlerinden biri olan MDA ve TBA arasındaki reaksiyon sonucu oluşan pembe renkli kompleksin 532 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçülmesi esasına dayanmaktadır.

Deneyin yapılışı

62,5 µl kolon homojenizatına 125 µl TCA - TBA ayırıcı (% 15 w/v TCA ve % 0,375 TBA'n 0.25 N HCl'deki çözeltisi) ilave edildi. Reaksiyon karışımı vortekste karıştırıldı ve 100°C'de 10 dakika kaynar su banyosunda bekletildi. Soğutulduktan sonra 6 000 rpm'de 10 dakika santrifüje edildi. Meydana gelen pembe rengin absorbansı 532 nm'de ölçülerek MDA miktarı 1,1,3,3,-tetraetoksipropen (TEP) kullanılarak hazırlanan standart eğriden veya absorplama kapasitesi ($\epsilon = 1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) değeri kullanılarak lipid peroksitlerin miktarı hesaplandı ve nmol TBARS/g doku olarak ifade edildi.

MDA Standart Eğri Denkleminin Elde Edilmesi

Çalışma standardı olarak 32 µM TEP (MDA) hazırlandı. Bu çözeltinin distile su ile seyreltilmesiyle konsantrasyonları 16 µM, 8 µM, 4 µM, 2 µM ve 1 µM olan çözeltiler elde edildi. Çözeltilere TBA metodu uygulandıktan sonra meydana gelen pembe rengin absorbansı 532 nm'de ölçüldü. Deney beş kez tekrarlandı ve bulunan değerlerden, en küçük kareler yönteminin uygulanmasıyla MDA standart eğrisi çizildi ve regresyon denklemi elde edildi (Şekil 3-2).



Şekil 3-2: MDA standart eğrisi ve regresyon denklemi.

3.11.7. Kolon Dokusunda Glutasyon (GSH) Tayini

Kullanılan çözeltiler

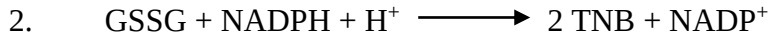
- % 5'lik sülfosalisilik asid
- 6,3 mM EDTA içeren 143 mM sodyum fosfat tamponu (pH 7.5)
- 0,3 mM NADPH
- 1 mM DTNB
- 50 U/ml glutasyon redüktaz

Deneyin prensibi

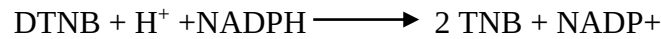
İndirgenmiş (GSH) glutasyonun konsantrasyonu Tietz'in Anderson (1985) tarafından modifiye edilmiş DTNB-GSSG redüktaz geri dönüşümlü (recycling) metoduna göre yapıldı. Bu metod redüklenmiş glutasyonun ortamdaki 5,5'-ditiobis (2-nitrobenzoik asid)'i sürekli indirgemesi esasına dayanır. Meydana gelen okside glutasyon (GSSG) ise GR ve NADPH tarafından tekrar redüklenir.



GR



GR



GSSG/GSH

Deneyin yapılışı

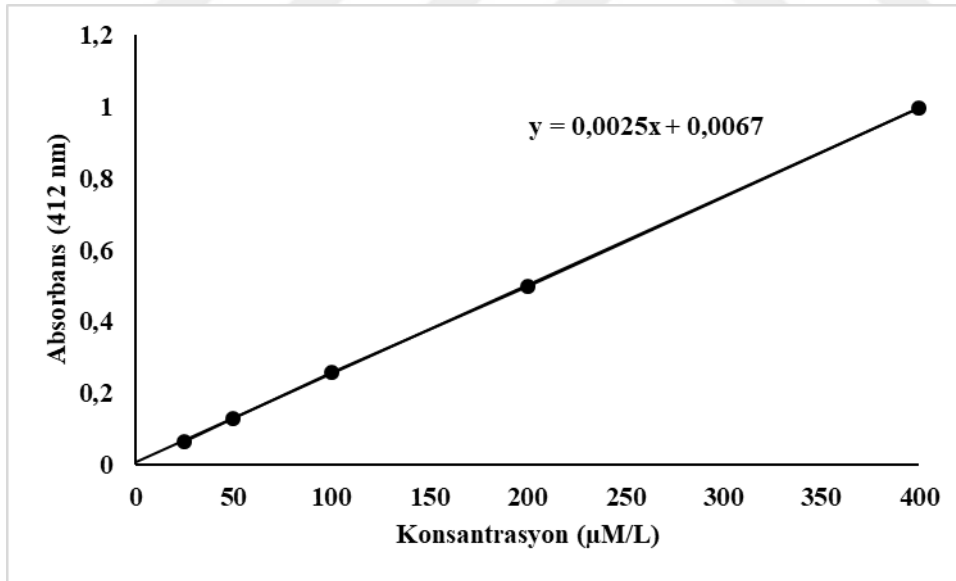
Kolon dokusundaki glutasyonun ölçülmesi için önce dokunun % 5'lik 5-sülfosalisilik asitteki homojenizatu hazırlanarak (10 vol/g doku) proteinsizleştirildi. Doku homojenizatu 13 000 devirde 5 dakika santrifüje edildi. Ayrılan supernatanttan 100 µl % 5'lik 5-sülfosalisilik asid içeren Eppendorf tüpüne aktarıldı.

Kolon dokusunda redüklenmiş glutasyonun (GSH) ölçülmesi için 700 µl 0,3 mM/ml (son konsantrasyonu 0,21 mM) NADPH'ın 6,3 mM Na₄EDTA içeren 143 mM

sodyum fosfat tamponundaki çözeltisi (pH 7,5), 100 µl DTNB (son konsantrasyonu 0,6 mM), 175 µl su ve 25 µl kolon homojenizatu karıştırıldı ve 30°C’de inkübe edildi. Reaksiyon 10 µl 50 U glutatyon redüktaz (son konsantrasyon 0.5 U)’ın 900 µl reaksiyon karışımına ilavesi ile başlatıldı. Absorbans değışikliğı 420 nm’de her 15 saniyede olmak üzere 90 saniye ölçüldü. GSH’ın seri sulandırılmaları ile standart eğri çizildi ve örnek konsantrasyonları grafikten elde edilen denklemden hesaplandı. Elde edilen veriler doku örnekleri için nmol/g doku cinsinden verildi.

Redüklenmiş Glutatyon (GSH) Standart Eğri Denkleminin Elde Edilmesi

Glutatyon Stok Standardı olarak 1 mmol/L lik GSH çözeltisi hazırlandı. Bu çözeltiden %5’lik sülfosalisilik asid ile seyreltilmesiyle konsantrasyonları 25 µM, 50 µM, 100 µM, 200 µM ve 400 µM olan çözeltiler elde edildi. Çözeltilere DTNB-GSSG redüktaz geri dönüşümlü (recycling) metodu uygulandıktan sonra meydana gelen sarı renkli 5-tiyo-2-nitrobenzoik asid’in (TNB) absorbansı spektrofotometrik olarak 412 nm’de ölçüldü. Deney beş kez tekrarlandı ve bulunan değerlerden, en küçük kareler yönteminin uygulanmasıyla GSH standart eğrisi çizildi ve regresyon denklemi elde edildi (Şekil 3-3).



Şekil 3-3: GSH standart eğrisi ve regresyon denklemi.

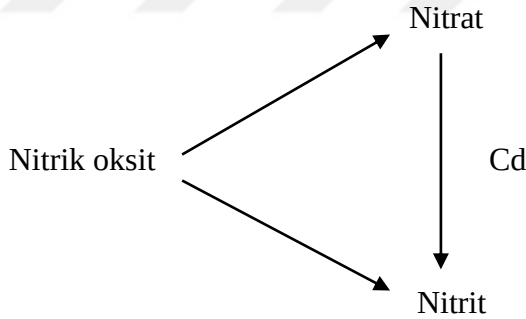
3.11.8. Kolon Dokusunda Nitrik Oksit (NO) Miktar Tayini

Kullanılan çözeltiler:

- Bakır kaplı kadmiyum granülleri 2,5-3 g ağırlığında tartıldı ve kullanmadan önce distile su (2 x 1 ml), 0,1 N HCl (2 x 1ml) ve 0,1 M NH₄OH, pH 9,6 (2 x 1 ml) ile yıkandı.
- % 30 ZnSO₄
- Renklendirici: 1mM sülfanilamid (3 N HCl içerisinde) ve 0,1 mM N-1-naftiletilendiamin dihidroklorür çözeltileri hazırlandı.

Deneyin prensibi

Kolon dokusunda NO ölçümü bu molekülün yarı ömrünün çok kısa olması nedeni ile zor olduğundan NO düzeyi göstergesi olan nitrit (NO₂⁻) ve nitrat düzeylerinin saptanmasıyla hesaplanmaktadır. Bu amaçla Fiddler (1977) tarafından modifiye edilmiş Griess metodu (Green ve ark., 1982) kullanıldı. Bu metod sulu ortamda NO'nin hızlı bir şekilde nitrat ve nitrite dönüşmesi esasına dayanır. Oluşan nitrat ise kadmiyum tarafından nitrite dönüşür ve Griess ayırıcı kullanılarak nitrit miktarı tayin edilir.



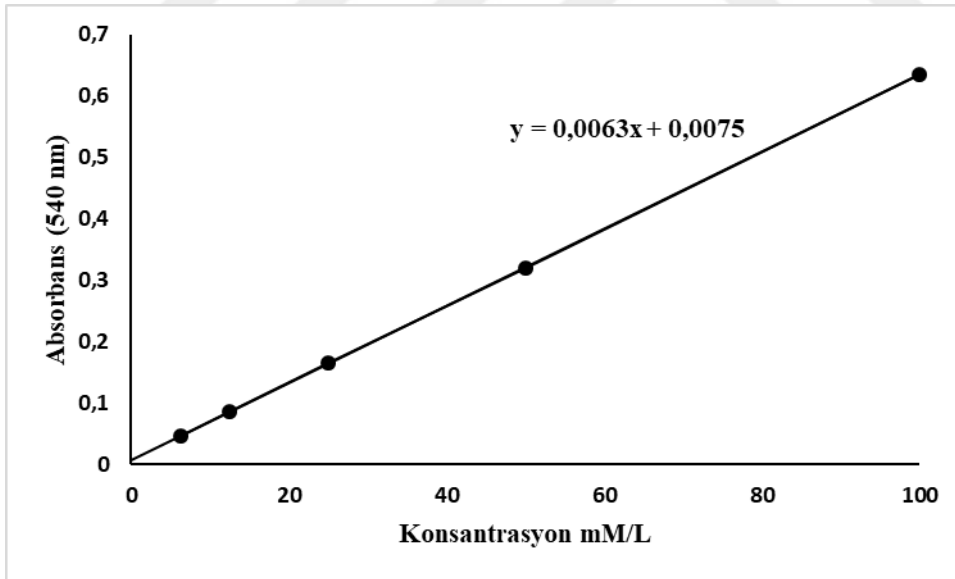
Deneyin yapılışı

Bakır kaplı kadmiyum granülleri, proteinsizleştirilmiş numune supernatantı ile inkübasyona bırakılarak nitratın redüksiyonu sağlandı. Kullanmadan önce bakır kaplı kadmiyum granülleri su (2x1 ml), 0,1 M HCl (2 x 1 ml) ve 0,1 M amonyum hidroksit (2 x 1 ml), pH 9,6 ile yıkandı. Deproteinizasyon işlemi için 250 µl plazma 950 µl'ye distile su ile tamamlandı ve 50 ml % 30 ZnSO₄ eklendi, vorteks karıştırıcıda karıştırıldı, oda temperaturünde 15 dakika inkübe edildi ve 3000-4000 rpm'de 5 dakika santrifüje edildi. Supernatant, 0,5 g iki adet bakır kaplı kadmiyum granülü içeren Eppendorf tüplere aktarıldı ve bir gece oda temperaturünde sürekli çalkalanarak inkübe edildi. Numuneler

temiz Eppendorf tüplere aktarılarak tekrar santrifüje edildi ve supernatantta NO₂ tayin edildi. 500 µl supernatanta 500 µl 1 mM sulfanilamidin 3 N HCl'deki çözeltisi ve 500 µl 0,1 mM N-(1-naftil) etilendiamin dihidroklorür'ün sudaki çözeltisi ilave edildi. Oluşan nitrit, sulfanilamid ve N-naftiletildiamin ile reaksiyona girmesi sonucunda oluşan pembe rengin 540 nm dalga boyunda okunması ile belirlendi. Sodyum nitratin seri sulandırılmaları ile standart eğri çizildi ve örnek konsantrasyonları grafikten elde edilen denklemden hesaplandı. Elde edilen veriler doku örnekleri için nmol/g doku cinsinden verildi.

Sodyum nitrit (NaNO₂) Standart Eğri Denkleminin Elde Edilmesi

NaNO₂'nin distile sudaki 1 mM'lık çözeltisi hazırlandı. Daha sonra bu çözeltinin distile su ile seyreltilmesiyle konsantrasyonları 6,25, 12,5, 25, 50 ve 100 µM olan çözeltiler elde edildi. Çözeltilere, ayrı ayrı, Griess metodu uygulandıktan sonra meydana gelen pembe rengin absorbansı 540 nm'de ölçüldü. Deney beş kez tekrarlandı ve bulunan değerlerden, en küçük kareler yönteminin uygulanmasıyla NaNO₂ standart eğrisi çizildi ve regresyon denklemi elde edildi (Şekil 3-4).



Şekil 3-4: NaNO₂ standart eğrisi ve regresyon denklemi.

3.11.9. Kolon Dokusunda Süperoksit Dismutaz (SOD) Aktivitesi Tayini

Kullanılan çözeltiler:

- 30 mM EDTA
- 50 mM KOH'de çözünmüş 30 mM ksantin
- 3 mM NBT
- 57,5 mM KH₂PO₄ - KOH, pH 7,4
- 1,5 U Ksantin oksidaz (0,05 U/ml)

Deneyin prensibi

Kolon dokusunda süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesi Aruoma ve arkadaşlarının (1989) geliştirdiği metoda göre tayin edildi. Deney süperoksitin nitroblue tetrazolium'u (NBT) indirgemesi esasına dayanır. Süperoksit radikalleri ortamdaki NBT'yi indirgeyerek renkli formazonları oluşturur. Bu kompleks 560 nm'de maksimum absorbanı verir. Enzimin bulunmadığı veya aktivitenin düşük olduğu ortamda bu indirgeme meydana gelir ve mavi-mor renk oluşur.

Deneyin yapılışı

3 ml'lik reaksiyon ortamında 50 mM KH₂PO₄ – KOH tamponu (pH 7,4), 1 mM EDTA, 0,1 mM ksantin, 0,1 mM NBT ve 0,05 U ksantin oksidaz vardır. 100 µl kolon homojenizatı, 100 µl 30mM EDTA (son konsantrasyon 1 mM), 10 µl 50 mM KOH'de çözünmüş 30 mM ksantin (son konsantrasyon 0,1 mM), 100 µl 3 mM NBT (son konsantrasyon 0,1 mM) ve 2,59 ml 57,5 mM KH₂PO₄ - KOH, pH 7,4 (son konsantrasyon 50 mM) karıştırıldı. 100 µl 1,5 U ksantin oksidaz (son konsantrasyon 0,05 U/ml) ilavesi ile reaksiyon başlatıldı. 5 dakika sonra absorbanlar 560 nm'de köre karşı okundu. NBT redüksiyonunu % 50 oranında inhibe eden enzim aktivitesi bir SOD ünitesi kabul edildi.

3.11.10. Kolon Dokusunda Katalaz (CAT) Aktivitesinin Tayini

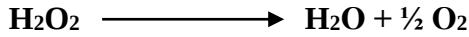
Kullanılan çözeltiler:

- 50 mM fosfat tamponu (pH 7,0)
- 20 mM H₂O₂

Deneyin prensibi

H₂O₂'in katalaz tarafından yıkım hızı, H₂O₂'in 240 nm dalga boyunda ışığı absorbe etmesinden yararlanılarak Aebi (1974) yöntemi ile spektrofotometrik olarak ölçüldü.

Katalaz



Deneyin yapılışı

0,1 ml kolon homojenizatı, 1,9 ml 50 mM fosfat tamponuna (pH 7.0) ilave edildi. Reaksiyon 1 ml 20 mM H₂O₂'in ilavesi ile başlatıldı, katalaz aktivitesi absorbans azalmasının 240 nm'de okunmasıyla, H₂O₂ için 43,6 M⁻¹cm⁻¹ olarak belirlenmiş katsayısı kullanarak ve yapılan seyreltmeler göz önüne alınarak hesaplandı ve U/mg doku proteini şeklinde belirtildi. 1 ünite CAT, dakikada 1 µmol H₂O₂'in yıkılmasını kataliz eden enzim miktarıdır.

3.11.11. Kolon Dokusunda Glutasyon Redüktaz (GR) Aktivitesinin Tayini

Kullanılan çözeltiler:

- 1,035 mM Na₂EDTA.2H₂O içeren 51,6 mM Tris-HCl tamponu (pH 8,0)
- 20 mM okside glutasyonun (G-S-S-G)
- 2 mM NADPH

Deneyin prensibi

Glutasyonun oksitlenmiş formu (GSSG) glutasyon redüktaz enzimi ile GSH'a indirgenir ve kofaktör olarak NADPH kullanılır. GR aktivitesi, NADPH'ın NADP'ye yükseltgenmesi sırasındaki absorbans farkı 340 nm'de Carlberg ve Mannervik (1985)'in bildirdiği metoda göre spektrofotometrik olarak ölçülerek belirlendi.

Deneyin yapılışı

1 ml'lik reaksiyon karışımında 1 mM EDTA içeren 50 mM Tris-HCl tamponu (pH 8,0), 0,1 mM NADPH, 1 mM yükseltgenmiş glutasyon vardır. 870 µl 1,035 mM Na₂EDTA.2H₂O içeren 51,6 mM Tris-HCl tamponu (pH 8,0), 50 µl GSSG ve 50 µl

NADPH karıştırıldı ve karışım 25°C'de absoransı sabit bir değere ulaşana kadar inkübe edildi. 30 µl doku homojenizati ilave edilerek reaksiyon başlatıldı. Her bir örnek için GR aktivitesi, bu deneyde NADPH için $6,22 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ olarak belirlenmiş absorpsiyon katsayısını kullanarak ve yapılan seyreltmeler göz önüne alınarak hesaplandı ve U/mg doku proteini şeklinde belirtildi. 1 U GR, dakikada 1 nmol NADPH'ın yükseltgenmesini kataliz eden enzim miktarıdır.

3.11.12. Kolon Dokusunda Glutasyon Peroksidaz (GPx) Aktivitesinin Tayini

Kullanılan çözeltiler:

- 50 mM Potasyum fosfat tamponu (pH 7.0)
- 20 mM EDTA.2H₂O'nın fosfat tamponundaki çözeltisi
- 20 mM Sodyum azid (NaN₃)'in fosfat tamponundaki çözeltisi
- 20 mM GSH'un fosfat tamponundaki çözeltisi
- 20 U/ml GR
- 2 mM NADPH
- 20 mM H₂O₂

Deneyin prensibi

Glutasyon peroksidaz aktivitesi Lawrence ve Burk (1976)'un bildirdiği metoda göre spektrofotometrik olarak ölçüldü. GPx, hidrojen peroksit varlığında indirgenmiş glutatyonun (GSH) yükseltgenmiş glutatyon (GSSG) yükseltgenmesini katalize eder.

Deneyin yapılışı

1 ml'lik reaksiyon karışımında 50 mM fosfat tamponu (pH 7,0), 1 mM EDTA, 1 mM NaN₃ (sodyum azit), 1 mM indirgenmiş glutatyon, 1 U glutatyon redüktaz, 0,2 mM NADPH ve substrat olarak 2 mM H₂O₂ vardır. 100 µl doku homojenizati, 500 µl 50 mM potasyum fosfat tamponu (pH 7,0), 50 µl 20 mM EDTA (son konsantrasyon 1 mM), 50 µl 20 mM GSH, 50 µL 20 mM NaN₃ ve 50 µl 20 U GR karıştırıldı ve 10 dakika 25°C'de inkübe edildi. 100 µl 2 mM NADPH ilave edildi ve karışımın absoransı sabit değere ulaştığında 100 µl 20 mM H₂O₂ ilave edilerek reaksiyon başlatıldı. GPx aktivitesi (kolon homojenizati), NADPH'ın NADP⁺'ya yükseltgenmesi sırasındaki absorans azalmasının 340 nm'de okunmasıyla, NADPH için $6,22 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$

1cm^{-1} olarak belirlenmiş absorpsiyon katsayısını kullanarak ve yapılan seyreltmeler göz önüne alınarak hesaplandı ve U/mg doku proteini şeklinde belirtildi. 1 U GSH-Px, dakikada 1 nmol NADPH'ın yükseltgenmesini kataliz eden enzim miktarıdır.

3.11.13. Kolon Dokusunda Glutasyon-S-Transferaz (GST) Aktivitesinin Tayini

Kullanılan çözeltiler:

- 1,075 mM EDTA içeren 107,5 mM potasyum fosfat tamponu (pH 6.5)
- 75 mM GSH
- 30 mM 1-kloro-2,4-dinitrobenzen (CDNB)
- % 95 Etanol

Deneyin prensibi

GST aktivitesi substrat olarak kullanılan 1-kloro-2,4-dinitrobenzen'in glutasyonla oluşturduğu konjugatın absorbanasının ölçülmesi esasına dayanan Habig ve Jacoby (1981)'nin bildirdiği metoda göre spektrofotometrik olarak ölçüldü.

Deneyin yapılışı

3 ml'lik reaksiyon karışımında 1 mM EDTA içeren 100 mM potasyum fosfat tamponu (pH 6.5), 2,5 mM redükte glutasyon ve 1 mM substrat (1-kloro-2,4-dinitrobenzen) vardır. 2,70 ml 1,075 mM EDTA içeren 107,5 mM potasyum fosfat tamponu (pH 6.5), 100 μl 75 mM GSH ve 100 μl 30 mM CDNB ile karıştırıldı. 100 μl kolon homojenizatın ilave edilmesi ile enzim aktivitesi, absorbansta meydana gelen artışın 340 nm'de okunmasıyla, CDNB için $9,610^3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ olarak belirlenmiş katsayısı kullanarak ve yapılan seyreltmeler göz önüne alınarak hesaplandı ve U/mg doku proteini şeklinde belirtildi. 1 U GST, dakikada 1 nmol glutasyon-2,4-dinitrobenzen oluşumunu kataliz eden enzim miktarı olarak ifade edildi.

3.11.14. Kolon Dokusunda Miyeloperoksidaz (MPO) Aktivitesinin Tayini

Kullanılan çözeltiler:

- % 0,5 heksadesiltrimetilamonyum bromür (HTAB) içeren 50 mM potasyum fosfat tamponu (pH 6,0)

- 167 µg/ml o-dianizidin HCl ve % 0.0005 H₂O₂ içeren 50 mM potasyum fosfat tamponu (pH 6,0)

Deneyin prensibi

H₂O₂'in MPO etkisiyle parçalanmasından oluşan oksijen radikalın bir hidrojen vericisi olan o-dianisidin ile reaksiyona girmesi sonucunda meydana gelen renkli maddenin absorbansının ölçümüne dayanan Hillegass ve ark., (1990)'ın bildirdiği metoda göre yapıldı.

Deneyin yapılışı

50 mg kolon dokusu tartılarak, 1,5 ml 50 mM fosfat tamponunda (pH 6,0) homojenize edildi. Homojenizat eppendorf tüplerine alınarak 10 000 rpm'de +4°C'de, 15 dakika santrifüje edildi. Supernatant atıldı ve pelletin üzerine 1,5 ml % 0.5 heksadesiltrimetilamonyum bromür (HTAB) içeren 50 mM potasyum fosfat tamponu (pH 6,0) ilave edildi. Vorteksle 30 saniye karıştırıldı, 20 saniye sonikasyon yapıldıktan sonra -80°C'de donduruldu ve çözüldü (bu işlem 2 kez tekrarlandı). Son çözülme işleminden sonra tüpler 10 000 rpm'de +4°C'de 15 dakika santrifüje edildi. Supernatant ile MPO aktivite tayini yapıldı. 2,5 ml'lik reaksiyon karışımında 16,7 mg/ml o-dianisidin ve 1 ml % 0.05 H₂O₂ içeren 50 mM potasyum fosfat tamponuna (pH 6,0) 0,5 ml kolon homojenizatın ilave edilmesi ile enzim aktivitesi, absorbansta meydana gelen artışın 460 nm'de okunmasıyla, peroksit için $1,13 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ olarak belirlenmiş absorpsiyon katsayısı kullanılarak ve yapılan seyreltmeler göz önüne alınarak hesaplandı ve U/g doku şeklinde belirtildi. 1 U MPO, dakikada 1 µmol H₂O₂ parçalanmasını kataliz eden enzim miktarıdır.

3.12. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

3.12.1. TNF-α, IL-1, IL-6, IL-10 ve INF-γ Miktar Tayini

Kullanılan çözeltiler

- Yıkama tamponu (1x): 50 ml konsantre yıkama tamponuna (20x) 950 ml distile suyun ilave edilmesiyle hazırlandı.
- Deney tamponu (1x): 5 ml deney konsantre tamponuna (20x) 95 ml distile suyun ilave edilmesiyle hazırlandı.

- Biotin-Konjugat: Konsantre Biotin-Konjugat çözeltinin 100 kez seyreltilmesiyle (60 µl Biotin-Konjugatına 5,94 ml 1x deney tamponunun ilave edilmesiyle) hazırlandı.
- Streptavidin-HRP: Konsantre Streptavidin-HRP çözeltinin 100 kez seyreltilmesiyle (120 µl Streptavidin-HRP'e 11,88 ml 1x deney tamponunun ilave edilmesiyle) hazırlandı.
- TMB substrat çözeltisi (tetrametil-benzidin)
- Durdurma çözeltisi (1 M Fosforik asit)
- Numune dilüsyon çözeltisi

Deneyin prensibi

Bu yöntemde, TNF- α , IL-1, IL-6, IL-10, INF- γ , her bir sitokine karşı oluşturulmuş spesifik antikorla kaplanmış mikrolaka kuyuculara uygulanan örnek veya standart içerisindeki sitokin bu antikorlara bağlanır. Bundan sonra ilave edilen biotin ile konjuge sitokine karşı spesifik antikor birinci antikor tarafından yakalanan sitokine bağlanır, böylece ölçümü yapılması istenen sitokinler, iki antikor ile bağlanmış olur. İlk inkübasyon sonrasında bağlanmamış, biotin ile konjuge sitokine karşı spesifik antikor yıkama işlemi ile uzaklaştırıldıktan sonra Streptavidin bağlı HRP (Horse Radish Peroxidase) enzimi ilave edilir ve ortamdaki ikinci antikora (biotin ile konjuge sitokine karşı spesifik antikor) bağlanır. İkinci inkübasyon sonrasında bağlanmamış Streptavidin-HRP enzimi yıkama işlemi ile ortamdan uzaklaştırılır, kuyucuklara substrat ilave edilerek enzimatik reaksiyon sonucunda sitokin miktarı ile orantılı olarak meydana gelen ürünün absorbansı, asit ilavesiyle reaksiyonun durdurulmasından sonra, 450 nm'de mikrolaka okuyucuda ölçülür.

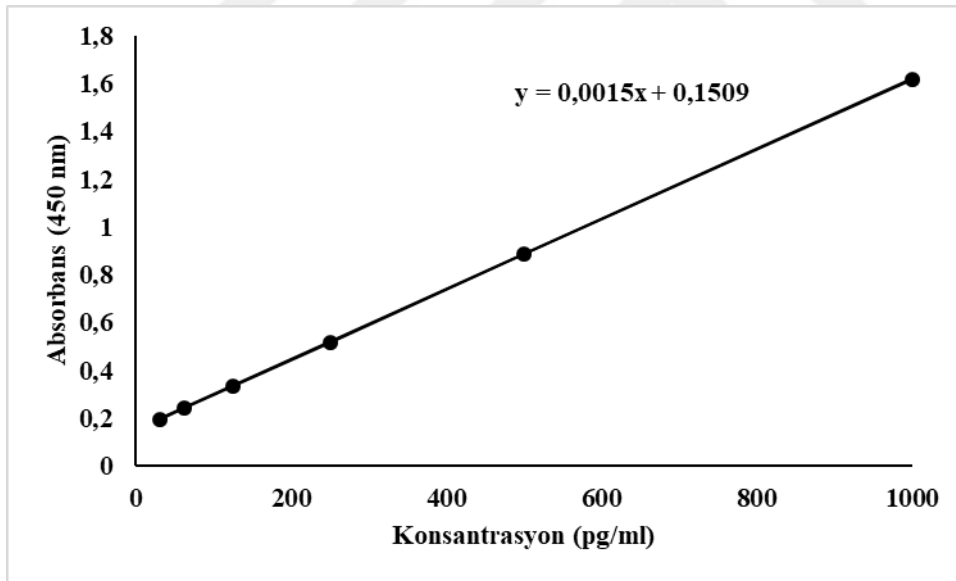
Deneyin yapılışı

Standart çözeltilerin uygulanacağı kuyucuklara 100 µl standart, numunelerin uygulanacağı kuyucuklara 50 µl numune çözeltisi ve 50 µl numune, boş kontrole ise 100 µl numune çözeltisi eklendi. Tüm kuyucuklara 50 µl biotin ile konjuge ilgili sitokine karşı spesifik antikor (biyotinlenmiş anti-TNF- α , anti-IL-1 β , anti-IL-6, anti-IL-10 ve anti-INF- γ) ilave edildikten sonra mikrolağın üstü kapatılarak 2 saat oda ısısında bekletildi. Bu sürenin sonunda kuyucuklar boşaltıldı ve herbirine 300 µl yıkama

tamponu ilave edilerek 4 kez yıkama yapıldı. Tüm kuyucuklara 100 µl Streptavidin bağlı HRP enzimi ilave edildikten sonra mikrolakanın üstü kapatılarak 1 saat oda ısısında (25°C) mikrolaka çalkalayıcının üzerinde inkübe edildi. Bu sürenin sonunda kuyucuklar boşaltıldı ve herbirine 300 µl yıkama tamponu ilave edilerek 4 kez yıkama yapıldı. Her kuyucuğa 100 µl TMB substrat solüsyonu eklendi ve oda ısısında 10-30 dakika karanlıkta inkübe edildi. Herbir kuyucuğa 100 µl durdurma solüsyonu eklendi ve meydana gelen sarı rengin absorbansı 450 nm’de okundu.

TNF- α standart eğrinin ve standart eğri denkleminin elde edilmesi

TNF- α ’nın seyreltme çözeltisindeki 2000 pg/ml’lik çözeltisi hazırlandı. Daha sonra bu çözeltinin seyreltilmesiyle konsantrasyonları 1000 pg/ml; 500 pg/ml; 250 pg/ml, 125 pg/ml, 62,5 pg/ml ve 31,3 pg/ml olan çözelti elde edildi. Çözeltilere, ayrı ayrı, test protokolü uygulandı. Ölçülen absorbans değerlerine en küçük kareler yönteminin uygulanması ile TNF- α standart eğrisi çizildi ve regresyon denklemi elde edildi (Şekil 3-5).

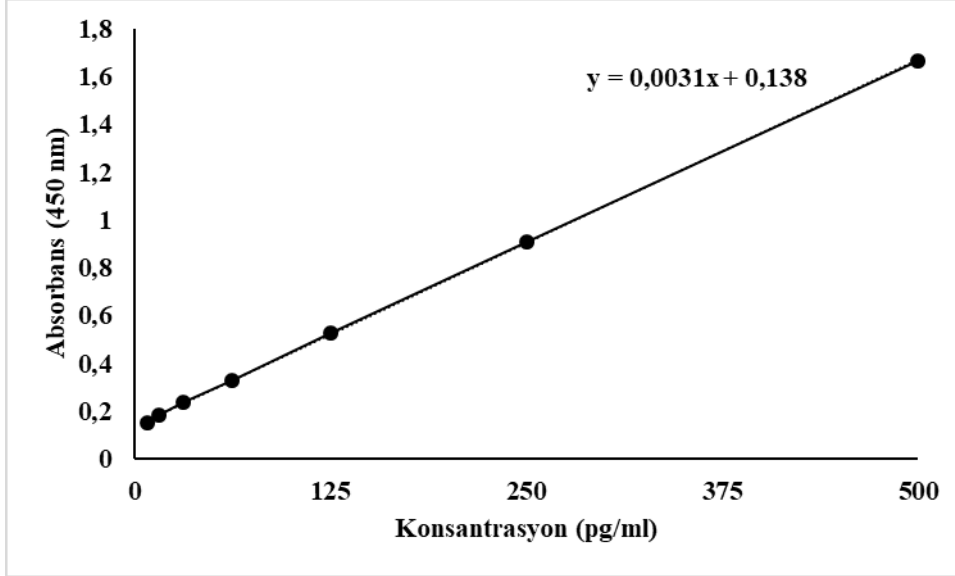


Şekil 3-5. TNF- α standart eğrisi ve regresyon denklemi

IL- β standart eğrinin ve standart eğri denkleminin elde edilmesi

IL-1 β ’nın distile sudaki 1000 pg/ml’lik çözeltisi hazırlandı. Daha sonra bu çözeltinin seyreltilmesiyle konsantrasyonları 500 pg/ml; 250 pg/ml, 125 pg/ml, 62,5 pg/ml, 31,3 pg/ml, 15,6 pg/ml ve 7,8 pg/ml olan çözelti elde edildi. Çözeltilere, ayrı

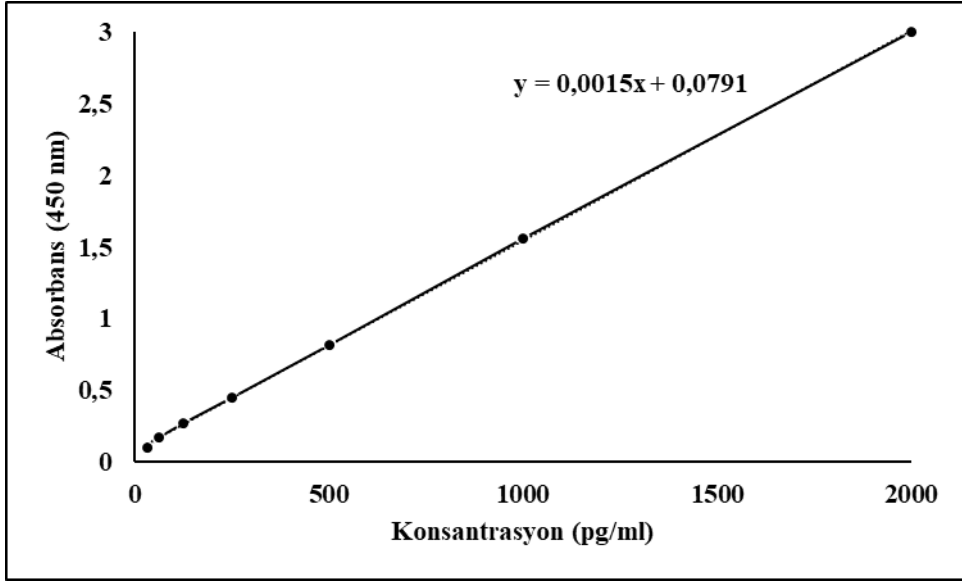
ayrı, test protokolü uygulandı. Ölçülen absorbens değerlerine en küçük kareler yönteminin uygulanması ile IL-1 β 'nın standart eğrisi çizildi ve regresyon denklemi elde edildi (Şekil 3-6).



Şekil 3-6: IL-1 β standart eğrisi ve regresyon denklemi

IL-6 standart eğrinin ve standart eğri denkleminin elde edilmesi

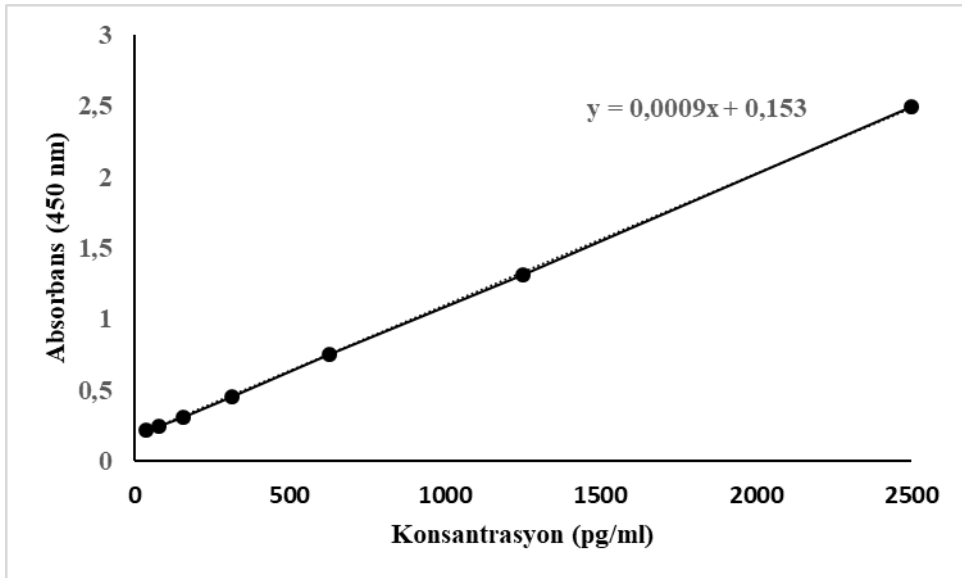
IL-1 β 'nın distile sudaki 4000 pg/ml'lik çözeltisi hazırlandı. Daha sonra bu çözeltinin seyreltilmesiyle konsantrasyonları 2000 pg/ml; 1000 pg/ml, 500 pg/ml, 250 pg/ml, 125 pg/ml, 62,5 pg/ml ve 31,3 pg/ml olan çözeltiler elde edildi. Çözeltilere, ayrı ayrı, test protokolü uygulandı. Ölçülen absorbens değerlerine en küçük kareler yönteminin uygulanması ile IL-6'nın standart eğrisi çizildi ve regresyon denklemi elde edildi (Şekil 3-7).



Şekil 3-7: IL-6 standart eğrisi ve regresyon denklemi

IL-10 standart eğrinin ve standart eğri denkleminin elde edilmesi

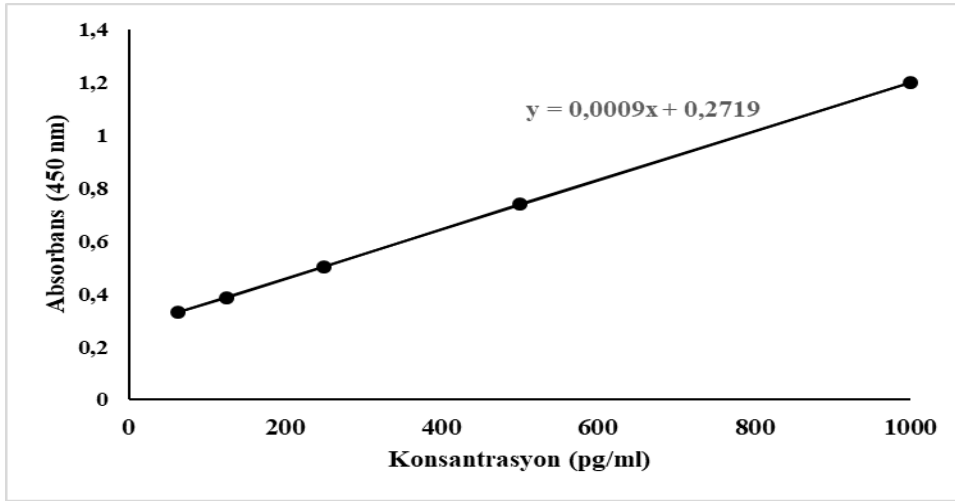
IL-1 β 'nın distile sudaki 5000 pg/ml'lik çözeltisi hazırlandı. Daha sonra bu çözeltinin seyreltilmesiyle konsantrasyonları 2500 pg/ml; 1250 pg/ml, 625 pg/ml, 313 pg/ml, 156 pg/ml, 78 pg/ml ve 39 pg/ml olan çözeltiler elde edildi. Çözeltilere, ayrı ayrı, test protokolü uygulandı. Ölçülen absorbans değerlerine en küçük kareler yönteminin uygulanması ile IL-10'nun standart eğrisi çizildi ve regresyon denklemi elde edildi (Şekil 3-8).



Şekil 3-8: IL-10 standart eğrisi ve regresyon denklemi

INF- γ standart eğrinin ve standart eğri denkleminin elde edilmesi

INF- γ 'nın distile sudaki 2000 pg/ml'lik çözeltisi hazırlandı. Daha sonra bu çözeltinin seyreltilmesiyle konsantrasyonları 1000 pg/ml; 500 pg/ml, 250 pg/ml, 125 pg/ml, 62,5 pg/ml, 31,3 pg/ml ve 15,6 pg/ml olan çözeltiler elde edildi. Çözeltilere, ayrı ayrı, test protokolü uygulandı. Ölçülen absorbans değerlerine en küçük kareler yönteminin uygulanması ile INF- γ 'nın standart eğrisi çizildi ve regresyon denklemi elde edildi (Şekil 3-9).



Şekil 3-9: INF- γ standart eğrisi ve regresyon denklemi

3.12.2. Prostaglandin Miktar Tayini

Kullanılan çözeltiler

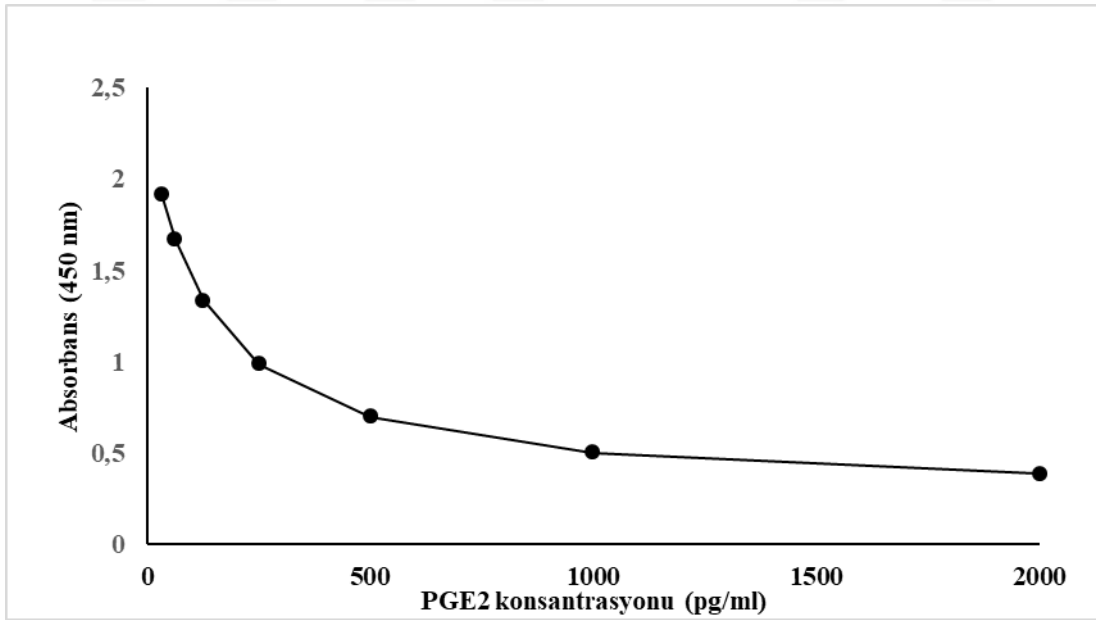
- Yıkama tamponu (1x): 30 ml konsantre yıkama çözeltisine (25x) 750 ml distile suyun ilave edilmesiyle hazırlandı.
- Biotinlenmiş ölçüm antikor çalışma çözeltisi (1x): Konsantre biyotinlenmiş ölçüm antikor çözeltinin çözücüsü ile 100 kez seyreltilmesiyle hazırlandı.
- HRP konjugatı çalışma çözeltisi (1x): Konsantre HRP konjugatı çözeltisinin çözücüsü ile 100 kez seyreltilmesiyle hazırlandı.
- Substrat çözeltisi
- Durdurma (asit) çözeltisi

Deneyin prensibi

Prostaglandin E2 ile kaplı mikrolaka kullanıldı. Standart çözeltilerin veya numunedeki PG'lerin PGE2'ye spesifik biyotinlenmiş ölçüm antikor bağlanma bölgesi için yarışmaları esasına dayanır. Oluşan biyotinlenmiş konjugatın fazlası veya bağlanmamış standart veya numune, yıkama işlemi ile uzaklaştırılır ve HRP ile konjuge olan avidin ilave edilerek inkübe edilir. TMB substratı ilave edildikten sonra, enzim substrat reaksiyonu asid çözeltisinin ilave edilmesi ile durdurulur. Meydana gelen rengin absorbansı 450 nm'de ölçülmesiyle numulerdeki PG miktarı, PG standardın seri sulandırılmaları ile hazırlanan standart eğriden belirlendi.

Prostaglandin standart eğrinin ve standart eğri denkleminin elde edilmesi

PGE2'nin 2000 pg/ml'lik stok çözeltisi hazırlandı. Daha sonra bu çözeltinin standart/numune çözeltisi ile seyreltilmesiyle konsantrasyonları 1000 pg/ml; 500 pg/ml, 250 pg/ml, 125 pg/ml, 62,5 pg/ml, 31,25 pg/ml olan çözeltiler elde edildi. Çözeltilere, ayrı ayrı, test protokolü uygulandı. Ölçülen absorbans değerlerine en küçük kareler yönteminin uygulanması ile PGE2'nin standart eğrisi çizildi ve regresyon denklemi elde edildi (Şekil 3-10).



Şekil 3-10: PGE2 standart eğrisi.

Deneyin yapılışı

Standart çözeltilerin uygulanacağı kuyucuklara 50 µl standart, numunelerin uygulanacağı kuyucuklara 50 µl numune eklendi. Tüm kuyucuklara 50 µl Biotinleşmiş Ölçüm Antikoru ilave edildikten sonra mikrolağın üstü kapatılarak 45 dakika 37°C’de inkübe edildi. Bu sürenin sonunda kuyucuklar boşaltıldı ve herbirine 300 µl yıkama tamponu ilave edilerek 3 kez yıkama yapıldı. Tüm kuyucuklara 100 µl HRP Konjugatı ilave edildikten sonra mikrolakanın üstü kapatılarak 30 dakika 37°C’de mikrolaka çalkalayıcının üzerinde inkübe edildi. Bu sürenin sonunda kuyucuklar boşaltıldı ve herbirine 300 µl yıkama tamponu ilave edilerek 5 kez yıkama yapıldı. Her kuyucuğa 90 µl substrat çözeltisi eklendi ve 37°C’de 15 dakika inkübe edildi. Her bir kuyucuğa 50 µl Durdurma Çözeltisi eklendi ve meydana gelen rengin absorbansı 450 nm’de okundu.

3.13. Western Blot Analizi

Kullanılan çözeltiler

- **RIPA (Radio-Immunoprecipitation Assay) Hücre Lizis Tamponu**

50 mM Tris-HCl, pH 7.4	50 ml
150 mM NaCl	8.76 g
Nonidet P-40	10 ml
% 0,5 Sodyum dezoksikolat	5 g
% 0,1 SDS	1 g

1000 ml’ye distile su ile tamamlandı. PMSF (proteaz inhibitörü) reaksiyon ortamındaki konsantrasyonu 1 mM olacak şekilde ilave edildi.

- **Örnek Yükleme Tamponu**

β-merkaptoetanol:“Laemmli” örnek tamponu (4X) = 1:9

- **Laemmli Örnek Tamponu (4X)**

277,8 mM Tris-HCl, pH 6.8
% 44,4 (v/v) Gliserol
% 4,4 Lityum Dodesil Sülfat (LDS)
% 0,02 Bromfenol Mavisi
1:9 oranında β-merkaptoetanol:“Laemmli” örnek tamponu (4X) karıştırıldı.

- **Elektroforez Yürütme Tamponu (Tris/glisin/SDS) (pH 8,3) – 1000 mL**
25 mM Tris
190 mM Glisin
% 0,1 SDS
- **TBS-T Tamponu (Tris Buffered Saline with Tween 20, pH 7.5)- 1000 mL**
20 mM Tris, pH 7,5
150 mM NaCl
% 0,1 Tween 20
- **Hafif Ayırma (Mild Stripping) Tamponu (pH 2.2)**
15 g Glisin
1 g SDS
10 mL Tween 20
600 mL dH₂O
1 M HCl ile pH 2,2'ye ayarlandı
dH₂O ile 1 L'ye tamamlandı.
- **Kuvvetli Ayırma (Harsh Stripping) Tamponu**
12,5 mL 0,5 M Tris-HCl
67,5 mL ultra saf dH₂O
20 mL %10'luk SDS
0,8 mL β -merkaptetanol
- **% 5'lik Yağsız Süt Tozu/TBS-T Çözeltisi**
- **Kemilüminesans Substrat Çözeltisi:** Luminol/Enhancer ve Peroksit çözeltilerinin 1:1 oranında karıştırılmasıyla çalışma çözeltisi hazırlandı.

Prensip

Herhangi bir örnekten elde edilen ve birçok protein içeren bir karışımın içinde istenen tek bir proteini saptamak amacıyla kullanılan bir yöntemdir.

Western blot analizi birbirini takip edecek şekilde beş basamaktan oluşur:

- (1) Proteinlerin membrana aktarımı,
- (2) Bloklama,
- (3) Birincil antikor uygulanması,
- (4) İkincil antikor uygulanması ve
- (5) Görüntüleme

Deneyin yapılışı

1. Kolon dokuları lizis tamponu ile % 10 oranında sulandırılarak, 3 kez 10 saniyelik sürelerle sonike edildi ve homojenizatlar, 10 000 x g devirde +4°C’de 10 dakika santrifüje edildikten sonra supernatantlar örnek olarak kullanıldı.
2. Örneklerin Bradford yöntemi ile protein miktar tayinleri yapılarak protein konsantrasyonları belirlendi.
3. Örnekler aynı miktarlarda protein içerecek şekilde SDS poliakrilamit jele yüklendi ve yürütüldü.
4. Proteinlerin Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE) ile molekül ağırlıklarına göre birbirinden ayrılması sağlandı. 20 µg protein içeren örneğe 3:1 oranında örnek yükleme tamponu ilave edildi ve 5 dk ısıtıcı blok içinde 100°C’de inkübe edildikten sonra % 12,5’luk SDS-PAGE jelinin kuyucuklarına yüklendi. Örnekler 100 Volta yaklaşık 1 saat yürütüldü.
5. Jelin boyutuna uygun PVDF membranları metanolle çalkalayıcıda muamele edildi.
6. Proteinlerin Jelden Membrana Yarı-Kuru (semi-dry) Yöntem ile Transferi (Blotlama): Molekül ağırlıklarına göre ayrılan proteinleri içeren jel, elektroforez tankından çıkarılarak transfer tamponu emdirilmiş filtre kağıdı ve membrandan oluşan sandviç üzerine dikkalce konuldu ve üzeri tekrar transfer tamponu emdirilmiş filtre kağıdı ile kapatılarak Trans-Blot Turbo™ transfer sisteminin kaseti içine yerleştirildi. Transfer tamponuyla 100 V’de 1 saat transfer işlemi gerçekleştirilir.
7. Bloklama: Proteinlerin transfer olduğu membran TBST (bloklama tamponu) ile hazırlanmış % 5’lik yağsız süt tozu karışımı içinde oda sıcaklığında 1 saat (+4°C’de 1 gece) çalkalandı.
8. Bloklama tamponu döküldü ve membran 3 kere 10’ar dakika TBST ile yıkandı.
9. Membran, bloklama tamponunun içinde ilgili proteine özgün uygun oranda seyreltilen birincil antikor ile gece boyu +4°C (oda sıcaklığında 1 saat) çalkalayıcı üzerinde (60 rpm) inkübe edildi.. İnkübasyon sonunda birincil antikor çözeltisi dökülerek üzerine 20 mL TBST eklendi ve 3 kez 5’er dakika çalkalayıcıda inkübe ederek yıkama yapıldı.
10. Membran, bloklama tamponu içinde uygun oranda seyreltilerek hazırlanmış ikincil antikor ile oda sıcaklığında çalkalayıcıda 1 saat çalkalayıcı üzerinde (60 rpm) ile inkübe edildi.

11. İkincil antikor çözeltisi dökülerek üzerine TBST eklenerek 3 kez 5'er dk çalkalayıcı da inkübe edilerek yıkama yapıldı.
12. Kemilüminesans Substrat çözeltisi içinde membran 5 dakika oda sıcaklığında çalkalayıcı da muamele edildi ve görüntülendi.
13. Görüntüleme: Membran jel görüntüleme cihazı (Vilber Lourmat, Fusion FX5) kullanılarak görüntülendi.

3.14. Histopatolojik Değerlendirme

Tüm gruplardaki farelerin distal kolonlarının proksimalinde bulunan kısımlardan alınan 0,5 cm'lik parçalar histolojik incelemelerde kullanılmak üzere Bouin solüsyonu içinde fikse edildi. Fiksasyonun ardından dokular alkol serilerinden geçirildi, ksilolde şeffaflaştırılmalarının ardından parafine gömüldü. Parafine gömülü dokulardan 5µm kalınlığında kesitler alındı. Kesitler Hematoksilen-Eozin (HE) ile boyanarak Olympus BX53F model trinoküler ışık mikrokobu ile incelendi ve Olympus DP27-CU dijital kamera ile fotoğraflandı.

Kolit hasar skorunun mikroskopik olarak belirlenmesi için HE boyalı kesitler kullanıldı. Uygulanan kolit skorlama sistemine göre inflamasyon şiddeti, yayılımı ve kript hasarı gibi ölçütler her bir fareye ait kesitlerde mikroskopik olarak değerlendirildi. Her bir ölçütün skoru o ölçütün kesit üzerinde ki yüzde tutulum oranı ile çarpıldı ve tüm ölçütlerin skorları toplandı. Bir birey için maksimum kolit hasar skoru 40 olarak kabul edildi.

3.15. İstatistiksel Değerlendirme

İstatistiksel analizler GraphPad Prism 8 versiyonu kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Grupların dağılımları, non-parametrik testlerden one-sample Kolmogorov-Smirnov testi ile değerlendirilmiştir. Normal dağılım gösteren gruplar one-way ANOVA ile (ikili karşılaştırmalar için post hoc Tukey's testi), normal dağılım göstermeyen gruplar ise Mann-Whitney U testi ile değerlendirilmiştir. Sonuçlar "ortalama $\pm$ standart sapma" olarak verilmiştir ve $p < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

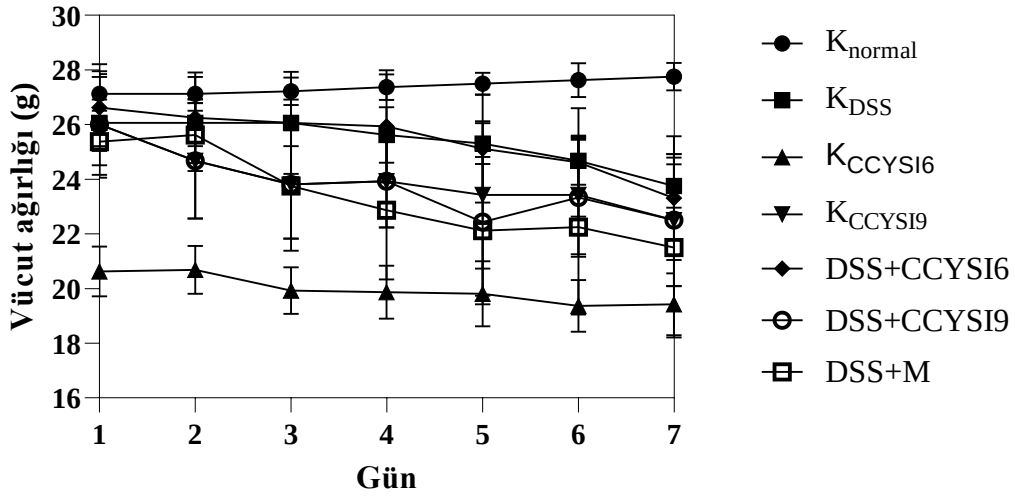
4. BULGULAR

4.1. Makroskopik Bulgular

Üçüncü günden itibaren DSS ile indüklenen ülseratif kolit fare modelinde, *C. cogglyria Scop.* yapraklarından hazırlanan sulu infüzyonu, 7 gün boyunca % 6 ve % 9 dozlarda her gün bir defa olmak üzere oral olarak verilmiştir ve makroskopik parametreler üzerinde infüzyonun etkisi izlenmiştir.

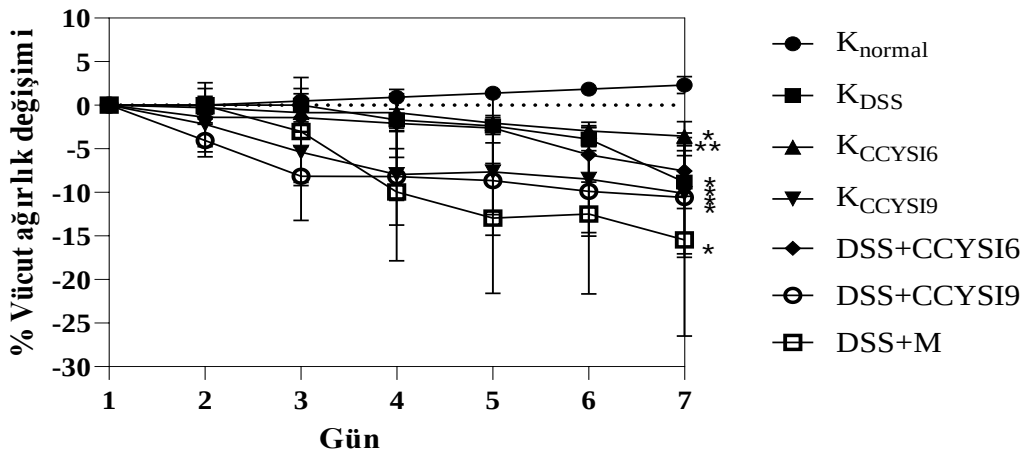
4.1.1. Farelerde Ağırlık Değişimlerine Ait Bulgular

Deney süresince gruplara göre farelerin vücut ağırlık değişimleri Tablo 4.1 ve Şekil 4.1’de, vücut ağırlıklarındaki % değişimleri ise Tablo 4.2 ve Şekil 4.2’de gösterilmiştir. Ölçümler sonucunda, ikinci ve üçüncü günde sadece % 9’luk infüzyon verilen gruplara ait farelerde, sağlıklı kontrol grubuna kıyasla daha fazla ağırlık kaybı gözlenmiştir ($p<0,05$), diğer gruplar arasında ise ağırlıklarının % değişiminde anlamlı bir farklılık saptanmamıştır ($p>0,05$). Kolit belirtilerinin gözlemlendiği deneyin 4. gününden itibaren tüm deney süresince, DSS verilen gruptaki farelerin yanısıra DSS ile birlikte CCYSI9 ve mesalamin uygulanan farelerin vücut ağırlıklarında, sağlıklı kontrol grubuna kıyasla, önemli bir azalma gözlenmiştir. Deneyin 5. ve 7. günleri arasında % 6’lık infüzyon verilen farelerin % vücut ağırlıklarında da, sağlıklı kontrol grubuna göre, istatistiksel olarak anlamlı bir düşüş tespit edilmiştir ($p<0,05$). Tüm gruplarda fare ağırlıklarındaki en belirgin azalma ise son DSS uygulamasından sonraki 24 saat içerisinde meydana gelmiştir.



Şekil 4-1: Gruplara göre farelerin vücut ağırlık değişimleri (Ortalama ± Standart sapma).

(K_{normal} : 7 gün boyunca steril musluk suyu verilen grup; K_{DSS} : Deneyin ilk 2 günü steril musluk suyu verilir, 3.günden sonra 5 gün boyunca steril musluk suyu içinde çözündürülmüş % 3 DSS verilen grup; K_{CCYSI6} : 7 gün boyunca günde 1 kez gavajla 10 ml/kg % 6'lık bitki infüzyonu verilen grup; K_{CCYSI9} : 7 gün boyunca günde 1 kez gavajla 10 ml/kg % 9'lık bitki infüzyonu verilen grup; $DSS + CCYSI6$: 7 gün boyunca günde 1 kez gavajla 10 ml/kg % 6'lık bitki infüzyonu, 3.günden sonra 5 gün boyunca steril musluk suyu içinde çözündürülmüş % 3 DSS verilen grup; $DSS + CCYSI9$: 7 gün boyunca günde 1 kez gavajla 10 ml/kg % 9'lık bitki infüzyonu, 3.günden sonra 5 gün boyunca steril musluk suyu içinde çözündürülmüş % 3 DSS verilen grup; $DSS + M$: 7 gün boyunca günde 1 kez gavajla 250 mg/kg, 3.günden sonra 5 gün boyunca steril musluk suyu içinde çözündürülmüş % 3 DSS verilen grup)



Şekil 4-2: Gruplara göre farelerin % vücut ağırlık değişimleri (Ortalama ± Standart sapma).

* $p < 0,05$ K_{normal} gruba göre anlamlı

** $p < 0,05$ K_{DSS} grubuna göre anlamlı

Tablo 4-1: Gruplara göre deney süresince farelerin vücut ağırlık değişimleri.

Grup	1 gün	2 gün	3 gün	4 gün	5 gün	6 gün	7 gün
K_{normal}	27,12 ± 0,62	27,12 ± 0,62	27,22 ± 0,50	27,37 ± 0,47	27,50 ± 0,40	27,62 ± 0,62	27,75 ± 0,50
K_{DSS}	26,06 ± 0,86	26,06 ± 0,86	26,06 ± 0,86	25,62 ± 1,02	25,31 ± 0,75	24,68 ± 0,88	23,75 ± 0,80
K_{CCYSI6}	20,62 ± 0,91	20,68 ± 0,88	19,93 ± 0,86	19,87 ± 0,87	19,81 ± 1,19	19,37 ± 0,95	19,43 ± 1,14
K_{CCYSI9}	26,00 ± 1,85	24,68 ± 2,12	23,81 ± 1,99	23,93 ± 1,69	22,43 ± 2,70	23,43 ± 2,17	22,50 ± 2,42
DSS+CCYSI6	26,62 ± 1,59	26,25 ± 1,66	26,06 ± 1,87	25,93 ± 2,06	25,12 ± 1,97	24,62 ± 1,99	23,31 ± 2,26
DSS+CCYSI9	26,00 ± 1,85	24,68 ± 2,12	23,81 ± 1,99	23,93 ± 1,69	22,43 ± 2,70	23,43 ± 2,17	22,5 ± 2,42
DSS +M	25,37 ± 0,87	25,62 ± 1,32	23,75 ± 2,37	22,87 ± 2,53	22,12 ± 2,70	22,25 ± 3,20	21,5 ± 3,29

Tablo 4-2: Gruplara göre deney süresince farelerin vücut ağırlıklarındaki yüzde değişimler.

Grup	1.gün	2.gün	3.gün	4.gün	5.gün	6.gün	7.gün
K_{normal}	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,47 ± 0,03	0,93 ± 0,07	1,39 ± 0,017	1,84 ± 0,04	2,31 ± 0,97
K_{DSS}	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	-1,69 ± 1,25*	-2,38 ± 0,97*	-3,88 ± 1,33*	-8,82 ± 3,02*
K_{CCYSI6}	0,00 ± 0,00	-0,28 ± 1,31	-0,85 ± 2,17	-0,85 ± 2,17	-2,06 ± 0,88*	-2,96 ± 1,01*	-3,54 ± 1,67*, **
K_{CCYSI9}	0,00 ± 0,00	-2,17 ± 2,59	-5,39 ± 3,46*	-7,96 ± 2,99*, **	-7,64 ± 4,91*, **	-8,47 ± 6,14*	-10,11 ± 6,94*
DSS+CCYSI6	0,00 ± 0,00	-1,37 ± 3,99	-1,41 ± 3,35	-2,08 ± 5,91	-2,62 ± 4,07	-5,67 ± 3,16*	-7,55 ± 2,89*
DSS+CCYSI9	0,00 ± 0,00	-4,05 ± 1,87*	-8,15 ± 5,07*	-8,20 ± 5,57*, **	-8,66 ± 6,29*, **	-9,88 ± 5,14*, **	-10,58 ± 6,87*
DSS+M	0,00 ± 0,00	-0,06 ± 1,98	-3,01 ± 6,21	-9,95 ± 7,89*, **	-12,94 ± 8,64*, **	-12,48 ± 9,17*, **	-15,45 ± 11,03*

Değerler ortalama standart sapma olarak ifade edildi. Anlamlılık sınırı olarak $p < 0.05$ kabul edildi.

* $p < 0,05$ K_{normal} gruba göre anlamlı

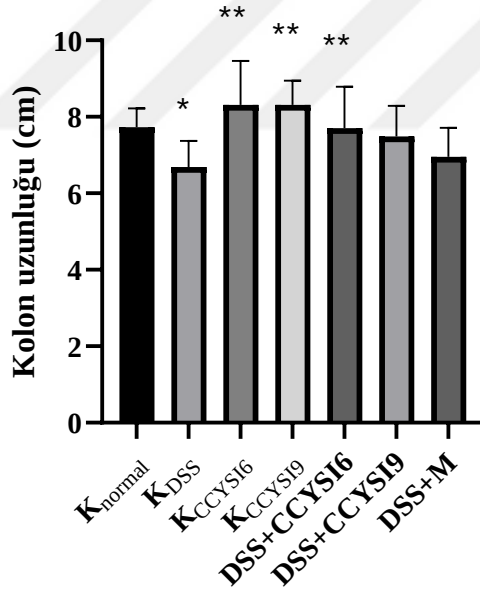
** $p < 0,05$ K_{DSS} grubuna göre anlamlı

4.1.2. Farelerde Kolon Uzunluğunun Ölçümüne Ait Bulgular

Kolon dokularının uzunluğunun ölçümünde, DSS uygulanan grup dışında diğer deney grupları gözönüne alındığında, kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik saptanmamıştır ($p>0,05$). DSS uygulanan gruptaki farelerin kolon uzunluğunda normal kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir azalma gözlenmiştir ($p<0,05$).

DSS kontrol grubundaki farelerle karşılaştırıldığında, CCYSI9 ve mesalamin uygulaması yapılan DSS grubuna ait dokuların kolon uzunluğunda istatistiksel olmayan, CCYSI6 ve CCYSI9 kontrol ile DSS ile birlikte CCYSI6 verilen gruplara ait farelerin kolon uzunluğunda ise istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlenmiştir ($p<0,05$).

Farelerin kolon uzunluklarında meydana gelen değişiklikler Şekil 4-3 ve Tablo 4-3'te gösterilmiştir.



Şekil 4-3: Gruplara göre kolon uzunluğu ölçüm değerleri (Ortalama ± Standart sapma).

Tablo 4-3: Gruplara göre kolon uzunluğu ölçüm değerleri.

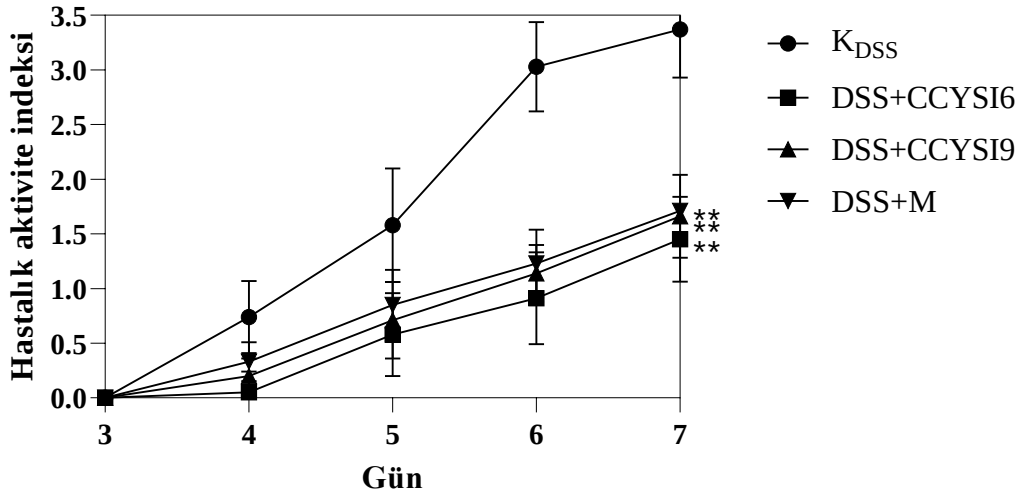
Grup	Kolon uzunluğu (cm)
K _{normal}	7,72 ± 0,49
K _{DSS}	6,68 ± 0,72*
K _{CCYSI6}	8,31 ± 1,14**
K _{CCYSI9}	8,30 ± 0,63**
DSS+CCYSI6	7,70 ± 1,13**
DSS+CCYSI9	7,48 ± 0,80
DSS+M	7,11 ± 0,76

Değerler ortalama standart sapma olarak ifade edildi. Anlamlılık sınırı olarak $p < 0.05$ kabul edildi.

4.1.3. Hastalık Aktivite İndekslerinin Değerlendirilmesine Ait Bulgular

Gruplara göre hayvanlara DSS uygulamasını takiben 5 gün boyunca tespit edilen hastalık aktivite indeksleri (HAİ) Tablo 4.4 ve Şekil 4.4'te özetlenmiştir. Deneyin DSS uygulanmaya başlandıktan sonraki tüm günlerinde HAİ'nin yüksek olduğu belirlenmiştir. Aynı şekilde, DSS ile birlikte CCYSI ve mesalamin uygulanan gruplara ait farelerde de, DSS uygulamasının ardından HAİ'de günlük olarak anlamlı artışlar görülmüştür.

Hem DSS verilen kolit grubunda hem de DSS ile birlikte CCYSI ve mesalamin uygulanan gruplarda en yüksek HAİ değerlerine, DSS uygulamasının 5. gününde ulaşılmıştır. Ancak HAİ, DSS ile birlikte CCYSI ve mesalamine uygulanan gruplarda, DSS uygulamasının yapıldığı tüm günlerde sadece DSS verilen farelerdekinden düşük seviyelerde seyrettiği görülmüştür. Bu durumda CCYSI veya mesalamine ön uygulamasının DSS'nin etkisini hafiflettiği düşüncesini telkin etmektedir. Ayrıca, HAİ'nin değerlendirilmesindeki parametrelerden biri olan rektumda görünür kan bulunması, DSS uygulamasının son gününde DSS kolit grubundaki tüm farelerde gözlenmiştir. Bununla birlikte, iyileştirme grubundaki birkaç farede hafif derecede kanlı rektum görülmüştür.



Şekil 4-4: Gruplara göre günlük hastalık aktivite indeksleri (Ortalama ± Standart sapma).

**p<0,05 K_{DSS} grubuna göre anlamlı

Tablo 4-4: Gruplara göre kolit oluşturduktan sonraki günlerde hastalık aktivite indeksleri.

Grup	3	4	5	6	7
K_{DSS}	0,00 ± 0,00	0,74 ± 0,33	1,58 ± 0,52	3,03 ± 0,41	3,37 ± 0,44
DSS+CCYSI6	0,00 ± 0,00	0,05 ± 0,19**	0,58 ± 0,38**	0,91 ± 0,42**	1,45 ± 0,39**
DSS+CCYSI9	0,00 ± 0,00	0,20 ± 0,16**	0,71 ± 0,35**	1,14 ± 0,26**	1,66 ± 0,38**
DSS+M	0,00 ± 0,00	0,33 ± 0,18**	0,85 ± 0,32**	1,23 ± 0,31**	1,71 ± 0,23**

Değerler ortalama standart sapma olarak ifade edildi. Anlamlılık sınırı olarak p < 0.05 kabul edildi.

**p<0,05 K_{DSS} grubuna göre anlamlı

4.2. BİYOKİMYASAL BULGULAR

Çalışmamızda DSS ile oluşturulan ülseratif kolite *Cotinus coggygria* sulu infüzyonunun antioksidan ve koruyucu etkileri incelenmiş ve elde edilen sonuçlar Tablo 6’da gösterilmiştir.

4.2.1. Plazmada AST ve ALT Aktivitelerine Ait Bulgular

Tüm deney gruplarında plazma AST ve ALT düzeyleri, kontrol bireylerle karşılaştırıldığında, istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık ($p>0,05$) gözlenmemiştir.

Tablo 4-5: Gruplara göre ALT ve AST aktivitelerine ait bulgular.

Grup	ALT	AST
K _{normal}	23,10 ± 1,92	25,93 ± 1,25
K _{DSS4}	26,40 ± 2,02	29,23 ± 2,05
K _{CCYSI6}	24,88 ± 6,17	27,19 ± 1,90
K _{CCYSI9}	21,46 ± 3,69	26,65 ± 1,85
DSS+CCYSI6	24,07 ± 4,19	28,89 ± 2,36
DSS+CCYSI9	25,47 ± 4,30	29,74 ± 2,91
DSS+M	23,82 ± 3,84	26,55 ± 1,86

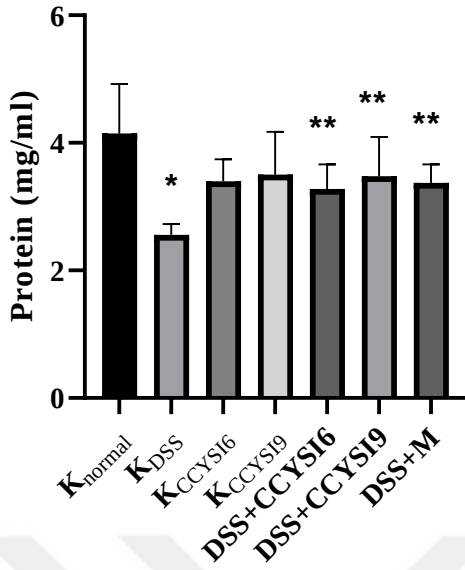
Değerler ortalama standart sapma olarak ifade edildi. Anlamlılık sınırı olarak $p < 0.05$ kabul edildi.

4.2.2. Kolon Dokusu Protein Seviyelerine Ait Bulgular

Kolon dokusu total protein düzeylerinin DSS uygulanmış kontrol grubunda, normal kontrol grubuna göre anlamlı ($p<0,0001$) olarak azaldığı gözlenmiştir. CCYSI6 ve CCYSI9 kontrol, DSS ile birlikte CCYSI6, CCYSI9 ve mesalamin uygulanan gruplara ait dokuların protein düzeylerinde, normal kontrol grubunun protein düzeylerine göre anlamlı olmayan bir azalma kaydedilmiştir ($p>0,05$).

DSS kontrol grubundaki farelerle karşılaştırıldığında, CCYSI6, CCYSI9 ve mesalamin uygulaması yapılan DSS grubuna ait dokuların protein seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlenmiştir ($p<0.05$).

Kolon dokusu homojenizatlarından elde edilen protein seviyelerinin gruplara göre dağılımı Şekil 4-5’de gösterilmiştir.



Şekil 4-5: Gruplara göre kolon homojenizatlarında ölçülen protein seviyeleri (Ortalama $\pm$ Standart sapma).

*Kontrol grubundan farklı ($p < 0,05$).

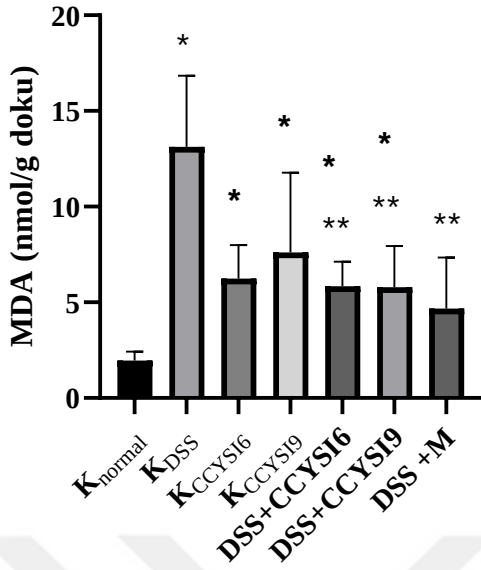
**Ülseratif kolit grubundan farklı ($p < 0,05$).

4.2.3. Kolon Dokusu Malondialdehit (MDA) Seviyelerine Ait Bulgular

Normal kontrol grubundaki farelerle karşılaştırıldığında MDA düzeylerinde, hem CCYSI6 ve CCYSI9 verilen kontrol grupları hem de DSS ile birlikte CCYSI6 ve CCYSI9 verilen gruplardaki MDA seviyelerinde anlamlı bir artış kaydedilirken ($p < 0,05$); DSS+mesalamin grubunda ise anlamlı bir değişiklik saptanmamıştır ($p > 0,05$). En belirgin artış DSS uygulanmış kontrol grubunda kaydedilmiştir ($p < 0,0001$).

Aralarında anlamlı bir farklılık ($p > 0,05$) gözlenmeyen DSS ile birlikte CCYSI6, CCYSI9 veya mesalamin verilen deney gruplarının kolon MDA düzeylerinde DSS uygulanmış kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı azalma görülmüştür ($p < 0,0001$), ancak bulunan bu değerler kontrol grubu düzeyinin üzerinde kalmıştır.

Kolon dokusu homojenizatlarından elde edilen MDA seviyelerinin gruplara göre dağılımı Şekil 4-6’te gösterilmiştir.



Şekil 4-6: Gruplara göre kolon doku homojenizatlarında ölçülen MDA seviyeleri (Ortalama $\pm$ Standart sapma).

*Kontrol grubundan farklı ($p < 0,05$).

**Ülseratif grubundan farklı ($p < 0,05$).

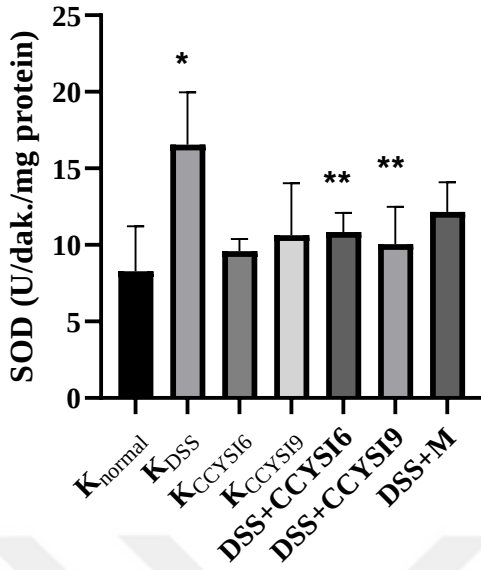
4.2.4. Kolon Dokusu Süperoksit Dismutaz (SOD) Aktivitesine Ait Bulgular

Normal kontrol deney grubunun SOD düzeyleri, CCYSI6 ve CCYASI9 kontrol, DSS ile birlikte CCYSI6, CCYSI9 ve mesalamin verilen deney gruplarının kolon SOD düzeyleri ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamıştır ($p > 0,05$), DSS uygulanmış kontrol grubunda ise anlamlı bir artış kaydedilmiştir ($p < 0,0001$).

DSS kontrol grubundaki farelerle karşılaştırıldığında SOD aktivitelerinde, hem CCYSI6 ($p = 0,0016$) hem de CCYSI9 ($p = 0,0003$) uygulanmış DSS kolit gruplarında anlamlı bir azalma kaydedilirken; mesalamin uygulanmış DSS grubunda ise anlamlı bir değişiklik saptanmamıştır ($p > 0,05$).

DSS ile birlikte CCYSI6 ve CCYSI9 verilen deney grubunun kolon SOD aktivitesi, sadece % 6'lık veya % 9'luk CCYSI verilen kontrol bireylerdeki seviyelere yaklaşmıştır ($p > 0,05$).

Kolon doku homojenizatlarından elde edilen SOD seviyelerinin gruplara göre dağılımı Şekil 4-7'de gösterilmiştir.



Şekil 4-7: Gruplara göre kolon doku homojenizatlarında ölçülen SOD seviyeleri (Ortalama $\pm$ Standart sapma).

*Kontrol grubundan farklı ($p < 0,05$).

**Ülseratif grubundan farklı ($p < 0,05$).

4.2.5. Kolon Dokusu Katalaz (CAT) Aktivitesine Ait Bulgular

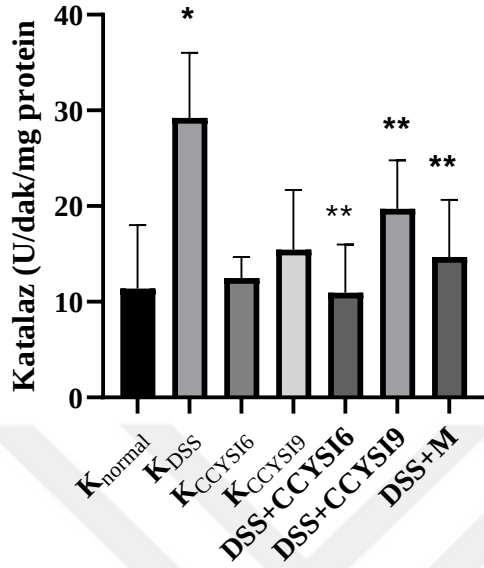
DSS uygulanmış kontrol grubu farelerde katalaz aktivitesi normal kontrol grubuna göre anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur ($p < 0,0001$).

CCYSI6 ve CCYSI9 kontrol, DSS ile birlikte % 6 ve % 9 CCYSI ile mesalamin verilmiş farelerde katalaz düzeyinde normal kontrol gruba göre anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir ($p > 0,05$).

DSS ile birlikte % 6 ve % 9 CCYSI ile mesalamin uygulanmış deney gruplarında katalaz düzeyleri, DSS kontrol bireylerle karşılaştırıldığında, istatistiksel olarak düşük bulunmuştur. DSS+CCYSI6 ($p < 0,0001$), DSS+CCYSI9 ($p = 0,019$) ve DSS+mesalamin ($p = 0,0003$) gruplardaki anlamlılık dereceleri gözönüne bulundurularak en düşük katalaz aktivitesi CCYASI6 verilen ülseratif kolitli farelerde tespit edilmiştir.

DSS ile birlikte % 6 veya % 9 CCYSI verilmiş deney gruplarının kolon katalaz aktiviteleri, sadece % 6'lık veya % 9'luk CCYSI verilen kontrol bireylerdeki seviyelere yaklaşmıştır ($p > 0,05$).

Kolon doku homojenizatlarından elde edilen katalaz seviyelerinin gruplara göre dağılımı Şekil 4-8’de gösterilmiştir.



Şekil 4-8: Gruplara göre kolon doku homojenizatlarında ölçülen katalaz seviyeleri (Ortalama $\pm$ Standart sapma).

*Kontrol grubundan farklı ($p<0,05$).

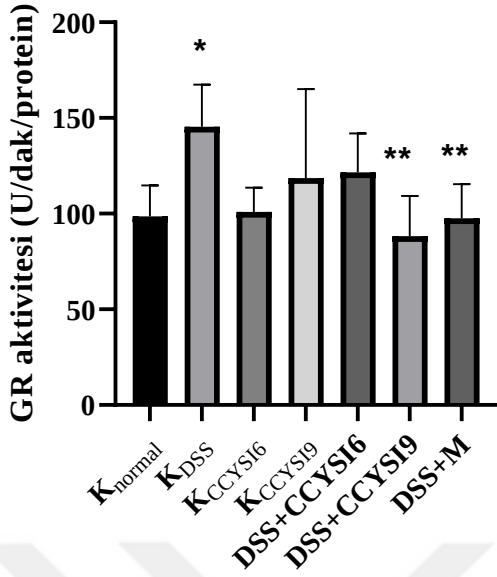
**Ülseratif grubundan farklı ($p<0,05$).

4.2.6. Kolon Dokusu Glutatyon Redüktaz (GR) Aktivitesine Ait Bulgular

Normal kontrol deney grubunun GR düzeyleri, CCYSI6 ve CCYSI9 kontrol, DSS ile birlikte CCYSI6 ve CCYSI9 ile mesalamin verilen deney gruplarının GR düzeyleri ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamıştır ($p>0,05$), DSS kontrol grubunda ise istatistiksel olarak anlamlı bir artış kaydedilmiştir ($p<0,05$).

DSS ile birlikte CCYSI6 verilen gruba ait kolon dokusu GR düzeyleri, DSS kontrol grubuna oranla istatistiksel olarak anlamlı olmayan şekilde ($p>0,05$), DSS ile birlikte CCYSI9 ($p=0,0007$) ve mesalaminin ($p=0,014$) verilen gruplara ait kolon dokusu GR düzeyleri ise istatistiksel olarak anlamlı şekilde düşük bulunmuştur.

Kolon doku homojenizatlarından elde edilen GR seviyelerinin gruplara göre dağılımı Şekil 4-9’da gösterilmiştir.



Şekil 4-9: Gruplara göre kolon doku homojenizatlarında ölçülen GR seviyeleri (Ortalama $\pm$ Standart sapma).

*Kontrol grubundan farklı ($p < 0,05$).

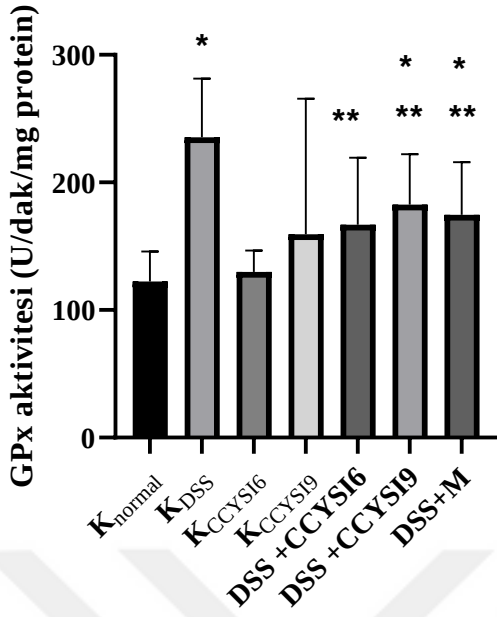
**Ülseratif grubundan farklı ($p < 0,05$).

4.2.7. Kolon Dokusu Glutasyon Peroksidaz (GPx) Aktivitesine Ait Bulgular

DSS uygulanmış kontrol deney grubunun kolon dokusu GPx düzeyleri, normal kontrol grubu farelere göre anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur ($p < 0,05$). DSS ile birlikte CCYSI9 ve mesalamin verilen grupların GPx aktivite düzeylerinde anlamlı bir artış kaydedilirken ($p < 0,05$); CCSYI6 ve CCYSI9 kontrol ile DSS ile birlikte CCYSI6 verilen fare gruplarına ait GPx düzeylerinde normal kontrol grubuna göre anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir ($p > 0,05$).

DSS kontrol grubuna oranla, DSS ile birlikte CCYSI6, CCYSI9 ile mesalamin verilen gruplara ait kolon dokusu GPx düzeyleri istatistiksel olarak anlamlı şekilde düşük bulunmuştur ($p > 0,05$).

Kolon doku homojenizatlarından elde edilen GPx seviyelerinin gruplara göre dağılımı Şekil 4-10'da gösterilmiştir.



Şekil 4-10: Gruplara göre kolon doku homojenizatlarında ölçülen GPx seviyeleri (Ortalama $\pm$ Standart sapma).

*Kontrol grubundan farklı ($p < 0,05$).

**Ülseratif grubundan farklı ($p < 0,05$).

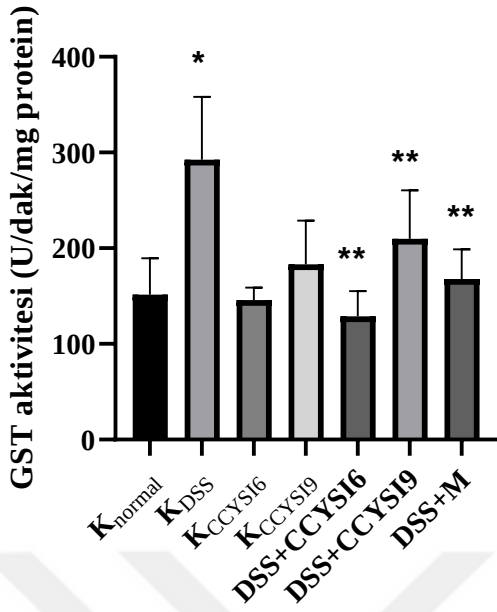
4.2.8. Kolon Dokusu Glutasyon-S-Transferaz (GST) Aktivitesine Ait Bulgular

DSS uygulanmış kontrol gruptaki GST aktivitesi, aralarında anlamlı bir farklılık ($p > 0,05$) gözlenmeyen normal kontrol, % 6'lık ve % 9'luk CCYSI kontrolleri, DSS ile birlikte CCYST6, CCYSI9 ve mesalamin verilen gruplara göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur ($p < 0,0001$).

Aralarında anlamlı bir farklılık ($p > 0,05$) gözlenmeyen DSS ile birlikte CCYSI6 ve CCYSI9 verilen deney gruplarının kolon GST aktivite düzeylerinde, DSS uygulanmış kontrol deney grubuna göre istatistiksel olarak düşük bulunmuştur ($p < 0,0001$).

DSS+CCYSI6 ($p < 0,0001$), DSS+CCYSI9 ($p = 0,0068$) ve DSS+mesalamin ($p < 0,0001$) gruplardaki anlamlılık dereceleri gözönünde bulundurularak en büyük azalma ülseratif kolitli farelere CCYASI6 ve mesalamin verilmesiyle sağlandığı tespit edilmiştir.

Kolon doku homojenizatlarından elde edilen GPx seviyelerinin gruplara göre dağılımı Şekil 4-11'da gösterilmiştir.



Şekil 4-11: Gruplara göre kolon doku homojenizatlarında ölçülen GST seviyeleri (Ortalama $\pm$ Standart sapma).

*Kontrol grubundan farklı ($p < 0,05$).

**Ülseratif grubundan farklı ($p < 0,05$).

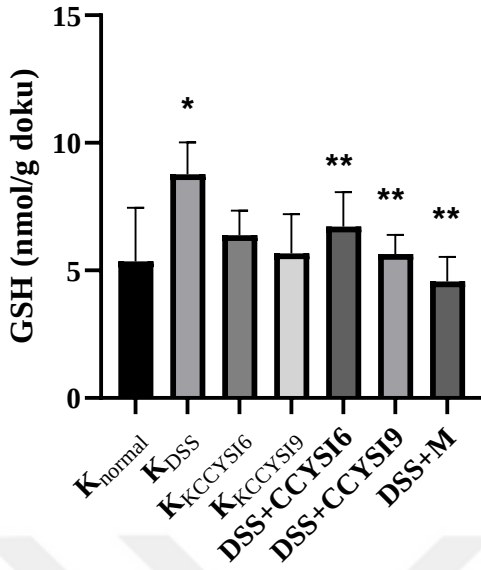
4.2.9. Kolon Dokusu Glutatyon (GSH) Seviyelerine Ait Bulgular

DSS uygulanmış kontrol deney grubunun kolon GSH düzeyleri, normal kontrol grubu farelere göre anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur ($p < 0,001$).

Normal kontrol deney grubunun GSH düzeyleri, CCYSI6 ile CCYSI9 kontrol ve DSS ile birlikte CCYSI6, CCYSI9 ve mesalamin verilen deney gruplarının kolon dokusu GSH düzeyleri ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamıştır ($p > 0,05$).

DSS ile birlikte CCYSI6, CCYSI9 ve mesalamin verilen deney gruplarında kolon dokusu GSH düzeyleri, DSS uygulanmış kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, istatistiksel olarak anlamlı şekilde düşük bulunmuştur. Gruplardaki artan anlamlılık dereceleri şu şekildedir sıralanmıştır: DSS+CCYSI6 ($p = 0,032$), DSS+CCYSI9 ($p = 0,0002$), DSS+mesalamin ($p < 0,0001$).

Kolon doku homojenizatlarından elde edilen GSH seviyelerinin gruplara göre dağılımı Şekil 4-12’de gösterilmiştir.



Şekil 4-12: Gruplara göre kolon doku homojenizatlarında ölçülen GSH seviyeleri (Ortalama $\pm$ Standart sapma).

*Kontrol grubundan farklı ($p < 0,05$).

**Ülseratif grubundan farklı ($p < 0,05$).

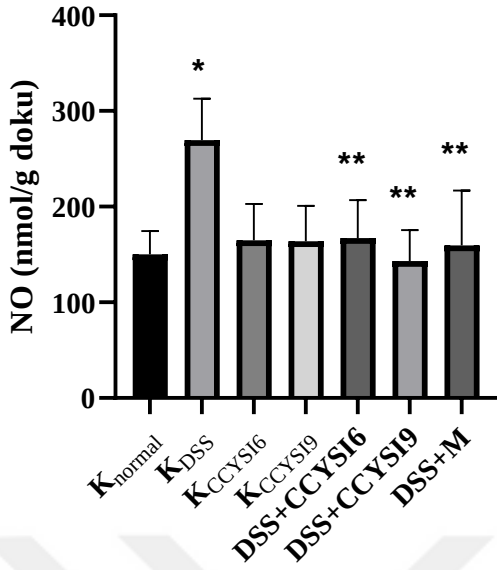
4.2.10. Kolon Dokusu Nitrik Oksit Seviyelerine Ait Bulgular

DSS uygulanmış kontrol deney grubunun kolon NO düzeyleri, normal kontrol grubu farelere göre anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur ($p=0,0003$).

Normal kontrol deney grubunun NO düzeyleri, CCYSI6 ile CCYSI9 kontrol ve DSS ile birlikte CCYSI6, CCYSI9 ve mesalamin verilen deney gruplarının kolon dokusu GSH düzeyleri ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamıştır ($p > 0,05$).

DSS ile birlikte CCYSI6 ($p=0,0002$), CCYSI9 ($p < 0,0001$) ve mesalamin ($p=0,0004$) verilen deney gruplarında, DSS uygulanmış kontrol gruba göre NO miktarı istatistiksel olarak düşük bulunmuştur.

Kolon doku homojenizatlarından elde edilen NO seviyelerinin gruplara göre dağılımı Şekil 4-13’de gösterilmiştir.



Şekil 4-13: Gruplara göre kolon doku homojenizatlarında ölçülen NO seviyeleri (Ortalama $\pm$ Standart sapma).

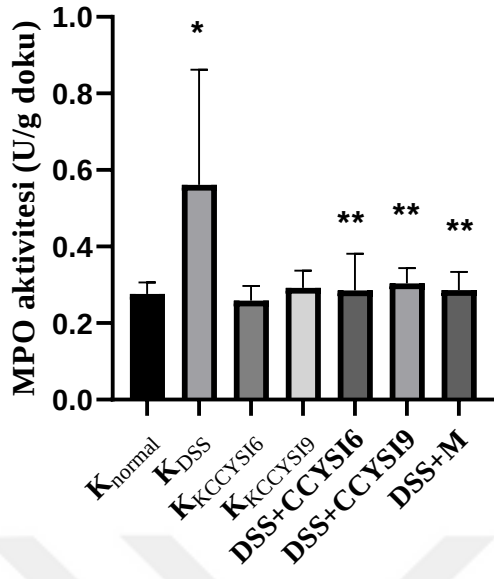
*Kontrol grubundan farklı ($p < 0,05$).

**Ülseratif grubundan farklı ($p < 0,05$).

4.2.11. Kolon Dokusu Miyeloperoksidaz (MPO) Aktivitesine Ait Bulgular

DSS uygulanmış kontrol deney grubunun kolon dokusu MPO aktivite düzeyleri, normal kontrol grubu farelere göre anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur ($p = 0,018$). Aralarında anlamlı bir farklılık ($p > 0,05$) gözlenmeyen DSS ile birlikte CCYSI6, CCYSI9 ve mesalamin verilen deney gruplarının kolon dokusu MPO düzeylerinde ise DSS uygulanmış kontrol deney grubuna göre anlamlı azalma görülmüştür ($p < 0,05$). Gruplardaki anlamlılık dereceleri şu şekildedir: DSS+CCYSI6 ($p = 0,0029$), DSS+CCYSI9 ($p = 0,0064$), DSS+mesalamin ($p = 0,0073$).

Kolon doku homojenizatlarından elde edilen NO seviyelerinin gruplara göre dağılımı Şekil 4-14’de gösterilmiştir.



Şekil 4-14: Gruplara göre kolon doku homojenizatlarında ölçülen MPO seviyeleri (Ortalama $\pm$ Standart sapma).

^aKontrol grubundan farklı ($p < 0,05$).

^bÜlseratif grubundan farklı ($p < 0,05$).

Tablo 4-6: DSS ile oluşturulan ülseratif kolite *C. coggigria* sulu infüzyonunun ve mesalaminin MPO ve antioksidan parametrelerine etkisi.

Grup	Protein (mg/ml)	SOD (U/mg protein)	Katalaz (U/mg protein)	GR (U/mg protein)	GPx (U/mg protein)	GST (U/mg protein)	NO (nmol/g protein)	GSH (nmol/g doku)	MDA (nmol/g doku)	MPO (nmol/g doku)
K_{normal}	4,14 ± 0,77	8,28 ± 2,94	11,37 ± 6,64	98,56 ± 16,10	122,33 ± 15,54	151,38 ± 38,21	150,26 ± 24,12	5,35 ± 2,10	1,95 ± 0,47	0,276 ± 0,030
K_{DSS}	2,55 ± 0,16*	16,54 ± 3,41*	29,68 ± 7,89*	145,36 ± 22,00	235,37 ± 43,61*	295,73 ± 86,45*	244,51 ± 51,77*	8,98 ± 1,37*	13,13 ± 3,70*	0,523 ± 0,32*
K_{CCYSI6}	3,39 ± 0,35	9,59 ± 0,79	12,33 ± 2,80	100,83 ± 12,79	129,90 ± 16,65	145,88 ± 12,09	167,15 ± 48,65	6,54 ± 1,07	6,20 ± 1,93*	0,259 ± 0,038
K_{CCYSI9}	3,50 ± 0,66	10,63 ± 3,39	15,44 ± 6,25	118,57 ± 46,50	159,44 ± 106,07	167,32 ± 57,36	157,05 ± 35,36	5,66 ± 1,53	6,62 ± 3,53*	0,315 ± 0,046
DSS+CCYSI6	3,15 ± 0,38	10,51 ± 1,01**	10,94 ± 5,04**	121,54 ± 20,38	166,99 ± 52,34**	128,89 ± 31,86**	167,01 ± 39,89**	6,04 ± 0,59**	5,74 ± 1,33**;	0,294 ± 0,11**
DSS+CCYSI9	3,47 ± 0,61**	10,04 ± 2,43**	18,63 ± 5,38**	88,17 ± 21,07**	182,71 ± 39,28**;	193,09 ± 46,99**	145,30 ± 33,65**	5,64 ± 0,74**	5,20 ± 1,36**;	0,303 ± 0,040**
DSS+M	3,37 ± 0,29**	12,16 ± 1,93	14,84 ± 6,66**	97,51 ± 17,86**	174,52 ± 41,28**;	151,66 ± 22,68**	161,22 ± 80,84**	4,57 ± 0,96**	4,64 ± 2,97**	0,292 ± 0,050**

Değerler ortalama standart sapma olarak ifade edildi. Anlamlık sınırı olarak $p < 0.05$ kabul edildi.

* $p < 0,05$ K_{normal} grubuna göre anlamlı

** $p < 0,05$ K_{DSS} grubuna göre anlamlı

4.3. Fare Kolon Dokularının ELISA Analiz Sonuçları

Fare kolon dokularının ELISA analiz sonuçları Tablo 4-7’de özetlenmiştir.

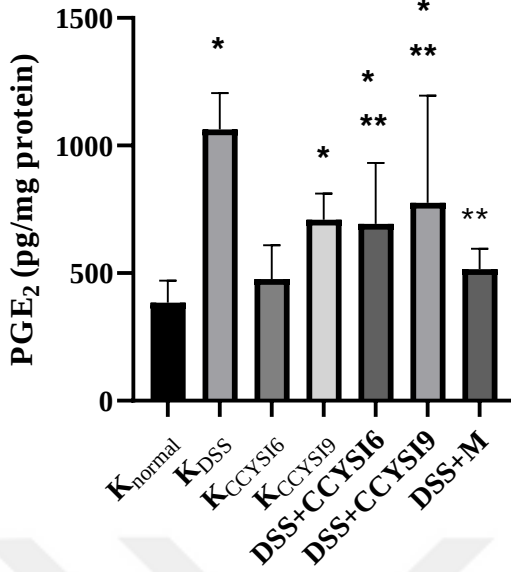
4.3.1. Kolon Dokusu Prostaglandin E2 Seviyelerine Ait Bulgular

DSS uygulanmış kontrol grubunun PGE2 seviyelerinde, kontrol grubuna göre istatistiksel olarak belirgin bir artış gözlenmiştir ($p=0,0002$).

Normal kontrol grubundaki farelerle karşılaştırıldığında, sadece CCYSI9 uygulanmış kontrol ile DSS ile birlikte CCYSI6 ve CCYSI9 verilen grupların PGE2 düzeylerinde anlamlı bir artış kaydedilirken ($p<0,05$); sadece CCYSI6 uygulanmış kontrol ile mesalamin uygulanmış DSS grubunda anlamlı bir değişiklik saptanmamıştır ($p>0,05$).

DSS uygulanmış kontrol grubuna göre DSS ile birlikte CCYSI6, CCYSI9 veya mesalamin verilen deney gruplarının kolon dokusu PGE2 düzeylerinde anlamlı azalma görülmüştür ($p<0,05$). En büyük azalma DSS ile birlikte mesalamin verilen grupta gözlenmiştir ($p=0,0007$), ancak bulunan değer normal kontrol grup düzeyinin üzerinde kalmıştır. Bu grubu sırasıyla DSS+CCYSI6 ($p=0,024$) ve DSS+CCYSI9 ($p=0,14$) grupları izlemiştir.

Kolon doku homojenizatlarından elde edilen PGE2 seviyelerinin gruplara göre dağılımı Şekil 4-15’de gösterilmiştir.



Şekil 4-15: Gruplara göre kolon doku homojenizatlarında ölçülen PGE2 seviyeleri (Ortalama $\pm$ Standart sapma).

*Kontrol grubundan farklı ($p < 0,05$).

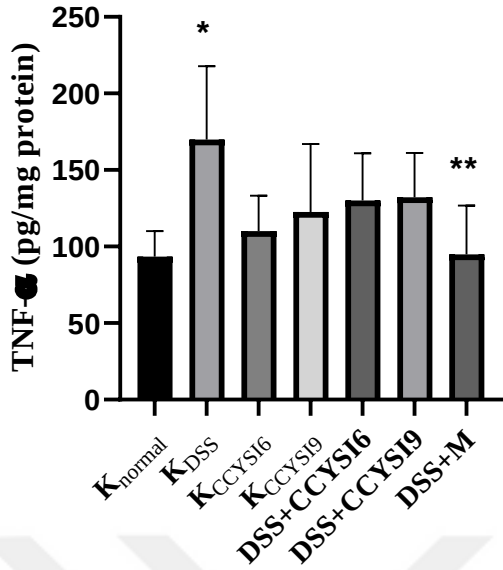
**Ülseratif grubundan farklı ($p < 0,05$).

4.3.2. Kolon Dokusu Tümör Nekroz Faktör- α Seviyelerine Ait Bulgular

Normal kontrol grubuna kıyasla, TNF- α seviyesindeki en belirgin artış DSS uygulanmış kontrol grubunda gözlenmiştir ($p = 0,012$). DSS ile birlikte CCYSI6, CCYSI9 ve mesalamin uygulandığı fare grupları ile normal kontrol grup arasında anlamlı bir farklılık ($p > 0,05$) gözlenmemiştir.

DSS uygulanmış kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, DSS ile birlikte CCYSI6 ve CCYSI9 verilen deney gruplarında kolon dokusu TNF- α düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı olmayan bir azalma gözlenmekle birlikte ($p > 0,05$), mesalamin verilen grupta istatistiksel olarak anlamlı düşüş saptanmıştır ($p = 0,004$).

Kolon doku homojenizatlarından elde edilen TNF- α seviyelerinin gruplara göre dağılımı Şekil 4-16'da gösterilmiştir.



Şekil 4-16: Gruplara göre kolon doku homojenizatlarında ölçülen TNF- α seviyeleri (Ortalama $\pm$ Standart sapma).

*Kontrol grubundan farklı ($p < 0,05$).

**Ülseratif grubundan farklı ($p < 0,05$).

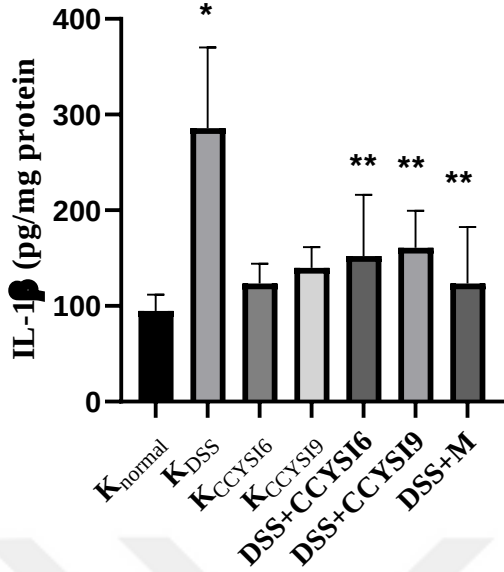
4.3.3. Kolon Dokusu İnterlökin-1 β (IL-1 β) Seviyelerine Ait Bulgular

Normal kontrol grubuna kıyasla IL-1 β seviyesindeki en belirgin artış DSS uygulanmış kontrol grubunda gözlenmiştir ($p < 0.0001$).

CCYSI6 kontrol, CCYSI9 kontrol, DSS ile birlikte CCYSI6, CCYSI9 ve mesalamin uygulandığı fare grupları ile normal kontrol grup arasında anlamlı bir farklılık ($p > 0,05$) gözlenmemiştir.

DSS ile birlikte CCYSI6 ($p = 0,0001$), CCYSI9 ($p = 0,0003$) veya mesalamin ($p < 0,0001$) verilen deney gruplarının IL-1 β düzeylerinde, DSS uygulanmış kontrol deney grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı azalma görülmüştür.

Kolon doku homojenizatlarından elde edilen IL-1 β seviyelerinin gruplara göre dağılımı Şekil 4-17’de gösterilmiştir.



Şekil 4-17: Gruplara göre kolon doku homojenizatlarında ölçülen IL-1 β seviyeleri (Ortalama $\pm$ Standart sapma).

*Kontrol grubundan farklı ($p < 0,05$).

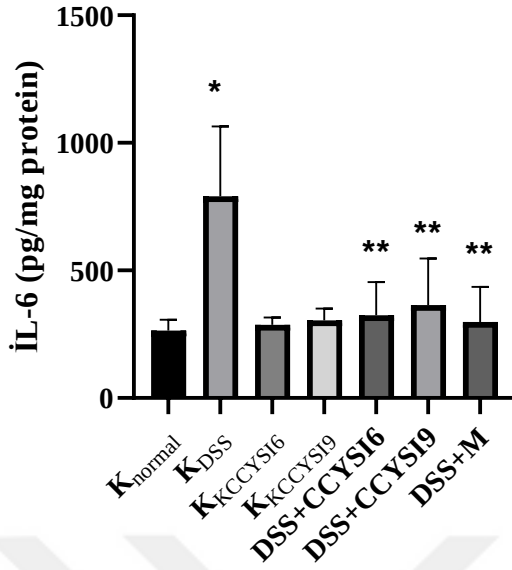
**Ülseratif grubundan farklı ($p < 0,05$).

4.3.4. Kolon Dokusu İnterlökin-6 (IL-6) Seviyelerine Ait Bulgular

DSS uygulanmış kontrol deney grubunun kolon IL-6 düzeyleri, kontrol grubuna göre anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur ($p < 0,0001$). Normal kontrol deney grubunun kolon IL-6 düzeyleri, CCYSI6 ve CCYSI9 kontrol, DSS ile birlikte CCYSI6, CCYSI9 veya mesalamin verilen deney gruplarının IL-6 düzeyleri ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamıştır ($p > 0,05$).

DSS uygulanmış kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, DSS ile birlikte CCYSI6, CCYSI9 ve mesalamin verilen deney gruplarının IL-6 düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı düşüş saptanmıştır ($p < 0,0001$).

Kolon doku homojenizatlarından elde edilen IL-6 seviyelerinin gruplara göre dağılımı Şekil 4-18’de gösterilmiştir.



Şekil 4-18: Gruplara göre kolon doku homojenizatlarında ölçülen IL-6 seviyeleri (Ortalama $\pm$ Standart sapma).

*Kontrol grubundan farklı ($p < 0,05$).

**Ülseratif grubundan farklı ($p < 0,05$).

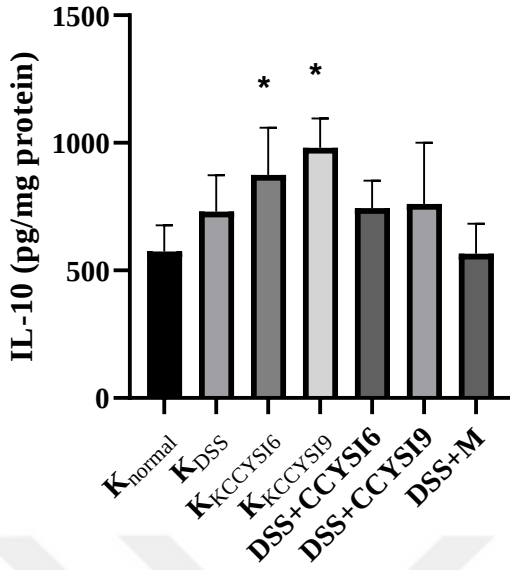
4.3.5. Kolon Dokusu İnterlökin-10 (IL-10) Seviyelerine Ait Bulgular

Aralarında anlamlı bir farklılık ($p > 0,05$) gözlenmeyen CCYSI6 ($p = 0,048$) ve CCYSI9 ($p = 0,0031$) uygulanmış kontrol deney gruplarının kolon IL-10 düzeyleri, kontrol grubuna göre anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur.

Normal kontrol deney grubunun kolon IL-10 düzeyleri, DSS uygulanmış kontrol deney grubu ile DSS ile birlikte CCYSI6, CCYSI9 veya mesalamin verilen deney gruplarının IL-10 düzeyleri ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamıştır ($p > 0,05$).

DSS uygulanmış kontrol deney grubunun kolon IL-10 düzeyleri, DSS ile birlikte CCYSI6, CCYSI9 ve mesalamin verilen deney gruplarının IL-10 düzeyleri ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamıştır ($p > 0,05$).

Kolon doku homojenizatlarından elde edilen IL-10 seviyelerinin gruplara göre dağılımı Şekil 4-19'da gösterilmiştir.



Şekil 4-19: Gruplara göre kolon doku homojenizatlarında ölçülen IL-10 seviyeleri (Ortalama $\pm$ Standart sapma).

^aKontrol grubundan farklı ($p < 0,05$).

^bÜlseratif grubundan farklı ($p < 0,05$).

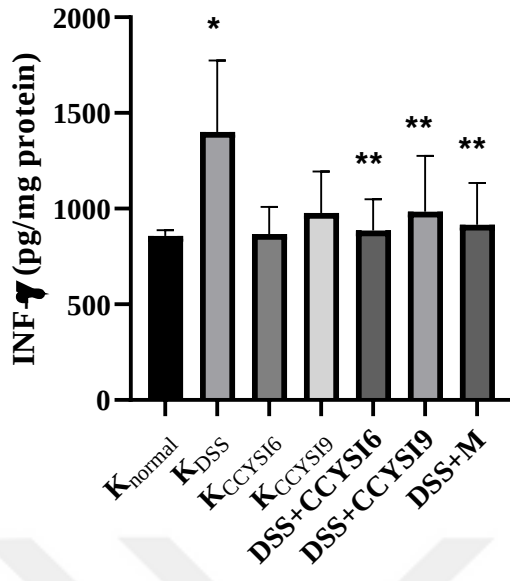
4.3.6. İnterferon- γ (INF- γ) Seviyelerine Ait Bulgular

Normal kontrol grubuna kıyasla INF- γ seviyesindeki en belirgin artış DSS uygulanmış kontrol grubunda gözlenmiştir ($p < 0.0001$).

CCYSI6 kontrol, CCYSI9 kontrol, DSS ile birlikte CCYSI6, CCYSI9 ve mesalamin uygulandığı fare grupları ile normal kontrol grup arasında anlamlı bir farklılık ($p > 0,05$) gözlenmemiştir.

DSS ile birlikte CCYSI6 ($p = 0,002$), CCYSI9 ($p = 0,02$) veya mesalamin ($p = 0,01$) verilen deney gruplarının INF- γ düzeylerinde, DSS uygulanmış kontrol deney grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı azalma görülmüştür.

Kolon doku homojenizatlarından elde edilen IL-1 β seviyelerinin gruplara göre dağılımı Şekil 4-20’de gösterilmiştir.



Şekil 4-20: Gruplara göre kolon doku homojenizatlarında ölçülen INF- γ seviyeleri (Ortalama $\pm$ Standart sapma).

^aKontrol grubundan farklı ($p < 0,05$).

^bÜlseratif grubundan farklı ($p < 0,05$).

Tablo 4-7: DSS ile oluşturulan ülseratif kolite *C. coggygria* sulu infüzyonunun ve mesalaminin PGE2 ve sitokin parametrelerine etkisi.

Grup	PG (pg/mg)	TNF- α (pg/mg)	IL-1 β (pg/mg)	IL-6 (pg/mg)	IL-10 (pg/mg)	IFN- γ (pg/mg)
K_{normal}	318,34 $\pm$ 163,74	87,69 $\pm$ 16,55	144,72 $\pm$ 92,74	314,43 $\pm$ 106,99	698,78 $\pm$ 235,95	924,98 $\pm$ 64,08
K_{DSS}	1089,20 $\pm$ 170,14*	260,85 $\pm$ 75,59*	249,55 $\pm$ 59,12*	795,16 $\pm$ 352,75*	759,73 $\pm$ 219,46	1431,50 $\pm$ 392,28*
K_{CCYSI6}	637,22 $\pm$ 166,04	150,15 $\pm$ 50,14	179,76 $\pm$ 49,12	503,58 $\pm$ 67,57	1487,40 $\pm$ 361, 89*	1010,13 $\pm$ 236,96
K_{CCYSI9}	740,32 $\pm$ 106,27*	179,33 $\pm$ 74,13	225,27 $\pm$ 43,34	547,78 $\pm$ 256,34	1348,11 $\pm$ 518,67*	1335,32 $\pm$ 573,35
DSS+CCYSI6	798,62 $\pm$ 209,65***; *	190,08 $\pm$ 74,13	136,85 $\pm$ 50,75**	261,51 $\pm$ 60,50**	747,12 $\pm$ 114,87	885,29 $\pm$ 164,07**
DSS+CCYSI9	698,82 $\pm$ 210,03***; *	125,88 $\pm$ 39,30	153,17 $\pm$ 43,84**	288,81 $\pm$ 137,71**	623,79 $\pm$ 156,14	975,72 $\pm$ 313,89**
DSS+M	489,22 $\pm$ 81,43**	91,06 $\pm$ 33,86**	123,63 $\pm$ 58,79**	297,88 $\pm$ 137,58**	565,94 $\pm$ 117,52	849,05 $\pm$ 294,39**

Değerler ortalama standart sapma olarak ifade edildi. Anlamlılık sınırı olarak $p < 0.05$ kabul edildi.

* $p < 0,05$ K_{normal} grubuna göre anlamlı

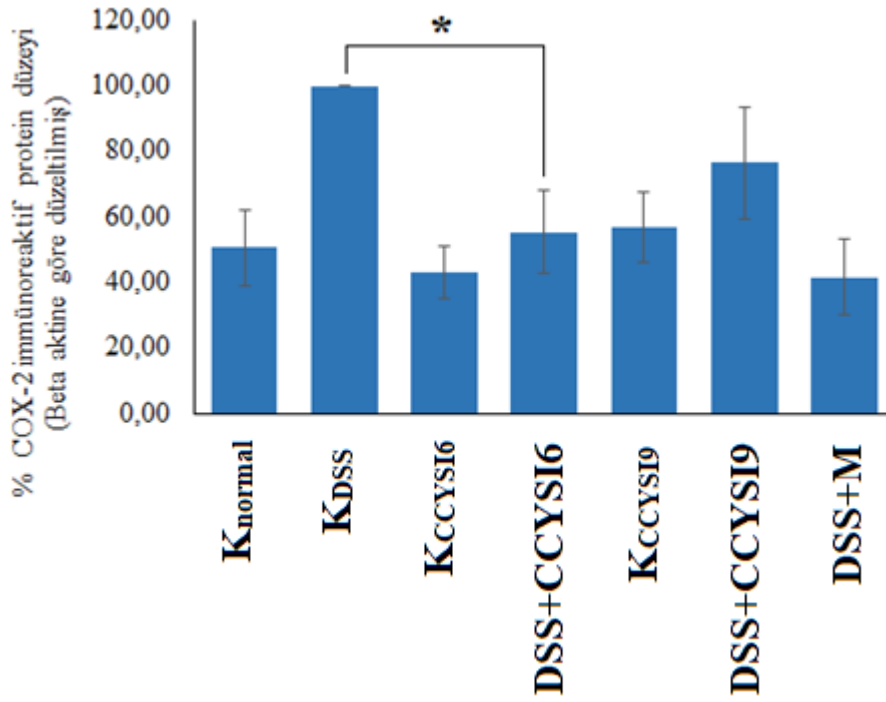
** $p < 0,05$ K_{DSS} grubuna göre anlamlı

4.4. Fare Kolon Dokularının Western Blot Analiz Sonuçları

COX-2 düzeylerinin değerlendirildiği Western Blot analiz sonuçlarına göre, immünoreaktif COX-2 düzeyinin, DSS uygulanmış kontrol grubunda (K_{DSS}) (% 100), kontrol (K_{normal}) (% 50,61) grubuna kıyasla anlamlı şekilde arttığı gözlenmiştir ($p = 0,017$). K_{normal} grubu (% 50,61) ile sadece % 6 (% 46,67) veya % 9 (% 56,97) CCYSI uygulanan gruplar arasında ise istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmadı. Sadece CCYSI6 uygulandığı grup (K_{CCYSI6}) (% 46,67), DSS ile birlikte CCYSI6 (% 55,4) uygulanan grup ile karşılaştırıldığında COX-2 düzeyinin her iki grup için de benzer olduğu belirlendi. K_{CCYSI9} (%46,67) grubu, DSS+CCYSI9 (%76,71) grubu ile karşılaştırıldığında, COX-2 düzeyinin DSS+CCYSI9 grubunda daha yüksek olduğu ancak bu farklılığın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı bulundu ($p=0,096$).

K_{DSS} ile DSS+CCYSI6 grubu (%55,46) ile karşılaştırıldığında, DSS grubunda artan COX-2 düzeyinin DSS+CCYSI6 grubunda anlamlı şekilde azaldığı saptanmıştır ($p=0,026$). Ayrıca, K_{DSS} grubuna (%100) kıyasla, COX-2 protein düzeyinin DSS+CCYSI9 grubunda da (%76,56) azaldığı ancak bu azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlendi ($p=0,167$). DSS+CCYSI6 (%55,46) grubu pozitif kontrol olarak kullanılan DSS+M (%41,59) grubu ile karşılaştırıldığında COX-2 düzeylerinin bu iki grupta benzer olduğu gözlemlendi ($p>0,05$) (Şekil 4-21; 4-23).

Western Blot analiz sonuçlarına göre, COX-2 düzeylerinin, DSS uygulaması ile belirgin şekilde arttığı belirlenmiştir. DSS'deki bu artış CCYSI6 uygulaması ile birlikte kullanılan pozitif kontrole benzer bir şekilde baskılanmıştır. Diğer yandan, sayısal değerler açısından DSS ile birlikte CCYSI9 uygulanan grupta da istatistiksel olarak anlamlı olmasa da bir inhibisyon gözlenmiştir. CCYSI6, CCYSI9'a kıyasla COX-2 düzeyini daha etkin bir şekilde baskılayarak antiinflamatuvar etki gösterdiği saptanmıştır.



Şekil 4-21: DSS ile oluşturulan ülseratif kolite, CCYSI6, CCYSI9 ve mesalaminin, COX-2 immünoaktif protein düzeyleri üzerine etkileri.

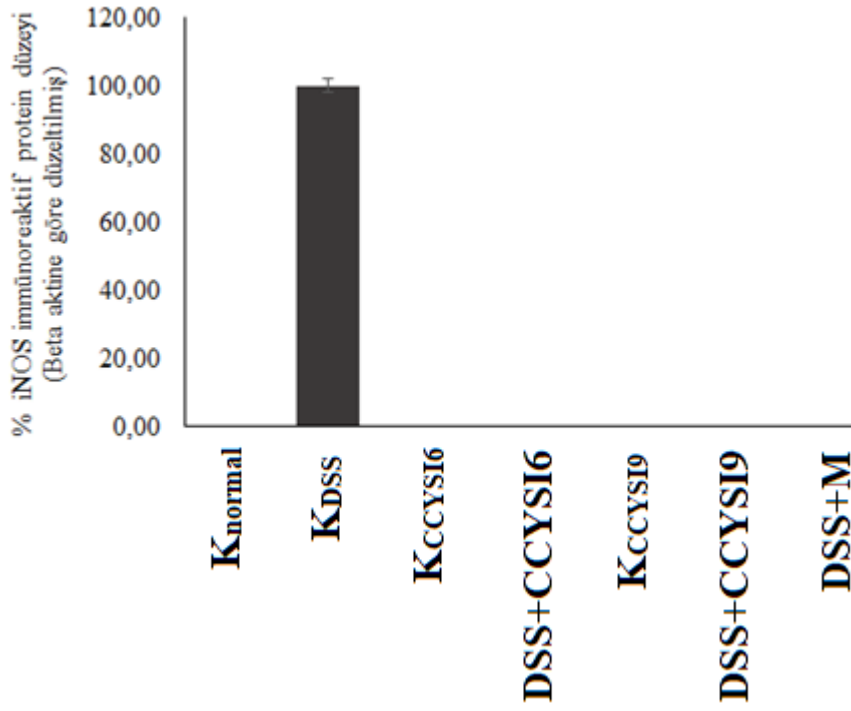
İmmünoaktif protein düzeyi %K_{DSS} olarak ifade edilmiştir.

İnternal kontrol olarak Beta-aktin kullanılmıştır.

*İstatistiksel değerlendirmede Bağımsız T-test kullanılmıştır, $p < 0,05$.

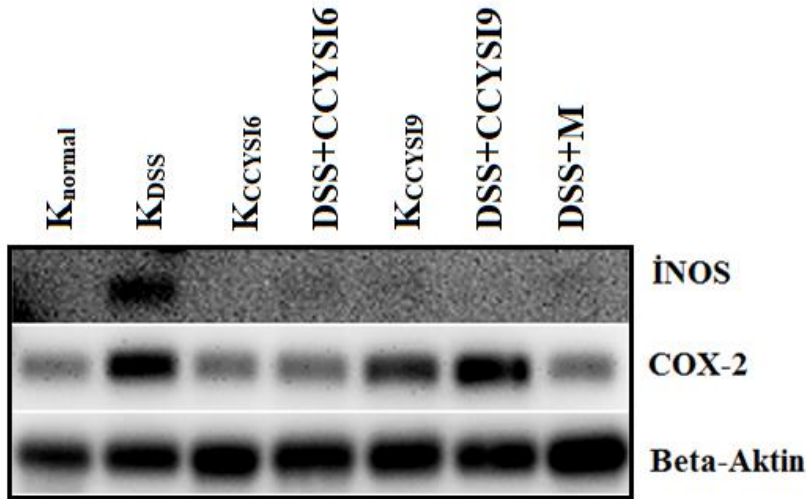
iNOS immünoaktif protein düzeyleri incelendiğinde, K_{normal} grubunda herhangi bir immünoaktif iNOS düzeyi saptanmadı. Buna karşın, iNOS immünoaktif protein düzeyinin sadece DSS uygulanmış grupta (%100), normal kontrole kıyasla arttığı belirlendi. DSS uygulaması ile gözlenen bu artışın DSS+CCYS6 ve DSS+CCYS9 gruplarında belirgin bir şekilde baskılandığı gözlemlendi (Şekil 4-22; 4-23).

Sonuç olarak iNOS düzeylerinin de COX-2 düzeylerine benzer şekilde DSS uygulaması sonucunda belirgin şekilde arttığı belirlenmiştir. Ayrıca, DSS uygulaması ile gerçekleşen iNOS protein indüksiyonunun hem CCYSI6 hem CCYSI9 uygulaması ile inhibe edildiği gözlenmiştir. Bu sonuçlara göre, CCYSI6 ve CCYSI9'lerin inflamatuvar cevap ile artan iNOS düzeyini baskılayarak antiinflamatuvar etki gösterdiği belirlenmiştir.



Şekil 4-22: DSS ile oluşturulan ülseratif kolite, CCYSI6, CCYSI9 ve mesalaminin, iNOS immünoreaktif protein düzeyleri üzerine etkileri.

İmmünoreaktif protein düzeyi % K_{DSS} olarak ifade edilmiştir. Internal kontrol olarak Beta-aktin kullanılmıştır.



Şekil 4-23: DSS ile oluşturulan ülseratif kolite, CCYSI6, CCYSI9 ve mesalaminin COX-2 ve iNOS immünoreaktif protein bantları üzerine etkileri.

İnternal kontrol olarak Beta-aktin kullanılmıştır.

4.5. Histopatolojik Bulgular

Normal kontrol grubu farelerin kolon kesitlerinde sağlıklı histolojik görünüm gözlenmiştir. Kontrol grubunda inflamasyon, nekroz, ödem gibi bulgulara rastlanmamıştır (Şekil 4-24).

% 6 CCSI verilen kontrol kolon kesitlerinde sağlıklı histolojik görünüm gözlenmiş ve kontrol grubu bireylerin kesitlerinde olduğu gibi herhangi bir histolojik hasar bulgusuna rastlanmamıştır (Şekil 4-25).

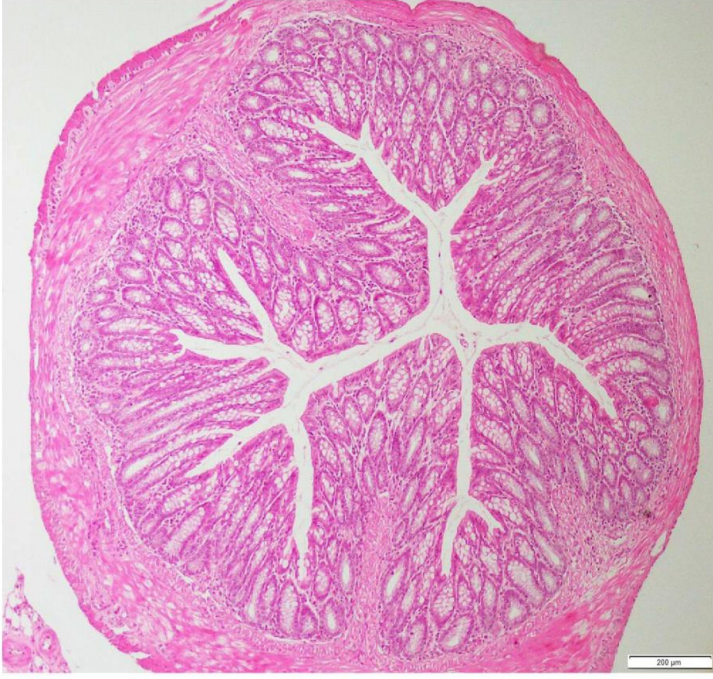
% 9 CCYSI verilen kontrol bireylerin kolon kesitlerinde mukozada hafif inflamasyon ve bazı bireylerde hafif nekroza rastlanmıştır (Şekil 4-26).

DSS verilen kolit grupundaki farelerin kolon kesitlerinde, kontrol grubu farelere göre belirgin histolojik hasar tespit edilmiştir. DSS verilen grupta, mukoza ve submukozada yaygın ve şiddetli olarak gözlenen inflamatuvar hücre infiltrasyonu ve inflamasyon, yaygın submukozal ödem, yüzey epitelinde dökülme ve kayıplar, yaygın kript kaybı ve vakuolar hidropik dejenerasyon ile nekroz gözlenmiştir (Şekil 4-27).

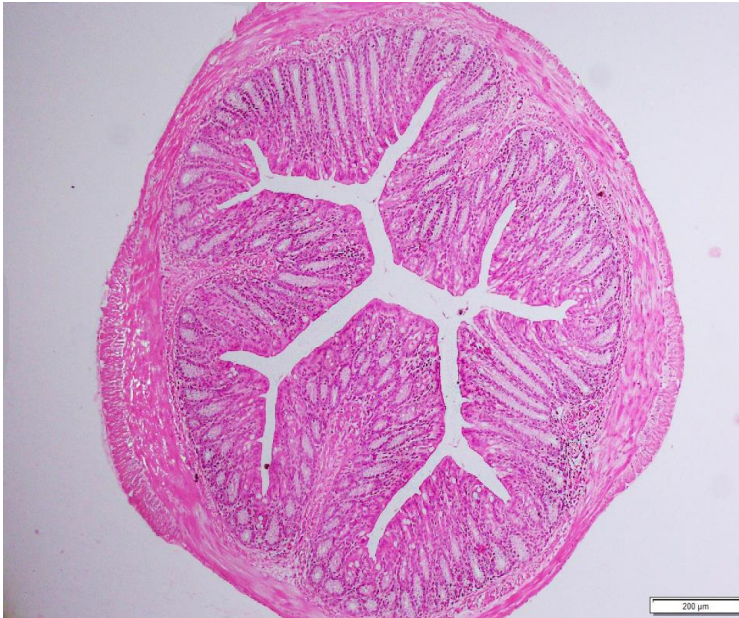
DSS ile birlikte CCYSI6 uygulaması yapılan gruba ait farelerin distal kolon kesitlerinde DSS kolit grubuna göre, histolojik hasarın belirgin olarak azaldığı tespit edilmiştir. Bu grupta, hafif şiddette inflamatuvar hücre infiltrasyonu ve bazı hücrelerde vakuolar hidropik dejenerasyon gözlenmiştir. DSS verilen grupta gözlenen şiddetli dejeneratif hasar bulgularına ve nekroza rastlanmamıştır (Şekil 4-28).

DSS ile birlikte CCYSI9 verilen grupta ise hemen hemen her bireyin kolon mukozasında hafif şiddette nekroz ve inflamasyon bulgularına rastlanmıştır. Ayrıca bu gruba ait bazı bireylerde ise submukozada hafif ödem ve vakuolar hidropik dejenerasyon da gözlenmiştir (Şekil 4-29).

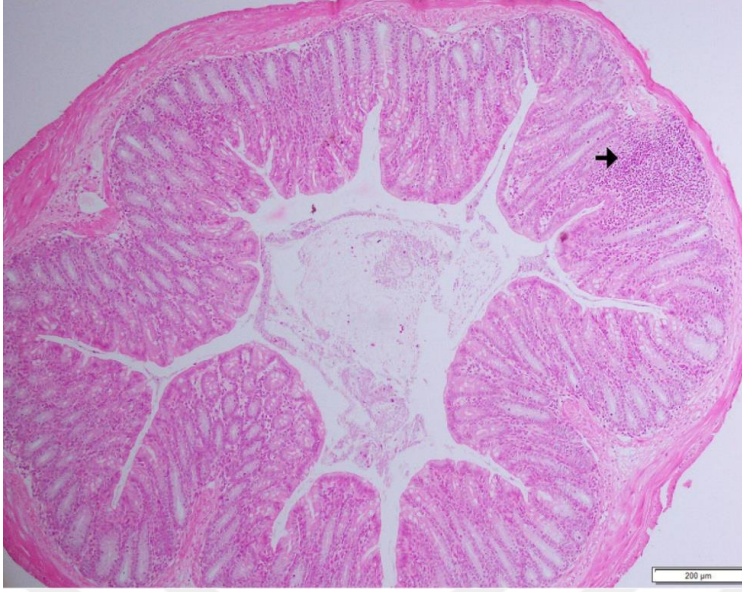
DSS ile birlikte mesalamin uygulanan grupta kolit hasarı DSS verilen gruba göre azalmasına rağmen, mukozada şiddetli ve yaygın inflamatuvar hücre infiltrasyonu ve submukozada şiddetli ödem bulguları gözlenmiştir. Ayrıca, bazı bireylerde yer yer kript kaybı, vakuolar hidropik dejenerasyon ve nekroza da rastlanmıştır (Şekil 4-30).



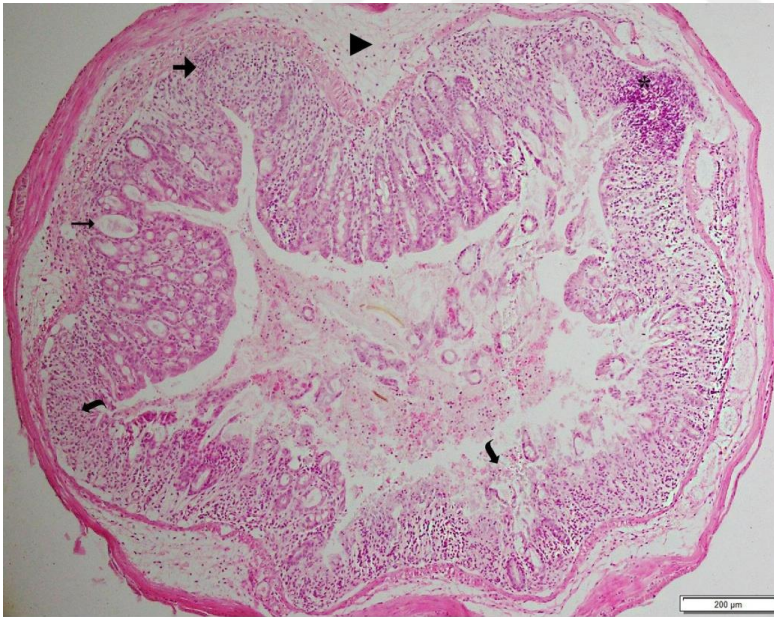
Şekil 4-24: Kontrol grubuna ait kolon dokusunun genel histolojik görünümü. HE.



Şekil 4-25: % 6 bitki ekstresi verilen kontrol grubuna ait farenin kolon kesiti. HE.



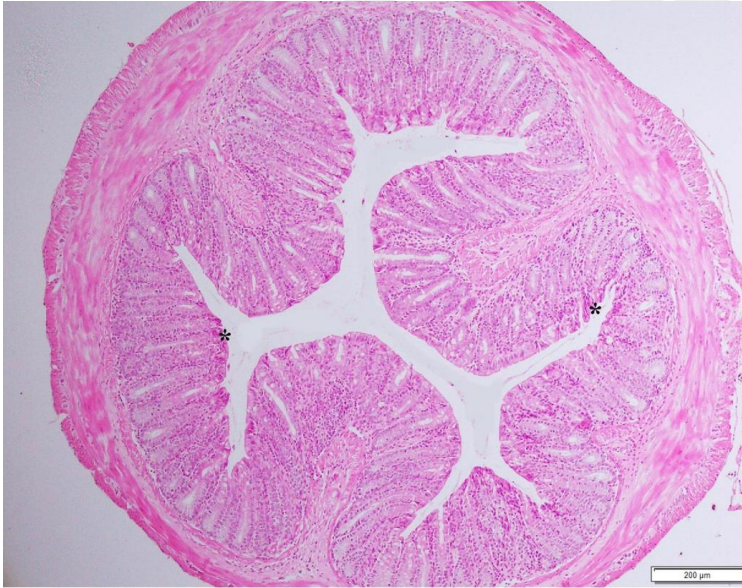
Şekil 4-26: % 9 bitki ekstresi verilen kontrol gruba ait farenin distal kolon kesiti. Hafif şiddette inflamatuvar hücre infiltrasyonu (➡) gözlenmektedir. HE.



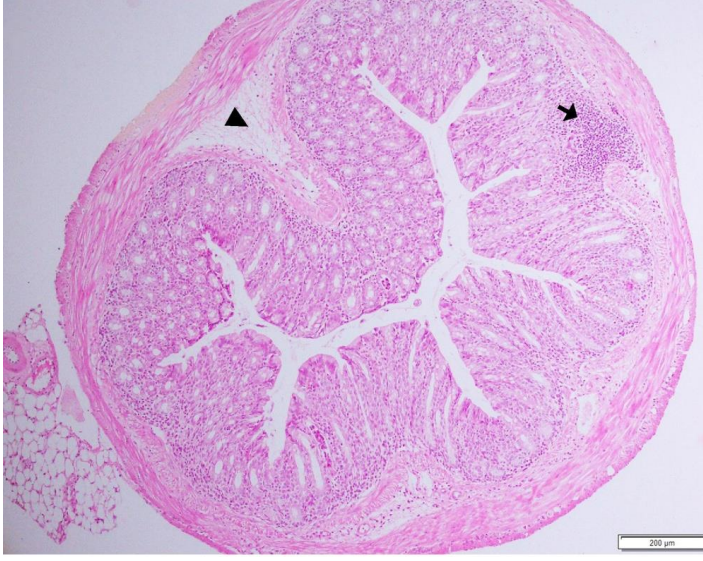
Şekil 4-27: DSS verilen kolit grubuna ait bireyin kolon kesidinin genel histolojik görünümü. inflamatuvar hücre infiltrasyonu (➡), submukozada ödem (▶), nekrotik alan (*), kript hücrelerinde görülen vakuolar hidropik dejenerasyon (➡), tamamen bozulmuş kript yapısı ve yüzey epitelinde kayıplar (↪) gözlenmektedir. HE.



Şekil 4-28: DSS ile birlikte CCYSI6 uygulanmış grubuna ait farenin kolon kesidinin genel görünümü. Hafif şiddette inflamatuvar hücre infiltrasyonu (→). HE.



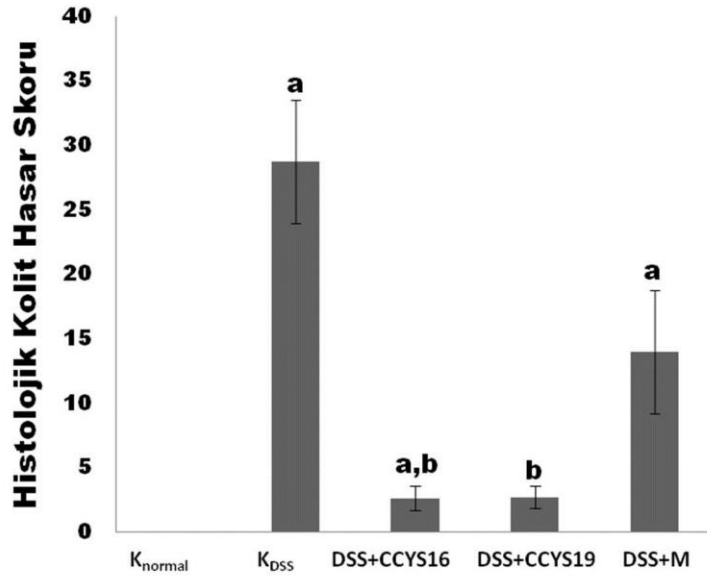
Şekil 4-29: DSS ile birlikte CCYSI9 uygulanmış gruba ait farenin kolon kesiti. Nekroza gitmekte olan hücreler (*). HE.



Şekil 4-30: Mesalamin + DSS grubuna ait bireyin kolon dokusunun histolojik görünümü. Şiddetli inflamatuvar hücre infiltrasyonu (→) ve submukozada ödem (▴) gözlenmektedir. HE.

4.5.1. Histolojik Kolit Skorlamasına Ait Bulgular

Dieleman ve arkadaşlarının (1998) kolit skorlama sistemine göre değerlendirilen histolojik skor bulguları Şekil 4-31’de verilmiştir. En yüksek kolit hasar skoru DSS kolit grubu farelerde tespit edilmiştir. Hem DSS grubunun hem de DSS ile birlikte mesalamin uygulanan gruplarına ait bireylerinin kolit skorunda kontrol grubuna göre anlamlı bir artış tespit edilmiştir ($p<0,05$). CCYSI6 uygulaması yapılan DSS grubu farelerin kolit hasar skorunda kontrol grubu farelere göre anlamlı bir artış ($p<0,05$), DSS kolit grubu farelere göre de anlamlı bir azalma ($p<0,01$) saptanmıştır. DSS ile birlikte CCYSI9 uygulanan gruba ait bireylerin histolojik hasar skorlarında DSS kolit grubu bireylere göre anlamlı bir azalma tespit edilmiştir ($p<0,01$).



Şekil 4-31: Gruplara göre histolojik kolit hasar skoru (Ortalama± standart hata).

Kontrol: 0 ± 0, DSS: 28,75 ± 4,76, %6B+DSS: 2,66 ± 0,95, %9B+DSS: 2,71 ± 0,86, ASA+DSS: 14 ± 4,81

^aKontrol grubundan farklı (p<0,05)

^bDSS grubundan farklı (0,01)

5. TARTIŞMA

C. coggygia'nın antioksidan ve antiinflamatuvar etkilerini dikkate alarak yapmış olduğumuz bu çalışmada farelerde DSS ile indüklenen ülseratif kolit modeli oluşturarak gelişen kolit hasarı üzerine *C.coggygia*'nın % 6 ve % 9'luk sulu infüzyonunun etkileri, mesalamin ile karşılaştırarak değerlendirilmiştir.

Bu çalışmada ilk başta *C. coggygia* sulu infüzyonunun etkinliğini araştırmak üzere, uygulanan infüzyon dozunun seçiminde, % 5'in üzerinde uygulanan dozların genotoksik olduğunu gösteren çalışmalar dikkate alınarak, biri % 5'in altında diğeri ise % 5'in üzerinde olmak üzere % 3 ve % 6 dozların uygulanması planlanmıştır. Fakat % 6'lık doz ile yapılan çalışmalarda elde edilen biyokimyasal değerlendirmede AST ve ALT değerlerinde herhangi bir sapma görülmediği ve histopatolojik değerlendirmede bitkinin toksik etkisi sonucunda oluşabilecek bir hasar tespit edilmediği için, % 3 dozunun yerine % 9'luk dozunun uygulanmasına karar verilmiştir.

DSS ile oluşturulan deneysel kolit modeli, insandaki inflamatuvar barsak hastalığının bulgularına benzer klinik ve histopatolojik tablonun görülmesi nedeniyle potansiyel anti-inflamatuvar ilaçların farmakolojik analizinde kullanılmaktadır (Ahn ve Kim, 2018). DSS'nin molekül ağırlığı, dozu ve uygulama süresi dikkate alınarak, C57BL/6 farelere % 3 DSS (w/v)'nin 3. gününden itibaren 5 gün boyunca oral olarak verilmesi sonucunda ağırlık kaybı ve kanlı dışkı ile kendini gösteren akut kolit hasarı oluşturulmuştur. 7. günde, sakrifikasyon işlemi sonrası doku örnekleri alınarak yapılan histopatolojik incelemelerde, DSS kontrol grubunda kript epitelinin nekrozu, inflamatuvar hücre infiltrasyonu, yaygın submukozal ödem durumları tespit edilmiş ve bulgular literatürle uyumlu bulunmuştur (Chen ve ark., 2013; Rodriguez-Canales ve ark., 2016; Chaudhary ve ark., 2017; Muthas ve ark., 2017). Sağlıklı kontrol grubuna en yakın sonuçlar DSS ile birlikte CCYSI6 uygulanan grubu olduğu belirlenmiştir. Tüm histopatolojik parametreler bir arada değerlendirilerek toplam histolojik skor ortalamaları hesaplanmış ve gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar saptanmıştır. En yüksek skorun DSS kontrol grubuna ait olduğu ve bu değer diğer gruplara göre istatistiksel olarak önemli derecede yüksek olduğu görülmüştür ($p<0.05$). DSS ile birlikte CCYSI6, CCYSI9 ve mesalamin uygulanan gruplarında görülen doku

hasarının, DSS kontrol grubuna kıyasla önemli derecede azaldığı saptanmıştır ($p<0.05$). Sağlıklı kontrol grubuna en yakın skorun, CCYSI6 uygulanan grup olduğu belirlenmiştir. DSS ile birlikte CCYSI6 ve CCYSI9 uygulanan gruplara ait skorun, DSS ile birlikte mesalamin uygulanan gruba kıyasla istatistiksel olarak önemli derecede düşük olduğu saptanmıştır ($p<0.05$). Bu verilere dayanarak *C. coggygia* infüzyonunun verilmesinin, kolon dokusundaki histopatolojik hasarın azaltılmasında etkili olduğunu ortaya koymuştur.

% 3'lük DSS ile indüklenen akut kolitte HAI'nin tüm bireylerde 3'ün üstünde seyrettiği, kolon uzunluğunda ise kontrol bireylere oranla belirgin azalmanın olduğu, kilo kaybı, diyare, dışkıda kan gibi ülseratif kolit'te görülen klinik semptomlar gözlenmiş ve bu bulgular literatürle uyumlu olarak bulunmuştur (Chen ve ark.,2013; Rodriguez-Canales ve ark., 2016; Chaudhary ve ark., 2017; Ahn ve Kim, 2018; Zhu ve ark., 2019). CCYSI9 ve mesalaminin uygulandığı kolit grubundaki farelerde kilo kaybının DSS kontrol grubuna göre de daha belirgin olması ve bu kaybın çalışmanın ilerleyen günlerinde de devam etmesi CCYSI9 ve mesalaminin toksik etkili olduğunu düşündürmüştür.

UK hastaların biyopsi örneklerinde artmış lipid peroksidasyon ürünlerinin ve reaktif oksijen türlerinin mukozal üretiminin tespit edilmesinden sonra UK patogenezinde ROT'ların rolü ile ilgili araştırmalar önem kazanmıştır (Krieglstein ve ark., 2001; Chu ve ark., 2004). Reaktif oksijen ve nitrojen türlerindeki artış ve savunma sistemlerindeki bir yetersizlik vücuttaki antioksidan dengesinin bozulmasına ve "oksidatif stres" koşullarının oluşmasına neden olmaktadır. UK'te dolaşımda bulunan nötrofiller tarafından salgılanan toksik oksijen veya nitrojen metabolitleri, epitel dokusu hasarın ortaya çıkmasına neden olan inflamatuvar cevap oluşumunda görev aldıkları bildirilmiştir.

Kolon enterositleri, serbest oksijen veya nitrojen radikallerine karşı NO, GSH, SOD, CAT, GR ve GPx gibi önemli hücre içi antioksidan savunma sistemlerini içermektedir (Piechota-Polanczyk ve Fichna, 2014). Süperoksit radikalın oluşturabileceği hasara karşı savunmanın ilk hattında SOD yer almaktadır (Kruidenier ve ark., 2003). İnsan hücrelerinde SOD'un üç izoformu bulunmaktadır; SOD1 (Cu/Zn-SOD sitozolde bulunur), SOD2 (Mn-SOD mitokondride bulunur) ve SOD3 veya ECSOD (Cu/Zn-SOD ekstrasellüler aralıkta bulunur). SOD'ların % 70'inden sorumlu

olan SOD1, süperoksit anyonunu dismutasyona uğratarak organizmayı korumaktadır. İBH patogenezinde reaktif oksijen türlerinin oluşumunu ve bunların meydana getirdiği hasarı önlemek için total SOD aktivitesinin arttığı bildirilmiştir (Tian ve ark., 2017). İBH ile yapılan klinik çalışmalarda üç SOD izoformlarının farklı ekspresyonu gözlenmiştir. CH ve UK hastalığında inflame mukoza epitelinde artmış Mn-SOD ve azalmış Cu/Zn-SOD ve EC-SOD seviyeleri bildirilmiştir (Kruidenier ve ark., 2003). Total SOD aktivitesinin İBH patogenezinde gelişen oksidatif stres ve inflamasyona cevap olarak arttığı ve bu nedenle oksidatif belirteci olarak kullanılabileceği bildirilmiştir (Tian ve ark., 2017).

İnflame dokularda $O_2^{\cdot-}$ ve $NO^{\cdot}$ radikallerin etkileri, bozulmuş endotel-bağımlı vazodilatasyon cevabı, nükleer transkripsiyon faktörlerini uyarak inflamatuvar sitokinlerin üretimi, lökositlerin aktivasyonu ve biraraya toplanmalarının artması, apoptozun hızlanması ve parenkimal hücre nekrozu şeklinde ortaya çıkmaktadır. Vasküler endotelyum tarafından üretilen NO ve süperoksit radikali etkileşiminin vasküler tonüs düzenlenmesi ve kan basıncı üzerine yararlı etkilerinin yanı sıra SOD tarafından NO'nin sitotoksik ve proinflamatuvar NO'e redüklenmesinden dolayı iki radikalın arasındaki fizyolojik dengenin önemli olduğu ve bu dengenin bozulmasının, inflamasyonu arttırdığı ileri sürülmüştür. Krieglstein ve ark. (2001) tarafından bildirilen bir çalışmada iNOS ve CuZn/SOD enzimlerinin, farelerde DSS ile oluşturulan kolit patogenezinde çok önemli rolleri olduğu vurgulanmıştır.

İndirgenmiş glutatyon (GSH) içerdiği tiyol grubu aracılığı ile hücre içinde redoks potansiyeli yüksek bir ortam sağlayarak, hücreyi oksidatif hasarlara karşı korur. GSH, yüksek miktarda sitoplazmada (5-11 mM), nükleusta (3-15 mM) ve mitokondride (5-11 mM) bulunur (Piechota-Polanczyk ve Fichna, 2014). Glutatyon antioksidan sisteminde γ -glutamilsistein sentetaz, GR, GPx ve GST enzimleri görev alırlar. γ -Glutamilsistein sentetaz enzimi GSH'nin sentezinden, glutatyon redüktaz ise GSH'nin rejenerasyonundan sorumluyken, glutatyon peroksidaz ve glutatyon S-transferaz enzimleri ise GSH ile birlikte bağırsak mukozasındaki hidrojen peroksit ve diğer hidroperoksitlerin detoksifikasyonundan sorumludur (Aw, 2005; Guan ve Lan, 2018). Oksidatif stres sonucunda artan ROS ürünlerin detoksifikasyonu, glutatyonun indirgenmiş şeklinin (GSH) glutatyon peroksidaz tarafından oksitlenmiş dimer şekline (GSSG) dönüşümü ile sağlanmaktadır. Oksidasyon sonucunda oluşan GSSG (glutatyon

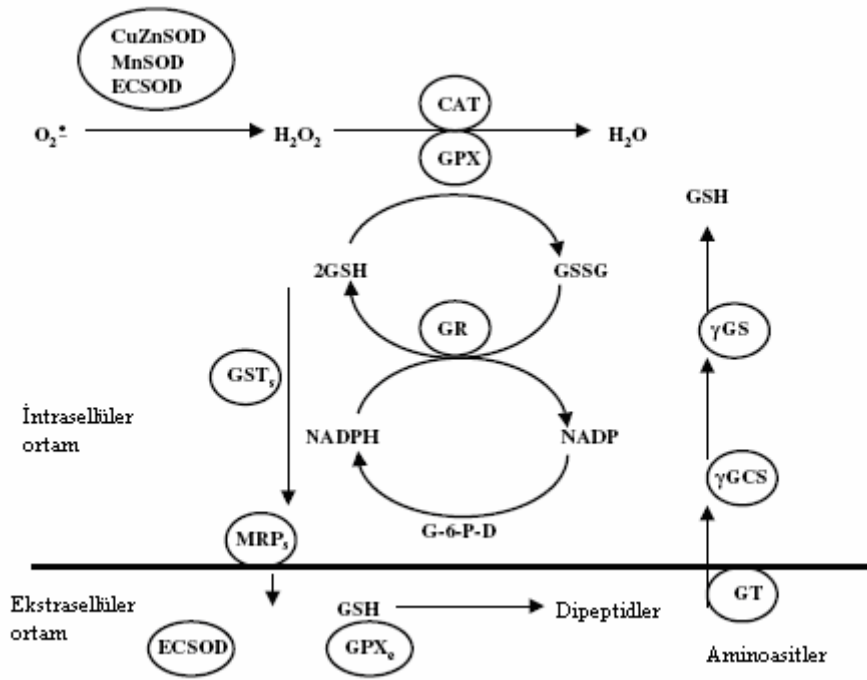
disulfit) ise glutatyon redüktaz enzimi aracılığıyla ile geri dönen bir siklusla GSH'a rejenere olmaktadır. Hücre, yüksek miktarda oksidana maruz kaldığında, GSSG oluşumu metabolik sınırını aşmakta ve oksidatif stres oluşmaktadır. GSH/GSSG oranının azalması doku hiperplazisi, mukozal inflamasyona ve UK'in klinik semptomlarına yol açmaktadır (Piechota-Polanczyk ve Fichna, 2014).

Bu çalışmada DSS ile indüklenmiş kolon hasarı sonucunda meydana gelen oksidatif stresin glutatyon antioksidan sisteminde yol açtığı değişiklikler incelemiştir. Kolon hasarı oluşumu sırasında ROT üretiminde meydana gelen aşırı artışa bağlı olarak DSS ile indüklenmiş kolit modellerinde doku GSH düzeylerinin azalması ile birlikte GR, GPx ve GST düzeylerinde azalma görüldüğü bildirilmiştir (Rodriguez-Canales ve ark.,2016; Chaudhary ve ark., 2017). Bu bilgilerin ışığı altında yaptığımız çalışmada DSS kontrol grubunda doku GSH, CAT, SOD, GR ve Gpx düzeylerinde azalma beklenirken en yüksek değerlere sahip olması, 7 günlük sürenin antioksidan parametrelere yansıyabilmesi için yetersizliğinden kaynaklı olabileceği, ayrıca toksik kimyasal ajanı olan DSS'nin organizmada inflamatuvar yanıtı başlatarak meydana gelen fazla oksidan üretiminin, antioksidan enzim sisteminin daha aktif çalışmasına neden olabileceği düşünülmektedir.

Glutatyon peroksidaz hidrojen peroksit varlığında indirgenmiş glutatyonun yükseltgenmesini katalize etmesi yanında, SOD tarafından oluşturulan hidrojen peroksiti mitokondri ve sitoplazmada su ve oksijene indirger. Katalaz ise SOD ile kombine bir şekilde etki ederek, SOD tarafından oluşturulan hidrojen peroksiti peroksizomlarda su ve oksijene çevirir. Kolon epitelinde ve lamina propriada eksprese olan katalaz enzimi, inflamasyon durumlarında yani H_2O_2 konsantrasyonu arttığında aktive olmaktadır. İnsanda glutatyon peroksidazın sekiz izoformu bulunmaktadır. GPX2 bağırsak epitelinde eksprese olan GPX2 oksidatif strese ve inflamasyona karşı koruyucu rolü olduğu bildirilmiştir (Tian ve ark., 2017).

Çalışmamızda kolon dokusunda, DSS kontrol grubunda normal kontrol gruba göre SOD düzeyinde belirgin artışlar olması, DSS ile oluşturulmuş kolon hasarına bağlı olarak oksidatif stresin geliştiğini göstermektedir. Ayrıca, katalaz ve GPx aktivite artışları olması SOD aktivitesi ile oluşan hidrojen peroksidin GPx ve katalaz enzimleri ile elimine edildiğini göstermektedir.

GSH'nun, GPx ve GST ile hidroperoksitlerin dekompozisyonunda birlikte görev almaları göz önünde bulundurulursa, çalışmamızda kolon dokusunda DSS kontrol grubunda, normal kontrol grubuna göre GST, GPx ile GSH düzeyinde anlamlı artış görülmesi ve bu artışın infüzyon alan fare gruplarında normal kontrol değerine yaklaşması, *C. coggygia* infüzyonun oksidatif strese karşı organizmayı toksik radikallere karşı koruduğunu düşündürmektedir (Şekil 5-1).



Şekil 5-1: Glutasyon antioksidan sistemi

DSS ile birlikte CCYSI6 ve CCYSI9 de alan fare gruplarında kolon lipid peroksidasyonun son ürünü olan MDA düzeyinde belirgin azalma olması, ancak bunun normal kontrol seviyesine inmemesi, oksidatif stresin azaldığını, ancak tamamen ortadan kalkmadığını düşündürmektedir. MDA, birçok DSS ile indüklenmiş ülseratif kolit çalışmada yüksek bulunmuştur (Yao ve ark., 2010; Yeom ve Kim, 2015; Chaudhary ve ark., 2017).

Nötrofil infiltrasyonun duyarlı bir göstergesi olan MPO aktivitesi, birçok çalışmada gelişen akut kolon hasarı ile ilişkili bulunmuştur.

Bu çalışmada, DSS ile birlikte CCYSI ve mesalamin uygulanan fare gruplarında, kolon dokusunda artmış inflamasyon ve nekrozun bir göstergesi olan MPO enzim

aktivitesinin, sadece DSS uygulanan kontrol grubuna göre, istatistiksel olarak anlamlı olarak düşük olması ve elde ettiğimiz değerlerin normal kontrol grubundaki değere kadar düşmesi CCYSI ve mesalaminin DSS kaynaklı kolon hasarını engelleyici etkisi olduğunu göstermektedir.

NO, NADP'a ihtiyaç duyan nitrik oksit sentaz (NOS) enzimin katalitik etkisiyle, L-arginin amino asidinin terminal nitrojenin oksidasyonu sonucunda oluşan bir radikaldir. Sitozolik bir enzim olan NOS'un üç izoformu bulunmaktadır; nöronal (nNOS) ve endotel (eNOS) hücrelerinde az miktarda devamlı sentezlenen konstitüsyonel NOS (cNOS) ve sitokinler, bakteri ürünlerin etkisiyle indüklenebilen ve devamlı NO sentezinin yapılmasına sebep olan indüklenebilen NOS (iNOS). Kalsiyum ve kalmoduline bağımlı olarak çalışan cNOS'ın etkisiyle saniyeler veya dakikalar içinde çok düşük konsantrasyonda (nanomolar düzeyde) oluşan NO fizyolojik olaylarda görev alır. Kalsiyum ve kalmoduline bağımsız olarak etki eden iNOS ise uzun süre fazla miktarda NO oluşumuna yol açmaktadır. iNOS'un aktivitesi gen transkripsiyonu ile düzenlendiği için etkisi birkaç saat sonra görülür ve 5 gün devam edebilir (Kolios ve ark., 2004).

eNOS'un etkisiyle oluşan NO, çözünür guanilat siklazı aktive ederek vasküler tonüsün düzenlenmesinde, lökosit adezyonu ve trombosit agregasyonunun inhibisyonunda görev alan sitozolik siklik guanozin monofosfat (cGMP) miktarını artırır. eNOS'un etkisiyle oluşan NO, mikrovasküler ve epitel permeabilitenin düzenlenmesi, uygun perfüzyonun korunması gibi gastrointestinal mukozanın birçok önemli fonksiyonunun homeostatik düzenlenmesinde görev almaktadır. Ayrıca NO'in, immün hücreleri üzerinde olan etkisi inflamatuvar yanıt aracılı doku hasarına karşı koruyucu etkisini açıklayabilir. Devamlı sentezlenen NO, nötrofil $\beta 2$ integrin fonksiyonunu inhibe eder, endotelial P-selektin ekspresyonunu azaltır, IL-8 ve MIP-1 (makrofaj inflamatuvar protein-1) gibi kemokinlerine karşı kemotaktik cevabı baskılar (Kolios ve ark., 2004).

iNOS'un arttırıcı düzenlenmesi (up-regülasyonu) ile oluşan aşırı miktarda NO sitotoksik radikallerin oluşumuna yol açarak doku hasarının artmasına katkıda bulunur. NO'in süperoksitle reaksiyona girerek doku hasarını arttıran son derece toksik ve reaktif bir radikal ve nötrofiller için güçlü bir kemotaktik ajan olan peroksinitritlerin oluşumuna neden olur. Süperoksit radikalın ve NO'in üretiminin artması, peroksinitrit oluşumunu sitotoksik seviyelere gelecek kadar arttırabilir. İnflamasyon durumlarında

iNOS aracılı NO'nin aşırı üretimi transkripsiyon faktör NF-kB'yı arttırarak DNA onarımında rolü olan ve nükleer bir enzim olan PARP'ın (Poly ADP-Ribose-Polymerase) aktivasyonu sonucu DNA'da kırıkların artmasına ve hücre ölümüne neden olabilir. NF-kB aktivasyonu, inflammatuar sinyal yollarının uyarılmasını ve proinflammatuar sitokinlerin salınımını tetikleyebilir (Kolios ve ark., 2004). Birçok çalışmada NO'nin aşırı üretiminin intestinal inflamasyonda görevli olduğu ve inhibisyonunun inflammatuar hasarı azaltabileceği bildirilmiştir (Mei ve ark., 2005; Wang ve ark., 2010).

Fare kolit modellerinde NO serbestlenmesindeki artış, artmış iNOS ekspresyonu ile ilişkilendirilmiştir. Asetik asit ile indüklenmiş UK olgularında NO'nin proinflammatuar etkisinin, artmış iNOS ekspresyonu ve NO'nin mikromolar düzeyinde artışı ile ilişkili olabileceği bildirilmiştir (Sakthivel ve Guruvayoorappan, 2014). iNOS'un de novo sentezini selektif olarak inhibe eden aminoguanidin, N^G-nitro-L-arginin metil ester (L-NAME) ve N^G-monometil-L-arginin (L-NMMA) gibi L-arginin analogları veya N-[3-(aminometil)benzil] asetamidin ile histolojik hasarlanma derecesinin önemli oranda düzeltildiği bildirilmiştir (Rachmilewitz ve ark., 1995; Kolios ve ark., 2004). Birçok çalışmada iNOS inhibisyonunun akut kolon hasarını azaltabileceği ileri sürülmüştür (dos Reis ve ark., 2009).

Kolon dokusundaki epitelyal iNOS ekspresyonunu Western blot yöntemi ile değerlendirdiğimiz bu çalışmada DSS grubunda ileri derecede iNOS ekspresyonu saptanırken, DSS ile birlikte CCYSI ve mesalamin uygulanan gruplarda iNOS ekspresyonunun belirgin bir şekilde baskılandığı gözlenmiştir.

iNOS ekspresyonun artması sonucu DSS kontrol olgularda NO doku seviyelerinin normal kontrol grubuna göre artmış bulunması ve CCYSI ile mesalamin verilen gruplarda anlamlı olarak azaldığının gözlemlenmesi, her ikisinin de olumlu etkisinin bir göstergesidir.

Yapmış olduğumuz bu çalışmada, DSS ile kolit indüklenmesi sonrası kolon hasarı gelişen olgularda, infüzyon ve mesalamin verilmesi ile iNOS aktivitelerinde ve NO seviyelerinde anlamlı azalmalar saptanmış olup, bu sonuç *C. coggigria* bitkisinin kolon hasarında çok önemli rolleri olan artmış NO'nin zararlı etkilerine karşı koruyucu etki gösterebileceği düşündürmektedir. Bu düşünce, DSS ile birlikte CCYSI uygulanan gruplarında, iNOS aktivitesindeki ve NO seviyelerindeki azalmalar ile korele olarak

histopatolojik düzelmelerin saptanması ile de desteklenmektedir. Benzer sonuçlar Li ve ark. (2008) ve Wang ve ark. (2010) tarafından bildirilmiştir.

UK gelişiminde ROT etkisiyle salgılanan proinflamatuvar sitokinler, COX-2'nin ekspresyonuna neden olurlar. COX-1 mRNA'sı fizyolojik süreçlerde sürekli şekilde eksprese edilirken, COX-2 ekspresyonunun UK olgularda inflame kolon dokusunda sıklıkla arttığı gösterilmiştir (Singer ve ark., 1998). İnflame dokularda PGE2 üretiminden COX-2 sorumlu olduğu bildirilmiştir (Sklyarov ve ark., 2011). PGE2'nin, nötrofiller için güçlü bir kemoatraktan olan IL-8'in mRNA ekspresyonunu ve IL-8 sekresyonunu arttırdığı ve bu nedenle kolon hasarında proinflamatuvar rolü olduğu bildirilmektedir (Dey ve ark., 2006). Diğer bir çalışmada ise PG reseptörlerinden ER4'ün agonisti kullanılarak bir anti-inflamatuvar sitokin olan IL-10'un salgılanmasını arttırmak suretiyle DSS ile indüklenen hasarın azaldığı bildirilmiştir (Nitta ve ark., 2002). Yaptığımız çalışmada DSS kontrol grubunda COX-2 ekspresyonunda ve PGE2 miktarında anlamlı artışlar gözlenmiştir. Bu bulgular yapılan diğer çalışmalar ile uyumlu bulunmuştur (dos Reis ve ark., 2009; Abdel-Aziz ve ark., 2013; Rocha ve ark., 2019). COX-2 ve PGE2 düzeylerindeki en az artışın ise DSS ile birlikte CCYS16 grubunda olduğu görülmüştür.

Ülseratif kolit modellerinde aktif makrofajlar tarafından salınan sitokinlerin inflamasyonlu dokuda miktarlarının artması lokal iskemiye ve epitelyal hücre permeabilite artışına yol açar. Yapılan birçok çalışmada, DSS uygulanması ile güçlü kemotaktik ajan oldukları bilinen ve inflame kolon mukozasına nötrofil infiltrasyonundan sorumlu olan TNF- α , IL-1 β ve IL-8 gibi proinflamatuvar sitokinlerin değerlerindeki artışın, sağlıklı kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak önemli miktarda yüksek olduğu belirtilmiştir. Funakoshi ve ark. (1995), ülseratif kolitli hastaların mukozal lezyonlarında RT-PCR kullanarak, interlökin-1 β , interlökin-6, TNF- α 'nın artmış mRNA seviyelerini tespit etmişler ve adı geçen proinflamatuvar sitokinlerin ülseratif patogenezinde önemli rol oynayabileceğini ileri sürmüşler. Melgar ve ark. (2003) aynı metodu kullanarak ülseratif kolitli hastaların inflame mukozalarındaki T lenfositlerinden salgılanan sitokinlerden IL-10'nun mRNA miktarının en fazla olduğunu tespit etmişlerdir. Guimbaud ve ark. (1998) ülseratif kolitte en yüksek artış interlökin-1 β olmak üzere TNF- α , IL-6 ve IL-8 üretiminde de artma olduğunu tespit etmişlerdir. Szkaradkiewicz ve ark. (2009), inflamatuvar bağırsak hastaların ve normal kontrollerin dolaşımındaki inflamatuvar sitokinler ile IL-10 seviyelerini karşılaştırmışlar ve ülseratif

kolitli hastaların inflamatuvar sitokin ve IL-10 seviyeleri, normal kontrollere göre yüksek bulunmuştur. UK ve CH arasındaki tek fark artmış TNF- α (CH) ve IL-10 (UK) seviyelerinde olduğu tespit edilmiştir. Yapmış olduğumuz bu çalışmada da, biyokimyasal incelemelerde TNF- α , IL-1 β , IL-6 ve INF- γ düzeyleri için yapılan istatistiksel analizinde, kolon dokusu TNF- α , IL-1 β , IL-6 ve INF- γ düzeylerinin en fazla DSS kolit grubunda arttığı gözlenmiştir. Bu aynı zamanda histopatolojik hasarın en fazla olduğu grup olarak belirlenmiştir. Bu bulgular DSS'nin sitokin düzeylerini arttırdığını, TNF- α , IL-1 β , IL-6 ve INF- γ kolon dokusu seviyeleri ile kolon hasarlanma derecesinin birbiri ile korele olduğunu bildiren çalışmalarla uyumlu bulunmuştur (Li ve ark., 2008; Wang ve ark., 2010; Rodriguez-Canales ve ark., 2016; Zhu ve ark., 2019). DSS ile birlikte CCYSI6 uygulanan grubunda kolon dokusunun TNF- α , IL-1 β , IL-6 ve INF- γ düzeylerinin en düşük seviyelerde olduğu ve bu düşüş ile korele olarak kolon dokusundaki histopatolojik hasarın düzeldiği ve sonuçların normal kontrol değerine ulaştığı belirlenmiştir. Bunun yanı sıra; IL-10 düzeyleri incelendiğinde, DSS kontrol grubuna göre CCYSI verilen gruplarda IL-10 seviyelerinin yüksek olduğu gözlenmiştir. Bu bulgular, DSS ile oluşturulan kolon hasarında *C. coggygia*'nın inflamatuvar reaksiyonların başlangıç aşamasında rol oynayan TNF- α , IL-1 β ve IL-6 gibi proinflamatuvar sitokinlerin salınımını baskılanmada etkili olduğu ve IL-10 anti-inflamatuvar sitokin üretimini arttırarak inflamatuvar cevabını azaltarak etkisini gösterdiği görüşünü desteklemektedir.

Kolon hasarının ortaya çıkmasına neden olan inflamatuvar cevap oluşumunda, nötrofiller tarafından salgılanan toksik oksijen metabolitlerinin ve serin proteazların, matriks metaloproteinazların ve miyeloperoksidazın önemli rolü olduğu bildirilmektedir (Muthas ve ark., 2017).

iNOS kaynaklı NO, hücre içi adezyon moleküllerinin ve P-selektinin sentezini uyararak nötrofillerin infiltrasyonunu arttıran TNF- α üretimini tetikler (Yasukawa ve ark., 2012). Nötrofiller tarafından aktive edilen NF- κ B, translokasyon ile nükleusa girerek DNA'ya bağlanır ve mukozal inflamasyonda görevli sitokinleri kodlayan genlerin ekspresyonunu uyarır.

DSS ile birlikte CCYSI6 grubunda, iNOS ekspresyonunun baskılanması yanı sıra, doku sitokin ve MPO aktiviteleri de kolit grubuna göre anlamlı miktarda azalmış olarak bulunmuştur. Bu verilere dayanarak, *C. coggygia* infüzyonunun iNOS aktivitesini azaltarak PARP aktivasyonunu engelleyebileceği düşünülmektedir.

Yapılan çok sayıda deneysel çalışmada, pek çok hayvan modelinde, serbest radikal üretimi, nötrofil infiltrasyonu ve proinflatuar sitokin üretimi üzerine etki eden ilaçların kullanımı ile UK şiddetinin azaltılabileceği bildirilmiştir (Piechota-Polanczyk ve Fichna, 2014). Bu nedenle inflamatuvar süreçte görev alan çok sayıda inflamatuvar mediyatör inhibitörlerin kullanımı ile kolon dokusunda oluşacak hasar engellenmeye çalışılmıştır. Mei ve ark. (2005), melatonin, TNBS/etanol ile indüklenmiş kolon dokusundaki hasarı azalttığını histopatolojik olarak doğrulamıştır. Kolgazi ve ark. (2007) tarafından bildirilen diğer bir çalışmada farelerde TNBS ile indüklenmiş kolit modelinde doğal bir antioksidan olan lipoik asidin kullanılması ile dokudaki lipid peroksidasyonun azaldığı, MPO aktivitesinin ve GSH miktarının arttığı gözlenmiştir. Bakteri ürünü olan ectoinin, deneysel olarak oluşturulmuş TNBS/ethanol hasarına bağlı olarak gelişen kolon inflamatuvar değişiklikleri önlemede etkili olduğu ve bu etkinin TNF- α , IL-1, ICAM-1, PGE2 ve LTB4 seviyelerinin azaltılmasına bağlı olarak meydana geldiği bildirilmiştir (Abdel-Aziz ve ark., 2013). NF- κ B aktivitesinin inhibisyonu, intestinal epitel hücrelerindeki Fas/FasL, BAX ve kaspaz-3 mRNA'larının ekspresyonunu azaltarak ve Bcl-2 aktive ederek hücre apoptozunu etkileyebilir. Apoptozun inhibisyonunun, epitel hücrelerinin aşırı kaybını önleyerek, intestinal hasara karşı koruduğu bildirilmiştir (Liu ve Wang, 2011). Üzüm çekirdeğinden izole edilen proantosiyanidinlerin inflamatuvar hücre infiltrasyonunu ve oksidatif stres hasarını inhibe ederek, farelerde TNBS ile indüklenmiş kolite karşı koruyucu etkisi olduğu bildirilmiştir (Wang ve ark., 2010; Li ve ark., 2008). Asetik asit ile deneysel kolon hasarı oluşturulmuş farelere zencefil ekstresinin uygulanması sonucunda MDA, TNF- α , PGE2 üretiminin ve MPO aktivitesinin inhibe edildiği ve antioksidan sisteminde artış gözlemlendiği rapor edilmiştir (El-Albhar, 2008). 2,4-dinitrobenzen sulfonik asid (DNBS) ile indüklenen kolit modelinde *Angelica sinensis* polisakkaridlerin oksidatif strese karşı koruyucu etkisi olduğu ve kolon hücrelerinde apoptozu azalttığı bildirilmiştir (Wong ve ark., 2008). Diğer bir çalışmada *Garcinia cambogia* ekstrenin farelerde TBNS ile oluşturulmuş kolit modelinde anti-inflatuar etkisi araştırılmış ve ekstrenin makroskopik hasarı önlemede etkili olduğu, artmış olan MPO aktivitesi ile PGE2 ve IL-1 β seviyelerini azalttığı, COX-2 ve iNOS ekspresyonunu baskıladığı sonucuna varılmıştır (Dos Reis ve ark., 2009). *Tanacetum parthenium* bitkisinden izole edilen ve bir seskiterpen lakton olan parthenolid'in uygulanmasının, DSS ile indüklenmiş kolit şiddetini histolojik hasar skorunu düşürerek azaltması, MPO aktivitesinin ve I κ B

proteinin fosforilasyona uğraması ve sonrasında parçalanarak ortamdaki uzaklaştırılmasının baskılanması ile fosfo-NF- κ B p65 ekspresyonunun ve dolayısıyla TNF- α ve IL-1 β üretiminin azaltılması ile sonuçlandığı bildirilmiştir (Zhao ve ark., 2012). Oksidatif stres NF- κ B yolağı aktive ettiği için, inhibisyonu ROS üretiminde azalmaya yol açar. NF- κ B yolağın aktivitesi, bütirat gibi kolon epitel hücreleri için enerji kaynağı olan bileşiklerden de etkilenebilir. CH hastaların kolon mukozası biyopsilerinde ve kolon epitel hücrelerinde bütiratın, LPS ile indüklenmiş ROS konsantrasyonunu ve NF- κ B, TNF- α , COX-2 ve ICAM-1'i kodlayan genlerin ekspresyonunu ve proteinlerin miktarını azalttığı bildirilmiştir (Russo ve ark., 2012). Diğer bir çalışmada bir triaçilgliserol olan tributirin'in verilmesi ile gözlenen redüklenmiş mukozal hasar ve nötrofil ile eozinofil infiltrasyonu, lamina propriada artmış Treg hücre sayısı ve TGF- β ve IL-10 miktarı ile ilişkilendirilmiştir (Leonel ve ark., 2012). Yağ asidi analogu olan tetradecylthioacetic acid (TTA)'in, TNF- α , IL-1 β , and IL-6'a ait mRNA seviyelerini azaltarak ve iNOS mRNA seviyelerini arttırarak iNOS aracılı PARP aktivasyonu ile inflamatuvar sürecin regülasyonunda rol oynayabileceği ve farelerde DSS ile indüklenmiş kolon hasarını azaltabileceği ileri sürülmüştür (Bjørndal ve ark., 2013). Diğer bir çalışmada kurkuminin, serbest radikalleri gidererek, MPO, COX-1, COX-2, LOX ve iNOS aktiviteleri ile TNF- α ve IFN- γ miktarlarını ve NF- κ B'yı inhibe ederek IBH tedavisinde etkili olduğu bildirilmiştir (Baliga ve ark., 2012). TNF- α , IL-1 β ve MDA seviyelerinin azalması ile MPO aktivitesinin baskılanması, moleküler hidrojen indükleyicisi olan laktulozun DSS ile indüklenmiş kolitli farelere uygulanması ile gözlenmiştir (Chen ve ark., 2013).

DSS ile indüklenen kolit modelinde, *Thymus serpyllum* ekstresi (Algieri ve ark., 2014), *Sasa quepaertensis* yaprak ekstresi (Yeom ve Kim, 2015), *Amphipterygium adstringens* (Rodriguez-Canales ve ark., 2016), *Lagerstroemia speciosa* yaprak ekstresi (Chaudhary ve ark., 2017), *Ricinus communis* kökü ekstresi (Saiyed ve ark., 2017), *Periplaneta americana* etanol ekstresi (Ma ve ark., 2018), *Gastrodia elata* (Ahn ve Kim, 2018), *Spirulina platensis* ekstresi (Morsy ve ark., 2019) gibi birçok bitkinin etkinliğini değerlendiren çalışmalarda, doku MPO ve sitokin düzeylerinde azalmaların yanı sıra kolon dokusundaki histopatolojik hasarın da anlamlı olarak düzeltildiği bildirilmiştir.

DSS uygulanması ile indüklenen kolon hasarının önlenmesinde doğal kaynaklı bileşiklerin etkinliğini değerlendirmek üzere yapılan çalışmalarda *Sophora flavescens*

kökünden ekstre edilen bir alkaloit olan oksimatrın (Zheng ve ark., 2005), resveratrol (Yao ve ark., 2010), naringenin (Azuma ve ark., 2013), paçuli alkolü (Qu ve ark., 2017), berberin hidroklorürün (Zhu ve ark., 2019), pterostilbenin (Shi ve ark., 2019) IL-6/STAT3/NF-κB sinyal yolağını inhibe ederek ve PPAR-γ ekspresyonunu arttırarak antiinflammatuar etki gösterdikleri bildirilmiştir.

İnsanlar üzerinde yapılan klinik araştırmalar sınırlıdır. Süperoksit oluşumunu azaltan allopurinolün, sulfasalazin veya kortikosteroidlerle kombine olarak verilmesiyle UK hastalarının tedavisinde olumlu sonuçlar elde edilmiştir. Asya'nın tropikal bölgelerinde yaygın olarak yetişen bir tıbbi bitki olan *Curcuma longa* ya da bilinen adıyla zerdeçal'dan izole edilen kurkuminin mesalamin ile beraber alınmasında da yararlı etki gözlenmiştir. Çiçekleri bisabolol, chamazulene, apigenin, luteolin gibi antioksidan ve anti-inflammatuar bileşikleri içeren papatya (*Matricaria chamomilla*), artemesini, myrcene ve kamfor içeren pelin otu (*Artemisia türleri*), rosmarinik asit, eriocitrin, luteolin ve terpenler içeren nane (*Mentha piperita*), *Aloe vera*, *Andrographis paniculata* ekstresi, bilberry, kırmızı biber, karnozin, ferrous fumarat, yeşil çay (epigallocatechin-3-gallate), kivi, damlasakızı reçinesi, N-asetil-L-sistein, TNF inhibitörü ve ksantin türevi olan oksipentifilin, nar (*Punica granatum*), psyllium (*Plantago ovata* tohumları), piknojenol, resveratrol (kırmızı şarap), süperoksit dismutaz ve tormentil (*Potentilla erecta*), çok doymamış yağ asitleri veya balık yağı ile yapılan randomize çift kör plasebo kontrollü klinik çalışmalar Khan ve ark. (2017) tarafından özetlenmiştir.

Sonuçlar

Bu çalışma, ülseratif kolit gibi inflammatuar bağırsak hastalıklarının önlenmesinde ve tedavisinde *C. coggia* bitkisinin terapötik bir ajan olarak kullanılabileceğini deneysel olarak doğrulayan ilk çalışma olma niteliğindedir.

Bu çalışmada:

- DSS ile kolit oluşturulmuş farelere CCYSI6'nın 7 gün boyunca verilmesinin, istatistiksel olarak anlamlı derecede kolon uzunluğunda bir artışa ve HAI'nin düşmesine neden olarak kolit oluşumunu engellediği gösterilmiştir.
- CCYSI6'nın, DSS uygulanan farelerde inflamasyon hasarının şiddeti ile paralel olarak yükselmiş olan MPO düzeyleri üzerinde sağladığı azalma ile mukozaya nötrofil infiltrasyonu ve histolojik hasar skorunu da önemli derecede azaltarak,

DSS'nin distal kolonda gelişen hasarı büyük ölçüde önleyerek kolon morfolojisini koruduğu histopatolojik olarak gösterilmiştir.

- Lipid peroksidasyonunun göstergesi olan MDA seviyelerinde, kolit grubundaki farelere oranla belirgin bir azalmaya neden olarak, DSS ile oluşan oksidatif hasara karşı koruduğu gözlenmiştir.
- Çalışmamızda, DSS kontrol grubunda, normal kontrol grubuna göre SOD, CAT, GST, GPx aktiviteleri ile GSH düzeyinde anlamlı artış görülmesi ve bu artışın infüzyon alan fare gruplarında normal kontrol değerine ulaşması, *C. coggygria* infüzyonunun oksidatif stresi azalttığı ve buna bağlı olarak antioksidan enzim aktivitelerinin histolojik hasarı ile korele olarak anlamlı bir şekilde düşüş gösterdiği sonucuna varılmıştır.
- Kolon dokusunda TNF- α , IL-1 β , IL-6 ve INF gibi pro-inflamatuar sitokinlerin salınımını azaltarak, IL-10 seviyesini arttırarak anti-inflamatuar etki gösterdiği ve kolon hasarına karşı koruyucu rol oynayabileceği gösterilmiştir.
- Western blot analizi ile inflammatuar cevabın daha ileri aşamada incelenmesinde, 7 günlük uygulamanın kolondaki iNOS ve COX-2 aktivitelerinde ve dolayısıyla NO ve PGE2 düzeylerindeki azalmalar ile korele olarak histopatolojik düzeltilmeler saptanmıştır.

Bu bulguların doğrultusunda CCYSI'nin anti-inflamatuar etkisinin ve dolayısıyla kolon harabiyetine karşı koruyucu etkisinin bulunduğu kanısına varılmıştır. Bunun yanı sıra %5'in üzerindeki dozların genotoksik oldukları gösteren çalışmalar dikkate alınarak, sağlıklı kontrol grubuna en yakın histolojik skoru ve iyileşmeyi sağlayan *C. coggygria*'nın %6'luk infüzyonunun, UK semptomlarını hafifletmede etkili olabileceğini göstermektedir. %9'luk infüzyonunun da etkili olduğunu ancak toksisiteye sebep olabileceği için risk oluşturabileceği düşünülmektedir.

Öneriler

Yeni ilaçların geliştirilmesinde doğal kaynaklardan elde edilen ilaç hammaddeleri ve ilgili bileşikler tercih edilmektedir. Yeni ilaçların keşfi ile uygulanan tedavi protokollerinde de hızlı değişiklikler olmaktadır ve inflamasyon tedavisine yeni açılımlar getirebilmektedir. Bu çalışmanın sonuçlarına dayanarak *Cotinus coggygia* bitkisinin kullanımının kolon hasarı ve inflamasyondan koruyucu etkili olduğu ve UK tedavisine katkıda bulunan tamamlayıcı bir ajan olarak kullanılabileceği kanısına varılmıştır. Ancak rutin uygulanacak bir protokol oluşturulması için klinik çalışmalara da ihtiyaç duyulmaktadır.



6. KAYNAKLAR

Abdel-Aziz, H., Wadie, W., Abdallah, D.M., Lentzen, G., Khayyal, M.T. (2013). Novel effects of ectoine, a bacteria-derived natural tetrahydropyrimidine, in experimental colitis. *Phytomedicine*, 20, 585-591.

Aebi, H. (1974). Catalases, in: H.U. Bergmeyer (Ed.), *Methods of Enzymatic Analysis*, vol. 2, Academic Press, NY, pp. 673-684.

Ahn, E.-M., Kim, S.-J. (2018). The improving effect of *Gastrodia elata* Blume on DSS-induced colitis in mice. *Biomedical Science Letters*, 24(3), 168-174.

Ahluwalia, B., Moraes, L., Magnusson, M.K., Öhman, L. (2018). Immunopathogenesis of inflammatory bowel disease and mechanisms of biological therapies. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 53(4), 379-389.

Aksoy, H., Sancar, M., Sen, A., Okuyan, B., Bitis, L., Uras, F., Akakin, D., Cevik, O., Kultur, S., İzzettin, F. V. (2016). The effect of topical ethanol extract of *Cotinus coggygia* Scop. on cutaneous wound healing in rats. *Natural Product Research*, 30(4), 452-455.

Aldini, R., Micucci, M., Cevenini, M., Fato, R., Bergamini, C., Nanni, C., Cont, M., Camborata, C., Spinozzi, S., Montagnani, M., Roda, G., D'Errico-Grigioni, A., Rosini, F., Roda, A., Mazzella, G., Chiarini, A., Budriesi, R. (2014). Antiinflammatory effect of phytosterols in experimental murine colitis model: Prevention, induction, remission study. *Plos One*, 9, e108112.

Algieri, F., Rodriguez-Nogales, A., Garrido-Mesa, N., Zorilla, P., Burkard, N., Pischel, I., Sievers, H., Benedek, B., Feistel, B., Walbroel, B., Rodriguez-Cabezas, M.E., Galvez, J. (2014). Intestinal anti-inflammatory activity of the *Serpylli herba* extract in experimental models of rodent colitis. *Journal of Crohn's and Colitis*, 8, 775-788.

Anderson, M. (1985). Determination of glutathione disulfide in biological samples. *Methods in Enzymology*, 113, 548-555.

Andresen, L., Jorgensen, V. L., Perner, A., Hansen, A., Eugen- Olsen, J., Rask-Madsen, J. (2005). Activation of nuclear factor kappaB in colonic mucosa from patients with collagenous and ulcerative colitis, *Gut*, 54(4), 503-509.

Antal, D.S., Schwaiger, S., Ellmerer-Müller, E.P., Stuppner, H. (2010). *Cotinus coggygia* wood: novel flavanone dimer and development of an HPLC/UV/MS method for the simultaneous determination of fourteen phenolic constituents. *Planta Medica*, 76, 1765-1772.

Antal, D.S., Ardelean, F., Pinzaru, I., Borcan, F., Ledeti, I., Coricovac, D., Zupko, I., Baghdikian, B., Ollivier, E., Soica, C., Bolintineanu, S.L. (2016). Effects of cyclodextrin complexation on the anti-cancer effects of *Cotinus coggygia* extract and its constituents, butein and sulfuretin. *Revista de chimie*, 67(8), 1618-1622.

Anzoice, M.L., Marrassini, C., Bach, H., Gorzalczany, S. (2016). Beneficial properties of *Passiflora caerulea* on experimental colitis. *Journal of Ethnopharmacology*, 194, 137-145.

Artun, F.T., Karagoz, A., Ozcan, G., Melikoglu, G., Anil, S., Kultur, S., Sutlupinar, N. (2016). In vitro anticancer and cytotoxic activities of some plant extracts on hela and vero cell lines. *Journal of the Balkan Union of Oncology (JBUON)*, 21(3), 720-725.

Aruoma, O.I., Halliwell, B., Hoey, B.M., Butler, J. (1989). The antioxidant action of N-acetylcysteine: its reaction with hydrogen peroxide, hydroxyl radical, superoxide, and hypochlorous acid. *Free Radical Biology and Medicine*, 6, 593–597.

Aw, T.Y. (2005). Intestinal glutathione: determinant of mucosal peroxide transport, metabolism, and oxidative susceptibility. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 204, 320-328.

Azuma, T., Shigeshiro, M., Kodama, M., Tanabe, S., Suzuki, T. (2013). Supplemental naringenin prevents intestinal barrier defects and inflammation in colitis mice. *Journal of Nutrition*, 143, 827-834.

Baliga, M.S., Joseph, N., Venkataranganna, M.V., Saxena, A., Ponemone, V., Fayad, R. (2012) Curcumin, an active component of turmeric in the prevention and

treatment of ulcerative colitis: preclinical and clinical observations. *Food & Function*, 3, 1109-1117.

Bamias, G., Nyce, M.R., De La Rue, S.A., Cominelli, F. (2005). New Concepts in the pathophysiology of inflammatory bowel disease. Review. *Annals of Internal Medicine*, 143, 895-904.

Baytop, T. (1999). *Therapy with Medicinal Plants in Turkey-Past and Present*. Nobel Tip Basimevi. 2 st ed. Istanbul, pp: 146-147.

Berg, D.J., Zhang, J., Weinstock, J.V., Ismail, H.F., Earle K.A., Alila H., Pamukcu, R., Moore, S., Lynch, R.G. (2002). Rapid development of colitis in NSAID-treated IL10-deficient mice, *Gastroenterology*, 123, 1527-1542.

Bergmeyer, HU. (1980). IFCC methods for measurement of catalytic concentrations of enzymes. Part 3, IFCC. Method for alanine aminotransferase (L-alanine 2-oxoglutarate aminotransferase, EC 2.6.1.2). *Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry*, 105, 145F-72F.

Bergmeyer, H.U., Horder, M. and Rej, R. International Federation of Clinical Chemistry (IFCC). (1986). Scientific Committee, Analytical Section: approved recommendation (1985) on IFCC methods for the measurement of catalytic concentration of enzymes. Part 2. IFCC method for aspartate aminotransferase (L-aspartate: 2-oxoglutarate aminotransferase, EC 2.6.1.1). *Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry*, 24, 497-510.

Bjørndal, B., Grimstad, T., Cacabelos, D., Nylund, K., Aasprong, O.G., Omdal, R., Portero-Otin, M., Pamplona, R., Lied, G.A., Hausken, T., Berge, R.K. (2013). *Digestive Diseases and Sciences*, 58, 97-106.

Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254.

Bilen, S., Yılmaz, S., Bilen, A.M., Biswas, G. (2014). Effects of dietary incorporation of tetra (*Cotinus coggygria*) extract on immune response and resistance to *Aeromonas hydrophila* in Koi Carp (*Cyprinus carpio*). *The Israeli Journal of Aquaculture-Bamidgeh (IJA)*, 66, 1051- 1057.

Blumberg, R.S. ve Strober W. (2001). Prospects of research in inflammatory bowel disease. *Journal of the American Medical Association (JAMA)*, 285, 643-647.

Borchardt, J.R., Wyse, D.L., Sheaffer, C.C., Kauppi, K.L., Fulcher, R.G., Ehlke, N.J., Biesboer, D.D., Bey, R.F. (2008). Antimicrobial activity of native and naturalized plants of Minnesota and Wisconsin. *Journal of Medicinal Plants Research*, 2, 98-110.

Breese, E., Braegger, C.P., Corrigan, C.J., Walker Smith, J.A., MacDonald, T.T. (1993). Interleukin-2 and interferon-gamma-secreting T cells in normal and diseased human intestinal mucosa. *Immunology*, 78, 127-131.

Buege, J.A. ve Aust, S.D. (1978). Microsomal lipid peroxidation. *Methods in Enzymology*, 52, 302-310.

Carlberg I. and Mannervik, B. (1977). *Biochimica et Biophysica Acta*, 484, 268-274.

Cha, M.R., Park, J.H., Choi, Y.H., Choi, C.W., Hong, K.S., Choi, S.U., Kim, Y.S., Kim, Y.K., Kim, Y.H., Ryu, S.Y. (2009). Alpha-glucosidase inhibitors from the branches extract of *Cotinus coggygia*. *Korean Journal of Pharmacognosy*, 40 (3), 229-232.

Chaudhary, G., Mahajan, U.B., Goyal, S.N., Ojha, S., Patil, C.R., Subramanya, S.B. (2017). Protective effect of *Lagerstroemia speciosa* against dextran sulfate sodium induced ulcerative colitis in C57BL/6 mice. *American Journal of Translational Research*, 9 (4), 1792-1800.

Chen, X., Zhai, X., Shi, J., Liu, W.W., Tao, H., Sun, X., Kang, Z. (2013). Lactulose mediates suppression of dextran sodium sulfate-induced colon inflammation by increasing hydrogen production. *Digestive Diseases and Sciences*, 58, 1560-1568.

Cho, J.H. (2003). Significant role of genetics in IBD: the NOD2 gene. *Reviews in Gastroenterological Disorders*, 3, 18-22.

Chu, F.-F., Esworthy, R.S., Doroshov, J.H. (2004). Role of Se-dependent glutathione peroxidases in gastrointestinal inflammation and cancer. *Free Radical Biology & Medicine*, 36 (12), 1481-1495.

Cooper, H.S., Murthy, S.N., Shah, R.S., Sedergran, D.J. (1993). Clinicopathologic study of dextran sulfate sodium experimental murine colitis. *Laboratory Investigation*, 69(2), 238-249.

Davis, P. H. (1967). *Flora of Turkey and East Aegean Islands*, Vol. 2, pp. 543, Edinburg University Press, Edinburgh.

Demirci, B., Demirci, F., Başer, K. H. C. (2003). Composition of the essential oil of *Cotinus coggygia* Scop. from Turkey. *Flavour and Fragrance Journal*, 18, 43-44.

Dey, I., Lejeune, M., Chadee, K. (2006). Prostaglandin E2 receptor distribution and function in the gastrointestinal tract. Review. *British Journal of Pharmacology*, 149, 611-623.

Dieleman, L.A., Palmen, M.J., Akol, H., Bloemena, E, Pena, A.S., Meuwissen, S.G., Van Rees, E.P. (1998). Chronic experimental colitis induced by dextran sulphate sodium (DSS) is characterized by Th1 and Th2 cytokines. *Clinical and Experimental Immunology*, 114 (3), 385-391.

Dos Reis, S.B., de Oliveira, C.C., Acedo, S.C., Miranda, D.D.C., Ribeiro, M.L., Pedrazzoli Jr.J. and Gambero, A. (2009). Attenuation of colitis injury in rats using *Garcinia cambogia* extract. *Phytotherapy Research*, 23, 324-329.

Dubuquoy, L., Jansson, E.A., Deeb S., Rakotobe, S., Karoui, M., Colombel J.F., Auwerx, J., Pettersson, S., Desreumaux, P. (2003). Impaired expression of peroxisome proliferator-activated receptor γ in ulcerative colitis. *Gastroenterology*, 124, 1265-1276.

Duo, J., Ying, G.G., Wang, G.W., Zhang, L. (2012). Quercetin inhibits human breast cancer cell proliferation and induces apoptosis via Bcl-2 and Bax regulation. *Molecular Medicine Reports*, 5(6), 1453- 1456.

Duvnjak, M., Bilić, A., Barsić, N., Tomasić, V., Stojšavljević, S. (2013) Classical medications in the treatment of inflammatory bowel diseases. *Acta Medica Croatica*, 67 (2), 111-124.

Eichele, D.D., Kharbanda, K.K. (2017). Dextran sodium sulfate colitis murine model: An indispensable tool for advancing understanding of inflammatory bowel diseases pathogenesis. *World Journal of Gastroenterology*, 23(33), 6016-6029.

El-Abhar, H.S., Hammad, L.N., Gawad, H.S. (2008). Modulating effect of ginger extract on rats with ulcerative colitis. *Journal of Ethnopharmacology*, 118, 367-372.

Engel, M.A., Neurath, M.F. (2010). New pathophysiological insights and modern treatment of IBD. *Journal of Gastroenterology*, 45, 571-583.

Fan, B., Wu, Y.F., Yuan, H.F. (2005). Primarily screening of antiviral substances from plants. *Journal of Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry*, 33, 167-170.

Farrell, R.J., Peppercorn, M.A. (2002). Ulcerative colitis. *Lancet*, 359, 331-340.

Ferrazzano, G.F., Roberto, L., Catania, M.R., Chiaviello, A., De Natale, A., Roscetto, E., Pinto, G., Pollio, A., Ingenito, A., Palumbo, G. (2013). Screening and scoring of antimicrobial and biological activities of Italian vulnerary plants against major oral pathogenic bacteria. *Evidence- Based Complementary and Alternative Medicine*, 316280.

Ferreira, V.L., Borba, H.H.L., Bonetti, A.F., Leonar, L.P., Pontarolo, R. (2018). Cytokines and interferons: Types and functions. <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.74550>

Fiddler, K.M. (1977). Collaborative study of modified AOAC method of analysis of nitrite in meat and meat products. *J AOAC*, 60, 594-598.

Ford, A.C., Achkar, J.-P., Khan, K.J., Kane, S.V., Talley, N.J., Marshall, J.K., Moayyedi, P. (2011). Efficacy of 5-aminosalicylates in ulcerative colitis: Systematic review and meta-analysis. *American Journal of Gastroenterology*, 106, 601-616.

Fraternale, D., Ricci, D. (2014). Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Cotinus coggygria* Scop. from Italy. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 17(3), 366-370.

Funakoshi, K., Sugimura, K., Sasakawa, T., Bannai, H., Anezaki, K., Ishizuka, K., Yoshida, K., Narisawa, R., Asakura, H. (1995). Study of cytokines in ulcerative colitis. *Journal of Gastroenterology*, Suppl 8, 61-63.

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

Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı, Gıda ve Kontrol Genel Müdürlüğü, Gıda Olarak Kullanılabilecek Bitkiler Komisyonu. (2014). *Cotinus coggygria Scop.'un Yaprak ve Genç Sürgünlerinin Gıdalarda Kullanımının Güvenilirliğinin Değerlendirilmesi Hakkında Bilimsel Görüş*.

(https://www.tarimorman.gov.tr/GKGM/Belgeler/DB_Risk_Degerlendirme/BilimselGorus/Cotinus_coggygria.pdf).

Gospodinova, Z., Bózsity, N., Nikolova, M., Krasteva, M., Zupkó, I. (2017). Antiproliferative properties against human breast, cervical and ovarian cancer cell lines, and antioxidant capacity of leaf aqueous ethanolic extract from *Cotinus coggygria Scop.* *Acta Medica Bulgarica*, 44, 21-25.

Griga, T., Hebler, U., Voigt, E., Tromm, A. and May, B. (2000). Interleukin-4 inhibits the increased production of vascular endothelial growth factor by peripheral blood mononuclear cells in patients with inflammatory bowel disease, *Hepato-Gastroenterology*, 47(36), 1604-1607.

Grisham, M.B. ve Granger, D.N. (1988). Neutrophil-mediated mucosal injury: Role of reactive oxygen metabolites. *Digestive Diseases and Sciences*, 33, 6-15.

Guan, G., Lan, S. (2018). Implications of antioxidant systems in inflammatory bowel disease. Review article. *BioMed Research International*, 1290179, 1-7.

Guimbaud, R., Bertrand, V., Chauvelot-Moachon, L., Quartier, G., Vidon, N., Giroud, J.P., Couturier, D., Chaussade, S. (1998). Network of inflammatory cytokines and correlation with disease activity in ulcerative colitis. *The American Journal of Gastroenterology*, 93(12), 2397-404.

Habig, W.H. and Jacoby, W.B. (1981). Assays for differentiation of glutathione-S-transferases. *Methods Enzymology*, 77, 398-405.

Head, K.A., and Jurenka, J.S. (2007). Inflammatory bowel disease Part I: Ulcerative colitis – pathophysiology and conventional and alternative treatment options. *Alternative Medicine Review*, 8 (3), 247-283.

Heller, F., Florian, P., Bojarski, C., Richter, J., Christ, M., Hillenbrand, B., Mankertz, J., Gitter, A.H., Bürgel, N., Fromm, M., Zeitz, M., Fuss, I., Strober, W., Schulzke, J.D. (2005). Interleukin-13 is the key effector Th2 cytokine in ulcerative colitis that affects epithelial tight junctions, apoptosis, and cell restitution, *Gastroenterology*, 129(2), 550-564.

Hibi, T. and Ogata, H. (2006). Novel pathophysiological concepts of inflammatory bowel disease. *Journal of Gastroenterology*, 41, 10-16.

Hillegass, L.M., Griswold, D.E., Brickson, B. And Albrightson-Winslow, C. (1990). Assessment of myeloperoxidase activity in whole rat kidney. *Journal of Pharmacological Methods*, 24, 285-295.

Ho, G.T., Nimmo, E.R., Tenesa, A., Fennell, J., Drummond, H., Mowat, C., Arnott, D., Satsangi, J. (2005). Allelic variations of the multidrug resistance gene determine susceptibility and disease behavior in ulcerative colitis. *Gastroenterology*, 128, 288-296.

Holleran, G., Lopetuso, L., Petito, V., Graziani, C., Ianiro, G., McNamara, D., Gasbarrini, A., Scaldaferri, F. (2017). The innate and adaptif immune system as targets for biologic therapies in inflammatory bowel disease. *International Journal of Molecular Sciences*, 18, 2020-2043.

Huang, Y. and Chen, Z. (2016). Inflammatory bowel disease related innate immunity and adaptive immunity. *American Journal of Translational Research*, 8(6), 2490-2497.

Ivanov, I.I., Zhou, L., Littman, D.R. (2007). Transcriptional regulation of Th17 cell differentiation. *Seminars in Immunology*, 19(6), 409-417.

Ivanova, D., Gerova, D., Chervenkov, T., Yankova, T. (2005). Polyphenols and antioxidant capacity of Bulgarian medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 96, 145-150.

Ivanova, D.G., Pavlov, D.V., Eftimov, M., Kalchev, K., Nashar, M.A., Tzaneva, M.A., Valcheva- Kuzmanova, S. (2013). Subchronic toxicity study of ethanol infusion from *Cotinus coggygria* wood in rats. *Bulgarian Journal of Agricultural Sciences*, 19(2), 182-185.

Jena, G., Trivedi, P.P., Sandala, B. (2012). Oxidative stress in ulcerative colitis: an old concept but a new concern. *Free Radical Research*, 46(11), 1339-1345.

Jeon, Y.-D., Kang, S.-H., Bang, K.-S., Chang, Y.-N., Lee, J.-H., Jin, J.-S. (2016). Glycyrrhetic acid ameliorates dextran sulfate sodium-induced ulcerative colitis in vivo. *Molecules*, 21, 523-533.

Jing, B., Ma, Z., Feng, J., Liang, H., Li, C., Zhang, X. (2012). Evaluation of the antiviral activity of extracts from plants grown in the qinling region of China against infection by Tobacco mosaic virus (TMV). *Journal of Phytopathology*, 160(4), 181-186.

Kawada, M., Ohno, Y., Ri, Y., Ikoma, T., Yuugetu, H., Asai, T., Watanabe, M., Yasuda, N., Akao, S., Takemura, G., Minatoguchi, S., Gotoh, K., Fujiwara, H., Fukuda, K. (2001). Anti-tumor effect of gallic acid on LL-2 lung cancer cells transplanted in mice. *Anticancer Drugs*, 12, 847-852.

Keshavarzian, A., Morgan, G., Sedghi, S., Gordon, J.H., Doria, M. (1990). Role of reactive oxygen metabolites in experimental colitis. *Gut*, 31, 786-790.

Keshavarzian, A., Sedghi, S., Kanofsky, J., List, T., Robinson, C., Ibrahim, C., Winship, D. (1992). Excessive production of reactive oxygen metabolites by inflamed colon: Analysis by chemiluminescence probe. *Gastroenterology*, 103, 177-185.

Khan, I., Samson, S.E., Grover, A.K. (2017). Antioxidant supplements and gastrointestinal diseases: A critical appraisal. *Medical Principles and Practice*, 26, 201-217.

Khor, T. O., Huang, M. T., Prawan A., Liu, Y., Hao, X., Yu, S., Cheung, W.K.L., Chan, J.Y., Reddy, B.S., Yang, C.S., Kong, A.-N. (2008). Increased susceptibility of Nrf2 knockout mice to colitis-associated colorectal cancer. *Cancer Prevention Research*, 1(3), 187-191.

Khor, T.O., Huang, M.T., Kwon, K. H., Chan, J. Y., Reddy, B. S., Kong, A. N. (2006). Nrf2-deficient mice have an increased susceptibility to dextran sulfate sodium-induced colitis, *Cancer Research*, 66(24), 11580-11584.

Kiesler, P., Fuss, I.J., Strober, W. (2015). Experimental models of inflammatory bowel diseases. *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology*, 1(2), 154-170.

Kim DH and Cheon JH. (2017). Pathogenesis of inflammatory bowel disease and recent advances in biologic therapies. *Immune network*, 17(1), 25-40

Kimura, H., Miura, S., Shigematsu, T., Ohkubo, N., Tsuzuki, Y., Kurose, I., Higuchi, H., Akiba, Y., Hokari, R., Hirokawa, M., Serizawa, H., Ishii, H. (1997). Increased nitric oxide production and inducible nitric oxide synthase activity in colonic mucosa of patients with active ulcerative colitis and Crohn's disease. *Digestive Diseases and Sciences*, 42, 1047-1054.

Kolgazi, M., Jahovic, N., Yuksel, M., Ercan, F., Alican, I. (2007). Alpha-lipoic acid modulates gut inflammation induced by trinitrobenzene sulfonic acid in rats. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 22, 1859-1865.

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

Krieglstein, C.F., Cerwinka, W. H., Laroux, F.S., Salter, J.W., Russell, J.M., Schuermann, G., Grisham, M.B., Ross, C.R., Granger, D.N. (2001). Regulation of murine intestinal inflammation by reactive metabolites of oxygen and nitrogen: Divergent roles of superoxide and nitric oxide. *Journal of Experimental Medicine*, 194 (9), 1207-1218.

Kruidenier, L., Kuiper, I., van Duijn, W., Marklund, S.L., van Hogezaand, R.A., Lamers, C.BHW, Verspaget, H.W. (2003). Differential mucosal expression of three superoxide dismutase isoforms in inflammatory bowel disease. *The Journal of Pathology*, 201 (1), 7-16.

Kuwano, Y., Tominaga, K., Kawahara, T., Sasaki, H., Takeo, K., Nishida, K., Masuda, K., Kawai, T., Teshima-Kondo, S., Rokutan, K. (2008). Tumor necrosis factor alpha activates transcription of the NADPH oxidase organizer 1 (NOXO1) gene and upregulates superoxide production in colon epithelial cells. *Free Radical Biology & Medicine*, 45 (12), 1642-1652.

Kültür, Ş. (2007). Medicinal plants used in Kırklareli Province (Turkey). *Journal of Ethnopharmacology*, 111, 341-364.

Lawrence, R.A. and Burk, R.F. (1976). Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 71, 952-958.

Leonel, A.J., Teixeira, L.G., Oliveira, R.P., Santiago, A.F., Batista, N.V., Ferreira, T.R., Santos, R.C., Cardoso, V.N., Cara, D.C., Faria, A.M., Alvarez-Leite, J. (2012). Antioxidative and immunomodulatory effects of tributyrin supplementation on experimental colitis. *British Journal of Nutrition*, 1-12.

Lewis, J.D., Deren, J.J., Lichtensten G.R. (1999). Cancer risk in patient with inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology Clinics of North America*, 28, 459- 477.

Li, X.L., Cai, Y.Q., Qin, H., Wu, Y.J. (2008). Therapeutic effect and mechanism of proanthocyanidins from grape seeds in rats with TNBS-induced ulcerative colitis. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 86, 841-849.

Liu, X., Wang, J.M. (2011). Iridoid glycosides fraction of *Folium syringae* leaves modulates NF-kappaB signal pathway and intestinal epithelial cells apoptosis in experimental colitis. *PLoS One*, 6, e24740.

Low, D., Nguyen, D.D., Mizoguchi, E. (2016). Animal models of ulcerative colitis and their application in drug research. *Drug Design, Development and Therapy*, 7, 1341-1357.

Lundberg, J.O., Hellström, P.M., Lundberg, J.M., Alving, K. (1994). Greatly increased luminal nitric oxide in ulcerative colitis. *Lancet*, 344, 1673-1674.

Ma, X., Hu, Y., Li, X., Zheng, X., Wang, Y., Zhang, J., Fu, C., Geng, F. (2018). *Periplaneta americana* ameliorates dextran sulfate sodium-induced ulcerative colitis in rats by Keap1/Nrf-2 activation, intestinal barrier function, and gut microbiota regulation. *Frontiers in Pharmacology*, 9, article 944, 1-16.

Marcetić, M., Bozić, D., Milenković, M., Malesević, N., Radulović, S., Kovacević, N. (2013). Antimicrobial, antioxidant and anti-inflammatory activity of young shoots of the smoke tree, *Cotinus coggygia* Scop., *Phytotherapy Research*, 27, 1658-1663.

Matić, S., Stanić, S., Solujić, S., Milosević, T., Niciforović, N. (2011a). Biological properties of the *Cotinus coggygia* methanol extract. *Periodicum Biologorum*, 113 (1), 87-92.

Matić, S., Stanić, S., Bogojević, D., Solujić, S., Grdović, N., Vidaković, M., Mihailović, M. (2011b). Genotoxic potential of *Cotinus coggygia* Scop. (Anacardiaceae) stem extract in vivo, *Genetics and Molecular Biology*, 34(2), 298-303.

Matić, S., Stanić, S., Bogojević, D., Vidaković, M., Grdović, N., Arambasić, J., Dinić, S., Uskoković, A., Poznanović, G., Solujić, S., Miladenović, M., Marković, J., Mihailović, M. (2011c). Extract of the plant *Cotinus coggygia* Scop. attenuates pyrogallol-induced hepatic oxidative stress in Wistar rats. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 89 (6), 401-411.

Matić, S., Stanić, S., Bogojević, D., Vidaković, M., Grdović, N., Dinić, S., Solujić, S., Mladenović, M., Stanković, N., Mihailović, M. (2013). Methanol extract from the stem of *Cotinus coggygia* Scop., and its major bioactive phytochemical constituent myricetin modulate pyrogallol-induced DNA damage and liver injury. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 755, 81-89.

Matić, S., Stanić, S., Mihailović, M., Bogojević, D. (2016). *Cotinus coggygia* Scop.: An overview of its chemical constituents, pharmacological and toxicological potential. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 23, 452-461.

Matricon, J., Barnich, N., Ardid, D. (2010). Immunopathogenesis of inflammatory bowel disease. *Self/Nonself*, 1 (4), 299-309.

Mei, Q., Xu, J.-M., Xiang, L., Hu, Y.-M., Hu, X.-P., Xu, Z.-W. (2005). Change of nitric oxide in experimental colitis and its inhibition by melatonin in vivo and in vitro. *Postgraduated Medical Journal*, 81, 667-672.

Melgar, S., Yeung, M. M.-W., Bas, A., Forsberg, G., Suhr, O., Öberg, Å., Hammarström, S., Danielsson, Å., Hammarström, M.-L. (2003). Over-expression of interleukin 10 in mucosal T cells of patients with active ulcerative colitis. *Clinical and Experimental Immunology*, 134(1), 127-137.

Miller, M.J., Sadowska-Krowicka, H., Chotinaruemol, S., Kakkis, J.L., Clark, D.A. (1992). Amelioration of chronic ileitis by nitric oxide synthase inhibition. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 264, 11-16.

Miller, M.J., Thompson, J.H., Zhang, X.J., Sadowska-Krowicka, Kakkis, J.L., Munshi, U.K., Sandoval, M., Rossi, J.L., Eloby-Childress, S., Beckman, J.S., Ye, Y.Z., Rodi, C.P., Manning, P.T., Currie, M.G., Clark, D.A. (1995). Role of inducible nitric oxide synthase expression and peroxynitrite formation in guinea pig ileitis. *Gastroenterology*, 109, 1475-1483.

Milošević, T., Nićiforović, N., Mihailović, V., Solujić, S., Vuković, N. (2008). Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils of flowers, leaves and stems of *Cotinus coggygria*. *Planta Medica*, 74, PI23.

Montrose, D.C., Horelik, N.A., Madigan, J.P., Stoner, G.D., Wang, L.-S., Bruno, R.S., Park, H.J., Giardina C., Rosenberg, D.W. (2011). Anti-inflammatory effects of freeze-dried black raspberry powder in ulcerative colitis. *Carcinogenesis*, 32 (3), 343-350.

Morsy, M.A., Gupta, S., Nair, A. B., Venugopala, K. N., Greish, K., El-Daly, M. (2019). Protective Effect of *Spirulina platensis* extract against dextran sulfate sodium-induced ulcerative colitis in rats. *Nutrients*, 11, 2309-2326.

Murad, H.A.S., Abdallah, H.M., Ali, S.S. (2016). *Mentha longifolia* protects against acetic acid-induced colitis in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 190, 354–361.

Muthas, D., Reznichenko, A., Balendran, C.A., Böttcher, G., Clausen, G., Mårdh, C.K., Ottosson, T., Uddin, M., MacDonald, T.T., Danese, S., Hanse, M.B. (2017). Neutrophils in ulcerative colitis: a review of selected biomarkers and their potential therapeutic implication. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 52 (2), 125-135.

Nićiforović, N., Mihailović, V., Mašković, P., Solujić, S., Stojković, A., Pavlović, M. D. (2010). Antioxidant activity of selected plant species; potential new sources of natural antioxidants. *Food Chemical Toxicology*, 48, 3125-3130.

Nishikawa, M., Oshitani, N., Matsumoto, T., Nishigami, T., Arakawa, T., Inoue, M. (2005). Accumulation of mitochondrial DNA mutation with colorectal carcinogenesis in ulcerative colitis, *British Journal of Cancer*, 93 (3), 331-337.

Nitta, M., Hirata, I., Toshina, K., Murano, M., Maemura, K., Hamamoto N et al. (2002). Expression of the EP4 prostaglandin E2 receptor subtype with rat dextran sodium sulphate colitis: colitis suppression by a selective agonist, ONO-AE1-329. *Scandinavian Journal of Immunology*, 56 (1), 66-75.

Novak, E. A. and Mollen, K. P. (2015). Mitochondrial dysfunction in inflammatory bowel disease. *Frontiers in Cell and Development Biology*, 3, article 62, 1-18.

Novaković, M., Vučković, I., Janačković, P., Soković, M., Filipović, A., Tešević, V., Milosavljević, S. (2007). Chemical composition, antibacterial and antifungal activity of the essential oils of *Cotinus coggygria* from Serbia. *Journal of the Serbian Chemical Society*, 72(11), 1045-1051.

Ochsenkuhn, T., Sackmann, M., Goeke, B. (2004). Infliximab for acute, not steroid-refractory ulcerative colitis: A randomized pilot study. *European Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 16 (11), 1167-1171.

Okayasu, I., Hatakeyama, S., Yamada, M., Ohkusa, T., Inagaki, Y., Nakaya, R. (1990). A novel method in the induction of reliable experimental acute and chronic ulcerative colitis in mice. *Gastroenterology*, 98(3), 694-702.

Ozkan, T.B. (2003). İnflamatuvar bağırsak hastalıkları. *Güncel Pediatri*, 1, 79-91.

Ozsoy, N., Yilmaz-Ozden, T., Serbetci, T., Kultur, S., Akalin, E. (2017). Antioxidant, anti-inflammatory, acetylcholinesterase and thioredoxin reductase inhibitory activities of nine selected Turkish medicinal plants. *Indian Journal of Traditional Knowledge*, 16 (4), 553-561.

Pavlov, D., Eftimov, M., Tzaneva, M., Ivanova, D., Nashar, M., Kobakova, I., Valcheva-Kuzmanova, S. (2013a). Gastroprotective effect of ethanol infusion from *Cotinus coggygria* wood in rats. *Scripta Scientifica Medica*, 45(5), 19-24.

Pavlov, D., Ivanova, D., Eftimov, M., Tzaneva, M., Nashar, M., Kobakova, I., Valcheva-Kuzmanova, S. (2013b). Effect of aqueous infusion from *Cotinus coggygria* leaves on indomethacin-induced gastric mucosal damage and oxidative stress in rats. *Scripta Scientific Medica*, 45(3), 32-38.

Pavlov, D., Nashar, M., Eftimov, M., Kalchev, K., Valcheva-Kuzmanova, S., Tzaneva, M., Ivanova, D. (2013c). Subchronic toxicity study of aqueous infusion from *Cotinus coggygria* leaves in Wistar rats. *Comptes rendus de l'Acad'emie bulgare des Sciences*, 66 (5), 749-756.

Perše, M. and Cerar, A. (2012). Dextran sodium sulphate colitis mouse model: Traps and Tricks, *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, article ID 718617, 1-13.

Piechota-Polanczyk, A., Fichna, J. (2014). Review article: the role of oxidative stress in pathogenesis and treatment of inflammatory bowel diseases. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 387, 605-620.

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

Pijut PM. (2008). *Cotinus* P. Mill. USDA Forest Services. North Central Research Station, 610, 557-4017.

Pohl, C., Hombach, A., Kruis, W. (2000). Chronic inflammatory bowel disease and cancer. *Hepatogastroenterology*, 47, 57-70.

Pollio, A., Zarrelli, A., Romanucci, V., Di Mauro, A., Barra, F., Crescenzi, E., Roscetto, E., Palumbo, G. (2016). Polyphenolic profile and targeted bioactivity of methanolic extracts from Mediterranean ethnomedicinal plants on human cancer cell lines. *Molecules*, 21(4), 395-418.

Qiu, W., Wu, B., Wang, X., Buchanan, M.E., Regueiro, M.D., Hartman, D.J., Schoen, R.E., Yu, J., Zhang, L. (2011). PUMA-mediated intestinal epithelial apoptosis contributes to ulcerative colitis in humans and mice. *The Journal of Clinical Investigation*, 121 (5), 1722-1732.

Qu, C., Yuanb, Z.-W., Yuc, X.-T., Huanga, Y.-F., Yanga, G.-H., Chena, J.-N., Lai, X.-P., Sua, Z.-R., Zengc, H.-F., Xieb, Y., Zhanga, X.-J. (2017). Patchouli alcohol

ameliorates dextran sodium sulfate-induced experimental colitis and suppresses tryptophan catabolism. *Pharmacological Research*, 121, 70-82.

Rachmilewitz, D., Karmeli, F., Okon, E., Bursztyn, M. (1995). Experimental colitis is ameliorated by inhibition of nitric oxide synthase activity. *Gut*, 37, 247-255.

Rachmilewitz, D., Stampler, J.S., Bachwich, D., Karmeli, F., Ackerman, Z., Podolsky, D.K. (1995a). Enhanced colonic nitric oxide generation and nitric oxide synthase activity in ulcerative colitis and Crohn's disease. *Gut*, 36, 718-723.

Riaz, T., Abbasi, M.A., Aziz-ur-Rehman Rubab, K., Shahzadi, T., Ajaib, M., Khan, K. M. (2012). *Cotinus coggygia*: A rich source of antioxidants, *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 25(3), 679-686.

Rocha, J., Direito, R., Lima, A., Motab, J., Gonçalves, M., Duarte, M.P., Solasa, J., Peniche, B.F., Fernandes, A., Pinto, R., Ferreira, R.B., Sepodesa, B., Maria-Eduardo Figueira, M.-E. (2019). Reduction of inflammation and colon injury by a Pennyroyal phenolic extract in experimental inflammatory bowel disease in mice. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 118, 109351.

Roda, G., Marocchi, M., Sartini, A., Roda, E. (2011). Cytokine networks in ulcerative colitis. *Ulcers*, article ID 391787, 1-5.

Rodriguez-Canales, M., Jimenez-Rivas, R., Canales-Martinez, M.M., Garcia-Lopez, A.J., Rivera-Yañez, N., Nieto-Yañez, O., Ledesma-Soto, Y., Sanchez-Torres, L.E., Rodriguez-Sosa, M., Terrazas, L.I., Rodriguez-Monroy, M.A. (2016). Protective effect of *Amphipterygium adstringens* extract on dextran sulphate sodium-induced ulcerative colitis in mice. *Mediators of Inflammation*, article ID 8543561, 1-12.

Rogler, G., Brand, K., Vogl, D., Page, S., Hofmeister, R., Andus, T., Knuechel, R., Baeuerle, P.A., Schölmerich, J., Gross, V. (1998). Nuclear factor kappaB is activated in macrophages and epithelial cells of inflamed intestinal mucosa. *Gastroenterology*, 115, (2), 357-369.

Rogler, G., Andus, T. (1998). Cytokines in inflammatory bowel disease. *World Journal of Surgery*, 22, 382-389.

Ruela-de-Sousa, R.R., Fuhler, G.M., Blom, N., Ferreira, C.V., Aoyama, H., Peppelenbosch, M.P. (2010). Cytotoxicity of apigenin on leukemia cell lines: implications for prevention and therapy. *Cell Death and Disease*, 1, e19.

Russo, I., Luciani, A., De Cicco, P., Troncone, E., Ciacci, C. (2012). Butyrate attenuates lipopolysaccharide-induced inflammation in intestinal cells and Crohn's mucosa through modulation of antioxidant defense machinery. *PLoS One*, 7(3), e32841.

Saiyed, M., Sachdeva, P., Kukkar, M. (2017). Effectiveness of *Ricinus communis* root extract against dextran sodium sulfate induced ulcerative colitis in rats. *International Journal of Green Pharmacy*, 11(2), 84-91.

Sakthivel, K.M. and Guruvayoorappan, C. (2014). Protective effect of *Acacia ferruginea* against ulcerative colitis via modulating inflammatory mediators, cytokine profile and NF- κ B signal transduction pathways. *Journal of Environmental Pathology and Oncology*, 33(2), 83-98.

Salvo-Romero, E., Alonso-Cotoner, C., Pardo-Camacho, C., Casado-Bedmar, M., Vicario, M. (2015). The intestinal barrier function and its involvement in digestive disease. *Revista Española de Enfermedades Digestivas*, 107(11), 686-696.

Sancar-Bas, S., Tunalı, S., Oyar-Yolmaz, E., Yanardağ, R. Bolkent, Ş. "Hepatoprotective effect of *Cotinus coggygia* Scop. extract on ethanol-induced liver injury of rats", 40 th FEBS Kongress, The Biochemical Basis of Life, volume 282, Issue S1, Berlin, Germany, July 4-9, 2015.

Sands, B.E., Tremaine, W., Sandborn, W.J., Rutgeerts, P.J. (2001). Infliximab in the treatment of severe, steroid-refractory ulcerative colitis: A pilot study. *Inflammatory Bowel Diseases*, 7 (2), 83-88.

Šavikin, K., Zdunic, G., Jankovic, T., Stanojkovic, T., Juranic, Z., Menkovic, N. (2009). In vitro cytotoxic and antioxidative activity of *Cornus mas* and *Cotinus coggygia*. *Natural Product Research*, 23(18), 1731-1739.

Seiberg, M., Stone, V.I., Zhao, R. (2006). Compositions containing *Cotinus coggygia* extract and use thereof on skin and mucosal tissues. US Patent 2006088608.

Seiberg, M., Stone, V.I., Zhao, Z., Bruning, E. (2008). Use of *Cotinus coggygia* extract treating hemorrhoids. Patent, Pub. No. WO2008055107 A2.

Shen, Q., Shang, D., Ma, F., Zhang, Z. (1991). Pharmacological study on anti-hepatitis effect of *Cotinus coggygia* Scop. syrup. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*, 16, 746-749.

Shi, L., Liu, Q., Tang, J.-h., Wen, J.-j., Li, C. (2019). Protective effects of pterostilbene on ulcerative colitis in rats via suppressing NF- κ B pathway and activating PPAR- γ . *European Journal of Inflammation*, 17, 1-10.

Siegmund, B. and Zeitz, M. (2011). Innate and adaptive immunity in inflammatory bowel disease. *World Journal of Gastroenterology*, 17(27), 3178-3183.

Simić, M., Vučićević, D., Milenković, M., Kovačević, N. (2008). Antioxidant and antiinflammatory activity of *Cotinus coggygia* extracts. *Planta Medica*, 74, PA63.

Singer, I.I., Kawka, D.W., Scott, S., Weidner, J.R., Mumford, R.A., Riehl, T.E., Stenson, W. F. (1996). Expression of inducible nitric oxide synthase and nitrotyrosine in colonic epithelium in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*, 111, 871-885.

Singer, I.I., Kawka, D.W., Schloemann, S., Tessner, T., Riehl, T., Stenson, W.F. (1998). Cyclooxygenase 2 is induced in colonic epithelial cells in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*, 115, 297-306.

Singh, S.K., Vishnoi, R., Dhingra, G.K., Kishor, K. (2012). Antibacterial activity of leaf extracts of some selected traditional medicinal plants of Uttarakhand, North East India. *Journal of Applied and Natural Sciences*, 4, 47-50.

Szkaradkiewicz, A., Marciniak, R., Chudzicka-Strugała, I., Wasilewska, A., Drews, M., Majewski, P., Karpiński, T., Zwoździak, B. (2009). Proinflammatory cytokines and IL-10 in inflammatory bowel disease and colorectal cancer patients. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, 57, (4), 291-294.

Sklyarov, A.Ya., Panasyuk, N.B., Fomenko, I.S. (2011). Role of nitric oxide-synthase and cyclooxygenase/lipoxygenase systems in development of experimental ulcerative colitis. *Journal of Physiology and Pharmacology*, 62(1), 65-73.

Stanić, S., Matić, S., Solujić, S., Milosević, T. (2009). Genotoxicity testing of the methanol extract of the plant *Cotinus coggygia* and gallic acid on *Drosophila melanogaster*, *Archives of Biological Sciences Belgrade*, 61(2), 261-266.

Stanić, S., Matić, S., Delić, G., Mihailović, M., Bogojević, D., Solujić, S. (2011). Study of genotoxicity and antigenotoxicity of the *Cotinus coggygia* Scop. methanol extract by *Drosophila melanogaster* sex-linked recessive lethal test. *Russian Journal of Genetics*, 47(7), 770-774.

Su, Q., He, J., Wang Z., Lv, L., Suo, Y., Wang, J., Zheng, Z., Huo, C., Li, J. (2016). Intestinal anti-inflammatory effect of the rhizome extracts of *Menispermum dauricum* DC. on trinitrobenzene sulfonic acid induced ulcerative colitis in mice. *Journal of Ethnopharmacology*, 193, 12-20 (2016).

Tanchev, S.S. and Timberlake, C.F., (1969). Anthocyanins in leaves of *Cotinus coggygia*. *Phytochemistry*, 8(12), 2367-2369.

Tian, T., Wang, Z., Zhang, J. (2017). Pathomechanisms of oxidative stress in inflammatory bowel disease and potential antioxidant therapies. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, article ID 4535194, 1-18.

Triantafyllidis, J.K., Triantafyllidis, A., Vagianos, C., Papaloisc, A. (2016). Favorable results from the use of herbal and plant products in inflammatory bowel disease: evidence from experimental animal studies. *Annals of Gastroenterology*, 29, 268-281.

Trivedi, P.P. and Jena, G.B. (2013). Melatonin reduces ulcerative colitis-associated local and systemic damage in mice: Investigation on possible mechanisms. *Digestive Diseases and Sciences*, 58, 3460-3474.

Tsankova, E.T., Dyulgerov, A.S., Milenkov, B.K. (1993). Chemical composition of the Bulgarian Sumac oil. *Journal Essential Oil Research*, 5, 205-207.

Tunalı, S., Yanardağ, R., Can, A. "Elastase and alpha glucosidase inhibitory activities of *Cotinus coggygia* Scop. leaf extracts", The Second Euro-Med Conference Plant Natural Products from Biodiversity to Bioindustry "BioNat-II", Alexandria – Egypt, December 11-13, 2011.

Tunalı, S., Yanardağ, R., Can, A. "In vitro antioksidant activity of *Cotinus coggygia* Scop. leaf extracts", The Second Euro-Med Conference Plant Natural Products from Biodiversity to Bioindustry "BioNat-II", Alexandria – Egypt, December 11-13, 2011.

Tunç, K., Hoş, A., Güneş, B. (2013). Investigation of antibacterial properties of *Cotinus coggygia* from Turkey. Polish Journal of Environmental Studies, 22(5), 1559-1561.

Tzakou, O., Bazos, I., Yannitsaros, A. (2005). Essential oils of leaves, inflorescences and infructescences of spontaneous *Cotinus coggygia* Scop. from Greece. Flavour and Fragrance Journal, 20, 531-533.

Ungaro, R., Mehandru, S., Allen, P.B., Peyrin-Biroulet, L., Colombel, J.-F. (2017). Ulcerative colitis. Lancet, 389, 1756-1770.

Valianou, L., Stathopoulou, K., Karapanagiotis, I., Magiatis, P., Pavlidou, E., Skaltsounis, A.L., Chrysosoulakis, Y. (2009). Phytochemical analysis of young fustic (*Cotinus coggygia* heartwood) and identification of isolated colourants in historical textiles. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 394, 871-882.

Vargas-Robles, H., Castro-Ochoa, K.F., Citalán-Madrid, A.F., Schnoor, M. (2019). Beneficial effects of nutritional supplements on intestinal epithelial barrier functions in experimental colitis models in vivo. World Journal of Gastroenterology, 25(30), 4181-4198.

Wang, Y.H., Yang, X.L., Wang, L., Cui, M.X., Cai, Y.Q., Li, X.L., Wu, Y.J. (2010). Effects of proanthocyanidins from grape seed on treatment of recurrent ulcerative colitis in rats. Canadian Journal of Physiology and Pharmacology, 88, 888-898.

Westenburg, H. E., Lee, K. J., Lee, S. K., Fong, H. H., van Breemen, R. B., Pezzuto, J. M., Kinghorn, A. D. (2000). Activity-guided isolation of antioxidative constituents of *Cotinus coggygia*, Journal of Natural Products, 63(12), 1696-1698.

Wirtz, S., Neufert, C., Weigmann, B., Neurath M.F. (2007). Chemically induced mouse models of intestinal inflammation. Nature Protocols, 2(3), 541-546.

Wirtz, S., ve Neurath, M.F. (2007). Mouse models of inflammatory bowel disease. Advanced Drug Delivery Reviews, 59(11), 1073-1083.

Wong, V.K.C., Yu, L., Cho, C.H. (2008). Protective effect of polysaccharides from *Angelica sinensis* on ulcerative colitis in rats, Inflammopharmacology, 16, 162-167.

Yamamoto, M., Yoshizaki, K., Kishimoto, T., Ito, H. (2000). IL-6 is required for the development of Th1 cell-mediated murine colitis. *Journal of Immunology*, 164(9), 4878-4882.

Yao, J., Wang, J.-Y., Liu, L., Li, Y.-X., Xun, A.-Y., Zeng, W.-S., Jia, C.-H., Wei, X.-X., Feng, J.-L., Zhao, L., Wang, L.-S. (2010). Anti-oxidant effects of resveratrol on mice with DSS-induced ulcerative colitis. *Archives of Medical Research*, 41, 288-294.

Yarat, A., Sacan, O., Akyuz, A., Alev, B., Pisiriciler, R., Ak, E., Yanardag, R. (2013). In vitro effect of aqueous plant extracts on antioxidant parameters in saliva samples. *Journal of Medicinal Plants Research*, 7(3), 118-125.

Yasukawa, K., Tokuda, H., Tun, X., Utsumi, H., Yamada, K.-i. (2012). The detrimental effect of nitric oxide on tissue is associated with inflammatory events in the vascular endothelium and neutrophils in mice with dextran sodium sulfate-induced colitis. *Free Radical Research*, 46(12), 1427-1436.

Yeom, Y. and Kim, Y. (2015). The *Sasa quelpaertensis* leaf extract inhibits the dextran sulfate sodium-induced mouse colitis through modulation of antioxidant enzyme expression. *Journal of Cancer Prevention*, 20(2), 136-146.

Zhang, X., Ling, Y., Yu, H., Ji, Y. (2010). Studies on mechanism of myricetin-induced apoptosis in human hepatocellular carcinoma HepG-2 cells. *Zhongguo Zhongyao Zazhi*, 35(8), 1046-1050.

Zhao, Z.J., Xiang, J.Y., Liu, L., Huang, X.L., Gan, H.T. (2012). Parthenolide, an inhibitor of the nuclear factor-kappaB pathway, ameliorates dextran sulfate sodium-induced colitis in mice. *International Immunopharmacology*, 12, 169-174.

Zheng, P., Niu, F., Liu, W., Shi, Y., Lu, L. (2005). Anti-inflammatory mechanism of oxymatrine in dextran sulfate sodium-induced colitis of rats. *World Journal of Gastroenterology*, 11, 4912-4915.

Zhu, L., Gu, P.Q., Shen, H. (2019). Protective effects of berberine hydrochloride on DSS-induced ulcerative colitis in rats. *International Immunopharmacology*, 68, 242-251.

ETİK KURUL KARARI



T.C
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU



Sayın Doç. Dr. Nurten ÖZSOY
İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi

Başvuru : 19.10.2017

Toplantı Tarihi : 26.10.2017

Sorumluluğunu üstlendiğiniz, aşağıda çalışma materyali belirtilen **Doktora Öğrencisi Uzman Sevinç ÖZGÜR**'e ait "Cotinus coggyria sulu infüzyonunun farelerde dekstran sülfat sodyum ile indüklenmiş ülseratif kolit üzerine etkisinin incelenmesi" isimli projeniz Kurulumuz tarafından incelenmiş ve Etik Kurul ilkelerine uygun bulunmuştur.

Çalışılacak Hayvanın	Türü	Fare
	Cinsiyeti	Erkek
	Sayısı	48
Proje Başlangıç/Bitiş Tarihi	01.11.2017/ 30.10.2019	

Prof. Dr. Alev AKDOĞAN KAYMAZ
İÜ HADYEK Başkanı

Prof. Dr. Mehmet YALTIRIK
Üye

Prof. Dr. Ufuk ÇAKATAY
Üye

Prof. Dr. Mustafa Oral ÖNCÜL
Üye

Doç. Dr. Alper OKYAR
Üye

Doç. Dr. Aygül EKİCİ
Üye

Doç. Dr. Uğur AKSU
Üye

Yard. Doç. Dr. Altan ARMUTAK
Üye

Yrd. Doç. Dr. Aydın ÇEVİK
Üye

Uzm. Vet. Hek. Fatma TEKELİ
Üye

Dr. Burak OLGUN
Mak.Yük. Müh
Üye

Avukat Selma DEMİR
Üye

İstanbul Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanlığı İ.Ü. Veteriner Fakültesi Dekanlık katı A 221 nolu
Oda Avcılar –İSTANBUL TEL : (0 212) 4737070/ 17031 E mail: hadyek@istanbul.edu.tr

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

COTİNUS COGGYGRİA SULU İNFÜZYONUNUN FARELERDE DEKSTRAN SÜLFAT SODYUM İLE İNDÜKLENMİŞ ÜLSERATİF KOLİT ÜZERİNE ETKİSİNİN İNCELENMESİ

ORJİNALLİK RAPORU

%**16**

BENZERLİK ENDEKSİ

%**11**

İNTERNET
KAYNAKLARI

%**5**

YAYINLAR

%**9**

ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	Submitted to Istanbul University Öğrenci Ödevi	% 5
2	dspace.baskent.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	% 1
3	acikerisim.aku.edu.tr İnternet Kaynağı	<% 1
4	acikerisim.selcuk.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	<% 1
5	Submitted to The Scientific & Technological Research Council of Turkey (TUBITAK) Öğrenci Ödevi	<% 1
6	www.scribd.com İnternet Kaynağı	<% 1
7	Submitted to Marmara University Öğrenci Ödevi	<% 1
8	Submitted to Uludag University	

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	SEVİNÇ	Soyadı	ÖZGÜR
Doğ.Yeri	ŞİŞLİ	Doğ.Tar.	08.03.1984
Email	sevincbiolog@hotmail.com	Uyruğu	T.C.

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mez. Yılı
Doktora		
Yük.Lis.	Marmara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Biyokimya ABD	2010
Lisans	Trakya Üniversitesi Fen-Edebiyat Fak. Biyoloji Bölümü	2007
Lise	Şişli Kaptanpaşa Lisesi	2001

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1.	Öğretim Görevlisi	İstanbul Esenyurt Üniversitesi	2015-DEVAM
2.	Öğretim Görevlisi	İstanbul Kavram MYO	2011-2015
3.			-

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*	KPDS/ÜDS Puanı	(Diğer) Puanı
İngilizce	İyi	Orta	Orta	67,5	

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
LES Puanı	70		
(Diğer) Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
Microsoft Office Programları	İyi

Yayınları/Tebliğleri Sertifikaları/Ödülleri

1. Yayınlar

1.1. Uluslararası hakemli dergilerde yayınlanan makaleler

1. Pinar Kuru, Seyda Bilgin, Semih Tiber Mentese, Gokhan Tazegul, **Sevinc Ozgur**, Ozlem T. Cilingir, Dilek Akakin, Aysen Yarat, Ozgur Kasimay. Nicotine&Tobacco Research Advance Access published October 8, 2014 ‘Ameliorative Effect of Chronic Moderate Exercise in Smoke Exposed or Nicotine Applied Rats From Acute Stress’ (TÜBİTAK Teşvik Ödülü)
2. Z.N.O. KUMRAL, G. SENER, **S. OZGUR**, M. KOC, S. SULEYMANOGLU, C. HURDAG, B.C. YEGEN. Journal of physiology and pharmacology 2016, 67, 1, 45-55.
‘Regular exercise alleviates renovascular hypertension-induced cardiac/endothelial dysfunction and oxidative injury in rats.’

1.2. Uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitabında basılı bildiriler

Cell Membranes and Free Radical Research Volume2 Number 1 June 2010 ‘The effect of deuterium depleted water consumption on blood and liver biochemical parameters in healthy rats’

1.3. Yazılan kitaplar ve kitaplarda bölümler

1.4. Ulusal dergilerde yayınlanan makaleler

1.5. Ulusal bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitabında basılı bildiriler

Sağlık Hizmetleri Bölümündeki Kadın Öğrencilerin Sektördeki Cinsel Eşitsizlik Algısı, II.Sağlık Ekonomisi Kongresi, Ankara-2014, Poster Bildiri

1.6. Diğer Yayınlar

Özgür, S., Nardalı, Ö., Çonak, Ö.&Şahin, A.(2015) Bölüm: Mobbingin Kariyer Planlamasına Etkisi. Soalk A, Solak Ö.(Ed). Gündelik Hayat Sosyolojisi Açısından Suç ve Suç Korkusu. Ankara: Hegem Yayınları: Bilimsel ve Popüler Eserler Dizisi:51.

1.7. Sanatsal Etkinlikler

2. Projeler

3. İdari Görevler:

-İstanbul Kavram Meslek Yüksekokulu

Sağlık Kurumları İşletmeciliği Program Başkanlığı (12 Eylül 2011 - 31 Ağustos 2015)

Yüksekokul Kurulu Üyeliği (12 Eylül 2011 - 31 Ağustos 2015)

-İstanbul Esenyurt Üniversitesi Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksek Okulu

Tıbbi Görüntüleme Teknikleri Program Başkanlığı (1 Eylül 2015 - Devam etmekteyim.)

Yüksekokul Kurulu Üyeliği (1 Eylül 2015 - Devam etmekteyim.)

4. Bilimsel Kuruluşlara Üyelik

5. Sertifikalar, Ödüller

1. İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi **‘Deney Hayvanları Uygulama ve Etik Kursu’** Katılım Sertifikası (80 saatlik) Haziran 2007
2. Boğaziçi Üniversitesi **Moleküler Biyoloji ve Genetik Haftasonu Seminerleri** Katılım Belgesi 12-14 Mayıs 2006
3. İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı **‘Cerrahpaşa Kadın Doğum ve Tüp Bebek Günleri’** Katılım Sertifikası 14-17 Haziran 2007
4. Boğaziçi Üniversitesi Proje ve Araştırma Kulübü (PARK) **‘İnterdisiplinerlik Çalışma’** Katılım Belgesi 9-10 Mayıs 2008
5. Turkish Society of Molecular Medicine **‘III.International Congress of Molecular Medicine’** Attendance Certificate 5th-8th May 2009
6. **Sevinç Özgür, A. Yarat, T. Yardımcı.** The effect of deuterium depleted water consumption on blood and liver biochemical parameters in healthy rats. **3rd International Congress on Cell Membranes and Oxidative Stress: Focus on Calcium Signaling and TRP Channels**, 22-27 Haziran 2010 ISPARTA (Bu bildiri TÜBİTAK tarafından desteklenmiştir).
7. **Gülsün Memi, S. Özgür, A. Yarat, B.Ç. Yeğen.** The effect of chronic swimming exercise on several target tissues of the stressed female rats with or without functioning ovarian hormones: the role of the HPA axis. **3rd International Congress on Cell Membranes and Oxidative Stress: Focus on Calcium Signaling and TRP Channels**, 22-27 Haziran 2010 ISPARTA (Bu bildiri TÜBİTAK tarafından desteklenmiştir).
8. **Sevinç Özgür, A. Yarat , T. Yardımcı.** Deneysel diyabette bazı kan parametreleri üzerine döteryumu azaltılmış su tüketiminin etkisi. **24.Ulusal Kimya Kongresi**, 29 Haziran-2 Temmuz 2010 ZONGULDAK
9. Türk Fizyolojik Bilimler Derneği **36. Ulusal Fizyoloji Kongresi** Katılım Belgesi 14-17 Eylül 2010 Edirne
10. İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi **‘2nd International and interdiciplinary conference on Health, Culture and the Human Body’** Katılım Belgesi 13-15 September 2012 İstanbul
11. İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı **‘Real Time PCR ve Western Blot: Yeni gelişen teknolojiler ve klinik uygulamalar’** Katılım Belgesi 26-27 Mayıs 2014
12. İstanbul İl Sağlık Müdürlüğü **‘Nörolojik Hastalıklar Bilinçlendirme Sempozyumu’** Katılım Belgesi 8 Mayıs 2014
13. İstanbul Kavram Meslek Yüksekokulu **Etkinlik Başarı Belgesi (23.01.2014)**
14. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü **İntihal ve Yayın Etiği Çalıştayı** Katılım Belgesi (26.02.2019)
15. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Bilimsel Proje ve Yayın Hazırlama Çalıştayı Katılım Belgesi (09.04.2019)
16. İstanbul Esenyurt Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Öğrenci Kongresi Oturum Başkanı (25.04.2019)

Özel İlgi Alanları (Hobileri):

Sosyal sorumluluk projelerine aktif katılmak, kitap okumak, doğayı gezmek.

