

**T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
FARMAKOLOJİ ve TOKSİKOLOJİ ANABİLİM DALI**



**DENEYSEL ÜLSERATİF KOLİT
MODELİNDE KOLONA
HEDEFLENDİRİLEN LİNALOOL VE
LİKOPEN'İN
ETKİNLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI**

DOKTORA TEZİ

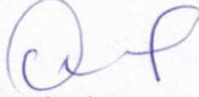
İbrahim Ozan TEKELİ

2016

ONAY SAYFASI

Prof. Dr. Mustafa KAPLAN

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü



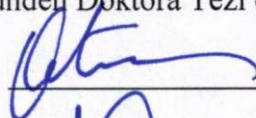
Bu tez Doktora Tezi standartlarına uygun bulunmuştur.

Prof. Dr. Gürdal DAĞOĞLU

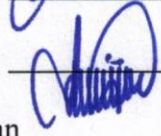
Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı Başkanı

Tez tarafımızdan okunmuş, kapsam ve kalite yönünden Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Ahmet ATEŞŞAHİN (1. Danışman)



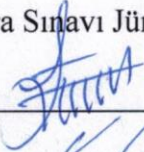
Doç. Dr. Fatih SAKİN (2. Danışman)



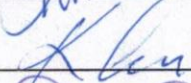
Danışman

Doktora Sınavı Jüri Üyeleri

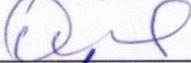
Prof. Dr. Songül SONAL



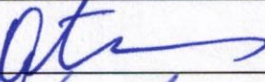
Prof. Dr. Kadir SERVİ



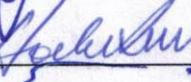
Prof. Dr. Gürdal DAĞOĞLU



Prof. Dr. Ahmet ATEŞŞAHİN



Prof. Dr. Haki KARA



Prof. Dr. Engin ŞAHNA



Doç. Dr. Fatih SAKİN



Her Zaman Yanımda Olan
Sevgili Eşim Tuğçe TEKELİ'ye



TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim boyunca ve tez çalışmalarım sırasında benden her türlü desteği ve yardımı esirgemeyen danışman hocam Prof. Dr. Ahmet ATEŞŞAHİN'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Doktora tez çalışmalarım boyunca devamlı olarak bilgilerinden yararlandığım ve desteklerini benden hiç esirgemeyen 2. danışmanım Doç. Dr. Fatih SAKİN ve Yrd. Doç. Dr. Mustafa YİPEL'e çok teşekkür ederim. Bana sağladıkları desteklerden dolayı Fırat Üniversitesi Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı öğretim üyeleri/elemanları Prof. Dr. Kadir SERVİ, Prof. Dr. Sadettin TANYILDIZI, Prof. Dr. Gürdal DAĞOĞLU, Prof. Dr. İzzet KARAHAN ve Arş. Gör. Mustafa Selim DOĞRU'ya teşekkür ederim.

Laboratuvar çalışmalarım sırasında; oksidatif stres ve yangı sitokini ölçümlerinde yardımlarını esirgemeyen Yrd. Doç. Dr. Pınar PEKER AKALIN'a, Western blot'ta protein ekspresyon düzeylerinin tayininde yardımlarını esirgemeyen Doç. Dr. Abdullah ASLAN'a, histopatoloji verilerinde emeği geçen Doç. Dr. Ali Osman ÇERİBAŞI'na, etken maddelerin kolona hedeflendirilmesinde emekleri geçen Doç. Dr. Cahit DEMETGÜL ve Yrd. Doç. Dr. Ali Fuat GÖKÇE'ye, tezin yazım aşamasında yardımını esirgemeyen Yrd. Doç. Dr. Cemil KÜREKÇİ'ye teşekkürü bir borç bilirim. Ayrıca manevi desteklerini her zaman yanımda hissettiğim eşim ve aileme çok teşekkür ederim.

Bu çalışma Mustafa Kemal Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi (MKÜBAP, No 14025) tarafından desteklenmiştir. Desteklerinden dolayı MKÜBAP'a teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

III.Onay Sayfası	ii
IV.Teşekkür	iv
V.İçindekiler	v
VI.Tablo Listesi	ix
VII.Şekil Listesi	x
VIII.Kısaltmalar Listesi	xi
1. Özet	1
2. Abstract	3
3. Giriş	5
3.1. Yangısal Bağırsak Hastalıkları	5
3.1.1. Ülseratif Kolit	6
3.1.1.1. Epidemiyolojisi	6
3.1.1.2. Etiyoloji ve Patogenezi	7
3.1.1.3. Ülseratif Kolit’te Oksidatif Stresin Rolü	9
3.1.1.3.1. Lipit Peroksidasyon ve Malondialdehid (MDA)	10
3.1.1.3.2. Antioksidan Enzimler	11
3.1.1.3.2.1. Glutasyon Peroksidaz	12
3.1.1.3.2.2. Katalaz	12
3.1.1.3.2.3. Süperoksit Dismutaz	13
3.1.1.3.2.4. Glutasyon	14
3.1.1.4. Ülseratif Kolit’te Yangı Mediyatörlerinin Rolü	14
3.1.1.5. Deneysel Kolit Modelleri	17
3.1.1.5.1. Asetik Asit ile Oluşturulan Kolit Modeli	17

3.1.1.5.2. Trinitrobenzen Sülfonik Asit ile Oluşturulan Kolit Modeli	19
3.1.1.5.3. Dekstran Sülfat Sodyum ile Oluşturulan Kolit Modeli	20
3.1.1.5.4. İndometazin ile Oluşturulan Kolit Modeli	21
3.1.1.5.5. Oksazolon ile Oluşturulan Kolit Modeli	22
3.1.1.6. Ülseratif Kolit'in Tedavisi	22
3.2. Karotenoidler	23
3.2.1. Likopen	23
3.2.1.1. Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri	24
3.2.1.2. Emilim ve Doku Dağılımı	25
3.2.1.3. Metabolizması	26
3.2.1.4. Likopen'in Etkileri	27
3.2.1.4.1. Likopen'in Antioksidan Etkisi	27
3.2.1.4.2. Likopen'in Antikanserojenik Etkisi	28
3.2.1.4.3. Likopen'in Antiinflamatuvar Etkisi	29
3.3. Monoterpenler	30
3.3.1. Linalool	31
3.3.1.1. Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri	32
3.3.1.2. Emilim, Metabolizma ve Atılım	32
3.3.1.3. Linalool'ün Etkileri	33
3.3.1.3.1. Linalool'ün Antioksidan Etkisi	33
3.3.1.3.2. Linalool'ün Antikanserojen Etkisi	34
3.3.1.3.3. Linalool'ün Antiinflamatuvar Etkisi	34
3.4. Etken Maddelerin Kolona Hedeflendirilmesi	36
4. Gereç ve Yöntem	42

4.1. Gereç	42
4.1.1. Kullanılan Kimyasallar ve Sarf Malzemeleri	42
4.1.2. Kullanılan Alet ve Cihazlar	45
4.1.3. Hayvan Materyali	46
4.1.4. Deney Grupları	47
4.1.5. Kolona Hedeflendirme İşlemleri	48
4.1.5.1. N-Süksinil Kitosan'ın Hazırlanması	49
4.1.5.2. Etken Maddelerin N-Süksinil Kitosan ile Kolona Hedeflendirilmesi	49
4.1.6. Örneklerin Alınması ve Hazırlanması	50
4.2. Yöntemler	51
4.2.1. Klasik Histopatoloji	51
4.2.2. Oksidatif Stres Parametrelerinin Ölçülmesi	52
4.2.2.1. Doku MDA Düzeylerinin Ölçümü	52
4.2.2.2. Doku GSH Düzeylerinin Ölçümü	52
4.2.2.3. Doku GPx Enzim Aktivitesinin Ölçümü	52
4.2.2.4. Doku CAT Enzim Aktivitesinin Ölçümü	53
4.2.2.5. Doku Protein Miktarı Ölçümü	53
4.2.3. Doku Sitokin Düzeylerinin Ölçümü	54
4.2.4. Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektrofrez (SDS-PAGE) ve Western Blotlama Tekniği ile Proteinlerin Analizi	55
4.2.4.1 Kolon Dokusundan Çekirdek Proteinlerinin Ayrılması	55
4.2.4.2. Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektrofrez	56
4.2.4.3. Western Blot Analizi ile Protein Ekspresyon Düzeylerinin Belirlenmesi	57
4.2.4.3.1. Stok Solüsyonlar ve Tamponlar	57

4.2.4.3.2. NF-kB, Nrf-2 ve COX-2 Ekspresyon Düzeylerinin Belirlenmesi	60
4.2.5. İstatistiksel Analizler	60
5. Bulgular	62
5.1. Histopatoloji Bulguları	62
5.2. Oksidatif Stres ve Antioksidan Parametre Bulguları	66
5.3. Yangı Sitokinleri Bulguları	69
5.4. NF-kB, Nrf-2 ve COX-2 Protein Ekspresyon Düzeyi Bulguları	71
6. Tartışma	75
7. Kaynaklar	85
8. Özgeçmiş	96

TABLO LİSTESİ

Tablo 1: Deney grupları mikroskopik skorlama kriterleri	51
Tablo 2: Deney gruplarına ait mikroskopik skorlama değerleri	63
Tablo 3: Deney grupları kolon dokusu MDA, GSH, GPx ve CAT düzeyleri	68
Tablo 4: Deney grupları kolon dokusu TNF- α , IL-1 β ve IL-6 düzeyleri	71



ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1: Ülseratif kolit ve Crohn hastalığı'nın kolonda yerleşimi	5
Şekil 2: Likopen'in kimyasal yapısı	25
Şekil 3: Likopen'in etki mekanizmaları	27
Şekil 4: Linalool'un kimyasal yapısı	32
Şekil 5: Kitosan ve N-Süksinil Kitosan'ın kimyasal yapısı	40
Şekil 6: Grup 1 (Kontrol) kolon mukozasının normal mikroskopik görünümü	64
Şekil 7: Grup 2 (ÜK)'de kolonun tüm katmanlarını tutan nötrofil infiltrasyonları, şiddetli ödem, hemoraji ve hiperemi	64
Şekil 8: Grup 3 (S)'de lamina propriada nekroz ve submukozada orta şiddette ödem ile birlikte lenfoid hiperplazi	65
Şekil 9: Grup 6 (HLN)'da submukozada orta şiddette ödem ile birlikte mukozal, submukozal ve muskularis propria'da ılımlı yangısal değişimler	65
Şekil 10: Grup 7 (HLK)'de submukozada şiddetli ödem ile birlikte mukozal, submukozal ve muskularis propria'da yangısal değişimler	66
Şekil 11: Deney grupları NF-kB protein ekspresyon düzeyleri	73
Şekil 12: Deney grupları Nrf-2 protein ekspresyon düzeyleri	73
Şekil 13: Deney grupları COX-2 protein ekspresyon düzeyleri	74

KISALTMALAR LİSTESİ

AP1	: Aktivatör protein 1
APC	: Antijen sunan hücreler
Bax	: Bcl-2 ilişkili X protein
Bcl-2	: B-hücreli lenfoma 2
CAT	: Katalaz
CMO-I	: Karoten-15,15'-monooksijenaz
CMO-II	: Karoten-9'10'-monooksijenaz
CO₂	: Karbondioksit
COX-2	: Siklooksijenaz-2
CRP	: C-reaktif protein
DAB	: 3,3'-Diaminobenzidin
DNA	: Deoksiribonükleik asit
DSÖ	: Dünya sağlık örgütü
DSS	: Dekstran sülfat sodyum
DTNB	: 5,5'-ditiyo-bis[2-nitrobenzoik asit]
GSH	: İndirgenmiş glutatyon
GPx	: Glutatyon peroksidaz
GR	: Glutatyon redüktaz
GSSG	: Okside glutatyon
GST	: Glutatyon-S-transferaz
H&E	: Hematoxylin-eosin
HDL	: Yüksek dansiteli lipoprotein
HLK	: Hedeflendirilmiş likopen

HLN	: Hedeflendirilmiş linalool
HO·	: Hidroksil anyonu
H₂O	: Su
H₂O₂	: Hidrojen peroksit
HRP	: Horseradish peroksidaz
IFN	: İnterferon
IL	: İnterlöykin
iNOS	: Uyarılabilir nitrik oksit sentaz
JNK	: c-Jun N-terminal kinaz
K	: Kontrol
KH	: Crohn hastalığı
LDL	: Düşük dansiteli lipoprotein
LK	: Likopen
LN	: Linalool
MAPK	: Mitojen-aktive edilmiş protein kinaz
MDA	: Malondialdehid
MPO	: Myeloperoksidaz
NADPH	: Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat
NF-κB	: Nükleer faktör kappa B
Nrf-2	: Nükleer faktör eritroit 2-ilşkili faktör 2
NMDA	: N-metil-D-aspartik asit
NO·	: Nitrik oksit
NO₂	: Nitrojen dioksit
O₂	: Oksijen

$^1\text{O}_2$	: Singlet oksijen
$^2\text{O}_2^-$	: Süperoksit anyonu
PBS	: Fosfat tamponu
PCNA	: Prolifere hücre çekirdek antijeni
PCR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
PGE	: Prostaglandin E
PIC	: Proteaz inhibitör kokteyl
PMID	: 3-(3-Pyridylmethylidene)-2-indolinone
PUFA	: Çoklu doymamış yağ asitleri
RNA	: Ribonükleik asit
$\text{ROO}^\bullet$	: Peroksil radikali
ROT	: Reaktif oksijen türleri
RNT	: Reaktif nitrojen türleri
RS	: Tiyol
RSO_2	: Sülfonil
RST	: Reaktif sülfür türleri
S	: Sülfasalazin
SAB	: Örnek uygulama tamponu
SDS PAGE	: Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi
SE	: Standart hata
SOD	: Süperoksit dismutaz
SR-B1	: Çöpçü reseptör sınıf B tip 1 protein
TEMED	: Tetramethylethylenediamine
TNF	: Tümör nekroz faktör

TBA	: Tiyobarbitürik asit
TBARS	: Tiyobarbitürik asit reaktif sübstansları
TNBS	: Trinitrobenzen sülfonik asit
ÜK	: Ülseratif kolit
VLDL	: Çok düşük dansiteli lipoprotein
YBH	: Yangısal bağırsak hastalıkları
5-ASA	: 5-aminosalisilik asit



1. ÖZET

Bu çalışma, deneysel olarak ülseratif kolit (ÜK) oluşturulan ratlarda linalool ile likopen'in geleneksel ve kolona hedeflendirilerek kullanılmasının muhtemel koruyucu etkilerini karşılaştırmalı olarak araştırmak amacıyla gerçekleştirilmiştir.

Çalışmada her grupta 7 adet olmak üzere toplam 49 adet Wistar Albino rat kullanıldı. Geleneksel ve hedeflendirilmiş linalool (200 mg/kg) ile likopen (10 mg/kg) ratlara 7 gün uygulandıktan sonra intrarektal olarak %4'lük asetik asit kullanılarak ÜK oluşturuldu. Çalışmanın sonunda hayvanlar dekapite edilerek analizler için kolon dokuları alındı.

Histopatolojik analizlerde, ülseratif lezyonların derinlik ve genişlikleri açısından skorlar, en yüksek ÜK grubunda bulunurken, hedeflendirilen gruplarda düşük bulundu ($P<0.001$). ÜK grubunda kolon dokusu malondialdehit (MDA) seviyelerinin yükseldiği ($P<0.05$), indirgenmiş glutatyon (GSH) düzeyleri ile katalaz (CAT) ve glutatyon peroksidaz (GPx) aktivitelerinin ise azaldığı ($P<0.05$) tespit edildi. ÜK grubuyla karşılaştırıldığında linalool ve likopen grupları ile hedeflendirilen gruplarda MDA seviyeleri azalırken ($P<0.05$), GSH düzeyleri ile CAT ve GPx aktivitelerinin arttığı belirlendi. Ayrıca, ÜK grubunda tümör nekroz faktör α (TNF- α), interlöykin 1 β (IL-1 β) ve interlöykin 6 (IL-6) düzeyleri yüksek bulunurken ($P<0.05$) hedeflendirilen likopen'in tüm değerleri, linalool'ün ise IL-1 β ve IL-6 düzeylerini düşürdüğü ($P<0.05$) tespit edildi. İlaveten; ÜK grubunda nükleer faktör kappa B (NF-kB) ve siklooksijenaz 2 (COX-2) protein ekspresyon düzeylerinin yüksek, nükleer faktör eritroit 2-ilışkili faktör 2 (Nrf-2) düzeylerinin düşük olduğu ($P<0.05$), hedeflendirilen gruplarda ise NF-kB ve COX-2 düzeylerinin azaldığı, Nrf-2 düzeylerinin ise arttığı görüldü ($P<0.05$).

Sonuç olarak; deneysel ÜK modelinde kolonda meydana gelen histopatolojik, oksidatif ve yangısal hasarlara karşı etken maddelerin geleneksel yolla kullanımına kıyasla hedeflendirilerek kullanılmasının daha etkili olduğu ortaya konulmuştur. Ayrıca ÜK modelinde hedeflendirilmiş likopen uygulanmasının linalool'den daha başarılı olduğu tespit edilmiştir. Bu bulgular ışığında, yangısal bağırsak hastalıklarının korunmasında kolona hedeflendirilmiş likopen ve linalool'ün etkili kullanım potansiyeline sahip olduğu kanaatine varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Ülseratif kolit, kolona hedeflendirme, likopen, linalool, koruyucu etki.

2. ABSTRACT

Investigation of Efficiency of Colon-Targeted Linalool and Lycopene in the Experimental Model of Ulcerative Colitis

This study was carried out with the aim of the investigation of possible protective effect of conventional and colon targeted linalool and lycopene comparatively in rats with experimental ulcerative colitis (UC).

A total of 49 Wistar Albino rats (7 animals in each group) were used. Conventional and colon targeted linalool (200 mg/kg) and lycopene (10 mg/kg) were given to them for 7 days and then UC was induced using 4% acetic acid intrarectally. At the end of the experiment, the animals were decapitated and colon tissues were taken for analysis.

Scores in terms of depth and width of ulcerative lesions were found to be highest in the UC group while lower in the targeted groups ($P < 0.001$). It was detected that colon tissue malondialdehyde levels (MDA) in the UC group were higher ($P < 0.05$) while reduced glutathione (GSH) levels and catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPx) activities were decreased ($P < 0.05$). However, MDA levels were found to be lower in the targeted linalool and lycopene groups ($P < 0.05$), while GSH levels, CAT and GPx activities were increased compared with UC group. Tumor necrosis factor α (TNF- α), interleukin 1 β (IL-1 β) and interleukin 6 (IL-6) levels were also higher ($P < 0.05$) in the UC group when compared to targeted lycopene group. It was detected that targeted linalool decreased level of IL-1 β and IL-6 ($P < 0.05$). Additionally, nuclear factor kappa B (NF- κ B) and cyclooxygenase 2 (COX-2) protein expression levels were found to be higher, nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf-2) was lower in the UC group ($P < 0.05$) where NF-

kB and COX-2 protein expression levels were found to be lower and Nrf-2 was higher in the targeted groups ($P<0.05$).

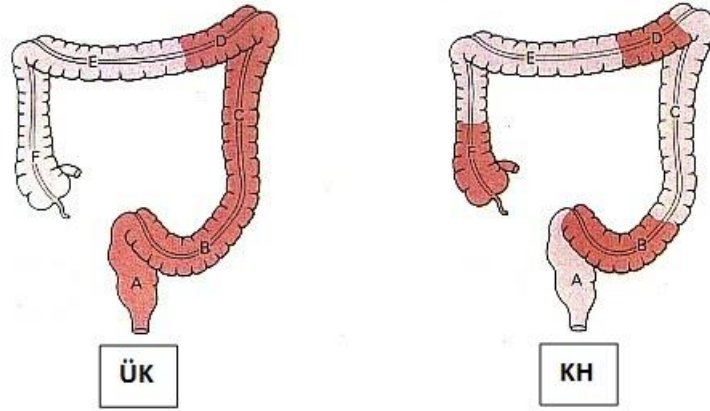
Consequently, the usage of targeted agents was found to be more effective than conventional usage against to histopathologic, oxidative and inflammatory damage occurred in the colon in the experimental UC model. Also targeted lycopene was found to be more effective than targeted linalool in the UC model. It was concluded from these data that targeted lycopene and linalool might have potential usage in the prevention of inflammatory bowel disease.

Key Words: Ulcerative colitis, colon targeting, lycopene, linalool, protective effect.

3. GİRİŞ

3.1. Yangısal Bağırsak Hastalıkları

Yangısal bağırsak hastalıkları (YBH), gastrointesinal kanalda sık tekrarlayan akut veya kronik inflamasyonla karakterize klinik, patolojik ve epidemiyolojik bulgularla seyreden ancak etiyojisi tam olarak aydınlatılamamış bir grup hastalığı kapsar (1). YBH'nin en önemli iki formu Crohn hastalığı (KH) ve ülseratif kolit (ÜK)'tir. Bu hastalıkların her ikisi de ishal, kanlı dışkı, kilo kaybı, karın ağrısı, ateş ve yorgunluk gibi benzer klinik semptomlar göstermektedir (2). Bununla birlikte ÜK öncelikli olarak kolon ve rektumun mukozal yüzeyini etkilemesine karşın (Şekil 1), KH gastrointestinal kanalın herhangi bir kısmında görülebilmektedir (3,4).



Şekil 1. Ülseratif kolit ve Crohn hastalığı'nın kolonda yerleşimi (5).

3.1.1. Ülseratif Kolit

Ülseratif kolit, çoğunlukla orta yaş grubu olmak üzere gençlerde de görülen kolonun kronik tekrarlayan yangısal bir hastalığıdır ve genellikle ömür boyu tedavi gerektirir (6). KH'de yangı bağırsak duvarının tüm katmanlarını etkilerken, ÜK'de yangı genellikle mukoza tabakası ile sınırlıdır (7). ÜK'de hastalık lezyonun yerleştiği bölgeye göre farklı isimlerle adlandırılmaktadır. Örneğin; hastalık yalnızca rektum'da görülüyorsa ülseratif proktit, hastalık inen kolonda görülüyorsa, sınırlı ya da distal kolit şayet hastalık tüm kolonda yaygın şekilde görülüyorsa pankolit olarak adlandırılmaktadır. Hastalığın ilk semptomları akut, hızlı bir şekilde görülebileceği gibi kademeli bir şekilde de ortaya çıkabilmektedir. Hastalığın hafif belirtileri arasında dışkıda yumuşama, abdominal kramplar ve ishal görülürken şiddetli belirtiler arasında kilo kaybı, yorgunluk, iştah kaybı, dışkıda mukus artışı, şiddetli rektal kanama, ateş ve anemi görülebilmektedir (2). ÜK hastalarının kolon kanserine yakalanma olasılığı normal bireylere göre en az iki kat daha fazladır. Karsinogenez riskiyle ilgili olarak, genomik instabiliteyle ilişkili kolonda oluşan yangı burada epitel hücre döngüsünü artırarak neoplastik dönüşüme neden olabilmektedir. Ayrıca ülseratif kolit hastalarının yarısından fazlasında hastalığın başlamasını takip eden beş yıl içinde nüks görülebilmektedir (8).

3.1.1.1. Epidemiyolojisi

Son yıllarda ÜK görülme oranlarında sürekli artışlar olduğu gözlenmektedir. Amerika Birleşik Devletleri'nde YBH görülen insan sayısının 1-2 milyon civarında olduğu ve bunların da yaklaşık yarısının ÜK hastası olduğu tahmin edilmektedir. Hayatın herhangi bir döneminde görülebilmesine rağmen ÜK

için 15-30 ve 50-70 yaş arasındaki bireyler potansiyel risk grubunu oluşturmaktadır. Kadın ve erkeklerde hastalığın görülme oranı eşittir. ÜK'li insanların yaklaşık %20'sinin YBH olan yakın akrabası vardır. Kafkas ve Kuzey Avrupa kökenli ırklarda hastalığın görülme oranı yüksek olmasına karşın Asya, Japonya, Afrika ve Güney Amerika ırklarında görülme oranı daha düşüktür. ÜK'nin insidensi Avrupa'da yüz binde 24.3 iken bu değer Kuzey Amerika'da 19.2'dir. Hastalığın prevalansı Kuzey Avrupa ve Kuzey Amerika'daki insanlarda yüz binde 90 ile 505 arasında iken Doğu ve Güney Avrupa'da bu değer daha düşüktür. Anne sütü ile beslenme, apendektomi ve sigara ÜK riskinde azalmayla ilişkiliyken batı tarzı beslenme, solaklık ve depresyon ÜK riskini artırabilmektedir (2, 9).

3.1.1.2. Etiyoloji ve Patogenezi

Ülseratif kolit'in etiyojisi tam olarak aydınlatılmamış olmakla birlikte, olası faktörlerin genetik etki, immunolojik anormallikler ve çevresel faktörler olabileceği bildirilmiştir (10). Araştırmacılar son yıllarda ilgilerini çevre (özellikle bağırsak florası) ve bağırsak bariyerlerinin savunma mekanizmaları (özellikle mukus tabakası ve mukozal bağışıklık sistemi) arasındaki etkileşime çevirmişlerdir (9). Mukozal immun sistemin ilk savunma basamağını epitel örtü oluşturmaktadır. Epitel örtü bağırsak lümenindeki antijenik maddelerin gastrointestinal kanalın immunojenik aktif bölgesine ulaşmasını engeller. Epitel hücrelerden salgılanan mukus, immun hücrelerden salgılanan IgA, glikoproteinler ve fosfolipitler epitel hücreler üzerinde koruyucu bir örtü oluşturur ve mikroorganizmaların hücre membranlarına bağlanmasını engeller. Ayrıca diğer taraftan mukozayı kimyasal ajanların oluşturduğu hasara karşı da korur. Bağırsak duvarının geçirgenliği

normalde epitelyum tabakasının bütünlüğü, mukus üretimi, bağırsak peristaltığı ile koruyucu faktörlerin salgılanmasına bağlıdır. YBH’de mukozada geçirgenlik arttığından dolayı lümendeki antijenik yapılar epitelden kolaylıkla altındaki immun alana geçerek yangısal süreci başlatır (11, 12). ÜK immun sistem aracılı bir hastalık olarak düşünülebilir ve genetik olarak yatkın bireylerin bağırsak lümeni içindeki antijenlere karşı verdiği düzensiz immun cevaplardan dolayı görülebilmektedir. YBH için genom ilişkilendirme çalışmaları yapılarak YBH ile ilişkili 163 lokus tespit edilmiş ve bu lokusların çoğunun ÜK ve KH’nın her ikisiyle de ilişkili olduğu bildirilmiştir. Bu bölgeler otofaji, mikroorganizmaların tanınması, lenfosit sinyalizasyonu, endoplazmik retikulum stresine cevap, sitokin sinyalizasyonu gibi çeşitli işlevler için aday genleri içerir. Yapılan çalışmalarda prevalansı düşük bir bölgeden prevalansı yüksek olan bir bölgeye göç eden insanların bu bölgede doğan çocuklarında ÜK riskinde artış olduğu, bunun sebebinin de ÜK gelişiminde çok önemli olan erken çocukluk ve bebeklik dönemlerindeki maruz kalınan çevresel faktörler ile immun sistem ve mikrobiyota gelişimine olan etkiler olduğu ortaya konulmuştur. Batı tarzı diyetlerde olduğu gibi yüksek oranda doymuş diyet (süt kaynaklı yağ gibi) bağırsak florasının bileşimini değiştirerek kolit insidensinde artışa yol açabilmektedir (9). Farklı genetik, immun ve çevresel faktörlere karşılık olarak gelişen hücresel immun reaksiyon, aşırı artmış yangısal sitokinler (Tümör nekroz faktör- α , interferon- γ , interlöykin 2 vd.), nükleer faktör kappa B (NF-kB)'nin aktivasyonu ve artmış serbest radikal üretiminin (reaktif oksijen türleri gibi) yanı sıra azalmış antioksidan kapasite ÜK'nin patogenezinde önemli bir yere sahiptir (13, 14). Ek olarak ÜK’de epitel hücre kayıplarında apoptoz’un da önemli bir rol oynadığı bildirilmiştir. Yapılan çalışmalarda epitel hücre apoptozundaki artış

ve yangı hücrelerindeki apoptozda inhibisyon kolon dokusundaki hasar ve immünolojik anormalliklerle yakından ilişkili bulunmuştur (15).

3.1.1.3. Ülseratif Kolit'te Oksidatif Stresin Rolü

Serbest radikaller dış yörüngelerinde bir veya daha fazla eşleşmemiş elektron içeren yüksek derecede reaktif moleküller olarak bilinirler. Serbest radikaller genellikle kararsız ve oksijen, nitrojen (reaktif nitrojen türleri: RNT) ve sülfürden (reaktif sülfür türleri: RST) köken alırlar (16). Hücrede enerji üretim basamaklarında kullanılan oksijen (O_2), tüketim sürecinde reaktif oksijen türleri (ROT)'ni meydana getirir. Canlılar yaşamları süresince az veya çok etkin serbest oksijen gruplarını üretirler. Az miktardaki serbest radikaller bağışıklık sistemi hücreleri için (nötrofil ve makrofajlar) gereklidir. Ancak, kontrolsüz bırakılırsa hücreler daha çok serbest radikal üretir ve hücrelerin savunma mekanizmaları zayıflar (17, 18). ROT yüksek oranda aktif kimyasal yapılar olmakla birlikte protein, lipit ve nükleik asit gibi makromolekülleri hedef alırlar. Bu moleküllerde protein yapı bozukluğu, lipit peroksidasyon ve DNA mutasyonlarına neden olurlar. Bundan dolayı, ROT'un fazla miktarda sentezi hücre ve doku hasarı ile abartılı yangı ve karsinogenezise sebep olabilmektedir (19). Biyolojik sistemlerdeki ROT; süperoksit anyonu ($^2O_2^-$), hidroksil radikali ($HO\cdot$), nitrik oksit ($NO\cdot$), peroksil radikali ($ROO\cdot$) ve radikal olmayan hidrojen peroksit (H_2O_2) gibi maddeler oksidatif stresin oluşmasındaki en önemli sebeplerdendir (17).

Canlıların yaşamsal ve biyokimyasal fonksiyonlarını devam ettirebilmeleri için prooksidanlar ve antioksidanlar arasında her zaman gözetilmesi gereken bir denge vardır. Bu dengenin prooksidanlar lehine bozulması oksidatif strese yol açar.

Çoğunlukla bazı yangısal hücrelerin aktivasyonu ve infiltrasyonu ile yol açılan kolon mukozası içindeki yangısal bozukluklarda, reaktif oksijen ve azot türevlerinin miktarlarında artışlar görülmektedir (12, 20). Kolon epitelinde fazla miktarda üretilen hidrojen peroksitin, bazal membran ve hücreler arası bağlantılara zarar vererek submukozal bölgeye bakteriyel antijenlerin geçişine neden olabileceği ve bu antijenlere karşı oluşan immün yanıtın ÜK'ye sebep olabileceği öne sürülmüştür (12, 19). Son yıllarda yapılan çalışmalarla YBH'de oksidatif stresekteki artış ve antioksidan kapasitedeki azalışlar ortaya konulmuştur. Bu hastalık için uygulanan standart tedavinin etkinliği (aminosalisilatlar gibi) onların antioksidan ve serbest radikal süpürücü etkileriyle ilişkili bulunmuş ve yapılan çalışmalarda çeşitli antioksidan maddelerin bu hastalığın tedavisindeki etkinlikleri denenmiştir (10).

3.1.1.3.1. Lipit Peroksidasyon ve Malondialdehid (MDA)

Lipit peroksidasyon hücresel bileşenlere ciddi zararlar veren reaksiyonlardan biridir. Hücre membranında bulunan araşidonik asit gibi çoklu doymamış yağ asitleri (PUFA), serbest radikallerle reaksiyona girip lipit peroksidasyona uğrayabilirler. Serbest radikallerin hücre zarları yağ asitleriyle reaksiyona girerek zar bütünlüklerinin bozulmasına sebep oldukları süreç lipit peroksidasyon olarak adlandırılır. MDA gibi lipit peroksidasyon kaynaklı aldehitler serbest radikallerle (oksijen ve hidrojen serbest radikalleri) karşılaştırıldıklarında nispeten daha stabildirler ve yüksek derecede reaktif elektrofilik molekül olarak hareket ederler. MDA üç karbonlu, düşük molekül ağırlıklı bir aldehittir. Lipit peroksidasyonun ikincil ürünlerinden olan MDA, hücre ve dokulardaki oksidatif

hasarın değerlendirilmesinde en sık kullanılan göstergelerden birisidir ve lipid peroksidasyonun şiddetiyle orantılı olarak artmaktadır (21, 22).

3.1.1.3.2. Antioksidan Enzimler

Biyolojik sistemler fazla miktarda artmış serbest radikalleri nötralize etmek ve onların zararlı etkilerine karşı hücreleri korumak için antioksidan sistemler ile donatılmışlardır. Antioksidanlar enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanlar olarak iki kategoriye ayrılır. Enzimatik antioksidanlar birincil ya da ikincil enzimlerdir. En etkili antioksidan enzimler birincil enzim olarak bilinen Glutasyon peroksidaz (GPx), Katalaz (CAT) ve Süperoksit dismutaz (SOD)'dır. Peroksiredoksin de birincil enzimler içinde yer almasına rağmen az miktarda peroksiti nötralize edebilmektedir. Glutasyon redüktaz (GR) ise ikincil enzim olarak bilinir ve doğrudan serbest radikalleri nötralize etme etkisi olmasa da okside glutasyon (GSSG) ve glikoz-6-fosfat dehidrojenazı düşürür, NADPH'ı yeniler ve diğer antioksidanlar için destekleyici role sahiptir. Enzimatik olmayan antioksidanları metabolik antioksidanlar ve gıda antioksidanları oluşturmaktadır. Metabolik antioksidanlar; tiyol antioksidanlar (glutasyon, tioredoksin, glutaredoksin, lipoik asit), melatonin, koenzim Q, ürik asit, bilirubindir. Gıda antioksidanları ise vitamin C ve E, karotenoidler, iz elementler (selenyum, sülfür, çinko), polifenolik bileşikler gibi doğal gıdalar ile beslenme takviyelerinden elde edilen eksojen bileşiklerdir (16, 19).

3.1.1.3.2.1. Glutasyon Peroksidaz

Bu enzim selenyum-bağımlı (GPx) ve selenyum-bağımsız (glutasyon-S-transferaz, GST) olmak üzere iki formda bulunur. Bu antioksidanlar, aktif bölgelerinde selenyum bağlama, katalitik mekanizma ve alt ünite sayısı açısından farklıdırlar. Tetramerik enzimler ailesinden olan GPx aktif bölgesinde selenosistein amino asitini içerir ve H_2O_2 ile lipid peroksitleri indirgemek için indirgenmiş glutasyon (GSH) gibi düşük molekül ağırlıklı tiyollere ihtiyaç duyar. GPx, H_2O_2 veya organik peroksit (ROOH)'in su veya alkole indirgenmesini katalizler. Bu işlemler GSH varlığında meydana gelir. GSH, GPx'in katalitik reaksiyonu vasıtasıyla GSSG'ye dönüştürülür. Substrat olarak H_2O_2 için GPx ve CAT arasında bir yarışma olmakla birlikte düşük seviyelerdeki oksidatif hasara karşı ana korumayı GPx sağlar (16, 23). Farklı genler tarafından kodlanan dört GPx izomeri bulunmaktadır. Bunlar sitozolik ve mitokondrial GPx (cGPx veya GPx1), sitozolik (GPx2), ekstraselüler (GPx3 veya GPxP) ve fosfolipit hidroperoksit (GPx4) olarak tanımlanmaktadır (16). GPx1 her yerde bulunur ve H_2O_2 ile yağ asiti peroksitlerini indirger fakat esterleşmiş peroksil lipidleri indirgeyemez. Esterleşmiş lipidler GPx4 tarafından indirgenir ve düşük molekül ağırlıklı tiyollere bu tepkimede ihtiyaç duyulur. GPx2 diyetle alınan peroksitleri azaltmak için mide ve bağırsaktaki epitel hücrelerde lokalize olmuştur. GPx3 hücre dışı bölmelerde bulunan GPx ailesinin bir üyesidir ve memelilerde en önemli hücre dışı antioksidan enzimlerden birisi olduğuna inanılmaktadır (23).

3.1.1.3.2.2. Katalaz

Katalaz tetramerik porfirin (dört eş monomer) içeren bir enzimdir ve esas olarak peroksizomlarda lokalize olmuştur. Yapısındaki her bir monomer aktif

bölgesinde "heme" grubu içerir. İki basamakta H_2O_2 'nin su ve moleküler oksijene dönüşmesini katalize eder. Alt birimde bağlı olarak bulunan NADPH'nin varlığı H_2O_2 tarafından inaktive edilen enzimin korunmasına yardımcı olur. CAT bilinen tüm enzimler arasında en fazla dönüşüm oranına sahip enzimlerden birisidir ve dakikada yaklaşık 6 milyon molekül H_2O_2 'yi su ve oksijene dönüştürebilmektedir. Tüm dokularda bulunabilmesine rağmen eritrositler ve karaciğer en yüksek enzim aktivitesine sahip dokulardır (16, 23).

3.1.1.3.2.3. Süperoksit Dismutaz

Bir metalloenzim olan SOD, vücuttaki en etkili antioksidan enzimlerden birisidir ve canlı hücrelerde ROT'a karşı ilk savunma hattını oluşturduğu düşünülmektedir. SOD $O_2^{\bullet-}$ 'nin O_2 ve H_2O_2 'ye dismutasyonunu teşvik eder. Üretilen H_2O_2 daha sonra CAT ve GPx tarafından ortamdan uzaklaştırılır. SOD'un birkaç izoformu vardır. Bu izoformlar kofaktör ve alt ünite sayısı, aminoasit yapısı ve aktif metal merkezinin tabiatı gibi birçok açıdan farklılıklar içerirler. Memelilerde farklı doku dağılımı ve lokalize olduğu spesifik bölge açısından 3 farklı SOD türü tanımlanmıştır. Bunlar sitozolik bakır çinko SOD (Cu Zn-SOD), mitokondriyal mangan SOD (Mn-SOD) ve hücre dışı SOD (EC-SOD)'dur. Bu izoformlar arasında tüm hücrelerde mitokondri içinde lokalize olan Mn-SOD, antitümör etkinliğinin yanında en etkili antioksidan enzimlerden birisi olarak bilinir. Yalnızca birkaç hücre tipinin (fibroblast ve endotelial hücreler) sentez edebildiği EC-SOD hücrenin yüzeyinde lokalize olmuştur ve heparin ile heparin sülfata yüksek affinite gösterir (16, 23).

3.1.1.3.2.4. Glutasyon

Glutasyon çoğunlukla sitozol olmak üzere tüm hücre bölmelerinde bol miktarda bulunan önemli bir antioksidandır. GSH/GSSG oranı oksidatif stresin önemli bir belirleyicisidir. Glutasyon çeşitli yollarla antioksidan özelliğini göstermektedir. Glutasyon H_2O_2 ve lipid peroksitlerle tepkimeye girerek onların detoksifiye olmalarını sağlar. Glutasyon H_2O_2 'ye elektron vererek onun su ve oksijene indirgenmesini sağlar. Glutasyon redüktaz ise elektron vericisi olarak NAD(P)H'ı kullanarak GSSG'yi tekrar GSH'a indirger. Glutasyon, GPx ve GSH transferaz gibi birkaç detoksifiye edici enzim için kofaktördür. Vitamin C ve E'nin aktif formlarına döndürülmelerinde aktif role sahiptir. Proapoptotik ve antiapoptotik sinyal yollarıyla etkileşerek apoptoza karşı hücreleri korumaktadır. Glutasyon ayrıca AP-1, NF-kB ve Sp-1 gibi bazı transkripsiyon faktörlerini düzenler ve aktive eder (23).

3.1.1.4. Ülseratif Kolit'te Yangı Mediyatörlerinin Rolü

Ülseratif kolit'in patolojik mekanizmasının bağırsak lümenindeki antijenlere karşı gelişen immün cevaptaki bozukluklarla ilişkili olduğu düşünülmektedir. ÜK hastalığı birçok mikroorganizmanın ikamet ettiği kolonda meydana gelir. Normal bağırsak mikroflorası yaklaşık 400 farklı bakteri türünü kapsamaktadır ve terminal ileum ile kolon bu bakterilerin en yoğun bulunduğu bağırsak kısımlarıdır. Epitel örtü bağırsak lümenindeki antijenik maddelerle gastrointestinal kanalın immunojenik aktif bölgesi arasında bir bariyer oluşturur. Bu mikroflorada var olan dengenin bozulmasıyla Gram negatif bakteri endotoksini gibi toksik bileşikler ile β -glukuronidaz ve triptofanaz gibi zararlı enzimler

üretilebilmektedir. Üretilen sitotoksinler ve endotoksinler bağırsak epitel hücreleriyle etkileşerek mukozal immün sistemin yangısal aktivasyonunu uyarırlar. Bunun sonucunda yangılı bölgede pro-inflamatuvar sitokinler ve diğer mediyatörler bol miktarda üretilirler (24).

Ülseratif kolitin patogenezi tam olarak aydınlatılamamış olmakla birlikte gelişiminde immün sistem fonksiyon bozukluklarının belirleyici rol oynadığı düşünülmektedir. Bununla ilişkili olarak tümör nekroz faktör- α (TNF- α), interferon- γ (IFN- γ), interlöykin-1 β (IL-1 β), IL-6 ve IL-12 gibi pro-inflamatuvar sitokinler, IL-4, IL-10, IL-11 gibi antiinflamatuvar sitokinler ve siklooksijenaz-2 (COX-2) ile uyarılabilir nitrik oksit sentaz (iNOS) gibi inflamatuvar proteinlerin ekspresyonu arasındaki dengenin bozulması yangı sürecinde önemli bir role sahiptir (25).

Bağırsak immün sisteminin önemli sinyal molekülleri olan sitokinler bu özelliklerinden dolayı YBH'de anahtar role sahiptir. Sitokinler bağışıklık sistemi hücreleri tarafından üretilen küçük protein yapıda maddelerdir. Bu maddeler hücreler arasındaki iletişimi kolaylaştırarak, antijene spesifik efektör hücrelerin çoğalmasını teşvik ederler ve otokrin, parakrin, endokrin yolları kullanarak lokal ve sistemik yangıya aracılık ederler. Sitokinler YBH'de; yangı mediyatörleri, nitrik oksit, trombosit aktive edici faktör ve lökotrienlerin üretimi, NF-kB yolağının aktivasyonu ve apoptoz'un inhibisyonu gibi birçok role sahiptirler. Dolayısıyla ÜK gibi yangısal hastalıklarda doğrudan mukoza ve doku hasarından sorumludurlar (26, 27).

TNF- α , makrofaj ve diğer antijen sunan hücreler (APC) tarafından üretilen tipik bir pro-inflamatuvar sitokindir. Yangıdaki uyarıcı rolü, IL-1 β ve IL-6 üretimi,

epitel bariyerin bozulması, adezyon moleküllerinin ekspresyonu, fibroblastların çoğalması, prokoagülan faktörlerin aktivasyonu, bağırsak epitel hücreleri tarafından kemokin salgılanmasının uyarılması ve apoptozun inhibisyonu olarak bilinmektedir. Bunlara ilaveten, nötrofil ve makrofajları aktive eder, B hücreleri uyarır ve T hücreleri tarafından üretilen IFN- γ miktarını artırır (26, 27).

IL-1 β ve IL-6 YBH'nın prognozunda anahtar bir role sahiptir (28). IL-6 en önemli pro-inflamatuvar sitokinlerden birisidir ve üretimi akut faz cevabı sırasında uyarılır. Birçok hücre tarafından salgılanabilmesine rağmen bağırsaklarda ana üretim kaynağı makrofajlardır. IL-6 pro-inflamatuvar etkilerinin çoğunu çözünebilir reseptörüne (sIL-6R) bağlanarak gösterir. Bu reseptöre bağlanma olayı gp130 hücreleri tarafından stimüle edilir (26). Deneysel kolit modelinde IL-1 reseptör antagonistlerinin kullanımının, kalın bağırsakta yangı hücrelerinin infiltrasyonunu ve ödemli bölgedeki hücrelerde myeloperoksidaz (MPO) aktivitesini baskıladığı gösterilmiştir (27, 29).

NF-kB; hücreler arası adezyon molekülleri, COX-2, iNOS, pro-inflamatuvar sitokinler ve hücre ölümünü kapsayan yangısal cevap ve hücre canlılığıyla ilgili bir çok genin düzenlenmesinde rol almasından dolayı ÜK'de önemli bir sinyal yolağıdır (27). YBH'de NF-kB aktivasyonunda artışlar olduğu belirlenmiştir. NF-kB p65 oligonükleotidinin inhibisyonunun ÜK'den korunmada etkili bir yaklaşım olduğu gösterilmiştir. Yapılan bir çalışmada (30) NF-kB'nin inhibisyonuyla TNF- α , IFN- γ , IL-1 β , IL-6, IL-17, COX-2 ve iNOS gibi yangı sitokinlerinin baskılandığı bildirilmiştir. Bu sebepten dolayı, NF-kB'nin aktivasyonunun inhibe edilmesinin ÜK'nin tedavisi açısından etkili bir strateji olabileceği düşünülmektedir (31). Ayrıca yapılan başka bir çalışmada (32) c-Jun

N-terminal kinaz (JNK) gibi mitojenleri etkinleştiren protein kinazlar'ın YBH'de önemli role sahip oldukları bildirilmiştir. JNK, T hücrelerinin olgunlaşması ve aktive edilmesiyle TNF- α , IL-2, IL-6 gibi pro-inflamatuvar sitokinlerin sentezini düzenler (27).

3.1.1.5. Deneysel Kolit Modelleri

Yangısal bağırsak hastalıklarının patogenezi halen tam olarak aydınlatılamamış olmasından dolayı patogeneizde yer alan mekanizmaları ortaya koymak amacıyla deneysel olarak birçok akut ve kronik yangı modelleri geliştirilmiştir. Bu modeller genel olarak; kimyasallar tarafından uyarılan kolit modelleri, adoptif transfer modelleri, kendiliğinden (spontan) gelişen kolit modelleri ve transjenik hayvan modellerini içine alır. Bunlar arasında en yaygın kullanılan modellerden birisi de kimyasallarla uyarılan kolit modelleridir. Kimyasal ajanlar aracılığıyla ÜK'nin indüklendiği modeller arasında en yaygın olarak kullanılanlar asetik asit, indometazin, trinitrobenzen sülfonik asit (TNBS), oksazolon gibi toksik kimyasalların ve dekstran sülfat sodyum (DSS) gibi polisakkaritlerin çeşitli yollarla uygulanması sonucu oluşturulan yangı modelleridir. Deneysel hayvan modelleri hastalığın patogenezinin araştırılması ve yeni terapötik ajanların keşfi için büyük öneme sahiptir (33, 34).

3.1.1.5.1. Asetik Asit ile Oluşturulan Kolit Modeli

Asetik asitin %4-10 konsantrasyonunda kolon içine uygulanması kobay, fare, tavşan ve ratlarda akut koliti uyatabilmektedir. Asetik asit ile deneysel olarak oluşturulan ÜK'deki histopatolojik değişiklikler, insanlarda görülen ÜK

bulgularıyla çok benzerdir. Bu madde ile uyarılan ÜK hızlı bir gelişim gösterir (asetik asit uygulamasından 4 saat sonra) ve devamında asetik asit uygulamasından sonraki yedi gün içinde hızlı bir iyileşme gösterir (35).

Bu modelle ilgili ilk çalışma MacPherson ve Pfeiffer tarafından 1978 yılında yapılmıştır. Çalışmada 0.5 ml asetik asiti %10-50 konsantrasyonunda rektal yolla ratlara uygulamışlar ve 10 saniye bu şekilde tuttuktan sonra üç kere 0.5 ml fizyolojik tuzlu su ile bağırsak lümeninin yıkanması gerektiğini bildirmişlerdir (36). Bu ratlarda asetik asidin dozuna bağlı olarak kript anormallikleri ve distal kolonda ülserasyonu içeren histopatolojik bulgular gözlemlenmiştir. İlerleyen zamanlarda yapılan çalışmalarla (14, 37) asetik asetin konsantrasyonu ve temas süresinde bir takım değişiklikler ve optimizasyonlar yapılmıştır. Rektal yolla yüksek konsantrasyonlarda uygulanan asetik asit bağırsak lümeninde sıklıkla delinmelere yol açabilmektedir. Bu sebepten dolayı en son çalışmalarda uygulanan protokol anestezi altındaki ratlara 2 ml %4'lük asetik asit 2.7 mm yumuşak pediatrik katater vasıtası ile rektal yoldan uygulanması ve 30-120 saniye maruz bırakılmasıdır (14, 38).

Bu modelde asetik asite maruz kalma süresi ve konsantrasyonuna bağlı olarak mukoza tabakasında epitelyal nekroz ve ödem görülebilmektedir. Geçici lokal iskemi akut hasara katkı sağlayabilmektedir fakat nötrofiller erken aşamalarda işe karışmamaktadır. Mukozal ve submukozal yangıyı, NF-kB ve diğer yangı mediyatörlerinin aktivasyonu sonucu ilk hasar takip eder. Asetik asitle oluşturulan kolit yönteminin avantajı düşük maliyetli olması ve kolay uygulanabilmesidir. Bu modelde epitel doku hasarı asetik asit uygulamasından sonraki ilk 24 saat içinde görülebilmektedir (33).

3.1.1.5.2. Trinitrobenzen Sülfonik Asit ile Oluşturulan Kolit Modeli

Trinitrobenzen sülfonik asit, doku proteinlerine bağlanabilme ve Th1 hücre aracılı bağışıklığı uyarabilme yeteneğine sahip haptin yapısında bir maddedir. Taşıyıcısı olan etanol içinde TNBS'nin rektal yolla uygulanması fare ve ratlarda akut yangı ve ülserasyona sebep olabilmektedir. Akut hasar, uygulamadan 3 gün ile 1 hafta sonra pik yapabilir ve 2 hafta içinde de çözülmeye başlar (35).

Yüksek konsantrasyonlarda etanol TNBS uygulamasında taşıt madde olarak kullanılmaktadır. Çünkü TNBS'nin ÜK'yi uyarabilmesi için mukozaya ulaşabilmesi gerekmektedir. Onun mukozaya etki etmesini epitel bariyer sınırlandırır. Etanol, TNBS'nin ÜK oluşturabilmesi için bir bariyer bozucu olarak hareket etmektedir (39). Uygulama prosedüründe 4-5 mg TNBS %40-50 etanol konsantrasyonu içerisinde rektal yoldan uygulanır. Fakat bu modelde kullanılan deney hayvanlarının türlerine göre bazılarında duyarlılık bazılarında da direnç görülebildiğinden doz değişebilmektedir. TNBS tarafından uyarılan kolit bir gecikmiş tip aşırı duyarlılık reaksiyonu olarak meydana gelmektedir. TNBS, YBH'nin patogenezinde önemli rol oynayan yangı mediyatörlerinin miktarını artırır. Bu artış kolondaki MPO seviyesiyle de uyumludur (33).

Model oluşturma'nın kolay olması, deney süresinin kısa olması, ülser ve yangı hücreleri infiltrasyonu ile birlikte uzun süreli hasar görülmesi bu modelin avantajlarıdır. Bu modelde olduğu gibi insanlarda görülen ÜK hastalığında da yangılı mukozanın su emme gücü normale göre düşüktür ve bu etki ishale sebep olmaktadır. İnsan YBH'lerinden farklı olarak kendiliğinden görülen nükslerin olmaması dezavantajlarından birisidir. Ayrıca etanolün kendisi de bağırsak

mukozasında yangıya sebep olabilir. Etanol tarafından uyarılan bu yangıyı hapteler tarafından oluşturulan yangıdan ayırmak zordur (33, 39).

3.1.1.5.3. Dekstran Sülfat Sodyum ile Oluşturulan Kolit Modeli

Dekstran sülfat sodyum polisakkarit yapısında bir maddedir ve içme suyu içinde ratlara verildiğinde ÜK'yi uyardığı bilinmektedir. Bu modelde hayvanın türü, dozu ve uygulama süresine göre farklı protokoller bulunmakla birlikte en sık kullanılan rat ya da farelerin içme sularına %5 konsantrasyonda DSS'nin 5-10 gün süre ile katılmasıyla oluşturulur. DSS'nin uyardığı ÜK, makrofaj fonksiyon bozukluğu, lümen bakteri florasının değiştirilmesi ve kolonik epitelyum üzerine toksik etki ile ilişkili bulunmuştur (35).

Bu modelle oluşturulan ÜK'de hem akut hem de kronik yangı görülebilmektedir. Akut kolit DSS uygulaması sırasında meydana gelirken kronik kolit DSS uygulamasından bir süre sonra meydana gelmektedir. Bu modelle oluşturulan akut kolit'in doğuştan kazanılan immünite tarafından uyarıldığı düşünülmektedir. Bununla birlikte DSS uygulaması sonucu aktive olan makrofajlardan sitokinler salgılanır ve bu sitokinlerde lenfositleri aktive eder. Aktive olan bu lenfositlerin de kronik kolite sebep olduğu ileri sürülmüştür (39).

Dekstran sülfat sodyum aslında doğrudan bağırsaklarda yangıya değil epitelyumda kimyasal hasara sebep olur. Bu hasar sonucu submukosa ve lamina propriyanın enterik bakteriler ve lümen içinde bulunan antijenlere maruziyeti sonucu yangı başlar. DSS tarafından uyarılan ÜK'nin etkinliği; doz (genellikle %1-5), süre (akut ya da kronik), hayvanın türü (balb-c fareler çok duyarlıdır), hayvanın cinsiyeti (erkekler dişilere göre daha duyarlıdır) ve hayvanların sahip olduğu

mikroflora (germ free ya da özel bazı patojenlerden arı) gibi birçok faktöre bağlıdır. DSS ile oluşturulan ÜK sık kullanılan modellerdendir. Avantajları; kullanım kolaylığı (suya karıştırarak oral kullanılması), dozaj ve süre kontrolünün (yangı ya da iyileşme süreci çalışmaları için) kolay olmasıdır. Dezavantaj olarak ise özellikle farelerde DSS ile oluşturulmuş ÜK’de hastalık şiddetinin çok fazla değişkenlik göstermesidir (38).

3.1.1.5.4. İndometazin ile Oluşturulan Kolit Modeli

İndometazin kemirgenlerde doza bağlı olarak ince bağırsaklar ve kolon’da ülserasyonlara yol açabilmektedir. Bu modelde akut yangısal cevaba yol açmak için uygulanan prosedür önce indometazinin saf alkol (%100) içerisinde çözündürülmesi ile başlar. Daha sonra %5 steril sodyum bikarbonat ile seyreltilir ve 7.5 mg/kg dozunda aç bırakılmış ratlara derialtı yolla uygulanır. Akut cevaba maksimum yoğunlukta 24 saatte ulaşılır ve 7 günde yangı tamamen çözülür. Ek olarak indometazinin 2 gün derialtı uygulanmasıyla en az 2 hafta süren kronik yangı oluşturulur (33).

Seçici olmayan COX-2 inhibitörü indometazinin entero-koliti uyaran mekanizması tam olarak aydınlatılamamış olmakla birlikte olası mekanizmanın ilk olarak epitel hasarın PGE1, PGE2 ile prostasiklin gibi koruyucu prostaglandinlerin sentezinin inhibisyonu sonucu meydana geldiği ve lümen bakterilerinin indometazinin uyardığı yangının kronik fazının devamına ve şiddetlenmesine katkı sağladığı düşünülmektedir (40). Bu modelin avantajları; yangıyı kolay uyandırabilmesi, akut ve kronik her iki fazı da oluşturabilmesi ve hasarın hem ince bağırsaklarda hem de kalın bağırsaklarda görülebilmesidir (39).

3.1.1.5.5. Oksazolon ile Oluşturulan Kolit Modeli

Hapten yapısında olan oksazolon ÜK'nin patogenezi aydınlatmak için yapılan çalışmalarda deney hayvanlarında ÜK modeli oluşturmak için kullanılan maddelerden birisidir. Hapten yapısındaki diğer madde TNBS, ÜK modeli için de kullanılmakla birlikte daha çok KH'yi uyarmak için kullanılırken tersine oksazolon'un uyardığı kolit daha çok ÜK'ye benzer ve yangı yalnızca kolonun distal kısmı ile sınırlıdır. Bu modelde kullanılan prosedürlerden birisi ratlara ilk olarak bölgenin duyarlılığını artırmak için 300 µl %5 oksazolon (saf alkol içinde çözünmüş) transdermal olarak uygulanır. Daha sonra 5 ve 7. günler 450 µl %5 oksazolon (%50 etanolde çözünmüş) rektal yoldan uygulanır (33, 34). Diğer bir çalışmada (8) ise ÜK'nin uyarılması için oksazolon 7.5 mg/ml (%40 etanolde çözünmüş) konsantrasyonda ve rat başına 1.1 ml dozda uygulanmıştır.

3.1.1.6. Ülseratif Kolit'in Tedavisi

Bu hastalığın tedavisinde antiinflamatuvar ilaçlara odaklanılmış ve bu amaçla glukokortikoidler ile sülfasalazin gibi salisilatlar sıkça kullanılmıştır (41). ÜK'nin tedavisi antiinflamatuvar, antioksidan, antibakteriyal ilaçlar, steroidler, immünosüpresif ilaçlar ve genel destekleyici tedaviyi içermektedir. İlaçlar oral gavaj, parenteral veya rektal lavman şeklinde uygulanabilmektedir. İlaç tedavisinin yetersiz kaldığı durumlarda cerrahi operasyon tercih edilir. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ)'ne göre gelişmekte olan ülkelerde yaşayan bireylerin yaklaşık %80'i öncelikli sağlık ihtiyaçlarını geleneksel ilaçlardan karşılamaktadır. Bu sebeple hastalığın tedavisinde nutrisiyonel tedaviler, destekleyici bitkisel maddeler ile

probiyotikler sıkça kullanılmaktadır ve alternatif tedaviye yönelik çalışmalar halen devam etmektedir (42, 43).

3.2. Karotenoidler

Karotenoidler birçok bitki, yosun, mantar ve bakteriler tarafından sentezlenen ve 600'den fazla yağda çözünen pigmenti bünyesinde barındıran bir ailedir. Temel olarak C₄₀ lipofilik izoprenoidlerdir ve renksiz ile sarı, turuncu ve kırmızı renkler arasında sıralanırlar. Antioksidan ve pro-vitamin A aktivitelerinden dolayı canlılar için önemli besleyici maddeler arasında yer alırlar. Karotenoidler yapılarına göre şu şekilde sınıflandırılırlar;

- Karotenler; β -karoten, likopen gibi hidrokarbon karotenoidlerdir
- Ksantofiller; Oksijen veren karotenoidlerdir ve hidrokarbon karotenoidlerin türevleridir. Zeaksantin ve lütein (hidroksi), spiriloksantin (metoksi), ekinenon (okso) ve antheraksantin (epoksi) örnek olarak verilebilir.

Karotenoidlerin başta antioksidan ve antikanser etkinlik olmak üzere birçok etkinlikleri vardır (44, 45). Kendi aralarından antioksidan etki gücü olarak likopen> α -tokoferol> α -karoten> β -kriptoksantin>zeaksantin= β -karoten>lutein şeklinde sıralanırlar (46).

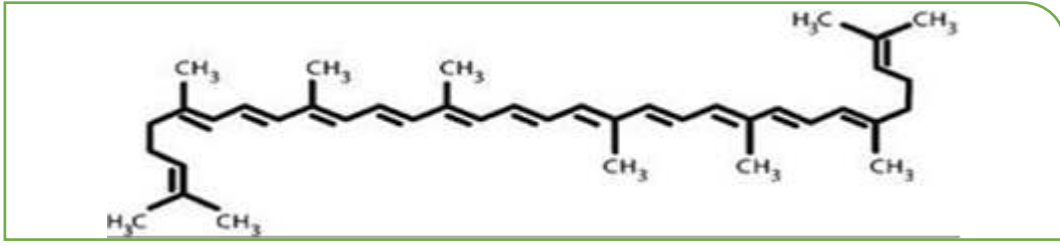
3.2.1. Likopen

Likopen; 1959 yılında Ernest ve ark tarafından keşfedilen yağda çözünen bir karotenoiddir. Domates ve domates ürünleri, kuşburnu, karpuz, papaya, kayısı ve pembe greyfurt gibi çok sayıda meyve ve sebzeye kırmızı rengini veren önemli bir bileşik olmakla birlikte bazı yosun ve mantarların doğal bileşenleri arasında da

yer almaktadır. İnsan ve hayvanlar likopeni sentezleyemediklerinden diyetle almaları gerekmektedir (44, 47). Domates ve domates ürünleri insanların diyetinde ana likopen kaynağıdır. İşlenmemiş domatesle karşılaştırıldığında domates sosu ve ketçap daha konsantre likopen kaynaklarıdır (44). Likopen'in 10 mg/kg dozu her gün iki porsiyon domates veya domates ürünü tüketimine eşdeğerdir ve kolay bir şekilde bu miktar günlük diyetle alınabilir (48). Farklı hayvan türlerinde yapılan deneysel çalışmalarla likopen'in antioksidan (49), antikanserojen (50), antiinflamatuvar (51) ve hipokolesterolemik (52) etkinliğe sahip olduğu gösterilmiştir.

3.2.1.1. Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri

Likopen 11 konjuge ve 2 konjuge edilmemiş çift bağ ihtiva eden, yüksek ölçüde doymamış hidrokarbon zincirden (Şekil 2) oluşan bir bileşiktir (53). Moleküler formülü $C_{40}H_{56}$, molekül ağırlığı 536.85 daltondur (44). Likopen kimyasal olarak bir karoten olmasına rağmen β -ionone halka yapısı eksikliğinden dolayı vitamin A aktivitesine sahip değildir (53). Yapısındaki çift bağlardan dolayı hem *cis* hem de *trans* izomer formlarında bulunabilmektedir. Doğada likopen'in bütün izomerik formları bulunmaktadır. Ancak, *cis* formu ışık, termal enerji ve kimyasal reaksiyonlar vasıtasıyla *mono* veya *poli* izomerizasyona uğrayabilmektedir. Genel olarak stabil bir molekül olmakla birlikte oksidatif, termal ve fotodegradasyona uğrayabilmektedir. Kırmızı domates tipik olarak %94-96 oranında *trans* formunu içerir ve bu form termodinamik olarak en stabil formudur (54-56).



Şekil 2. Likopen'in kimyasal yapısı (44).

3.2.1.2. Emilim ve Doku Dağılımı

Likopen insanlarda sindirim sisteminden önemli oranlarda doğrudan emilerek periferik dokular, karaciğer ve plazmada bir uçtan bir uca dolaşır ve birikir (57). Likopen gıdalarla alındıktan sonra lipid misellerle birleşip pasif difüzyonla bağırsak mukozasından emilir. Emilen likopen şilomikronlarla birleşerek karaciğere taşınmak için lenfatik sisteme salınır. Lenfatik sistemden lipoproteinler vasıtasıyla farklı organlara taşınmaktadır (58). Likopen doğal lipofilik yapısından dolayı serumda düşük dansiteli lipoprotein (LDL) ve çok düşük dansiteli lipoprotein (VLDL) fraksiyonu şeklinde bulunur. Testis, adrenal bezler, prostat bezi ve karaciğer likopen'in en yoğun bulunduğu organlardır (53).

Daha önceleri karotenoid emilim sürecinin pasif difüzyon yoluyla gerçekleştiği kabul edilse de son yıllarda karotenoid emiliminde aktif süreçte çöpcü reseptör sınıf B tip 1 proteinlerin (SR-B1) de ilişkili olduğu düşünülmektedir. SR-B1 insanlarda ince bağırsaklar dışında karaciğer, ovaryumlar, böbrek üstü bezleri, plasenta, böbrekler, prostat ve beyinde de bulunur. SR-B1'in lipoproteinlerden dokulara ve dokulardan da lipoproteinlere karotenoidlerin taşınmasından kısmen sorumlu olduğu düşünülmektedir (57). Likopen takviyesi alan ya da domates ürünleri tüketen canlıların serum likopen seviyeleri önemli oranda artmasına rağmen tüm likopen kaynaklarının biyoyararlanımı aynı değildir. Canlılar

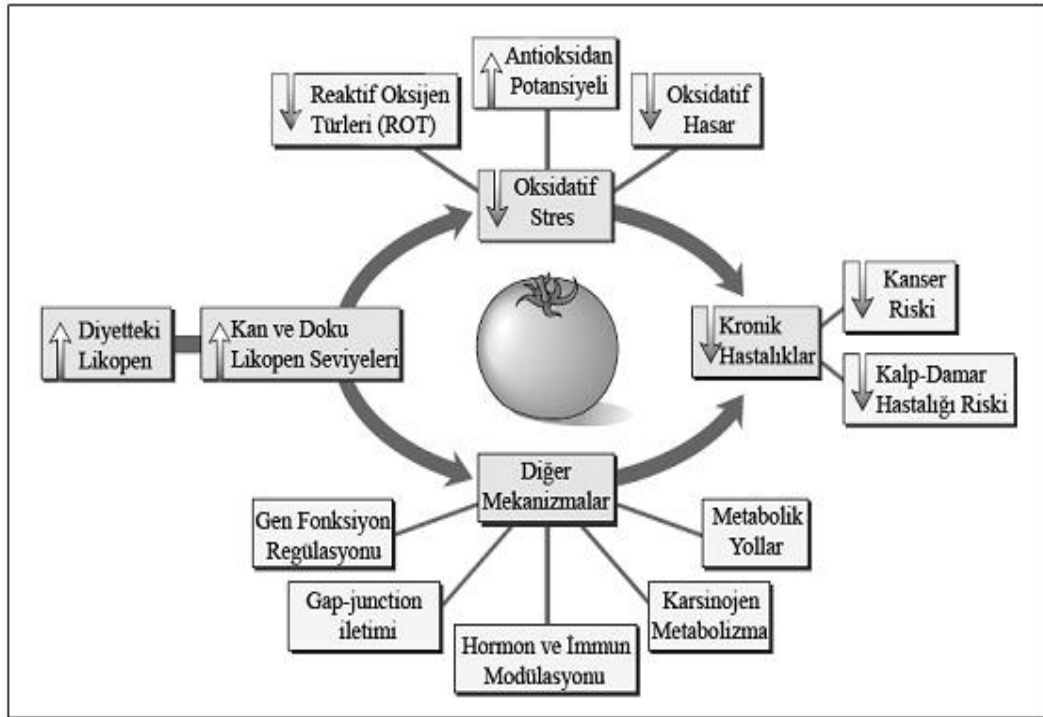
tarafından domates yendiğinde içindeki likopen'in *trans* formu fazla oranda olduğundan emilimi zayıf gerçekleşir. Fakat domates ve domates ürünlerine uygulanan ısıtma işlemi likopen'in *cis* izomerizasyonunu indükleyerek biyoyararlanımını artırır (53). İşlenmiş domates ürünlerinde likopen'in emiliminin daha yüksek olmasının nedeni *cis* izomerler safra asidi misellerinde ve birleştiği şilomikronlarda daha fazla çözündüğünden dolayı biyoyararlanımı *trans* izomerlerden daha yüksektir (59, 60). Her ne kadar domateste likopen'in en etkili geometrik izomeri bütün-*trans* izomerleri ise de insan serumunda likopen izomerik bir karışım halindedir ve toplam likopen'in %40-50'sini *cis*-izomerler oluşturmaktadır (53). Canlılarda görülen en yaygın izomerik likopen formları 5-*cis*-, 9-*cis*-, 13-*cis*-, ve 15-*cis*-likopendir (56).

3.2.1.3. Metabolizması

Kısa zincirli likopen ürünleri serbest radikal oksidasyonu, lipoksijenaz aktivitesi, faz II detoksifikasyon enzimleri ya da karotenoid ayırma enzimleri tarafından üretilirler. Enzimatik karotenoid metabolizması öncelikle karoten-15,15'-monooksijenaz (CMO-I) ve karoten-9'10'-monooksijenaz (CMO-II) isimli karotenoid monooksijenaz enzimler tarafından katalizlenir. CMO-I β -karoten gibi merkezi karotenoidleri metabolize eder. CMO-II öncelikle likopen gibi vitamin A prekürsörü olmayan karotenoidleri metabolize eder. CMO-II ürünleri apo-likopenal olarak adlandırılan kısa zincirli aldehydlerdir (61).

3.2.1.4. Likopen'in Etkileri

Yapılan deneysel çalışmalarla likopen'in farklı hayvan türlerinde antioksidan (49), antikanserojen (50), antiinflamatuvar (62), hipokolesterolemik (63) etkinliğe sahip olduğu gösterilmiştir. Likopen farklı mekanizmalar (Şekil 3) üzerinden birçok hastalıkta tedavi edici ya da koruyucu etkiye sahip olmasına rağmen bu çalışmada antioksidan, antikanserojenik ve antiinflamatuvar etkileri üzerinde detaylı durulacaktır.



Şekil 3. Likopen'in etki mekanizmaları (64).

3.2.1.4.1. Likopen'in Antioksidan Etkisi

Reaktif oksijen türleri ksenobiyotiklere maruziyet sonrası artış gösteren elektron taşıma zincirleri, enzimler ve redoks döngüsünün ürünleridir. ROT hücre savunmasını zayıflatıp DNA, membranlar ve proteinlerde hasara sebep olduğunda

oksidatif stres meydana gelir ve bu prooksidan dengenin bozulması olarak tanımlanır. Boyacıoğlu ve ark. (49) tarafından yapılan bir çalışmada likopen'den zengin diyet veya likopen takviyesi alan canlıların ROT ürünlerine karşı korunduğu rapor edilmiştir. Likopen singlet oksijeni (1O_2) giderir, serbest nitrojen dioksiti (NO_2), tiol ($RS\cdot$) ve sülfonil (RSO_2) radikallerini temizler. Karotenoidler içerisinde en etkili singlet oksijen gidericisi likopen olarak tanımlanır ve bu özelliği konjuge olmuş çift bağ sayısına bağlıdır (56). Likopen'in singlet oksijen giderici gücü β -karotenden iki kat, α -tokoferolden 10 kat daha güçlüdür (53). Bu özelliğinden yola çıkan araştırmacılar tarafından yapılan birçok çalışmayla prostat, idrar kesesi, kalın bağırsak, rektum, mide ve meme gibi organların yangısal hastalıkları ve kanserlerinde likopen tedavisinin etkili olduğu bildirilmiştir (65-68). Yapılan bir çalışmada (49) likopen'in ratlarda oluşturulan gastrik ülser modelinde oksidatif stresi azaltarak tedavi edici etkinliğe sahip olduğu gösterilmiştir. Mohamadin ve ark. (69) tarafından yapılan bir diğer çalışmada ratlarda oluşturulan kardiyotoksisite modelinde likopen'in GSH, vitamin C, SOD, CAT ve GPx seviyelerini yükseltip, lipid peroksidasyon ürünü tiyobarbitürik asit reaktif sübstans (TBARS) seviyelerini düşürerek antioksidan etkinlik gösterdiği bildirilmiştir.

3.2.1.4.2. Likopen'in Antikanserojenik Etkisi

Kanser dünyada ölüme sebep olan en önemli nedenler arasında yer almaktadır (70). Beslenmenin kanser gibi kronik hastalıklardan korunmada önemli bir role sahip olduğu bilinmektedir. Günümüzde meyve ve sebzeden zengin diyetle beslenen canlılarda kanser görülme riskinin daha düşük olduğu düşünülmektedir. Benzer şekilde domates ve domates ürünleri gibi yüksek likopen içeren gıdalarla

beslenen canlılarda bazı kanser türlerinin görülme riski daha düşüktür. Likopen tüketimi ile kanser görülme riski arasındaki ters korelasyon likopen'in; (i) antioksidan özelliği, (ii) hücreler arası iletişimi artırması, (iii) mutagenezisi azaltması, (iv) tümör hücre çoğalmasını inhibe etmesi ve (v) anti-tümör immun cevabı geliştirmesiyle açıklanabilir. Oksidatif stres en önemli kanser risk faktörleri arasında görülmektedir (46). Güçlü bir antioksidan ve singlet oksijen süpürücüsü olarak bilinen likopen'in koruyucu etkisi, hücre içi gap junction bağlantıları, hormonal ve immun sistem ile onun kanser gibi kronik hastalıklarındaki etkisinden sorumlu metabolik yollardaki değişikliklerle ilişkili bulunmuştur. Likopen tüketimi ile prostat, idrar kesesi, akciğer ve mide- bağırsak kanalında görülen çeşitli kanserlerin görülme riskindeki düşüş arasında güçlü bir ilişki olduğu ortaya konulmuştur (71). Yapılan bazı çalışmalarda (72, 73) kolorektal kanser modeli üzerine oral yolla alınan likopen'in kanser hücrelerinin büyümesini ve çoğalmasını önlediği, hücreler arasındaki iletişimi önemli oranda artırdığı, serbest radikallere karşı güçlü antioksidan özelliğe sahip olmasından dolayı DNA hasar oranını önemli ölçüde azalttığı bildirilmiştir. Tuzcu ve ark. (67) yaptıkları çalışmada likopen'den zengin domates tozunun kolon kanserini önlemede etkili olduğunu bildirmişlerdir.

3.2.1.4.3. Likopen'in Antiinflamatuvar Etkisi

C-Reaktif Protein (CRP) yüksek oranda karaciğer tarafından üretilen ve yapımı yangı alanından salınan TNF- α , IL-1 β ve IL-6 aracılığıyla tetiklenen bir akut faz proteinidir ve birçok yangısal hastalığın aktivitesini değerlendirmek için kullanılan bir belirteçtir. Yüksek oranda karaciğerde üretildiği için karaciğer yetmezliği olmadığı sürece yangının şiddetini doğru orantılı bir şekilde

göstermektedir (74, 75). Likopen seviyeleri ile CRP düzeyleri arasında ters bir korelasyon vardır ve doza bağlı olarak CRP seviyelerini düşürdüğü bildirilmiştir (76).

Likopen'in enfeksiyöz etkenlere karşı savunma mekanizmalarını uyararak antiinflamatuvar etki gösterdiği bilinmektedir. Likopen'in COX ve lipooksijenaz enzimlerini düzenleyerek ve bazı proinflamatuvarların (prostaglandin, prostasiklin, tromboksan ve lökotrien gibi) sentezini baskılayarak yangıyı önlediği bildirilmiştir (58). Ayrıca likopen'in artrit (62) ve ÜK (77) modellerinde CRP ve MPO gibi yangı parametrelerini düşürerek tedavi edici etkinliğe katkıda bulunduğu tespit edilmiştir.

3.3. Monoterpenler

Dünya nüfusunun yaklaşık %80'inin öncelikli sağlık ihtiyaçlarını geleneksel ilaçlardan karşıladıkları tahmin edilmektedir. Bu tedavilerin çoğunu bitki ekstraktları ve onların aktif bileşenlerinin (terpenoidler gibi) kullanımı oluşturur. Doğal ürünler içerisinde terpenoidler bilinen 30.000'den fazla çeşidiyle en geniş yelpazeye sahiptir. İzoprenoidler olarakta bilinen terpenoidler mevalonik asitten köken alırlar. Terpenoidlerin isimlendirilmesi izopren yapılarının sayısına bağlı olmakla birlikte monoterpen, diterpen, triterpen, tetraterpen, sesquiterpen ve politerpen olarak sınıflandırılabilirler. Monoterpenler; asiklik-linear (linalool, geraniol), monosiklik (α -terpinol, terpinolen) ve bisiklik (α -pinen, kamfor) olmak üzere üç alt guruba ayrılırlar. Monoterpenler izoprenoid ailesinin on karbonlu üyeleridir. Bu bileşikler bitkilerde yaygın şekilde bulunurlar ve çoğu bitkinin karakteristik kokusu bu maddeler tarafından sağlanır (78, 79). Monoterpenler ucuz olmalarından dolayı tatlandırıcı, parfümeri gibi alanlarda 19. yüzyılın başından

itibaren yaygın şekilde kullanılmaktadır. Son yıllarda terapötik potansiyellerinin keşfedilmesiyle ilaç endüstrisinde büyük bir rol oynamaya başlamışlardır (80). Monoterpenlerin; antioksidan, antikanser, antifungal, antispazmodik ve antibakteriyel de dâhil olmak üzere çeşitli farmakolojik özelliklere sahip oldukları ortaya konulmuştur (78, 79).

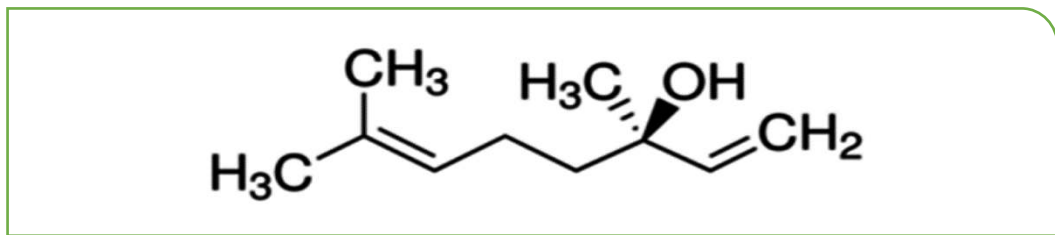
3.3.1. Linalool

Linalool, doğada 200'den fazla farklı aileye ait bitki esansiyel yağlarının bileşiminde bulunan asiklik monoterpen bir alkoldür. Yoğun olarak *Lamiaceae* (ballıbabagiller), *Lauraceae* (defnegiller), *Rutaceae* (sedef otugiller) familyalarına ait bitkilerden ekstrakte edilmektedir. *Coriandrum sativum* L. (kişniş), *Lavandula officinalis* (lavanta) ve *Ocimum basilicum* (fesleğen) gibi bitkilerin ana komponentidir. Terpenoidlere ait bitki kokularından yaklaşık %70'i linalool tarafından temsil edilir. Bitkilerde coriandrol ve licareol olmak üzere 2 linalool enantiomeri görülür. Bu enantiomerler farklı koku profiline sahiptir: Coriandrol tatlı, çiçek, otsu bir kokuya sahipken licareol odunsu, lavanta benzeri bir kokuya sahiptir. Linalool'ün özellikle sentetik kaynaklı olanı, kozmetik ürünlerin (vücut losyonu, şampuanlar, duş jelleri, sabunlar, saç spreyleri ve kremler) %60-90'nının içinde bulunur. Bununla birlikte evlerde kullanılan deterjanlar, mobilya bakım ürünleri ile tat ve koku verici olarak işlenmiş gıdalar da linalool ihtiva etmektedir. Bu geniş kullanım alanlarından dolayı linalool'ün dünya çapında yıllık tüketimi 1000 tonu aşmıştır. Ayrıca linalool pet hayvanlarında ektoparazit kontrolü amacıyla insektisit olarak kullanılabilir (81-83). Bunlara ilaveten yapılan çalışmalarda (83-

86) linalool'ün antioksidan, antitümöral, antimikrobiyel ve antiinflamatuvar etkilerinin olduğu ortaya konulmuştur.

3.3.1.1. Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri

Asiklik monoterpen bir alkol olan linalool (3,7-dimetil-1,6-oktadien-3-ol)'un kimyasal yapısı Şekil 4'te sunulmuştur. Moleküler formülü $C_{10}H_{18}O$, molekül ağırlığı 154.25 daltondur. Hidroksile 3. karbonunun kiral özelliğinden dolayı bitkilerde (3S)-(+)-linalool (coriandrol) ve (3R)-(-)-linalool (licareol) olmak üzere 2 linalool enantiomeri görülmektedir. Gül ağacı yağı (R)-(-)-linalool'ün ana kaynağı iken kişniş yağı ise önemli miktarda (S)-(+)-linalool içerir. Ayrıca bazı mantar grupları da bu monoterpen alkolü üretebilir. (3S)-(+)-linalool'e nazaran (3R)-(-)-linalool doğada daha yaygın bulunur. Kayısı gibi bazı bitkisel ürünlerde linalool rasemat formunda bulunur. Aynı zamanda bu formu fermantasyon işlemlerinin bir ürünü olmasının yanı sıra gıda maddesi üretimi ve ekstraksiyon tekniğiyle ilgili esansiyel yağların ayrılması sürecinde de meydana gelir (82, 87).



Şekil 4. Linalool'un kimyasal yapısı (88)

3.3.1.2. Emilim, Metabolizma ve Atılım

Linalool oral yolla alındıktan sonra bağırsaklardan hızlı bir şekilde emilir. Daha sonra insan ve hayvanlarda emilimden sonra çoğunluğu hızlı bir şekilde karaciğerde idrar veya dışkıyla atılmak için polar bileşiklere (serbest ya da konjugat

forma) metabolize edilir. Linalool'ün ana metabolik yolu glukronik asit ile konjugasyon vasıtasıyla olur. Tekrarlanan uygulamalar durumunda, sitokrom P-450 sistemi tarafından aracılık edilen allilik oksidasyon önemli bir metabolik yol haline gelir (82). Yapılan bir çalışmada ana metabolitleri 8-hidroksi ve 8-karboksi linalool olarak bildirilmiştir (89). Atılım yaklaşık %60 oranında idrar ile olurken %15 oranında ise dışkıyla olmaktadır. Ayrıca ağızdan alınan linalool'ün bir kısmı ise ara metabolizma yollarını takip ederek CO₂ olarak verilen havanın (%23) içinde atılır (82).

3.3.1.3. Linalool'ün Etkileri

Yapılan çalışmalarla linalool'ün farklı deneysel modellerde antioksidan (84, 90), antitümöral (83), antimikrobiyel (86), antinosiseptif (91) ve antiinflamatuvar (92) etkinliğe sahip olduğu gösterilmiştir. Linalool birçok hastalık üzerinde tedavi edici ya da koruyucu etkiye sahip olmasına rağmen bu çalışmada antioksidan, antikanserojenik ve antiinflamatuvar etkileri detaylı olarak ele alınacaktır.

3.3.1.3.1. Linalool'ün Antioksidan Etkisi

Linalool'ün lipit peroksitleri önleyerek antioksidan etkinlik gösterdiği çeşitli çalışmalarda ortaya konulmuştur (84, 93, 94). Örneğin linalool'ün H₂O₂ tarafından oluşturulan oksidatif strese karşı vitamin E ve lipoik asit ile neredeyse aynı derecede antioksidan özelliğe sahip olduğu, bu etkisini ise H₂O₂ tarafından uyarılan doymamış yağ asidi peroksidasyonunu inhibe ederek ve doymamış yağ asidi dağılımını normale yakın hale getirerek gösterdiği bildirilmiştir (84). Buna ilaveten akrilamid tarafından oluşturulan nörotoksisite modelinde farklı dozlarda

linalool uygulanmasının oksidatif stresi azaltarak tedavi edici etkinliğe sahip olduğu ve bu etkinin dozlara göre değiştiği tespit edilmiştir (90).

3.3.1.3.2. Linalool'ün Antikanserojen Etkisi

Kanser hücrelerinde seçici olarak apoptozu uyandırabilme yeteneğine sahip fakat normal hücreler için zararsız olan hedef organa özel maddelerin belirlenmesi kanser tedavisi açısından büyük önem arz etmektedir. Son yıllarda kullanılan kemoterapötiklerin kanser ve normal hücre arasında ayırım yapmada yeterince seçici olmaması yüzünden ortaya çıkan istenmeyen etkilerinden dolayı kanser hücrelerinde maksimum etki gösterirken normal hücrelerde minimum toksisite oluşturan fitokimyasallara ilgi artmıştır (83). Bu sebeple doğal küçük molekülü bir monoterpen olan linalool'ün antikanser etkinliği üzerine odaklanılmıştır (83, 95). Hücre döngüsünde önemli düzenleyici etkisi olan p53 (tümör baskılayıcı protein), kanser dokularındaki anormal hücre çoğalmasından korunmada ve genotoksik strese maruziyet sonrası genomik bütünlüğün korunmasında anahtar bir role sahiptir (82). Linalool'ün tümörlü dokularda p53'ü yükselterek sarkoma-180 solid tümör modelinde antikanserojenik etki gösterdiği bildirilmiştir (83). Ayrıca linalool'ün doksorubisinin antikanser etkinliğini artırdığı (95) ve 1,8-cineole ile kombine kullanılmasının da antikanser etkinlikte artışa yol açtığı tespit edilmiştir (96).

3.3.1.3.3. Linalool'ün Antiinflamatuvar Etkisi

Akut inflamasyon; çeşitli uyaranlara karşı vücudun gösterdiği koruyucu mekanizmaları temsil ederken, kronik inflamasyon zararlı ve tedavi edilmesi güç

olan bir yangı türüdür. Kronik inflamasyon kanser, astım, romatizma, atopik dermatit, depresyon ve mide-bağırsak bozukluğu gibi farklı hastalıkların etiyolojisinde yer alabilir. Tedavide kullanılan çoğu antiinflamatuvar maddenin ülserojenik özellik göstermeleri gibi istenmeyen yan etkilere sahip olmalarından dolayı yüksek güvenlik profiline sahip yeni ilaçların araştırılması her zaman ilgi odağı olmuştur. Etanol tarafından oluşturulan mide hasarı modelinde linalool ve linalyl asetat'ın erezyon bölgesinde önemli oranda azalmaya sebep olurken non-steroid antiinflamatuvar ajanların kullanımı sonucu görülen ülserojenik yan etkiyi göstermediği bildirilmiştir (82). Linalool antiinflamatuvar etkinliğe sahip bir monoterpendir (92). Bir transkripsiyon faktörü olan NF-kB, yangısal ve immun cevabın düzenlenmesinde anahtar role sahiptir. NF-kB'nin uyarılması ya da inhibe edilmesi birçok yangısal faktör ve sitokinlerin transkripsiyonunun düzenlenmesinde önemli bir rol oynar. Yapılan çalışmalarda (R)-(-)-linalool'ün antiinflamatuvar etki mekanizmasının NF-kB ve mitojen-aktif edilmiş protein kinaz (MAPK) yollarının blokajı vasıtasıyla yangı sitokinlerinin üretilmelerinin inhibisyonunu sağlayarak, N-metil-D-aspartik asit (NMDA) reseptörlerini antagonize ederek ve nitrik oksit (NO) sentezi veya salınmasını azaltarak gösterdiği vurgulanmıştır (82, 85) Benzer şekilde yapılan başka bir çalışmada linalool'ün NF-kB inhibisyonuna sebep olarak yangısal cevabı azalttığı ortaya konulmuştur (94). Bununla birlikte linalool'ün kompleks farmakolojik profilinden dolayı uzun süreli kullanımıyla ilgili yeterli bilginin olmaması ve antiinflamatuvar etkisinin sentetik ajanlarla karşılaştırmalı olarak yapılacak yeni çalışmalarla detaylı olarak gösterilmesi gerekmektedir (82).

3.4. Etken Maddelerin Kolona Hedeflendirilmesi

Kolon kanseri ve YBH'nin tedavisinde kullanılan geleneksel ilaçlar hedef bölgeye terapötik konsantrasyonda ulaşamadıkları için hastalığın tedavisinde yeterince etkili olamamaktadırlar. Üst mide-bağırsak kanalını geçerken görülen etken madde kayıplarını telafi etmek için yüksek dozda etken maddeye ihtiyaç duyulmaktadır. Fakat yüksek dozda kullanılan etken maddeler ise canlılarda istenmeyen yan etkilere sebep olabilmektedir. Son yıllarda yapılan çalışmalarla etken maddelerin kolona hedeflendirilmesiyle bu sorunun aşılabileceği vurgulanmıştır (97).

Hedeflendirilmiş ilaç taşıma sistemleri; etkinin ortaya çıkmasının istendiği hedef doku, organ ya da hücrelerde etken madde konsantrasyonunun etkili düzeye ulaşmasıyla ideal bir terapötik aktivite sunarken, hedef dışı bölgelere erişiminin sınırlandırılarak istenmeyen etkilerin azaltılmasını amaçlayan gelişmiş ilaç kullanım yöntemleridir (98, 99).

Kolon; pH'sının nötre yakın olması, geçiş süresinin çok uzun olması ve nispeten düşük proteolitik enzim aktivitesine sahip olması sebebiyle ilaç hedeflendirme sistemleri için önemli avantajlar sunar. Dolayısıyla protein, peptit ve çeşitli yapılardaki ilaçların hedeflendirilmesi için ideal bölgelerden birisidir (100). Kolona hedeflendirilen etken maddelerin salım ve emilimleri mide ile ince bağırsaktan geçerken gerçekleşmez. Fakat daha sonra kolona ulaşan etken maddeler burada pH ve kolon mikroflorasına ait bakterilerin salgıladığı enzimler ile bozunarak bu bölgeden absorbe edilirler (101, 102).

Etken maddeler; ön ilaç tasarımı, pH'ya duyarlı sistemler, zaman kontrollü sistemler, basınç kontrollü sistemler ve mikrobiyal enzimler tarafından bozunabilen

salım sistemleri gibi birçok yöntemle kolona hedeflendirilebilmektedir. En sık kullanılan zaman ve pH duyarlı sistemlerin bazı dezavantajları vardır. İnce ve kalın bağırsak arasındaki pH farklılığının çok az olmasından dolayı pH'ya duyarlı sistemlerin kolona hedeflendirme amacıyla kullanılmasında problemler yaşanabilmektedir. Zaman kontrollü sistemlerin kolona hedeflendirmede kullanılmasının en önemli kısıtlayıcı sebebi ise hayvanlarda ince bağırsak geçiş süresinin farklılığından dolayı hedeflendirilen biyoaktif maddenin ince bağırsak ya da kolonun terminal kısmında salınmaya başlayabilmesidir (100).

Kolon patojenlerinin lokal tedavisi, kolon kanseri, amebiyozis, KH, ÜK gibi çeşitli bağırsak hastalıklarının lokal tedavisinde etken maddelerin kolona hedeflendirilmesi istenen bir durumdur. Sindirim enzim çeşitliliği ile yoğunluğunun az olması ve ince bağırsaklarla karşılaştırıldığında mukozasının proteolitik aktivitesinin daha düşük olmasından dolayı kolon, peptit ve protein yapısındaki ilaçlar için uygun emilim bölgesi olarak bilinir. Protein ve peptit yapısındaki etken maddelerin kolona hedeflendirilmesi onların duodenum ile jejunumda enzimatik bozulma ve hidrolize uğramalarını engelleyerek kolon ve ileum'a gelen maddelerin burada salımı sonucu daha iyi bir sistemik biyoyararlanım elde edilebilir. Doğal polisakkaritler etken maddelerin kolona hedeflendirilmesinde sık kullanılan maddelerdir. Bol bulunmaları, ucuz ve geniş kullanım alanları, kimyasal olarak kolay modifiye edilebilmeleri, yüksek stabiliteye sahip olmaları, toksik olmayan, güvenli, hidrofilik, jel şekillendirebilme ve biyobozunur olmaları gibi birçok avantaja sahip olduklarından ilaç hedeflendirilmesinde kullanılabilmektedirler (102). Polisakkaritler; bitki (pektin, guar gum, inulin), hayvan (kitosan, kondroitin sülfat), alg (alginatlar) ve

mikroorganizmalar (dekstran) gibi doğal kaynaklardan elde edilebilirler. Bu maddeler etken maddeleri üst mide-bağırsak kanalının etkisinden korurken kolon mikroflorası tarafından basit sakkaritlere parçalanırlar. Devamında kolona gelen maddelerin glikozidik bağlarının hidroliziyle etken maddelerin salımı başlar. Bu biyobozunmadan sorumlu başlıca sakkarolitik türler *bakteroides* ve *bifidobakteria*'dır (100, 102).

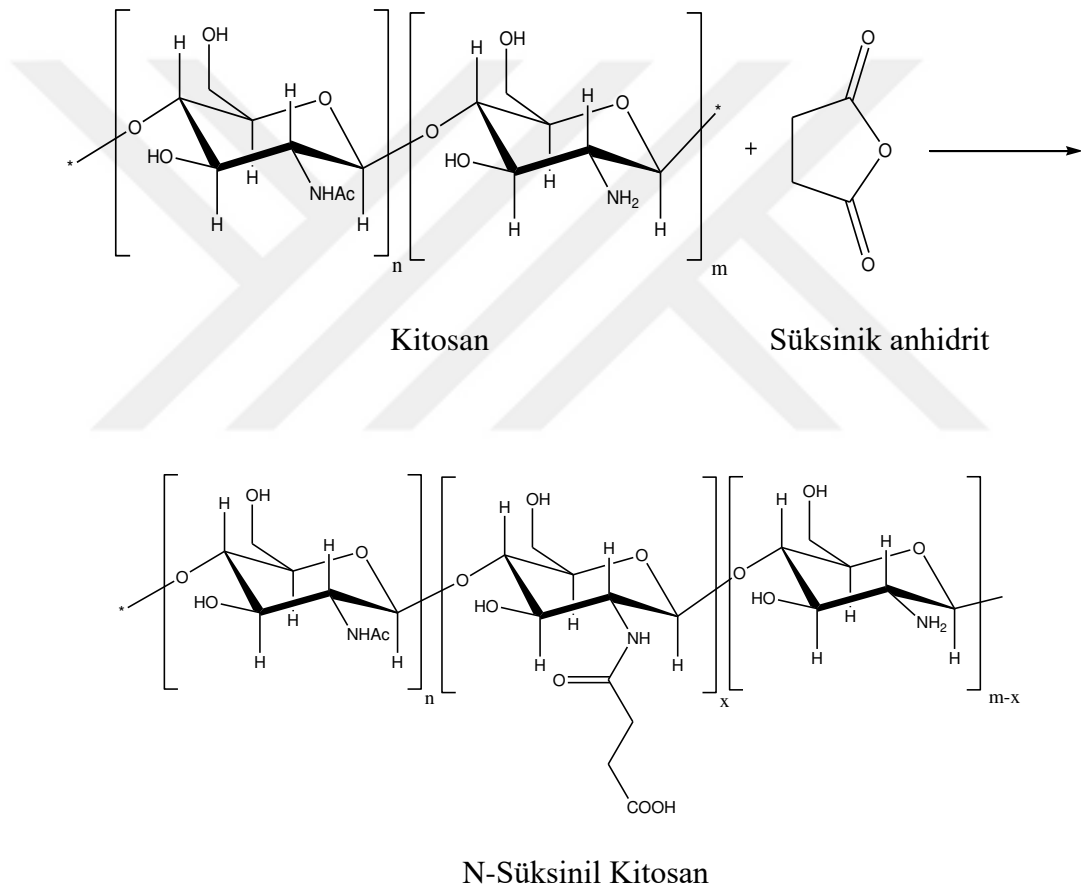
Son zamanlarda parçalanabilen, toksik olmayan, dokularla uyumlu ve istendiğinde kimyasal olarak modifiye edilebilecek özelliklere sahip polimerik ilaç taşıyıcı dizaynına ilgi artmıştır. Kitosan (Şekil 5) sahip olduğu fiziko-kimyasal özelliklerinden dolayı önemli adaylardan birisidir. İlaç hedeflendirme amacıyla kitosan tablet, jel, mikropartikül ve nanopartikül formlarında kullanılmaktadır. Yüksek oranda deasetilasyon kalıntıları içeren kitosan güçlü moleküller arası hidrojen bağlarına sahip olduğu için suda çözünmez. Fakat kitosanın $-OH$ ve $-NH_2$ pozisyonları üzerinde yapılan bazı modifikasyonlarla suda çözünürlüğü artırılabilir (103). Kitosan yengeç, karides gibi kabukluların dış iskeletinde yaygın bir şekilde bulunan doğal bir polisakkarittir ve ticari olarak kitinin deasetilasyonu vasıtasıyla elde edilmektedir. Düşük immunojenite, toksik olmaması, biyobozunur ve biyouyumlu olması gibi faydalı biyolojik özellikleriyle bol bulunması, güçlü mukozaya tutunma özelliği gibi doğal farmakolojik özelliklerinden dolayı bu katyonik polisakkarite ilaç ve biyomedikal sanayinde ilgi artmıştır. Kitosanın yapısında bulunan reaktif gruplar kimyasal modifikasyon için fırsat sunmaktadır. Modifikasyonlar sayesinde kitosanın; kuartenize kitosan, karboksialkil kitosan gibi birçok türevi bulunmaktadır. Bu türevleri doğal kitosanın önemli özelliklerini geliştirmek için dizayn edilmişlerdir (104). Asetilasyon derecesi kitosanın

çözünürlüğü, reaktivitesi, hücre yanıtı ve biyobozunabilirliği gibi fiziko-kimyasal özelliklerini önemli ölçüde etkiler (105). En güncel ilaç taşıma sistemlerinden olan kitosan, toksik olmayan, yarı kristal, biyolojik olarak uyumlu ve kolondan salgılanan lizozim tarafından parçalanabilen (biyobozunur), amino/hidroksil grupları nedeniyle reaksiyona girebilen kimyasal modifikasyonlarla türevlendirilebilme özelliğine sahip bir polisakkarittir. (106, 107). Kitosan ve türevleri bu istenen biyolojik avantajları nedeniyle farmakoloji ve biyomedikal alanlarındaki birçok güncel bilimsel çalışmada ilaç taşıma sistemleri içerisinde yer almakta ve gelecekte oral yolla kullanılacak ürünler için taşıyıcı madde olma potansiyeline sahiptir (106).

Yapısında bulunan farklı fonksiyonel gruplar (amino ve hidroksil gruplar) kitosanı kimyasal olarak aktifleştirmekte ve proteinler ile ilaçlar gibi bazı biyomoleküllerin etkili bir şekilde kaplanmasını sağlamaktadır. Fakat suda çözünürlüğünün zayıf olması kitosanın biyomedikal alanında kullanımını kısıtlamaktadır.

Sudaki çözünürlüğünü artırmak için çeşitli kitosan türevleri sentez edilmiştir. Çeşitli araştırmacılar tarafından suda çözünürlüğü ve pH duyarlılığını artırmak için kitosanın glikozamin ünitesinin N-pozisyonuna süksinil gruplar eklenerek süksinil kitosan (Şekil 5) elde edilmiştir (108). Süksinilleme işleminin amaçlarından birisi kitosanda bulunan amino grubuna süksinil grubu eklenerek maddenin hidrofilik hale getirilmesiyle sindirim sistemi emiliminin artırılmasıdır (106, 109). Süksinil kitosanın, süksinilasyon derecesi süksinik anhidratın reaksiyon koşulları değiştirilerek kolayca modifiye edilebilir. Süksinil kitosan sahip olduğu karboksil gruplarından dolayı *in vivo* ve *in vitro* önemli özelliklere sahiptir. Normal

kitosan asidik suda çözünebilirken alkali sularda çözünmemektedir. Tersine yüksek derecede süksinillenmiş (süksinilasyon derecesi: >0.65) süksinil kitosan alkali sularda çözünebilmektedir. Süksinil kitosan yapısında bulunan $-NH_2$ ve $-COOH$ gruplarından dolayı birçok ajanla kolayca reaksiyona girebilmektedir. Süksinil kitosan düşük toksisitesi, vücutta uzun süre tutulması ve tümör dokularında birikmesi gibi özelliklerinden dolayı iyi bir ilaç taşıyıcısıdır (110).



Şekil 5. Kitosan ve N-Süksinil Kitosan'ın kimyasal yapısı

Yukarıda verilen literatür bilgileri ışığında YBH ve kolon kanserlerinin dünya genelinde görülme sıklıklarının giderek arttığı ve hala etkili bir tedavi yönteminin bulunmadığı görülmektedir. Son yıllarda bu hastalıklara karşı alternatif tedavi seçeneği sunmak için konuyla ilgili yapılan çalışmaların sayısı giderek artmaktadır. Hastalığın tedavisinde sıklıkla antiinflamatuvar ve antioksidan özelliğe sahip ajanlar kullanıldığından bu etkiler bakımından güçlü olan başta likopen olmak üzere linalool'ün de YBH'de alternatif tedavi seçeneği olabileceği düşünülmüştür. Bunun yanı sıra, yapılan çalışmalarda geleneksel yoldan etken madde kullanımları yerine hedeflendirilerek kullanımların daha etkili olduğu ortaya konulmuş ve araştırmalar daha çok bu alana odaklanmıştır. Yapılan literatür incelemelerinde ÜK'ye karşı likopen ve linalool'ün hedeflendirilerek kullanılmasıyla ilgili herhangi bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Dolayısıyla mevcut bu çalışma deneysel olarak ÜK oluşturulan ratlarda linalool ile likopen'in geleneksel ve kolona hedeflendirilerek kullanılmasının muhtemel koruyucu etkilerini karşılaştırmalı olarak araştırmak amacıyla gerçekleştirilmiştir.

4. GEREÇ VE YÖNTEM

4.1. Gereç

4.1.1. Kullanılan Kimyasallar ve Sarf Malzemeleri

Amonyum sülfat	Merck 1216
Bakır-2-sülfat	Merck 1.02787
Disodyum etilendiamintetraasetik asit dihidrat	Sigma E5134
Disodyum hidrojen fosfat-2-hidrat	Merck 6580
5,5'-ditiyobis-2-nitrobenzoik asit	AppliChem 69-78-3
Etanol	Riedel 32221
Glutasyon peroksidaz	Sigma G6137
Glutasyon redüktaz	Sigma G3664
Hidrojen peroksit (%35)	Merck 1.08600
Hidroklorik asit (%37)	Merck 1.00314
İndirgenmiş glutasyon	Sigma G4251
İndirgenmiş nikotinamid adenin dinükleotid fosfat	Sigma N1630
Likopen CWS/S-TG	DSM Redivivo 5003792
Linalool	Sigma L2602
Potasyum dihidrojen fosfat	Merck 4873
Potasyum hidroksit	Merck 5032
Potasyum klorür	Merck 4936
Sığır serum albumini	Fluka 05470
Sodyum azid	Riedel 35088
Sodyum hidroksit	Sigma S0899
Sodyum karbonat	Merck 1.06398.1000

Sodyum klorür	Merck 1.06404.1000
Sodyum potasyum tartarat	Merck 8085.1000
1,1',3,3'- Tetraetoksipropan	Acros Organics 122-31-6
Trikloroasetik asit	Merck 807
Tris tamponu	Sigma T6066
2-Tiyobarbitürik asit	Merck 1.08180.0025
Kitosan	Sigma 448869
Süksinik anhidrat	Sigma 239690
Asetik asit	Sigma 27225
Metanol	Sigma 34885
Aseton	Sigma 34850
3,3'-Diaminobenzidin (DAB) tablet	Amresco E733
Sülfasalazin	Fluka S0883
DC protein assay kit II	Biorad 5000112
Filtre kagıdı	Biorad 1703932
Nitroselüloz membran	Biostep 01-14-103
Ekstraksiyon kiti	Abcam ab113474
Eliza kiti (IL-6)	Abcam ab100772
Eliza kiti (IL-1 β)	Abcam ab100768
Eliza kiti (TNF- α)	Abcam ab100785
Primer antibody (NF-kB)	Abcam ab16502
Primer antibody (Nrf-2)	Abcam ab137550
Primer antibody (COX-2)	Abcam ab52237
Primer antibody (Beta actin)	Abcam ab8227

Sekonder antibody	Abcam ab97051
Prism ultra protein ladder	Abcam ab116027
Diyaliz torbası	Sigma D6066
PBS tablet	Sigma P4417
Ripa buffer	Sigma R0278
Formaldehit	Sigma 15512
Normal traşlı lam	Isolab 075.05.003
Lamel 24x24	Isolab 075.00.004
Lamel 24x32	Isolab 075.00.005
Kullanıma hazır Mayer Hematoxylin	Thermo 008011
Eosin Y-solution %0.5 aqueous	Merck 109844.1000
Preparat kutusu	Isolab 076.02.001
Kapaklı parafin kaseti	Isolab 074.03.001
Alkol (%96)	Tekkim TK200655.05003
Absolut alkol	Merck 100983.2500
Ksilol	Merck M108661.2500
Boncuk parafin	Tekkim TK200661.25006
Entellan	Merck 107961.0100
Disposable mikrotom bıçağı	Isolab
Balon joje (5, 10, 25, 50, 100, 250 ml)	Isolab
Beher (10, 25, 50, 100, 250, 500,1000 ml)	Isolab
Erlen (25, 50, 100, 250, 500 ml)	Isolab
Dereceli silindir (50, 100, 250, 500 ml)	Isolab
Spatül (Düz ve kaşık)	Isolab

Diseksiyon seti	Kruuse
Cam tüp (16x100 mm)	Isolab

4.1.2. Kullanılan Alet ve Cihazlar

Distile su cihazı	Nüve NS112
Ultra saf su cihazı	Thermo Smart 2 Pure 12 UV/UF
Hassas terazi (0.0001g - 220g)	Kern ABJ-220 4M
Homojenizatör	Benchmark D1000
Sonikatör	Bandelin Sonopuls HD2070
Etüv	Nüve FN ₀₅₅
Manyetik karıştırıcı (tekli)	Mtops MS 300HS
Manyetik karıştırıcı (�oklu)	Mtops HS 15-030
Çok kanallı mikro pipet (10-100 �l)	Transferpette
Mikro pipet (0.5-10, 10-100, 100-1000, 500- 5000 �l)	Brand
Ph metre	Thermo Orion Star A2115
Soğutmalı santrifüj	Hettich Universal 32R
Buzdolabı (+4 �C)	Samsung RT50H6360WW
Derin dondurucu (-20 �C)	Hoover Hup 2000
Derin dondurucu (-80 �C)	New Brunswick Sci. U410
Spektrofotometre	Shimadzu Mini 1240 UV-VIS
Spektrofotometre küveti (normal ve kuvartz)	
Su banyosu	Memmert WNB10

Vorteks	Velp Classic F202A0173
Liyofilizatör	Labconco Freezone 12L
Rotary evaporatör	Ika RV05 Basic
Ultrasonik banyo	Isolab 3L
Buz makinası	Hoshizaki FM-80EE
Çeker ocak	Mipro MFH-D Serisi
Eliza okuyucu	Biotek Elx-800
Western blot	Biorad Mini-Protean 3 Cell Jel
	Elektroforez Sistemi
3D çalkalayıcı	Heidolph Polymax 1040
Rotary mikrotom	Leica RM 2125 RTS
Yüzdürme havuzu	Leica HI 1210
Doku takip cihazı	Leica TP 1020
Doku bloklama cihazı	Leica EG 1150 H
Doku bloklama cihazının soğutma ünitesi	Leica EG 1150 C
Florasana ataçmanlı, trinoküler ışık mikroskobu	Olympus BX 43

4.1.3. Hayvan Materyali

Çalışmada Mustafa Kemal Üniversitesi Deneysel Araştırmalar Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde (MKÜDAM) üretilen 3-4 aylık, 350-400 g ağırlığında 49 adet Wistar Albino ırkı erkek rat kullanıldı. Çalışmanın deneysel model aşaması MKÜDAM'da gerçekleştirildi. Hayvanlar standart şartlar altında (sabit ısı ve havalandırılmalı odalarda; 12 saat gün ışığı ve 12 saat karanlık olmak üzere) her

grupta 7 rat olacak şekilde kafeslerde barındırıldı. Ratlara su ve yem *ad libitum* olarak verildi. Ratların beslenmesinde Bil-yem'den temin edilen 8 mm'lik rat pellet yemleri kullanıldı.

Bu çalışma Mustafa Kemal Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun 30.04.2015 tarih ve 2015/4-4 sayılı onay kararı alınarak gerçekleştirildi.

4.1.4. Deney Grupları

Ratlar her grupta 7 adet olacak şekilde toplam 7 gruba ayrıldı. Kontrol grubuna sadece gavaj yoluyla serum fizyolojik uygulandı. Çalışmada kullanılacak etken maddelerden linalool'ün dozu Jana ve ark. (83), likopen'in dozu Ateşşahin ve ark. (111), sülfasalazin'in dozu Prabhu ve ark. (112) tarafından önerilen dozlar esas alınarak seçildi. ÜK modelinin oluşturulmasında kullanılan asetik asidin dozu ise Al-Rejaie ve ark. (14) tarafından önerilen modele göre seçildi. ÜK modeli oluşturulurken ratlara hafif anestezi altında %4'lük asetik asit intrarektal olarak 2 ml dozunda uygulandı ve ilacın rektumdan dışarı çıkmaması için hayvanlar 1 dakika boyunca baş aşağı şekilde tutuldu.

Çalışmada kullanılacak ratlar aşağıdaki şekilde gruplandırıldı.

Grup 1- Kontrol grubu (K) : Serum fizyolojik 7 gün süreyle gavaj yoluyla 2 ml uygulandı.

Grup 2- Ülseratif kolit grubu (ÜK): Serum fizyolojik 7 gün süreyle gavajla verildi ve 7. günün sonunda %4'lük asetik asit 2 ml intrarektal olarak kolona uygulandı.

Grup 3- Kolit+sülfasalazin grubu (S): 7 gün süreyle sülfasalazin 100 mg/kg dozda gavajla verildi ve 7. günün sonunda %4'lük asetik asit 2 ml intrarektal olarak kolona uygulandı.

Grup 4- Kolit+linalool grubu (LN) : 7 gün süreyle linalool 200 mg/kg dozda gavajla verildi ve 7. günün sonunda %4'lük asetik asit 2 ml intrarektal olarak kolona uygulandı.

Grup 5- Kolit+likopen grubu (LK): 7 gün süreyle likopen 10 mg/kg dozda gavajla verildi ve 7. günün sonunda %4'lük asetik asit 2 ml intrarektal olarak kolona uygulandı.

Grup 6- Kolit+ kolona hedeflendirilmiş linalool grubu (HLN) : Kolona hedeflendirilen linalool 7 gün süreyle 200 mg/kg dozda gavajla verildi ve 7. günün sonunda %4'lük asetik asit 2 ml intrarektal olarak kolona uygulandı.

Grup 7- Kolit+ kolona hedeflendirilmiş likopen grubu (HLK): Kolona hedeflendirilen likopen 7 gün süreyle 10 mg/kg dozda gavajla verildi ve 7. günün sonunda %4'lük asetik asit 2 ml intrarektal olarak kolona uygulandı.

4.1.5. Kolona Hedeflendirme İşlemleri

Etken maddelerin kolona hedeflendirilmesi Mura ve ark. (113, 114) tarafından tarif edilen yöntemle göre gerçekleştirildi. Kısaca kitosan öncelikle süksinillenerek elde edilen N-süksinil kitosan ile kullanılacak etken maddeler 1:1 mol oranında karıştırıldı ve karışım -80 °C'de donduruldu. Daha sonra 60 mmHg ve -70 °C'de 24 saat liyofilize edildi.

4.1.5.1. N-Süksinil Kitosan'ın Hazırlanması

- 0.6 g kitosan manyetik karıştırıcı üzerinde %2'lik asetik asit solüsyonu (50 ml) ile çözdürüldü.
- Elde edilen solüsyon 50 ml metanol ile yavaşça seyreltildi.
- Daha sonra 4 g süksinik anhidrat aseton'un minimum miktarında (30ml) çözdürülerek damla damla polimer solüsyonu içine eklendi.
- Reaksiyon, gece boyunca oda sıcaklığında karıştırıldı.
- Elde edilen akışkan jel berrak bir çözelti oluşana ve pH 10'a ulaşana kadar damla damla 2M NaOH ile seyreltildi.
- Çözelti rotary evaporatör vasıtası ile konsantre edilerek hızlı bir şekilde distile suya karşı 3 gün boyunca diyaliz edildi.
- Daha sonra çözelti beyaz pamuk benzeri bir malzeme elde etmek için liyofilizasyona tabi tutuldu.

4.1.5.2. Etken Maddelerin N-Süksinil Kitosan ile Kolona Hedeflendirilmesi

- Etken maddeler ile N süksinil-kitosan 1:1 molar oranda karıştırıldı.
- Karışım ultratoraks vasıtası ile homojenize edilerek ilaç ve polimerik malzemenin fazlasını ortamdan uzaklaştırmak için 1600 g de 30 dk santrifüj edildi.
- -80 °C'de dondurulan dispersiyon daha sonra 24 saat boyunca -70 °C'de ve 60 mmHg'da liyofilizatör kullanılarak istenilen matriks elde edildi.

4.1.6. Örneklerin Alınması ve Hazırlanması

Son uygulamadan 24 saat sonra ratlar hafif anestezi altında dekapite edilerek kan ve doku örnekleri alındı. İlaç uygulamaları devam ederken 4. gruptan bir hayvanın öldüğü gözlemlendi. Doku olarak distal kolondan 10 cm'lik bir parça alınarak serum fizyolojik ile yıkandı. Doku örneklerinin dörtte biri %10'luk formol içerisine konulurken kalan dörtte üçlük kısmı ise analizler için -80 °C'de saklandı.

Formolden çıkartılan kolon kısımları doku takibinden sonra parafine gömülüp 5-6 mikron kalınlığında kesitler alınarak histopatolojik analizler için saklandı.

-80 °C'den çıkarılan kolon parçalarından bir kısmında Western blot analizi için protein ekstraksiyonu yapıldı. Elde edilen çekirdek proteinlerini içeren süpernatantta NF-kB, Nrf-2 ve COX-2 parametrelerine bakıldı. Ayrıca kolon dokularından alınan örneklerin bir kısmı 1/10 oranında %1.15'lik KCl ile homojenize edilerek elde edilen homojenatın yarısında MDA (115) analizi yapılırken diğer yarısı 5000 g'de 1 saat (+4 °C'de) santrifüj edilip süpernatantları ayrılarak GSH (116), GPx (117) ve CAT (118) analizleri yapıldı. Homojenatta ve süpernatantta protein analizleri Lowry (119) yöntemiyle belirlendi.

Son olarak kolon dokularının kalan kısmından 0.3 g alınarak ripa bufferla ultratoraks vasıtası ile homojenize edildi. Elde edilen homojenat önce sonike edilerek 4 °C'de 12000 rpm'de 20 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrası elde edilen süpernatantlarda Eliza yöntemi ile TNF- α , IL-1 β ve IL-6 analizleri gerçekleştirildi.

4.2. Yöntemler

4.2.1. Klasik Histopatoloji

Ötenaziyi takiben ratlardan alınan kolon segmentleri %10'luk tamponlu formalin solüsyonunda tespit edildikten sonra bilinen klasik işlemlerden geçirilerek parafin bloklar hazırlandı. Bloklardan 5 µm kalınlığında alınan kesitler hematoxylin-eosin (H-E) yöntemi ile boyanarak (120), ışık mikroskopunda skorlama yapıldı. Skorlama için Ackerman ve ark. (121) tarafından kullanılan skorlama sistemi modifiye edilerek (Tablo 1) her hayvan için ayrı ayrı skorlama yapıldı ve bu değerler istatistiksel açıdan değerlendirildi.

Tablo 1. Deney grupları mikroskopik skorlama kriterleri.

	0	1	2	3	4
Nekroz derinliği	Yok	Mukozal	Mukozal ve submukozal	Mukozal, submukozal ve muskularis propria	Tüm kolon duvarında
Nekroz genişliği	Yok	Küçük bir alan	Orda derecede bir alan	Büyük bir alan	Yaygın
Yangı derecesi	Yok	Minimal	İlımlı	Orta derecede	Ciddi
Yangı genişliği	Yok	Mukozal	Mukozal ve submukozal	Mukozal, submukozal ve muskularis propria	Tüm kolon duvarında

4.2.2. Oksidatif Stres Parametrelerinin Ölçülmesi

4.2.2.1. Doku MDA Düzeylerinin Ölçümü

Doku MDA düzeylerinin tayini Ohkawa ve ark. (115) tarafından önerilen metoda uygun şekilde yapıldı.

Prensip: Doku MDA tayini; aerobik şartlar altında ve pH: 3.5'te, doku homojenatının kaynar su banyosunda 90-95 °C'de 1 saat inkübasyonu sonucu, lipid peroksidasyonun sekonder ürünü olan MDA'nın tiyobarbitürik asit ile reaksiyona girerek oluşturduğu pembe renkli kompleksin soğutulduktan sonra 532 nm'de spektrofotometrik olarak ölçümü esasına dayanır.

4.2.2.2. Doku GSH Düzeylerinin Ölçümü

Doku GSH düzeyleri Ellman (116) tarafından ditiyonitrobenzoik asit geri çevirim metodu olarak bilinen yöntem kullanılarak tayin edildi.

Prensip: Doku örneklerinden hazırlanan süpernatantta sülfidril taşımayan tüm proteinler çöktürücü çözeltilerle çöktürülür. 5,5'-ditiyo-bis[2-nitrobenzoik asit] (DTNB), sülfidril bileşikler tarafından redükte edilerek bir disülfid bileşiği olan sarı renkli kompleks oluşur. GSH miktarı bu sarı renkli bileşiğin spektrofotometrede 412 nm dalga boyunda ölçülmesi esasına dayanır.

4.2.2.3. Doku GPx Enzim Aktivitesinin Ölçümü

Glutasyon peroksidaz, redükte glutasyonu kullanarak H₂O₂'nin su ve oksijene dönüşümünü katalizleyen bir enzimdir. Dokulardaki GPx aktivitelerinin tayini Beutler (117) tarafından tarif edilen metoda uygun şekilde yapıldı.

Prensip: GPx, H_2O_2 varlığında GSH'ın okside glutatyon (GSSG)'a dönüşmesini katalize eder. H_2O_2 'nin bulunduğu ortamda GPx'in oluşturduğu GSSG, glutatyon redüktaz ve NADPH yardımıyla tekrar GSH'a dönüştürülür. GPx aktivitesi, ortamdaki NADPH'ın $NADP^+$ 'ye çevrilmesi ile optik dansitede meydana gelen absorbans farkının 340 nm'de spektrofotometrik olarak ölçülmesi esasına dayanır.

4.2.2.4. Doku CAT Enzim Aktivitesinin Ölçümü

Katalaz, enzim aktivitesiyle H_2O_2 'yi su ve oksijene dönüştürmektedir. Dokulardaki CAT enzim aktivitelerinin tayini Aebi (118) tarafından tarif edilen metoda uygun şekilde yapıldı.

Prensip: H_2O_2 , 240 nm dalga boyunda maksimum absorbans göstermektedir. Deney ortamına ilave edilen H_2O_2 'nin CAT enzimi tarafından parçalanmasıyla spektrofotometrede bir absorbans düşüşü görülebilmektedir. Absorbansta görülen bu düşüş enzim aktivitesi ile doğru orantılıdır. CAT ölçümü bu esasa dayanarak yapılmıştır.

4.2.2.5. Doku Protein Miktarı Ölçümü

Homojenat ve süpernatantlarda protein miktarları Lowry (119) tarafından tarif edilen yöntemle uygun şekilde ölçüldü.

Prensip: Alkali bakır ayırıcındaki Cu^{++} peptid bağları ile kompleks yapmaktadır. Folin-fenol ayıracı, bakır ile muamele edilmiş karışıma ilave edildiğinde mavi-mor bir renk şekillenir. Protein miktar tayini oluşan bu mavi-mor rengin spektrofotometrede 650 nm'de okunması esasına dayanır.

4.2.3. Doku Sitokin Düzeylerinin Ölçümü

Dokularda TNF- α , IL-1 β ve IL-6 sitokin düzeyleri kullanılan ticari kit (Abcam) prosedürüne uygun olarak Eliza cihazı ile ölçüldü.

Prosedür: Ön hazırlık olarak yöntemde kullanılan bütün reaktiflerin seyreltmeleri yapıldı. Oda ısısına gelmeleri sağlanarak standartların sulandırılması yapıldı.

Birinci aşamada her bir kuyucuğa standart ve örneklerden (ripa buffer ile homojenize edilen) 100 μ l eklendi. Plakanın üzeri jelatinle kapatılarak çalkalayıcıda 2.5 saat oda ısısında bekletildi. Daha sonra çalkalayıcıdan alınan plakanın kuyucukları boşaltılarak kuyucuklar 4 kez 1X wash solüsyonu ile yıkandı. İkinci aşamada her kuyucuğa 100 μ l 1X biotinylated (TNF- α , IL-1 β ve IL-6) antibody eklenerek oda ısısında çalkalayıcıda 1 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında içerik boşaltılarak kuyucuklar 4 kez 1X wash solüsyonu ile yıkandı. Üçüncü aşamada her bir kuyucuğa 100 μ l HRP-streptavidin solüsyonu eklenerek oda ısısında çalkalayıcıda 45 dk bekletildi. İnkübasyon sonrasında içerik boşaltılarak kuyucuklar 4 kez 1X wash solüsyonu ile yıkandı. Dördüncü aşamada her bir kuyucuğa 100 μ l TMB one-step substrat reaktifi eklenerek oda ısısında, karanlıkta ve karıştırıcı üzerinde 30 dk inkübe edildi. Beşinci aşamada her bir kuyucuğa 50 μ l stop solüsyonu eklenerek Eliza cihazında 450 nm dalga boyunda absorbanslar okundu. Ayrıca hesaplamalarda kullanmak üzere okunan standart absorbanslardan standart eğrisi çizilerek Lowry (119) yöntemiyle örneklerin protein miktarları ölçüldü.

4.2.4. Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektrofözezi (SDS-PAGE) ve Western Blotlama Tekniği ile Proteinlerin Analizi

İlk olarak kolon dokusundan çekirdek proteinleri elde edildi. Daha sonra SDS-PAGE poliakrilamid jel elektrofözezi'nde kuyulara protein yükleme yapılmadan önce Lowry (119) yöntemiyle protein konsantrasyonları ölçölerek her kuyuya 20 µg protein örnekleri yüklendi. SDS-PAGE tekniği ile dokulara ait protein örnekleri %12'lik jelde yürütölldü. Daha sonra bu proteinler Western blotlama tekniği ile nitroselölöz membrana aktarölarak sentez oranlarına bakölldü (122). Nitroselölöz membranda gözlenen protein düzeyleri yoğunluk belirleyici analiz sistemi ile ölçölldü (Image J; National Institute of Health, Bethesda, USA).

4.2.4.1 Kolon Dokusundan Çekirdek Proteinlerinin Ayrölması

Kolon dokusundan çekirdek proteinlerini ayörmak için 0.1 g doku alınarak hazır ticari kit (Abcam) vasötasıyla protein izolasyonu yapıölldü.

Prosedür: Birinci aşamada 10X pre-ekstraksiyon buffer distile su ile 10 kat sulandırölarak içine 1/1000 oranında DTT ve PIC (proteaz inhibitör kokteyl) eklenerek pre-ekstraksiyon buffer hazırlandı. Elde edilen bufferdan 0.5 ml alınarak kolon dokusu bu buffer içinde homojenize edildi. Homojenat 15 dk buz üzerinde inkübe edildikten sonra 4 °C'de 12000 rpm'de 10 dk santrifölü edildi. Santrifölü sonrası süpernatant ayrıölarak kalan pelet ikinci aşama işlemlere maruz bırakölldü.

İkinci aşamaya başlamadan önce ekstraksiyon buffer içine 1/1000 oranında DTT ve PIC solölasyonları eklendi. Daha sonra elde edilen peletin üzerine 0.5 ml ekstraksiyon bufferdan eklenerek 15 dk buz üzerinde inkübe edildi (her 3 dakikada bir 5 saniye vortekslendi). Bu aşamadan sonra ekstrakt 3x10 saniye sonike edilerek

4 °C’de 14000 rpm’de 10 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrası elde edilen süpernatant temiz bir ependorf tüpüne alınarak Lowry (119) yöntemiyle protein miktarları ölçüldükten sonra -80 °C’de analizlere başlayana kadar muhafaza edildi.

4.2.4.2. Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi

SDS-PAGE, Biorad mini-protean 3 cell jel elektroforez sistemi kullanılarak yapıldı. Proteinleri ayırmak için kullanılan jel aşağıdaki gibi hazırlandı.

Ayırma Jeli (%12)

dH ₂ O	3.35 ml
1.5 M Tris HCl (pH: 8.8)	2.5 ml
%10 SDS	100 µl
%30 Akrilamid/Bis	4 ml
%10 Amonyum persülfat	75 µl
TEMED	15 µl

Yükleme Jeli (%4)

dH ₂ O	6.1 ml
0.5 M Tris HCl (pH: 6.8)	2.5 ml
%10 SDS	100 µl
%30 Akrilamid/Bis	1.3 ml
%10 Amonyum persülfat	60 µl
TEMED	12 µl

Örnekler kuyulara yüklenmeden önce eşit miktarda SDS-PAGE SAB boyası ilave edilerek 5 dakika kaynatıldı. Elektroforez için 1X tank tamponu kullanılarak proteinlerin jeldeki hareketinin izlenmesini sağlayan boyaya (bromofenol mavisi) ait mavi bant, jelin sonuna gelinceye kadar 20 mA akım uygulandı. Elektroforez sonrası jel, oda sıcaklığında yarım saat süreyle komasi mavisi ile boyanmış ve sonrasında jeldeki protein bantları görünür hale gelinceye kadar boya uzaklaştırıcı solüsyon ile yıkandı. Jeller, jel kurutma sistemi ile kurutularak saklandı (122).

4.2.4.3. Western Blot Analizi ile Protein Ekspresyon Düzeylerinin Belirlenmesi

4.2.4.3.1. Stok Solüsyonlar ve Tamponlar

Agaroz jel için Örnek Uygulama Tamponu

Promega kitine ait tampon kullanıldı.

SDS-PAGE için 5X tank (yürütme) tamponu (5X running buffer)

0.025 M Trizma Base	15 g/ml
0.192 M Glisin	72 g/ml
%0.1 SDS	5 g/L

dH₂O ile 1X running buffer'a seyreltilerek çalışma solüsyonu hazırlandı.

SDS-PAGE için Örnek Uygulama Tamponu

%10 SDS	1 g/10 ml
0.5 M Tris HCl (pH: 6.8)	0.6 g/10 ml
%5 Gliserol	0.5 ml/10 ml

%25 2-Merkaptoetanol	0.25 ml/10 ml
%0.05 Bromofenol mavisi	0.005 g/10 ml
dH ₂ O ile 10 ml'ye tamamlandı.	

SDS-PAGE sonrası protein boyama solüsyonu

%0.1 Komasi brilliant mavisi	0.1 g/100 ml
%40 Metanol	40 ml/100 ml
%10 Glasiyal asetik asit	10 ml/100 ml
dH ₂ O ile 100 ml'ye tamamlandı.	

Western Blot Transfer Tamponu 5X

Glisin	4.3 g/300 ml
Trizma base	5.81 g/300 ml
Metanol	75 ml/300 ml

dH₂O ile 300 ml'ye tamamlandı.

PBS (Fosfat Tamponu) 9X

1.45 M NaCl	84.74 g/L
0.075 M Na ₂ HPO ₄ .12 H ₂ O	26.8 g/L
0.025 M NaH ₂ PO ₄ .12 H ₂ O	3.9 g/L

PBS Tween-20

PBS	1000 ml
Tween-20	2 ml

Süt tozu

Bloklama solüsyonu olarak %5'lik süt tozu kullanıldı.

Western Blotlama Sonrasında Nitroselüloz Membranda Protein

Görüntüleme Solüsyonu

1 M Tris (pH: 6.8)	1.33 ml/40 ml
3,3'-Diaminobenzidin (DAB) tablet	4 tablet
%30 H ₂ O ₂	40µl/40 ml
dH ₂ O ile 40 ml'ye tamamlandı.	

Western blot yöntemi Biorad mini-protean 3 cell jel elektroforez sistemi kullanılarak yapıldı. Blotlama öncesinde SDS-PAGE ile proteinlerin jelden ayrılması sağlandı. Daha sonra nitroselüloz transfer membranları jel boyutunda kesilerek filtre kâğıtları ile birlikte transfer tamponu içerisinde bekletildi. Elektroforez sonrasında jel de transfer tamponu içerisinde bekletildikten sonra Western blota özgü kasetin kapağı açılarak alt tarafına filtre kâğıdı ve onun üzerine de jel yerleştirildi. Hava kabarcığı kalmamasına dikkat edilerek nitroselüloz membran ve tekrar bir filtre kâğıdı yerleştirildi. Kasetin kapağı kapatılarak elektroforez tankına yerleştirildi. Tanka buz ünitesi yerleştirildikten sonra transfer tamponu dolduruldu ve güç kaynağına bağlanarak 250 mA'de 90 dakika akım verildi. Blotlama manyetik karıştırıcı üzerinde yapılarak ısının düzenli dağıtılması sağlandı. Blotlama sonrası membran, PBS Tween-20'de (PBS yıkama solüsyonu) 15 dakika yıkandı. 4 °C'de bir gece süt tozu içerisinde bloklama yapılarak 90 dakika oda ısısında bekletildi. Daha sonra 1/500 oranında seyreltilmiş primer antikor ilave

edilerek 90 dakika oda ısısında bekletildi ve sonra 15 dakika PBS yıkama solüsyonu ile yıkama yapıldı. 1/1000 oranında seyreltilmiş sekonder antikor ilave edilerek 90 dakika oda ısısında bekletildi ve sonrasında PBS yıkama solüsyonu ile 15 dakika yıkama yapıldı. Yıkama işleminin ardından protein görüntüleme solüsyonu (son hacim 40 ml saf suyla tamamlanacak şekilde 4 tablet (20 mg) DAB, 1,33 ml 1M Tris (pH: 6,8), %30'luk 40 µl H₂O₂) içerisinde bantlar belirgin hale gelinceye kadar bekletildi. Daha sonra dH₂O içerisine alınarak reaksiyon durduruldu. Bu prosedürler Aslan (73) ile Aslan ve Can (123) tarafından tarif edilen yöntemlerde bazı modifikasyonlar yapılarak gerçekleştirildi.

4.2.4.3.2. NF-kB, Nrf-2 ve COX-2 Ekspresyon Düzeylerinin Belirlenmesi

Kolon dokusu hücre çekirdeklerinden elde edilen proteinlerde; NF-kB, Nrf-2 ve COX-2 ekspresyon düzeyleri spesifik primer ve sekonder antikorlar kullanılarak SDS-PAGE ve Western blotlama tekniği ile belirlendi.

4.2.5. İstatistiksel Analizler

Bu çalışmada istatistiksel değerlendirmeler “IBM SPSS Statistics 23” paket programı kullanılarak yapıldı. Histopatolojik değerlendirmeler için grupların karşılaştırılmasında Kruskal Wallis H varyans analizi, grup içi önemlilikler için ise Mann-Whitney U-testi kullanıldı. Diğer verilerin istatistiksel değerlendirmelerinde gruplar arası farklılığın karşılaştırılmasında varyans analizi (ANOVA) kullanıldı. Grup içi karşılaştırmalarda ise Duncan testi kullanıldı. Sonuçlar ortalama ± standart

hata (SE) olarak ifade edilerek $P < 0.05$ değerleri istatistiksel olarak önemli kabul edildi.



5. BULGULAR

5.1. Histopatoloji Bulguları

Deney gruplarına ait mikroskopik skorlama değerleri Tablo 2'de, mikroskopik görünümeler ise Şekil 6-10'da sunulmuştur. Mikroskopik skorlamalara bakıldığında; yüzey epiteli ve kript kaybı, monosit ve nötrofil infiltrasyonları, hemoraji ve ödem ile karakterize ülseratif lezyonların derinlik ve genişliği açısından en yüksek skorlar ÜK grubunda belirlendi. Diğer deney gruplarının mikroskopik skorlama değerleri ÜK grubundan düşük olmakla birlikte ÜK, LN ve LK grupları arasındaki fark istatistiksel açıdan anlamsız, ÜK grubu ile S, HLN ve HLK grupları arasındaki fark ise anlamlı olarak tespit edildi ($P<0.001$). Aynı açıdan anlamlı istatistiksel farklılık S grubu ile LN ve LK grupları arasında da gözlemlendi. Yangısal değişimlerin derecesi ve genişliği bakımından ise yine en yüksek skorlar ÜK grubunda görüldü. Diğer deney gruplarının mikroskopik skorlama değerleri ÜK grubundan düşük olmakla birlikte ÜK, LN, LK, HLK grupları arasında istatistiksel farklılık bulunmadığı tespit edildi. S ve HLN gruplarında ise ÜK grubuna göre yangısal değişimlerin şiddetinin istatistiksel olarak anlamlı şekilde azaldığı gözlemlendi ($P<0.001$).

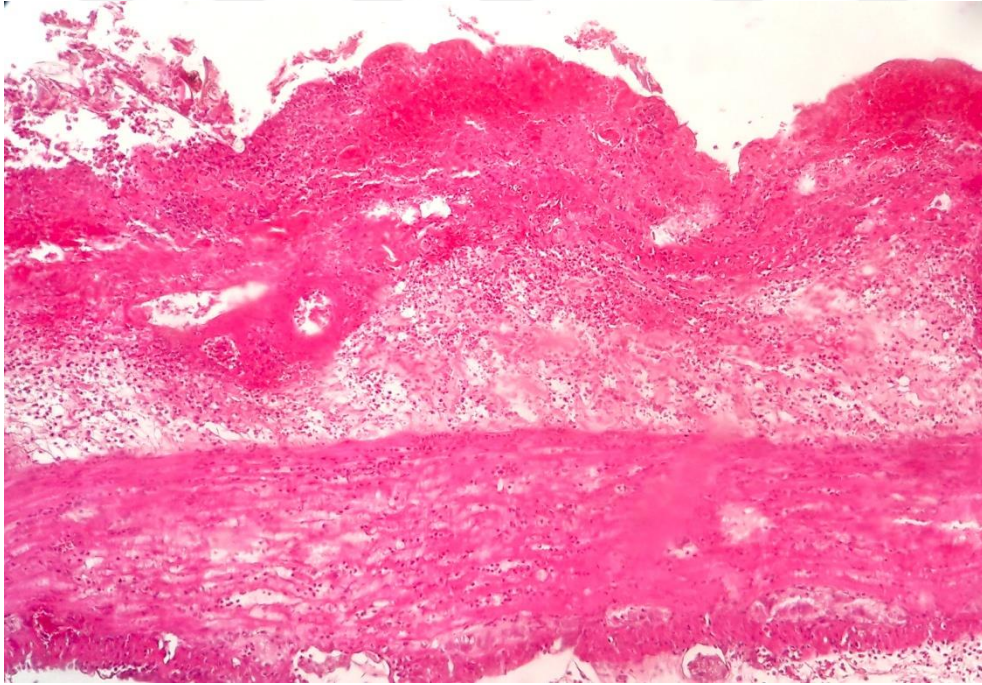
Tablo 2. Deney gruplarına ait mikroskopik skorum değerleri ($\bar{x} \pm SE \bar{x}$)

Gruplar	Nekroz Derinliği	Nekroz Genişliği	Yangı Derecesi	Yangı Genişliği
Grup 1 (K)	0.00±0.00 ^e	0.00±0.00 ^e	0.00±0.00 ^d	0.00±0.00 ^c
Grup 2 (ÜK)	4.00±0.00 ^a	4.00±0.00 ^a	3.29±0.18 ^a	3.43±0.20 ^a
Grup 3 (S)	1.71±0.29 ^d	1.71±0.29 ^d	1.71±0.29 ^c	1.86±0.26 ^b
Grup 4 (LN)	3.00±0.38 ^{abc}	3.00±0.38 ^{abc}	2.71 ± 0.29 ^{ab}	2.71±0.29 ^{ab}
Grup 5 (LK)	3.43±0.30 ^{ab}	3.43±0.30 ^{ab}	3.57±0.20 ^a	3.57±0.20 ^a
Grup 6 (HLN)	2.14±0.14 ^{cd}	2.29±0.18 ^{cd}	2.29±0.18 ^{bc}	2.29±0.18 ^b
Grup 7 (HLK)	2.71±0.18 ^{bcd}	2.71±0.18 ^{bcd}	2.86±0.26 ^{ab}	2.71±0.18 ^{ab}
<i>P</i>	0.001	0.001	0.001	0.001

a, b, c, d, e : Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen grup arası farklılıklar istatistiksel olarak önemlidir (P<0.05).



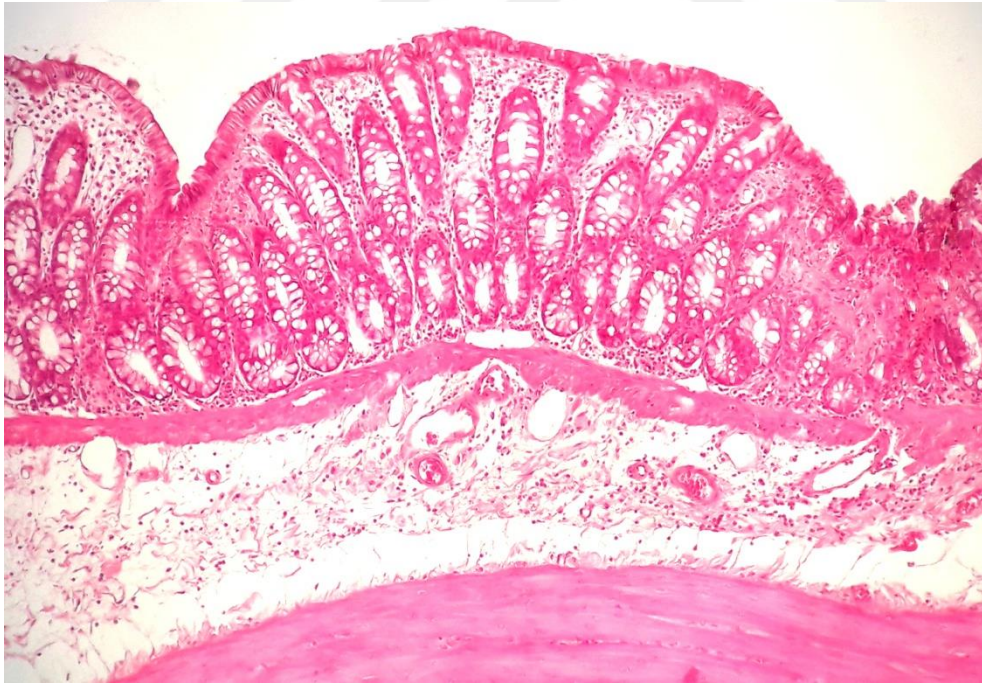
Şekil 6. Grup 1 (Kontrol) kolon mukozasının normal mikroskopik görünümü (H-E X 100).



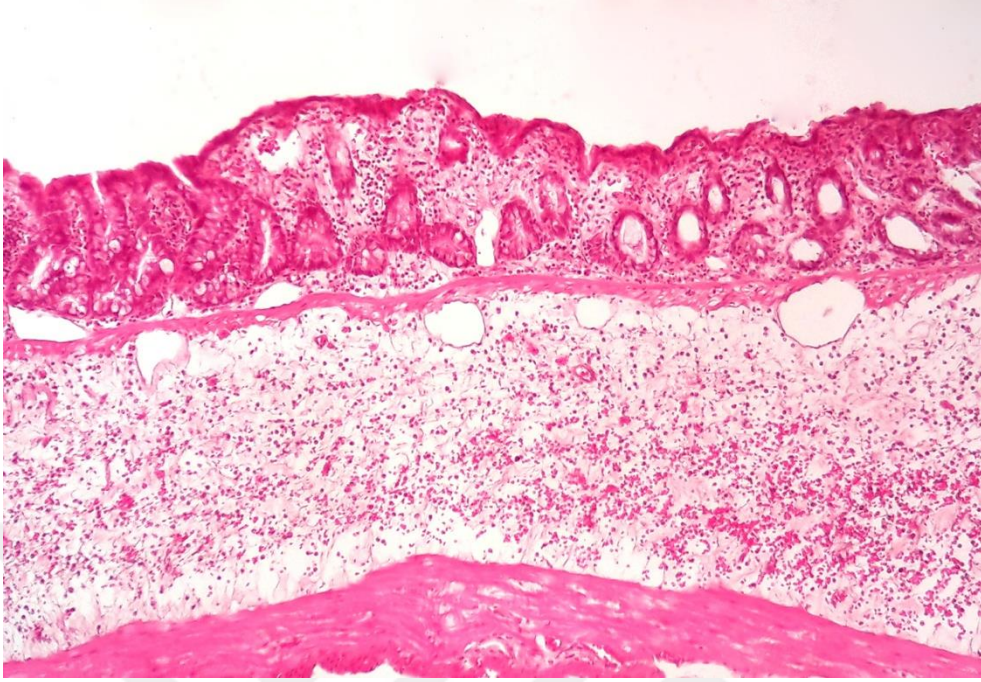
Şekil 7. Grup 2 (ÜK)'de kolonun tüm katmanlarını tutan nötrofil infiltrasyonları, şiddetli ödem, hemoraji ve hiperemi, (H-E X 50).



Şekil 8. Grup 3 (S)'de lamina propriada nekroz (asteriks) ve submukozada orta şiddette ödem ile birlikte lenfoid hiperplazi (ok başı), (H-E X 100).



Şekil 9. Grup 6 (HLN)'da submukozada orta şiddette ödem ile birlikte mukozal, submukozal ve muskularis propria'da ılımlı yangısal değişimler, (H-E X 100).



Şekil 10. Grup 7 (HLK)'de submukozada şiddetli ödem ile birlikte mukozal, submukozal ve muskularis propria'da yangısal değişimler, (H-E X 100).

5.2. Oksidatif Stres ve Antioksidan Parametre Bulguları

Deney gruplarına ait kolon dokusu MDA ve GSH düzeyleri ile GPx ve CAT aktiviteleri Tablo 3'te sunulmuştur.

Tablo 3 incelendiğinde grup 1 (kontrol) MDA düzeylerinin 5.79 nmol/g doku olduğu, ÜK grubunda bu değerin 8.37 nmol/g doku düzeylerine yükseldiği ve tedavi gruplarında ise 4.76-5.99 nmol/g doku seviyeleri arasında olduğu görüldü. ÜK grubu ile diğer grupların arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu tespit edildi ($P < 0.05$). LK grubunda MDA düzeylerinin 5.58 nmol/g doku düzeyinde olduğu, likopen'in hedeflendirildiği grup olan HLK grubunda ise MDA düzeylerinin 4.76 nmol/g doku seviyesine düştüğü ancak bu düşüşün istatistiksel açıdan anlamlı olmadığı belirlendi. LN grubunda MDA düzeylerinin 5.39 nmol/g

doku düzeyinde olduğu, linalool'ün hedeflendirildiği grup olan HLN grubunda ise bu değerin 5.99 nmol/g doku seviyesine yükseldiği ancak bu artışın da istatistiksel açıdan anlamlı olmadığı tespit edildi.

Kontrol grubu GSH düzeylerinin 6.53 nmol/mg protein düzeyinde olduğu, kolit grubunda bu değerin 3.04 nmol/mg protein düzeylerine anlamlı şekilde düşerken ($P<0.05$) S grubunda 4.29 nmol/mg protein düzeylerine yükseldiği tespit edildi ($P<0.05$). Bununla birlikte kolit grubu ile S grubu haricindeki tedavi grupları arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı gözlemlendi. LN grubunda GSH düzeylerinin 3.39 nmol/mg protein düzeylerinde olduğu, HLN grubunda bu değerin 3.59 nmol/mg protein seviyelerine yükseldiği fakat bu yükselişin istatistiksel açıdan anlamlı ifade etmediği tespit edildi. Benzer şekilde LK grubunda 2.98 nmol/mg protein olan GSH düzeylerinin, HLK grubunda 3.54 nmol/mg protein düzeylerine yükseldiği ama bu yükselişin de istatistiksel açıdan anlamlı olmadığı belirlendi.

Kontrol grubu CAT aktivitesinin 17.01 U/g protein olduğu, kolit grubunda bu değerin 12.10 U/g proteine düşmesine karşın ($P<0.05$) S grubunda 18.12 U/g protein değerine yükselerek kontrol grubu seviyelerine çıktığı tespit edildi ($P<0.05$). Kolit grubu ile kontrol, S ve HLK grupları arasında görülen farkın anlamlı olduğu ($P<0.05$) fakat kolit grubu ile LN, LK ve HLN grupları arasında görülen farkın ise istatistiksel açıdan anlamsız olduğu belirlendi. LN grubunda CAT aktivitesinin 12.51 U/g protein düzeylerinde olduğu, HLN grubunda aktivitenin 14.26 U/g protein düzeylerine yükseldiği fakat bu yükselişin istatistiksel açıdan anlamlı olmadığı tespit edildi. Benzer şekilde LK grubunda 13.99 U/g protein olan CAT aktivitesinin, HLK grubunda 17.55 U/g protein düzeylerine çıktığı fakat bu yükselişin de istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlendi.

Kontrol grubu GPx aktivitesi 768.03 U/g protein düzeyinde bulunurken, kolit grubunda aktivitenin 443.31 U/g protein seviyesine anlamlı şekilde düştüğü ($P<0.05$), S grubunda ise 601.58 U/g protein düzeylerine istatistiksel açıdan anlamlı şekilde yükseldiği tespit edildi ($P<0.05$). Ayrıca kolit grubu ile LN, LK, HLN, HLK grupları arasında görülen farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlendi. LN grubunda 527.93 U/g protein olan GPx aktivitesinin HLN grubunda 574.40 U/g protein'e yükseldiği tespit edildi. Aynı şekilde LK grubunda 520.94 U/g protein olan aktivitenin HLK grubunda 563.59 U/g protein olduğu belirlenirken bu yükselişlerin istatistiksel olarak anlamlı olmadığı tespit edildi.

Tablo 3. Deney grupları kolon dokusu MDA, GSH, GPx ve CAT düzeyleri ($\bar{x} \pm SE \bar{x}$)

Gruplar	MDA (nmol/g doku)	GSH (nmol/mg protein)	CAT (U/g protein)	GPx (U/g protein)
Grup 1 (K)	5.79±0.81 ^b	6.53±0.55 ^a	17.01±0.64 ^{ab}	768.03±44.96 ^a
Grup 2 (ÜK)	8.37±0.73 ^a	3.04±0.16 ^c	12.10±1.77 ^c	443.31±32.81 ^c
Grup 3 (S)	5.57±0.57 ^b	4.29±0.50 ^b	18.12±1.50 ^a	601.58±40.03 ^b
Grup 4 (LN)	5.39±0.44 ^b	3.39±0.32 ^{bc}	12.51±0.82 ^c	527.93±62.14 ^{bc}
Grup 5 (LK)	5.58±0.81 ^b	2.98±0.19 ^c	13.99±1.97 ^{bc}	520.94±39.19 ^{bc}
Grup 6 (HLN)	5.99±0.94 ^b	3.59±0.21 ^{bc}	14.26±1.74 ^{bc}	574.40±65.20 ^{bc}
Grup 7 (HLK)	4.76±0.29 ^b	3.54±0.26 ^{bc}	17.55±1.38 ^{ab}	563.59±32.35 ^{bc}
P	0.025	0.000	0.002	0.001

^{a, b, c} : Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen grup arası farklılıklar istatistiksel olarak önemlidir ($P<0.05$).

5.3. Yangı Sitokinleri Bulguları

Deney gruplarına ait kolon dokusu TNF- α , IL-1 β ve IL-6 düzeyleri Tablo 4'te sunulmuştur.

Tablo 4 incelendiğinde kontrol grubu TNF- α düzeylerinin 5.83 pg/mg protein olduğu, kolit grubunda bu değer 9.10 pg/mg protein'e anlamlı bir şekilde yükselirken ($P<0.05$), S grubunda ise 6.22 pg/mg değerine istatistiksel olarak anlamlı şekilde düşerek kontrol grubu seviyelerine geldiği belirlendi ($P<0.05$). Kolit grubu ile tedavi gruplarından S ve HLK grupları arasındaki farkın istatistiksel açıdan anlamlı olduğu ($P<0.05$) fakat kolit grubu ile karşılaştırıldığında LK ve HLN gruplarının TNF- α düzeylerinde de düşüş görülmekle birlikte bu farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı tespit edildi. LN grubunda 10.10 pg/mg protein olan TNF- α düzeylerinin HLN grubunda 9.08'e, LK grubunda 6.79 pg/mg protein seviyelerinde iken, HLK grubunda ise 5.11 pg/mg protein seviyelerine düştüğü, ancak bu düşüşlerin istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlendi.

Deney gruplarının IL-1 β düzeyleri incelendiğinde; kontrol grubunda 10.58 pg/mg protein olan düzeylerin kolit grubunda 21.49 pg/mg protein seviyelerine anlamlı şekilde yükseldiği ($P<0.05$), buna karşın kolit grubuna göre S grubunda 13.44 pg/mg protein seviyelerine düşerek kontrol grubunun değerlerine yaklaştığı görüldü ($P<0.05$). Kolit grubu ile tedavi gruplarının IL-1 β düzeyleri karşılaştırıldığında tüm tedavi gruplarının IL-1 β düzeyleri kolit grubundan istatistiksel açıdan anlamlı düzeyde düşük bulundu ($P<0.05$). LN grubunda 15.38 pg/mg protein olan IL-1 β düzeyleri HLN grubunda 13.59 pg/mg protein değerine düşmüş olmakla birlikte bu düşüşün istatistiksel olarak anlamlı olmadığı gözlemlendi. LK grubunda 16.12 pg/mg protein olan IL-1 β düzeyleri, HLK grubunda 8.72 pg/mg

protein seviyelerine istatistiksel olarak anlamlı şekilde düştüğü tespit edildi ($P<0.05$).

Deney gruplarının IL-6 düzeyleri incelendiğinde kontrol grubunda 24.92 pg/mg protein olan düzeylerin kolit grubunda 35.40 pg/mg protein seviyelerine anlamlı şekilde yükseldiği ($P<0.05$), bununla birlikte kolit grubuna göre S grubunda 28.43 pg/mg protein seviyelerine düşerek kontrol grubu değerlerine yaklaştığı tespit edildi ($P<0.05$). Ayrıca IL-6 seviyeleri açısından kolit grubu ile LN, HLN ve HLK grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı düşüşler olduğu tespit edilirken ($P<0.05$) kolit grubu ile LK grubu arasındaki farkın anlamsız olduğu belirlendi. LN grubunda 26.88 pg/mg protein olan IL-6 düzeyleri HLN grubunda 26.31 pg/mg protein değerine düştüğü ancak bu düşüşün istatistiksel olarak anlamlı olmadığı tespit edildi. LK grubunda 30.51 pg/mg protein olan IL-6 düzeyleri, HLK grubunda 21.30 pg/mg protein seviyelerine istatistiksel olarak anlamlı şekilde düştüğü belirlendi ($P<0.05$).

Tablo 4. Deney grupları kolon dokusu TNF- α , IL-1 β ve IL-6 düzeyleri ($\bar{x} \pm SE \bar{x}$)

Gruplar	TNF- α	IL-1 β	IL-6
	(pg/mg protein)	(pg/mg protein)	(pg/mg protein)
Grup 1 (K)	5.83 $\pm$ 0.73 ^c	10.58 $\pm$ 0.84 ^{cd}	24.92 $\pm$ 2.59 ^{bc}
Grup 2 (ÜK)	9.10 $\pm$ 1.56 ^{ab}	21.49 $\pm$ 1.88 ^a	35.40 $\pm$ 2.87 ^a
Grup 3 (S)	6.22 $\pm$ 0.74 ^c	13.44 $\pm$ 1.47 ^{bc}	28.43 $\pm$ 2.64 ^b
Grup 4 (LN)	10.10 $\pm$ 0.97 ^a	15.38 $\pm$ 1.16 ^b	26.88 $\pm$ 1.75 ^{bc}
Grup 5 (LK)	6.79 $\pm$ 0.69 ^{bc}	16.12 $\pm$ 0.35 ^b	30.51 $\pm$ 1.07 ^{ab}
Grup 6 (HLN)	9.08 $\pm$ 0.27 ^{ab}	13.59 $\pm$ 0.55 ^{bc}	26.31 $\pm$ 1.14 ^{bc}
Grup 7 (HLK)	5.11 $\pm$ 0.38 ^c	8.72 $\pm$ 0.40 ^d	21.30 $\pm$ 1.10 ^c
<i>P</i>	0.001	0.000	0.001

a, b, c, d : Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen grup arası farklılıklar istatistiksel olarak önemlidir (P<0.05).

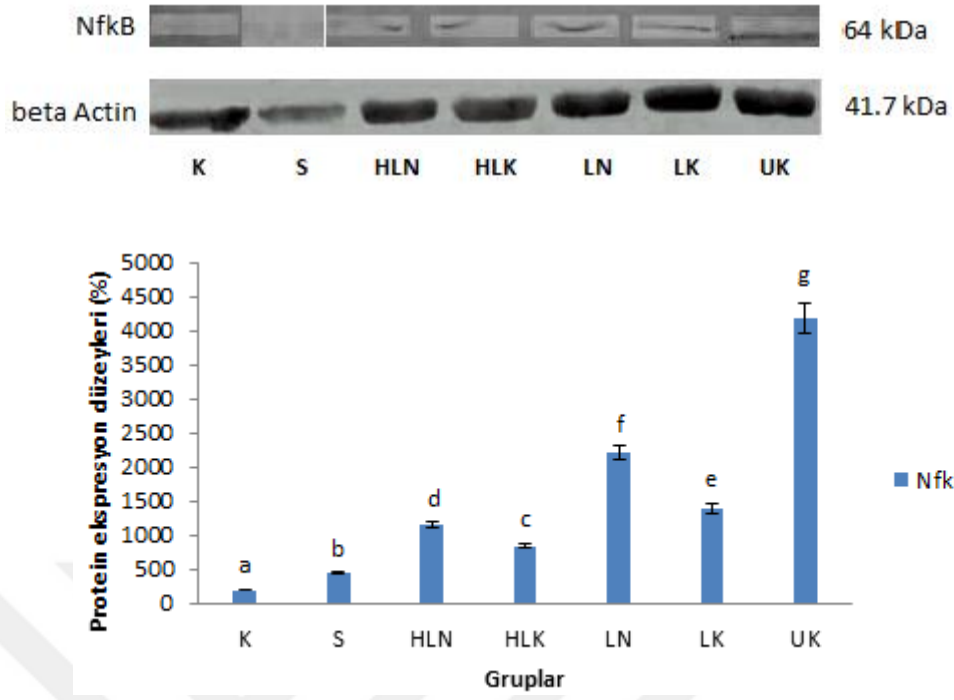
5.4. NF-kB, Nrf-2 ve COX-2 Protein Ekspresyon Düzeyi Bulguları

Kolon dokusu hücre çekirdeklerinden elde edilen proteinlerde NF-kB, Nrf-2 ve COX-2 ekspresyon düzeyleri Şekil 11-13’de sunulmuştur.

Şekil 11 incelendiğinde NF-kB ekspresyon düzeyleri açısından yüksekten düşüğe doğru ÜK>LN>LK>HLN>HLK>S>K grubu şeklinde sıralanmıştır. En yüksek NF-kB ekspresyon düzeyinin kolit grubunda, en düşük düzeyin ise kontrol grubunda olduğu tespit edilmiştir. Kolit grubu ile diğer gruplar arasındaki fark istatistiksel açıdan anlamlı bulunmuştur (P<0.05). Kolona hedeflendirilmiş gruplar (HLN ve HLK), hedeflendirilmemiş gruplara göre (LN ve LK) istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük bulunmuştur (P<0.05).

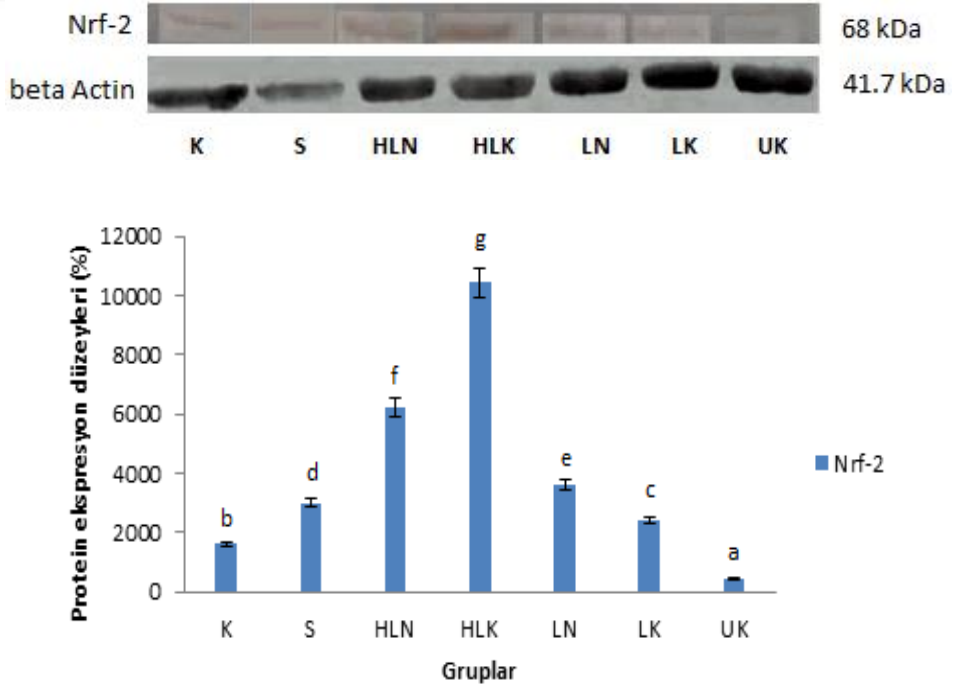
Şekil 12 incelendiğinde Nrf-2 ekspresyon düzeyleri açısından yüksekten düşüğe doğru HLK>HLN>LN>S>LK>K>ÜK grubu şeklinde sıralanmıştır. En düşük Nrf-2 ekspresyon düzeyi kolit grubunda, en yüksek düzey ise HLK grubunda olduğu tespit edilmiştir. Kolit grubu ile diğer gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($P<0.05$). Kolona hedeflendirilmiş gruplar (HLN ve HLK), hedeflendirilmemiş gruplara göre (LN ve LK) istatistiksel açıdan anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur ($P<0.05$).

Şekil 13 incelendiğinde COX-2 ekspresyon düzeyleri açısından yüksekten düşüğe doğru ÜK>LK>LN>S>HLN>HLK>K grubu şeklinde sıralanmıştır. En yüksek COX-2 ekspresyon düzeyi kolit grubunda, en düşük düzey ise kontrol grubunda olduğu tespit edilmiştir. Kolit grubu ile diğer gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($P<0.05$). Kolona hedeflendirilmiş gruplar (HLN ve HLK), hedeflendirilmemiş gruplara göre (LN ve LK) istatistiksel açıdan anlamlı düzeyde düşük bulunmuştur ($P<0.05$).



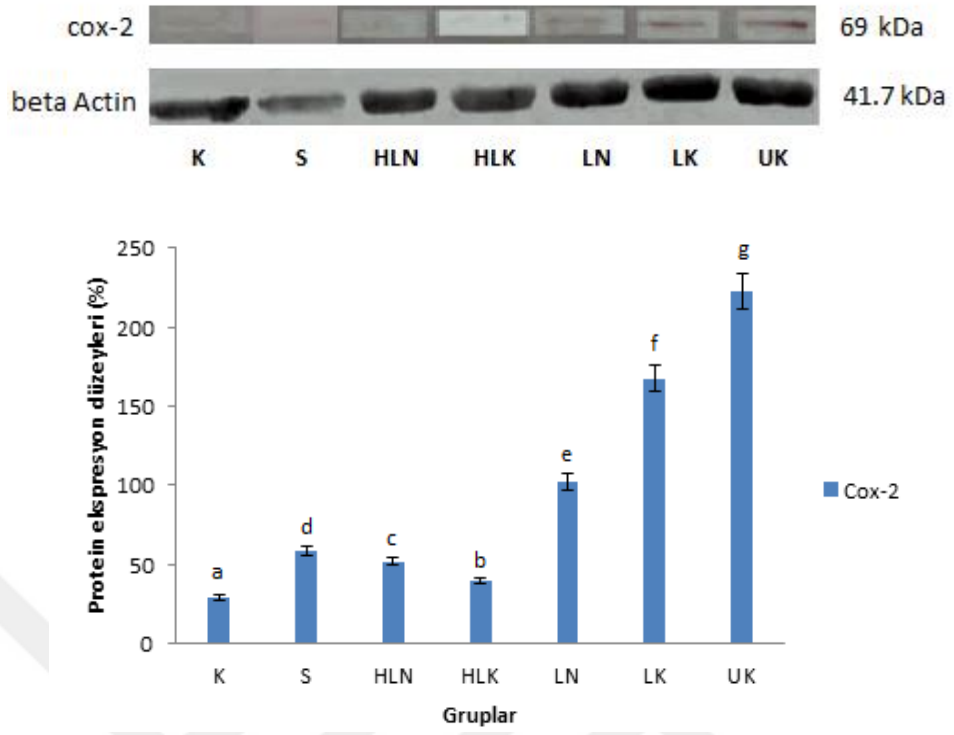
Şekil 11. Deney grupları NF-kB protein ekspresyon düzeyleri.

*a-g: Farklı harfi taşıyan gruplar arası fark önemlidir ($P < 0.05$).



Şekil 12. Deney grupları Nrf-2 protein ekspresyon düzeyleri.

*a-g: Farklı harfi taşıyan gruplar arası fark önemlidir ($P < 0.05$).



Şekil 13. Deney grupları COX-2 protein ekspresyon düzeyleri.

*a-g: Farklı harfi taşıyan gruplar arası fark önemlidir ($P < 0.05$).

6. TARTIŞMA

Yangısal bağırsak hastalıkları, ÜK ve KH'yi içine alan mide-bağırsak kanalının yaygın görülen kronik hastalıklarını tanımlar. ÜK çoğunlukla genç ve orta yaş grubu insanlarda görülen kalın bağırsağın yangısal bir hastalığıdır (6). ÜK'nin etiyoloji ve patogenezi araştırarak tedavisi için yeni ilaç seçenekleri sunabilmek açısından çok sayıda maddeyle (asetik asit, indometazin, TNBS, oksazolon, DSS, karragenan gibi) deneysel olarak hayvan modelleri geliştirilmiştir. Asetik asit, bu amaç için en yaygın kullanılan kimyasallardan birisidir (33, 34). Bu modelde görülen histopatolojik değişiklikler insanlardakine büyük oranda benzemektedir (35).

Konuyla ilgili yapılan çalışmalarda histopatolojik değerlendirmeler açısından birçok farklı makroskobik ve mikroskobik skorlamalar yapıldığı gözlenmiştir. Bakar ve ark. (11) tarafından deneysel olarak oluşturulan ÜK'ye karşı oral ve periton içi resveratrol'ün kullanıldığı bir çalışmada mikroskobik olarak yangı alanında görülen; nekroz, submukozal ödem, inflamatuvar hücre infiltrasyonu ve perforasyon kriterlerine göre toplamda 10 puan üzerinden skorlama yapılmıştır. Çalışmanın bulguları incelendiğinde en yüksek skorlamanın kolit grubuna ait olduğu, oral olarak resveratrol uygulanan gruba ait skorlama değerlerinin kolit grubuna göre düşük olmakla birlikte farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı, buna karşın periton içi resveratrol uygulanan grubun skorlama değerlerinin ise istatistiksel olarak anlamlı şekilde düşük bulunduğu bildirilmiştir. Skorlama kriterleri bire bir uyum göstermemekle birlikte mevcut bu çalışmada da yukarıdaki çalışmanın sonuçlarıyla benzer şekilde oral olarak LN ve LK uygulanan grupların skorlama değerleri kolit grubuna göre hafif derecede düşük bulunmuş,

buna karşın kolona hedeflendirilmiş HLN ve HLK gruplarında ise istatistiksel olarak anlamlı şekilde dūřık bulunmuştur. Al-Rejaie ve ark. (14) tarafından ratlarda asetik asit ile oluşturulan ÜK'ye karşı farklı dozlarda naringenin ve tek doz mesalazin'in kullanıldığı bir diğer çalışmada histopatolojik olarak ũlser, nekroz, hiperemi, ũdem, hũcresel infiltrasyon, goblet hũcre hiperplazisi kriterlerinin her biri için toplam 4 skrolama (+, ++, +++, +++) ũzerinden ayrı ayrı değerlendirmeler yapılmıştır. Çalışmanın verileri incelendiğinde kolit grubu skorlarının diğer gruplardan daha yũksek bulunduğu, mesalazinin ve farklı dozlardaki naringenin uygulamalarının ise skrolamaları doza bağımlı olarak dūřũrdũđu bildirilmiştir. Mevcut bu çalışmada kullanılan sũlfasalazin grubu verileri aynı grup etken maddeler olmasına rağmen yukarıdaki çalışmada kullanılan mesalazin grubu değerlerine gŕe yũksek bulunmuş olsa da bunun skrolama biçimlerinin farklı olmasından kaynaklandığı ve sonuç değerlendirme açısından iki çalışmanın da benzer olduğu gŕzlemlenmiřtir. Abdin ve ark. (8) tarafından ratlarda oksazolon ile deneysel olarak oluşturulan ÜK'ye karşı resveratrol etken maddesinin kullanıldığı bir başka çalışmada histopatolojik skrolamaların kolit grubunda diğer gruplardan yũksek olduğu, buna karşın kolona hedeflendirilmiş ve hedeflendirilmemiş resveratrol gruplarında ise kolit grubuna gŕe istatistiksel olarak anlamlı şekilde dūřık bulunduğu bildirilmiştir. Mevcut bu çalışmada da yukarıdaki çalışmayla benzer şekilde kolona hedeflendirilmiş HLK ve HLN gruplarında kolit grubuna gŕe histopatolojik skrolama değerlerinin istatistiksel olarak anlamlı şekilde dūřık olduğu tespit edilmiştir. Ancak kolona hedeflendirilmemiş LK ve LN gruplarında ise istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır. Bunun sebebi mevcut bu çalışmadan farklı olarak deneysel kolit modelinin oksazolon ile oluşturulması,

hedeflendirme materyalinin farklı olması (pektin), kolit modelinin çalışmanın başlangıcında oluşturulması ve tedavi sürecinin daha uzun olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Etiyolojisi tam olarak aydınlatılamamış olmakla birlikte ÜK'nin oksidatif stresle ilişkili olduğu yapılan birçok çalışmayla bildirilmiştir (15, 20, 124, 125, 126). Deneysel olarak oluşturulan ÜK modellerinde lipit peroksidasyonun en önemli göstergelerinden biri olan MDA düzeylerinin arttığı (126-129), buna karşın endojen enzimatik antioksidanlardan GPx (128, 129), SOD (112, 126, 128, 129) ve CAT (127-129) aktiviteleri ile enzimatik olmayan GSH düzeylerinin (112, 127) azaldığı ortaya konulmuştur. Mevcut bu çalışmada da kontrol grubuna göre asetik asit ile ÜK oluşturulan grupta doku MDA düzeylerinin anlamlı şekilde yükselmesine karşın CAT, SOD ve GPx aktiviteleri ile GSH düzeylerinin anlamlı şekilde azaldığı tespit edilmiştir. Elde edilen bu bulgular yukarıdaki araştırmacıların sonuçlarıyla paralellik göstermektedir. MDA düzeylerinin yüksek bulunmasının sebebi, asetik asit ile kolonda meydana gelen hasar sonucu patomekanizmanın bir parçası olarak serbest radikal üretiminin artması ve böylece lipit peroksidasyonu tetiklemesi olduğu düşünülmektedir. GSH düzeyleri ile CAT, SOD ve GPx aktivitelerinde görülen düşüşlerin de serbest radikal düzeylerindeki artmaya bağlı olarak endojen antioksidan savunma sonucunda tükenmeye bağlı inhibisyonla kaynaklandığı söylenebilir.

Oksidatif strese karşı antioksidanların koruyucu etkiler gösterdiği iyi bilinmektedir. ÜK tedavisinde antioksidanlar önemli bir yer tutmakla birlikte kolona hedeflendirilerek antioksidan kullanımı ile ilgili az sayıda literatür bulunmaktadır. Konuyla ilgili olarak yapılan bir çalışmada guar gum ile kolona

hedeflendirilen glisirizik asidin etkileri araştırılmış ve hedeflendirilmiş glisirizik asidin geleneksel olarak kullanılmaya göre MDA seviyelerini daha anlamlı bir şekilde düşürdüğü bildirilmiştir (97). Curcumin ve selekoksib etken maddelerinin eudragit s100 ile kaplanarak elde edilen nanopartiküllerin ratlarda oluşturulan ÜK modelindeki etkilerinin incelendiği bir diğer çalışmada (130), nanopartikül halinde uygulamanın geleneksel uygulamaya göre TBARS değerlerini daha iyi düşürürken SOD aktivitelerini ise daha iyi yükselttiği ortaya konulmuştur. Li ve ark. (131) tarafından yapılan bir çalışmada ise DSS ile ratlarda oluşturulan kolit modelinde kolona hedeflendirilen curcumin-piperin karışımının, hedeflendirilmeyen gruba göre MDA seviyelerini daha fazla düşürdüğü bildirilmiştir. Mevcut bu çalışmada kolona hedeflendirilerek kullanılan likopen'in hedeflendirilmeden geleneksel yolla kullanılan likopen'e göre MDA düzeylerini daha da düşürdüğü, bununla birlikte CAT aktivitelerini istatistiksel olarak anlamlı olmakla birlikte GSH düzeyleri ile GPx aktivitelerini yükseltme eğiliminde olduğu tespit edilmiştir. Benzer şekilde hedeflendirilmiş linalool uygulamasının hedeflendirilmeden uygulanmaya göre GSH düzeyleri ile CAT ve GPx aktivitelerini yükseltme eğiliminde olduğu belirlenmiştir. Elde edilen bu sonuçlar değerlendirildiğinde yukarıdaki araştırmacılar ile genel olarak uyumlu bulunmuştur. Yukarıdaki araştırmacılardan farklı olan bulguların ise kullanılan etken maddelerin, oluşturulan deneysel modelin ve hedeflendirme materyallerinin farklı olmasından kaynaklandığı söylenebilir. Bununla birlikte hedeflendirilerek etken madde uygulamalarının geleneksel uygulamaya göre daha etkili bulunmasının sebebi, etken maddelerin mide ve ince bağırsaktan geçerken kayba uğramaması sonucu hedef dokuda daha yüksek konsatrasyona ulaşması olduğu düşünülmektedir.

Proinflatuvar mediyatörler mukozal immün sistemin düzenlenmesi bakımından YBH'nin patogeneğinde önemli rol oynarlar. Yangılı mukoza bölgesine granülosit ve diğerk lökositlerin göçü sonucu fazla miktarda proinflatuvar sitokin üretimi meydana gelir. Yangı sitokinleri ve diğerk proinflatuvar mediyatörler (ROT vd.) kolondaki yangısal cevabın başlaması ve sürdürülmesinden sorumludurlar. Dolayısıyla YBH'nin tedavi stratejilerinden birisi de ortaya çıkan bu mediyatörlerin elimine edilmesidir (37, 132). Deneyisel kolit modellerinde TNF- α , IL-1 β ve IL-6 gibi yangı sitokinlerinin seviyelerinin arttığını gösteren çok sayıda çalışma bulunmaktadır (25, 132, 133). Tahan ve ark. (37) tarafından yapılan bir çalışmada asetik asit ile oluşturulan ÜK modelinde TNF- α , IL-1 β ve IL-6 seviyelerinin arttığı, buna karşın vitamin E kullanımının ise bu değerleri düşürdüğü ortaya konulmuştur. Bakar ve ark. (11) tarafından yapılan benzer bir çalışmada ÜK grubunda TNF- α ve IL-1 β seviyelerinin yükseldiğı, resveratrol uygulamasının ise IL-1 β seviyelerini anlamlı şekilde düşürürken TNF- α ve IL-6 seviyelerini de düşürme eğiliminde olduğı bildirilmiştir.

Yapılan literatür taramalarında deneyisel olarak oluşturulan ÜK modelinde TNF- α , IL-1 β ve IL-6 yangı sitokinlerinin düzeyleri üzerine linalool ve likopen'in geleneksel yolla ve/veya hedeflendirilerek kullanılmasının araştırıldığı herhangi bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Bununla birlikte, Yücel ve ark. (134) tarafından metotreksat ile oluşturulan ince bağırsak hasarına karşı kullanılan likopen'in yükselmiş olan IL-1 β düzeylerini anlamlı ve TNF- α düzeylerini ise ılımlı şekilde düşürdüğü tespit edilmiştir. Deneyisel olarak oluşturulan akciğerk hasarında linalool'un antiinflatuvar etkinliğinin araştırıldığı bir diğerk çalışmada (85) yükselmiş TNF- α ve IL-6 düzeylerinin linalool tarafından düşürüldüğü

bildirilmiştir. Bunlara ek olarak, farelerde oluşturulan kolit modeli üzerine kolona hedeflendirilen glikokortikoid yapısındaki budesonid'in etkinliğinin araştırıldığı bir çalışmada (135) kolit grubunda yüksek bulunan TNF- α , IL-1 β ve IL-6 ekspresyon düzeylerinin hedeflendirilerek uygulanan gruplarda geleneksel olarak kullanılan gruplara göre daha düşük olduğu bildirilmiştir. ÜK modelinde N-süksinil kitosan ile kolona hedeflendirilen 5-ASA'nın bir yangı mediyatörü olan MPO aktivitesi üzerine etkilerinin araştırıldığı bir diğer çalışmada (114) geleneksel uygulamanın MPO seviyelerini hafif düşürürken hedeflendirilerek uygulamanın MPO aktivitesini anlamlı şekilde düşürdüğü ortaya konulmuştur.

Mevcut bu çalışmada elde edilen bulgular yukarıdaki araştırmacıların sonuçlarıyla büyük oranda uyum göstermektedir. Bulgular incelendiğinde linalool uygulamasının ÜK grubunda yükselmiş olan IL-1 β ve IL-6 düzeylerini anlamlı şekilde düşürdüğü ortaya konulmuştur. Bununla birlikte likopen uygulamasının ise IL-1 β düzeylerini anlamlı şekilde ve TNF- α ile IL-6 düzeylerini ise ılımlı şekilde düşürdüğü belirlenmiştir. Bunlara ilaveten genel olarak hedeflendirilmiş linalool ve likopen uygulamalarının geleneksel yolla kullanımlarına göre yangı sitokin seviyelerini daha fazla düşürdüğü tespit edilmiştir. Özellikle hedeflendirilmiş likopen uygulamasının geleneksel kullanıma göre IL-1 β ve IL-6 düzeylerini anlamlı şekilde düşürdüğü ortaya konulmuştur. Çalışmada yangı sitokinlerinin düzeylerinin kolit grubunda yüksek bulunmasının sebebi, asetik asit uygulanmasıyla bağırsak epitel dokusunda hızla dejenerasyonların başlaması ve buradaki mukozal immun sistemin yangısal aktivasyonu sonucu olduğu ile açıklanabilir. Ayrıca likopen uygulanmasıyla yangı sitokin seviyelerinin düşmesi ise likopen'in CRP (yapımı yangı alanından salınan TNF- α , IL-1 β ve IL-6

tarafından tetiklenmektedir) miktarını düşürmesiyle ilişkili olabilir. Bununla birlikte linalool'ün sitokin seviyelerini NF-kB ve MAPK yollarını bloke ederek (yangı sitokinlerinin üretilmelerinin inhibisyonu) azalttığı düşünülmektedir.

Araşidonik asit aracılığıyla prostaglandin biyosentezinden sorumlu COX-2, normal dokulardan çok düşük düzeyde eksprese edilen, ancak patolojik durum ve kanserlerde ekspresyonu artan önemli bir enzimdir. Sentezlenen bu prostaglandinler ÜK gibi patolojik süreçlerde etkin role sahip olmakla birlikte yangı sürecini şiddetlendirmektedir (67, 136). Bir transkripsiyon faktörü olan NF-kB çoğunlukla sitoplazmada pasif halde bulunmaktadır. Yangısal sinyal iletimi sonucu aktive olarak çekirdeğe transfer olur. Aktive olan NF-kB yangı ve immun cevabın başlatılmasında önemli rol oynar (24). Bununla birlikte NF-kB, ÜK'nin patogenezinde rol alan TNF- α , IL-1 β ve IL-6 gibi çeşitli yangı sitokini genlerinin aktivasyonunu kontrol eder (137). Nrf-2, hücrel antioksidan cevabı düzenleyen önemli bir transkripsiyon faktörüdür. Uyarı ile sitozolden çekirdeğe geçen Nrf-2 aracılığında antioksidan ve detoksifiye edici genlerin ekspresyonu uyarılır. Bu vasıta ile antioksidan enzim seviyesinde artışa sebep olarak oksidatif hasara karşı koruyucu etki sağlar (137, 138).

Deneyssel olarak oluşturulan ÜK modellerinde NF-kB, Nrf-2 ve COX-2 protein ekspresyon düzeyleri üzerine linalool ve likoopen'in etkilerinin araştırıldığı az sayıda literatür bulunmaktadır. Sanchez-Fidalgo ve ark. (137) tarafından sekualen etken maddesinin etkinliğinin araştırıldığı bir çalışmada DSS ile oluşturulan kolit grubunda NF-kB ve COX-2 ekspresyon düzeyleri yüksek bulunurken tedavi gruplarında düzeylerin anlamlı şekilde düştüğü bildirilmiştir. ÜK modeli üzerine 3-(3-piridilmetiliden)-2-indolinon (PMID)'un etkinliğinin

araştırıldığı bir diğer çalışmada (139) PMID'ın artmış NF-kB ekspresyon düzeylerini düşürdüğü ve Nrf-2 ekspresyon düzeyini ise doza bağımlı olarak artırdığı tespit edilmiştir. Buna ek olarak, Li ve ark. (94) tarafından farelerde lipopolisakkarit/D-galaktozamin ile karaciğer hasarı oluşturulan bir çalışmada NF-kB ve COX-2 ekspresyon düzeyleri anlamlı şekilde yükselirken Nrf-2 ekspresyon düzeylerinin ise anlamlı şekilde düştüğü, buna karşın linalool uygulamasının bu seviyeleri doza bağımlı bir şekilde tersine çevirerek bertaraf ettiği bildirilmiştir. Azoksimetan ile oluşturulan kolon kanseri modeli üzerine domates tozunun etkilerinin araştırıldığı bir diğer çalışmada (67) kolon kanseri grubunda NF-kB ve COX-2 ekspresyon düzeylerinin yükselirken Nrf-2 ekspresyon düzeylerinin düştüğü, yüksek oranda likopen ihtiva eden domates tozunun bu etkileri tersine çevirerek bertaraf ettiği belirlenmiştir. Bunlara ilaveten, TNBS etken maddesi ile oluşturulan kolit modelinde (140) kolona hedeflendirilen selekoksib'in yükselmiş COX-2 ekspresyon düzeylerini düşürdüğü ve bu düşüşün hedeflendirilerek verilen grupta geleneksel yolla verilene göre daha fazla olduğu bildirilmiştir.

Mevcut bu çalışmada da ÜK grubunda NF-kB ve COX-2 ekspresyon düzeyleri yüksek bulunurken Nrf-2 ekspresyon düzeyleri ise düşük bulunmuştur. Bununla birlikte geleneksel yolla ve hedeflendirilerek uygulanan linalool ve likopen'in NF-kB ve COX-2 ekspresyon düzeylerini anlamlı şekilde düşürdüğü, buna karşın Nrf-2 ekspresyon düzeylerini ise anlamlı şekilde yükselttiği tespit edilmiştir. Bu etki bakımından hedeflendirilen likopen'in linalool'den istatistiksel olarak anlamlı şekilde etkili olduğu belirlenmiştir. Elde edilen bu bulgular yukarıdaki araştırmacıların sonuçlarıyla paralellik göstermektedir.

Sonuç olarak; asetik asit ile deneysel olarak oluşturulan ÜK modelinde kolon dokusunda muhtemelen serbest radikal oluşumunun arttığı, artan bu radikallerin lipit peroksidasyonu uyardığı ve bununla ilişkili olarak MDA seviyelerinde yükselişe sebep olduğu tespit edilmiştir. Lipit peroksidasyonun artmasıyla uyumlu olarak kolon dokusunda enzimatik (CAT ve GPx) ve enzimatik olmayan (GSH) antioksidan düzeylerinin düştüğü tespit edilmiştir. Buna karşılık antioksidan özellikleri bilinen likopen ve linalool uygulamalarının kolon dokusunda meydana gelen MDA düzeylerinde azalmaya sebep olarak lipit peroksidasyonu bertaraf ettiği ve antioksidan enzim düzeylerinde artışa sebep olduğu belirlenmiştir. Bunlara ilaveten, hücrede antioksidan cevabı düzenleyen bir transkripsiyon faktörü olan Nrf-2'nin artan lipit peroksidasyona bağlı olarak ekspresyon düzeylerinin düştüğü, buna karşılık likopen ve linalool uygulamalarının ise bu ekspresyon düzeylerini artırarak antioksidan savunma sistemi bileşenlerinin sentezini uyardığı ortaya konulmuştur. Asetik asit'in kolona uygulanmasıyla kolon dokusunda yangısal bir cevap geliştiği ve bu yangısal cevabı destekleyen transkripsiyon faktörlerinden olan NF-kB ve COX-2 ekspresyon düzeylerinin arttığı tespit edilmiştir. Bununla ilişki olarak, NF-kB yolağının aktivasyonu ile savunma sistemi hücrelerinden makrofaj/monosit kaynaklı TNF- α , IL-1 β ve IL-6 yangı sitokini düzeylerinin arttığı belirlenmiştir. Buna karşılık linalool ve likopen uygulamalarının ÜK'de önemli bir sinyal yolağı olan NF-kB ve COX-2 ekspresyon düzeyleriyle paralel olarak yangı sitokini düzeylerini düşürdüğü ve yangısal cevabı baskıladığı tespit edilmiştir. Genel olarak ölçülen tüm parametreler değerlendirildiğinde, etken maddelerin kolona hedeflendirilerek uygulanmasının antioksidan ve antiinflamatuvar parametreler üzerine olumlu etkiler meydana

getirdiği görülmüştür. Sonuç olarak; deneysel K modelinde kolonda meydana gelen histopatolojik, oksidatif ve yangısal hasarlara karşı likopen ve linalool etken maddelerinin geleneksel yolla kullanımına kıyasla hedeflendirilerek kullanılmasının daha etkili olduğu ortaya konulmuştur. Ayrıca K modelinde hedeflendirilmiş likopen uygulanmasının da linalool'den daha başarılı olduğu tespit edilmiştir. Bu bilgiler ışığında, yangısal bağırsak hastalıklarının korunmasında kolona hedeflendirilmiş likopen ve linalool'n etkili kullanım potansiyeline sahip olduğu ve bunun yapılacak yeni çalışmalarla desteklenmesi gerektiği kanaatine varılmıştır.

7. KAYNAKLAR

1. Öztürk Ç. Nesfatin-1'in sıçanda asetik asit ile indüklenmiş kolitte anti-inflamatuvar etkisi ve altta yatan mekanizma. Yüksek Lisans Tezi, İstanbul: Marmara Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 2013.
2. Head KA, Jurenka JS. Inflammatory bowel disease Part 1: ulcerative colitis-pathophysiology and conventional and alternative treatment options. *Altern Med Rev* 2003; 8(3): 247-283.
3. Daneshmand A, Mohammadi H, Rahimian R, et al. Chronic lithium administration ameliorates 2, 4, 6-trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis in rats; potential role for adenosine triphosphate sensitive potassium channels. *J Gastroenterol Hepatol* 2011; 26(7): 1174-1181.
4. Nagib MM, Tadros MG, EL Sayed MI, Khalifa AE. Anti-inflammatory and anti-oxidant activities of olmesartan medoxomil ameliorate experimental colitis in rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 2013; 271(1): 106-113.
5. Anonymous. "Gut Bacteria Fights Inflammatory Bowel Disease" <http://www.ecologyhealthcenter.net/book/export/html/26/> 18.02.2016.
6. Mehta SJ, Silver AR, Lindsay JO. Review article: strategies for the management of chronic unremitting ulcerative colitis. *Aliment Pharmacol Ther* 2013; 38: 77-97.
7. Rogler G. Chronic ulcerative colitis and colorectal cancer. *Cancer Lett* 2014; 345: 235-241.
8. Abdin AA. Targeting sphingosine kinase 1 (SphK1) and apoptosis by colon-specific delivery formula of resveratrol in treatment of experimental ulcerative colitis in rats. *Eur J Pharmacol* 2013; 718(1): 145-153.
9. Conrad K, Roggenbuck D, Laass MW. Diagnosis and classification of ulcerative colitis. *Autoimmun Rev* 2014; 13: 463-466.
10. Cetinkaya A, Bulbuloglu E, Kantarceken B, et al. Effects of L-carnitine on oxidant/antioxidant status in acetic acid-induced colitis. *Dig Dis Sci* 2006; 51(3): 488-494.
11. Bakar B. Resveratrol'ün ratlarda asetik asit ile oluşturulmuş deneysel kolit üzerine olan etkileri. Uzmanlık Tezi, Kahramanmaraş: Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi, Tıp Fakültesi, 2013.
12. Ozgun E, Ozgun GS, Eskiocak S, Yalcin O, Gokmen SS. Effect of L-carnitine on serum paraoxonase, arylesterase and lactonase activities and oxidative status in experimental colitis. *Turk J Biochem* 2013; 38(2): 145-153.
13. Daneshmand A, Rahimian R, Mohammadi H, et al. Protective effects of lithium on acetic acid induced colitis in rats. *Dig Dis Sci* 2009; 54(9): 1901-1907.

14. Al-Rejaie SS, Abuhashish HM, Al-Enazi MM, et al. Protective effect of naringenin on acetic acid-induced ulcerative colitis in rats. *World J Gastroenterol* 2013; 19(34): 5633-5644.
15. Giris M, Depboylu B, Dogru-Abbasoğlu S, et al. Effect of taurine on oxidative stress and apoptosis-related protein expression in trinitrobenzene sulphonic acid-induced colitis. *Clin Exp Immunol* 2008; 152(1): 102-110.
16. Aslani BA, Ghobadi S. Studies on oxidants and antioxidants with a brief glance at their relevance to the immune system. *Life Sci* 2016; 146: 163-173.
17. Altan N, Sepici-Dinçel A, Koca C. Diabetes mellitus ve oksidatif stres. *Türk Biyokimya Dergisi* 2006; 31(2): 51-56.
18. Agarwal A, Aponte-Mellado A, Premkumar BJ, Shaman A, Gupta S. The effects of oxidative stress on female reproduction: a review. *Reprod Biol Endocrinol* 2012; 10: 49-80.
19. Wang Z, Li S, Cao Y, et al. Oxidative stress and carbonyl lesions in ulcerative colitis and associated colorectal cancer. *Oxid Med Cell Longev* 2016; 2016: 9875298.
20. Abdallah DM, Ismael NR. Resveratrol abrogates adhesion molecules and protects against TNBS-induced ulcerative colitis in rats. *Can J Physiol Pharmacol* 2011; 89(11): 811-818.
21. Grotto D, Maria LS, Valentini J, et al. Importance of the lipid peroxidation biomarkers and methodological aspects for malondialdehyde quantification. *Quim Nova* 2009; 32(1): 169-174.
22. Yadav UC, Ramana KV. Regulation of NF- κ B-induced inflammatory signaling by lipid peroxidation-derived aldehydes. *Oxid Med Cell Longev* 2013; 2013: 690545.
23. Birben E, Sahiner UM, Sackesen C, Erzurum S, Kalayci O. Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy Organ J* 2012; 5(1): 9-19.
24. Hegazy SK, El-Bedewy MM. Effect of probiotics on pro-inflammatory cytokines and NF-kappaB activation in ulcerative colitis. *World J Gastroenterol* 2010; 16(33): 4145-4151.
25. Sakthivel KM, Guruvayoorappan C. Amentoflavone inhibits iNOS, COX-2 expression and modulates cytokine profile, NF- κ B signal transduction pathways in rats with ulcerative colitis. *Int Immunopharmacol* 2013; 17(3): 907-916.
26. Roda G, Marocchi M, Sartini A, Roda E. Cytokine networks in ulcerative colitis. *Ulcers* 2011; 2011: 391787.
27. Hur SJ, Kang SH, Jung HS, et al. Review of natural products actions on cytokines in inflammatory bowel disease. *Nutr Res* 2012; 32(11): 801-816.

28. Cho EJ, Shin JS, Noh YS, et al. Anti-inflammatory effects of methanol extract of *Patrinia scabiosaeifolia* in mice with ulcerative colitis. *J Ethnopharmacol* 2011; 136: 428-435.
29. Dionne S, D'Agata DI, Hiscott J, Vanounou T, Seidman EG. Colonic explant production of IL-1 and its receptor antagonist is imbalanced in inflammatory bowel disease (IBD). *Clin Exp Immunol* 1998; 112: 435-442.
30. Zhang J, Dou W, Zhang E, et al. Paeoniflorin abrogates DSS-induced colitis via a TLR4-dependent pathway. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2014; 306: 27-36.
31. Dou W, Zhang J, Ren G, et al. Mangiferin attenuates the symptoms of dextran sulfate sodium-induced colitis in mice via NF- κ B and MAPK signaling inactivation. *Int Immunopharmacol* 2014; 23(1): 170-178.
32. Roy PK, Rashid F, Bragg J, Ibdah JA. Role of the JNK signal transduction pathway in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 200-202.
33. Goyal N, Rana A, Ahlawat A, Bijjem KR, Kumar P. Animal models of inflammatory bowel disease: a review. *Inflammopharmacology* 2014; 22(4): 219-233.
34. Randhawa PK, Singh K, Singh N, Jaggi AS. A review on chemical-induced inflammatory bowel disease models in rodents. *Korean J Physiol Pharmacol* 2014; 18(4): 279-288.
35. Qin HY, Wu JC, Tong XD, et al. Systematic review of animal models of post-infectious/post-inflammatory irritable bowel syndrome. *J Gastroenterol* 2011; 46(2): 164-174.
36. MacPherson BR, Pfeiffer CJ. Experimental production of diffuse colitis in rats. *Digestion* 1978; 17(2): 135-150.
37. Tahan G, Aytac E, Aytekin H, et al. Vitamin E has a dual effect of anti-inflammatory and antioxidant activities in acetic acid-induced ulcerative colitis in rats. *Can J Surg* 2011; 54(5): 333-338.
38. Low D, Nguyen DD, Mizoguchi E. Animal models of ulcerative colitis and their application in drug research. *Drug Des Devel Ther* 2013; 7: 1341-1357.
39. Jurjus AR, Khoury NN, Reimund JM. Animal models of inflammatory bowel disease. *J Pharmacol Toxicol Methods* 2004; 50(2): 81-92.
40. Pawar AT, Anap RM, Ghodasara JV, Kuchekar BS. Protective effect of hydroalcoholic root extract of *rubia cordifolia* in indomethacin-induced enterocolitis in rats. *Indian J Pharm Sci* 2011; 73(2): 250-253.

41. Thippeswamy BS, Mahendran S, Biradar MI, et al. Protective effect of embelin against acetic acid induced ulcerative colitis in rats. *Eur J Pharmacol* 2011; 654(1): 100-105.
42. Işık F. Trinitrobenzen sülfonik asit (TNBS) ile oluşturulan deneysel kolitte çörek otu (*nigella sativa*) yağının koruyucu etkisinin incelenmesi. Yüksek Lisans Tezi, İstanbul: Marmara Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 2009.
43. Gautam MK, Goel S, Ghatule RR, et al. Curative effect of terminalia chebula extract on acetic acid-induced experimental colitis: Role of antioxidants, free radicals and acute inflammatory marker. *Inflammopharmacology* 2013; 21: 377-383.
44. Gupta S, Jawanda MK, Arora V, Mehta N, Yadav V. Role of lycopene in preventing oral diseases as a nonsurgical aid of treatment. *Int J Prev Med* 2015; 6: 70-75.
45. Rodrigo-Baños M, Garbayo I, Vélchez C, Bonete MJ, Martínez-Espinosa RM. Carotenoids from Haloarchaea and their potential in biotechnology. *Mar Drugs* 2015; 13(9): 5508-5532.
46. Islamian JP, Mehrli H. Lycopene as a carotenoid provides radioprotectant and antioxidant effects by quenching radiation-induced free radical singlet oxygen: an overview. *Cell J* 2015; 16(4): 386-391.
47. Seren S, Lieberman R, Bayraktar UD, et al. Lycopene in cancer prevention and treatment. *Am J Ther* 2008; 15(1): 66-81.
48. Jain CK, Agarwal S, Rao AV. The effect of dietary lycopene on bioavailability, tissue distribution, in vivo antioxidant properties and colonic preneoplasia in rats. *Nutrition Research* 1999; 19(9): 1383-1391.
49. Boyacioglu M, Kum C, Sekkin S, et al. The effects of lycopene on DNA damage and oxidative stress on indomethacin-induced gastric ulcer in rats. *Clin Nutr* 2016; 35(2): 428-435.
50. Takeshima M, Ono M, Higuchi T, et al. Anti-proliferative and apoptosis-inducing activity of lycopene against three subtypes of human breast cancer cell lines. *Cancer Sci* 2014; 105(3): 252-257.
51. Boeira SP, Funck VR, Borges-Filho C, et al. Lycopene protects against acute zearalenone-induced oxidative, endocrine, inflammatory and reproductive damages in male mice. *Chem Biol Interact* 2015; 230: 50-57.
52. Celik L, Kutlu HR, Sahan Z, et al. Yumurta tavukları rasyonlarına ilave edilen likopen'in yumurtanın kolesterol seviyesi ve yağ asitleri kompozisyonuna etkileri. *Hayvansal Üretim* 2012; 53(2): 1-7.

53. Gajowik A, Dobrzyńska MM. Lycopene-antioxidant with radioprotective and anticancer properties. A review. *Rocz Panstw Zakł Hig* 2014; 65(4): 263-271.
54. Clinton SK. Lycopene: Chemistry, biology, and implications for human health and disease. *Nutr Rev* 1998; 56: 35-51.
55. Agarwal S, Rao AV. Carotenoids and chronic diseases. *Drug Metab Drug Interact* 2000; 17(1-4): 189-210.
56. Viuda-Martos M, Sanchez-Zapata E, Sayas-Barberá E, et al. Tomato and tomato byproducts. Human health benefits of lycopene and its application to meat products: A review. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2014; 54(8): 1032-1049.
57. Wang XD. Lycopene metabolism and its biological significance. *Am J Clin Nutr* 2012; 96(5): 1214-1222.
58. Kömüroğlu AF. Diyabetik ratlarda Neopterin, CRP, Myeloperoksidaz ve GGT üzerine likopen uygulamasının etkisi. Doktora Tezi, Van: Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 2013.
59. Boileau AC, Merchen NR, Wasson K, Atkinson CA, Erdman JW. Cis-lycopene is more bioavailable than translycopene in vitro and in vivo in lymph-cannulated ferrets. *J Nut* 1999; 129(6): 1176-1181.
60. Shi J, Le Maguer M. Lycopene in tomatoes: chemical and physical properties affected by food processing. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2000; 40(1): 1-42.
61. Ford NA, Erdman JW. Are lycopene metabolites metabolically active?. *Acta Biochim Pol* 2012; 59(1): 1-4.
62. Renju GL, Muraleedhara Kurup G, Saritha Kumari CH. Anti-inflammatory activity of lycopene isolated from *Chlorella marina* on type II collagen induced arthritis in Sprague Dawley rats. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 2013; 35(2): 282-291.
63. Jiang H, Wang Z, Ma Y, et al. Effects of dietary lycopene supplementation on plasma lipid profile, lipid peroxidation and antioxidant defense system in Feedlot Bamei Lamb. *Asian-Australas J Anim Sci* 2015; 28(7): 958-965.
64. Rao AV, Ray MR, Rao LG. Lycopene. *Adv Food Nutr Res* 2006; 51: 99-164.
65. Okajima E, Tsutsumi M, Ozono S, et al. Inhibitory effect of tomato juice on rat urinary bladder carcinogenesis after N-butyl-N-(4-hydroxybutyl) nitrosamine initiation. *Jpn J Cancer Res* 1998; 89: 22-26.

66. Altuner Y, Sahin IK, Ozkorkmaz EG, et al. Evaluation of blood and biochemical parameters in experimental colitis treated with lycopene. *Rom J Biochem* 2011; 48(1): 13-21.
67. Tuzcu M, Aslan A, Tuzcu Z, et al. Tomato powder impedes the development of azoxymethane-induced colorectal cancer in rats through suppression of COX-2 expression via NF- κ B and regulating Nrf2/HO-1 pathway. *Mol Nutr Food Res* 2012; 56(9): 1477-1481.
68. Assar EA, Vidalle MC, Chopra M, Hafizi S. Lycopene acts through inhibition of I κ B kinase to suppress NF- κ B signaling in human prostate and breast cancer cells. *Tumor Biol* 2016: 1-11.
69. Mohamadin AM, Elberry AA, Mariee AD, Morsy GM, Al-Abbasi FA. Lycopene attenuates oxidative stress and heart lysosomal damage in isoproterenol induced cardiotoxicity in rats: A biochemical study. *Pathophysiology* 2012; 19(2): 121-130.
70. Waly MI, Al-Rawahi AS, Al Riyami M, et al. Amelioration of azoxymethane induced-carcinogenesis by reducing oxidative stress in rat colon by natural extracts. *BMC Complement Altern Med* 2014; 14: 60-70.
71. Dias MC, Vieirals NF, Gomes MI, et al. Effects of lycopene, synbiotic and their association on early biomarkers of rat colon carcinogenesis. *Food Chem Toxicol* 2010; 48(3): 772-780.
72. Tang FY, Shih CJ, Cheng LH, Ho HJ, Chen HJ. Lycopene inhibits growth of human colon cancer cells via suppression of the Akt signaling pathway. *Mol Nutr Food Res* 2008; 52: 646-654.
73. Aslan A. Ratlarda azoksimetan uygulanarak oluşturulan kolorektal kanserde likopen'in siklooksijenaz-2 (COX-2), kaspaz-3, kaspaz-9, bax, bcl-2, p53 proteinlerinin ekspresyonu ve DNA hasarı üzerine etkisi. Doktora Tezi, Elazığ: Fırat Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 2011.
74. Edward TH. CRP as a mediator of disease. *Circulation* 2004; 109(II): 11-14.
75. Vermeire S, Van Assche G, Rutgeerts P. C-reactive protein as a marker for inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 2004; 10(5): 661-665.
76. Kim JY, Paik JK, Kim OY, et al. Effects of lycopene supplementation on oxidative stress and markers of endothelial function in healthy men. *Atherosclerosis* 2011; 215(1): 189-195.
77. Reifen R, Nur T, Matas Z, Halpern Z. Lycopene supplementation attenuates the inflammatory status of colitis in a rat model. *Int J Vitam Nutr Res* 2001; 71(6): 347-351.
78. Santos MRV, Moreira FV, Fraga BP, et al. Cardiovascular effects of monoterpenes: A review. *Rev Bras Farmacogn Braz J Pharmacogn* 2011; 21(4): 764-771.
79. Chern LY, Shukor MY, Muse R. Monoterpenes in plants- a mini review. *Asian Journal of Plant Biology* 2013; 1(1): 15-19.

80. Guimarães AG, Quintans JS, Quintans LJ. Monoterpenes with analgesic activity--a systematic review. *Phytother Res* 2013; 27(1): 1-15.
81. Dayangac A, Ozkaya A, Bahsi M ve ark. Linalool sıçan karaciğer ve böbreklerindeki bazı doymamış yağ asit değerlerini FeCl₂ hasarından korumaktadır. *Düzce Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dergisi* 2011; 1(1): 12-17.
82. Aprotosoiaie AC, Hăncianu M, Costache II, Miron A. Linalool: A review on a key odorant molecule with valuable biological properties. *Flavour Fragr J* 2014; 29: 193-219.
83. Jana S, Patra K, Sarkar S, et al. Antitumorigenic potential of linalool is accompanied by modulation of oxidative stress: An in vivo study in sarcoma-180 solid tumor model. *Nutr Cancer* 2014; 66(5): 835-848.
84. Celik S, Ozkaya A. Effects of intraperitoneally administered lipoic acid, vitamin E, and linalool on the level of total lipid and fatty acids in guinea pig brain with oxidative stress induced by H₂O₂. *J Biochem Mol Biol* 2002; 35(6): 547-552.
85. Huo M, Cui X, Xue J, et al. Anti-inflammatory effects of linalool in RAW 264.7 macrophages and lipopolysaccharide-induced lung injury model. *J Surg Res* 2013; 180(1): 47-54.
86. Herman A, Tambor K, Herman A. Linalool affects the antimicrobial efficacy of essential oils. *Curr Microbiol* 2016; 72: 165-172.
87. Letizia CS, Cocchiara J, Lalko J, Api AM. Fragrance material review on linalool. *Food Chem Toxicol* 2003; 41(7): 943-964.
88. Chang MY, Shieh DE, Chen CC, Yeh CS, Dong HP. Linalool induces cell cycle arrest and apoptosis in leukemia cells and cervical cancer cells through CDKIs. *Int J Mol Sci* 2015; 16: 28169-28179.
89. Chadha A, Madyastha KM. Metabolism of geraniol and linalool in the rat and effects on liver and lung microsomal enzymes. *Xenobiotica* 1984; 14: 365-374.
90. Mehri S, Meshki MA, Hosseinzadeh H. Linalool as a neuroprotective agent against acrylamide-induced neurotoxicity in wistar rats. *Drug Chem Toxicol* 2015; 38(2): 162-166.
91. Batista PA, Werner MFP, Oliveira EC, et al. Evidence for the involvement of ionotropic glutamatergic receptors on the antinociceptive effect of (-)-linalool in mice. *Neurosci Lett* 2008; 440(3): 299-303.
92. Peana AT, D'Aquila PS, Panin F, et al. Anti-inflammatory activity of linalool and linalyl acetate constituents of essential oils. *Phytomedicine* 2002; 9(8): 721-726.

93. Tanyildizi S, Servi K, Cifci O. Protective effects of d-limonene and linalool on female rats intoxicated with 7,12 dimethylbenz(a)anthracene (DMBA). *Revue Méd Vét* 2009; 160(5): 221-225.
94. Li J, Zhang X, Huang H. Protective effect of linalool against lipopolysaccharide/D-galactosamine-induced liver injury in mice. *Int Immunopharmacol* 2014; 23(2): 523-529.
95. Ravizza R, Gariboldi MB, Molteni R, Monti E. Linalool, a plant-derived monoterpene alcohol, reverses doxorubicin resistance in human breast adenocarcinoma cells. *Oncol Rep* 2008; 20(3): 625-630.
96. Kladniew BR, Polo M, Villegas SM, et al. Synergistic antiproliferative and anticholesterogenic effects of linalool, 1,8-cineole, and simvastatin on human cell lines. *Chem Biol Interact* 2014; 214: 57-68.
97. Kumar De A, Datta S, Mukherjee A. Application of an amine functionalized biopolymer in the colonic delivery of glycyrrhizin: A design and in vivo efficacy study. *Sci Pharm* 2013; 81(4): 1101-1122.
98. Kshirsagar SJ, Bhalekar MR, Umap RR. Design, development and in vitro-in vivo study of a colon-specific fast disintegrating tablet. *Pharm Dev Technol* 2011; 16(5): 449-456.
99. Rani K, Paliwal S. A review on targeted drug delivery: Its entire focus on advanced therapeutics and diagnostics. *Sch J App Med Sci* 2014; 2(1C): 328-331.
100. Kosaraju SL. Colon targeted delivery systems: Review of polysaccharides for encapsulation and delivery. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2005; 45(4): 251-258.
101. Paharia A, Yadav AK, Rai G, et al. Eudragit-coated pectin microspheres of 5-fluorouracil for colon targeting. *AAPS PharmSciTech* 2007; 8(1): 12.
102. Philip AK, Philip B. Colon targeted drug delivery systems: A review on primary and novel approaches. *Oman Med J* 2010; 25(2): 79-87.
103. Aiping Z, Tian C, Lanhua Y, Hao W, Ping L. Synthesis and characterization of N-succinyl-chitosan and its self-assembly of nanospheres. *Carbohydr Polym* 2006; 66: 274-279.
104. Park JH, Saravanakumar G, Kim K, Kwon IC. Targeted delivery of low molecular drugs using chitosan and its derivatives. *Adv Drug Deliv Rev* 2010; 62(1): 28-41.
105. Shukla RK, Tiwari A. Carbohydrate polymers: Applications and recent advances in delivering drugs to the colon. *Carbohydr Polym* 2012; 88: 399-416.
106. Rekha MR, Sharma CP. Synthesis and evaluation of lauryl succinyl chitosan particles towards oral insulin delivery and absorption. *J Control Release* 2009; 135(2): 144-151.

107. Riva R, Ragelle H, Rieux A, et al. Chitosan and chitosan derivatives in drug delivery and tissue engineering. *Adv Polym Sci* 2011; 244: 19-44.
108. Mukhopadhyay P, Sarkar K, Bhattacharya S, et al. pH sensitive N-succinyl chitosan grafted polyacrylamide hydrogel for oral insulin delivery. *Carbohydr Polym* 2014; 112: 627-637.
109. Xiangyang X, Ling L, Jianping Z, et al. Preparation and characterization of N-succinyl-N'-octyl chitosan micelles as doxorubicin carriers for effective anti-tumor activity. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2007; 55(2): 222-228.
110. Kato Y, Onishi H, Machida Y. N-succinyl-chitosan as a drug carrier: water-insoluble and water-soluble conjugates. *Biomaterials* 2004; 25(5): 907-915.
111. Atessahin A, Ceribas AO, Yilmaz S. Lycopene, a carotenoid, attenuates cyclosporine-induced renal dysfunction and oxidative stress in rats. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2007; 100(6): 372-376.
112. Prabhu V, Guruvayoorappan C. Protective effect of marine mangrove *Rhizophora apiculata* on acetic acid induced experimental colitis by regulating anti-oxidant enzymes, inflammatory mediators and nuclear factor-kappa B subunits. *Int Immunopharmacol* 2014; 18(1): 124-134.
113. Mura C, Manconi M, Valenti D, et al. In vitro study of N-succinyl chitosan for targeted delivery of 5-aminosalicylic acid to colon. *Carbohydrate Polymers* 2011; 85(3): 578-583.
114. Mura C, Nácher A, Merino V, et al. N-Succinyl-chitosan systems for 5-aminosalicylic acid colon delivery: in vivo study with TNBS-induced colitis model in rats. *Int J Pharm* 2011; 416(1): 145-154.
115. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 1979; 95(2): 351-358.
116. Ellman G. Tissue sulphhydryl groups. *Arch Biochem Biophys* 1959; 82: 70-77.
117. Beutler E. Red cell metabolism. In: *A manual of biochemical methods*. Newyork: Grune Strottan 1975 pg: 67-69.
118. Aebi H. Catalase in vitro assay methods. *Methods Enzymol* 1984; 105: 121-126.
119. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with pholin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193: 265-275.
120. Luna LG. *Manuel of histologic staining methods of Armed Forces Institute of Pathology*. McGraw-Hill Book Co, New York, 1968.
121. Ackerman Z, Karmeli F, Cohen P, Rachmilewitz D. Experimental colitis in rats with portal hypertension and liver disease. *Inflamm Bowel Dis* 2003; 9: 18-24.

122. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227(5259): 680-685.
123. Aslan A, Can MI. Milk thistle impedes the development of carbontetrachloride-induced liver damage in rats through suppression of bcl-2 and regulating caspase pathway, *Life Sciences* 2014; 117: 13-18.
124. Korkina L, Suprun M, Petrova A, et al. The protective and healing effects of a natural antioxidant formulation based on ubiquinol and aloe vera against dextran sulfate-induced ulcerative colitis in rats. *Biofactors* 2003; 18(1-4): 255-264.
125. Aleisa AM, Al-Rejaie SS, Abuhashish HM, et al. Pretreatment of *Gymnema sylvestre* revealed the protection against acetic acid-induced ulcerative colitis in rats. *BMC Complement Altern Med* 2014; 14: 49-60.
126. Aksit D, Aksit H, Yildiz O, et al. Protective effect of 2-aminoethyl diphenylborinate in rat colitis model induced by acetic acid. *Int J Clin Exp Med* 2016; 9(3): 6219-6227.
127. Amirshahrokhi K, Bohlooli S, Chinifroush MM. The effect of methylsulfonylmethane on the experimental colitis in the rat. *Toxicol Appl Pharmacol* 2011; 253(3): 197-202.
128. Yan H, Wang H, Zhang X, Li X, Yu J. Ascorbic acid ameliorates oxidative stress and inflammation in dextran sulfate sodium-induced ulcerative colitis in mice. *Int J Clin Exp Med* 2015; 8(11): 20245-20253.
129. Zhang H, Deng A, Zhang Z, et al. The protective effect of epicatechin on experimental ulcerative colitis in mice is mediated by increasing antioxidation and by the inhibition of NF- κ B pathway. *Pharmacol Rep* 2016; 68(3): 514-520.
130. Gugulothu D, Kulkarni A, Patravale V, Dandekar P. pH-sensitive nanoparticles of curcumin-celecoxib combination: Evaluating drug synergy in ulcerative colitis model. *J Pharm Sci* 2014; 103(2): 687-696.
131. Li Q, Zhai W, Jiang Q, et al. Curcumin-piperine mixtures in self-microemulsifying drug delivery system for ulcerative colitis therapy. *Int J Pharm* 2015; 490(1-2): 22-31.
132. Fatani AJ, Al-Hosaini KA, Ahmed MM, et al. Carvedilol attenuates inflammatory biomarkers and oxidative stress in a rat model of ulcerative colitis. *Drug Dev Res* 2015; 76(4): 204-214.
133. Farombi EO, Adedara IA, Ajayi BO, Ayepola OR, Egbeme EE. Kolaviron, a natural antioxidant and anti-inflammatory phytochemical prevents dextran sulphate sodium-induced colitis in rats. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2013; 113(1): 49-55.

134. Yucel Y, Tabur S, Gozeneli O, et al. The effects of lycopene on intestinal injury due to methotrexate in rats. *Redox Rep* 2016; 21(3): 113-118.
135. Ali H, Weigmann B, Neurath MF, et al. Budesonide loaded nanoparticles with pH-sensitive coating for improved mucosal targeting in mouse models of inflammatory bowel diseases. *J Control Release* 2014; 183: 167-177.
136. Wang D, Dubois RN. The role of COX-2 in intestinal inflammation and colorectal cancer. *Oncogene* 2010; 29(6): 781-788.
137. Sánchez-Fidalgo S, Villegas I, Rosillo MÁ, Aparicio-Soto M, de la Lastra CA. Dietary squalene supplementation improves DSS-induced acute colitis by downregulating p38 MAPK and NFκB signaling pathways. *Mol Nutr Food Res* 2015; 59(2): 284-292.
138. De Roos B, Duthie GG. Role of dietary pro-oxidants in the maintenance of health and resilience to oxidative stress. *Mol Nutr Food Res* 2015; 59(7): 1229-1248.
139. Wang KP, Zhang C, Zhang SG, et al. 3-(3-pyridylmethylidene)-2-indolinone reduces the severity of colonic injury in a murine model of experimental colitis. *Oxid Med Cell Longev* 2015; 2015: 959253.
140. Lee Y, Kim W, Hong S, et al. Colon-targeted celecoxib ameliorates TNBS-induced rat colitis: a potential pharmacologic mechanism and therapeutic advantages. *Eur J Pharmacol* 2014; 726: 49-56.

8. ÖZGEÇMİŞ

1987 yılında Adana’da doğdum. İlk, orta ve lise eğitimimi Adana’da tamamladım. 2006 yılında girdiğim Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesini 2010 yılında tamamladım. 2010 yılında Biyoteknoloji Yüksek Lisansı için girdiğim İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü’nde 1 yıl hazırlık eğitimi gördüm. 2011 yılında Mustafa Kemal Üniversitesi Veteriner Fakültesi Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalına Araştırma Görevlisi olarak atandım. 2012 yılında doktora eğitimi almak üzere Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı’na 35. madde ile Araştırma Görevlisi olarak görevlendirildim. Doktora tez aşaması sürecinde 2014 yılı Eylül ayında tekrar Mustafa Kemal Üniversitesi Veteriner Fakültesi Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı’na Araştırma Görevlisi olarak döndüm ve halen aynı Anabilim Dalı’nda görevime devam etmekteyim.