



T.C.
BURDUR MEHMET AKİF ERSOY ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**FARELERDE KRONİK KOLİTİS MODELİNDE SİVELESTAT'IN
DNA HASARI, OKSİDATİF STRES VE YANGISAL YANIT
ÜZERİNE ETKİLERİ**

Uzm. Vet. Hek. Leyla Elif Özgü AYÖZGER

DOKTORA TEZİ

VETERİNER PATOLOJİ ANABİLİM DALI

Danışman

**Doç. Dr. Volkan İPEK
Doç. Dr. Burcu Menekşe BALKAN**

BURDUR-2025

T.C.
BURDUR MEHMET AKİF ERSOY ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**FARELERDE KRONİK KOLİTİS MODELİNDE SİVELESTAT'IN
DNA HASARI, OKSİDATİF STRES VE YANGISAL YANIT
ÜZERİNE ETKİLERİ**

Uzm. Vet. Hek. Leyla Elif Özgü AYÖZGER

DOKTORA TEZİ

VETERİNER PATOLOJİ ANABİLİM DALI

Danışmanlar

**Doç. Dr. Volkan İPEK
Doç. Dr. Burcu Menekşe BALKAN**

Bu Araştırma “Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü” tarafından “0950-DR-23” numaralı proje ve “TÜBİTAK” tarafından “123O526” numaralı 1001 proje ile desteklenmiştir.

BURDUR-2025

KABUL VE ONAY
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜ MÜDÜRLÜĞÜNE

Leyla Elif Özgü AYÖZGER tarafından **Doç. Dr. Volkan İPEK** ve **Doç. Dr. Burcu Menekşe BALKAN** yönetiminde hazırlanan “*Farelerde Kronik Kolitis Modelinde Sivelestat’ın DNA Hasarı, Oksidatif Stres ve Yangısal Yanıt Üzerine Etkileri*” başlıklı tez çalışması jüri üyeleri olarak tarafımızdan okunmuş; kapsamı ve niteliği açısından Patoloji Anabilim Dalında **Doktora Tezi** olarak oy birliği / oy çokluğu ile kabul edilmiştir.

Tez Savunma Sınavı Tarihi

..../..../.....

(imza)
Unvanı Adı ve Soyadı
Kurumu
Başkan

(imza)
Unvanı Adı ve Soyadı
Kurumu
Jüri

(imza)
Unvanı Adı ve Soyadı
Kurumu
Jüri

(imza)
Unvanı Adı ve Soyadı
Kurumu
Jüri
(5 üyeli jürilerde)

(imza)
Unvanı Adı ve Soyadı
Kurumu
Jüri
(5 üyeli jürilerde)

ONAY

Bu tez, Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Lisans Üstü Eğitim-Öğretim Yönetmeliği’nin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu ... / ... / Tarih ve sayılı kararı ile kabul edilmiştir.

(imza)
Unvanı, Adı ve Soyadı
Müdür

TEŞEKKÜR

Tez çalışmamda ve doktora eğitimim sürecinde bana yol gösteren, rehber olan, bilgilerini aktaran, her zaman destek olan, öğrencisi olmaktan her zaman gurur duyacağım danışman hocam Doç. Dr. Volkan İPEK, desteklerini ve anne elini aramızda kilometreler olsa dahi yakınımdaymış gibi hissettiğim değerli hocam Doç. Dr. Burcu Menekşe BALKAN ve aynı şekilde beni kendi öğrencilerinden ayırt etmeyen, her zaman desteğini hissettiğim değerli hocam Veteriner Patoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Özlem ÖZMEN hocalarıma en kalbi teşekkürlerimi sunarım. Doktora eğitimim sürecinde her zaman bana destek olan, bilgi ve tecrübelerini hep paylaşan, kendisini tanıdığım için her daim mutlu olacağım canım dostum, ahiretliğim ve kıymetli meslektaşım Dr. Adem MİLLETSEVER'e çok teşekkür ederim. Doktora eğitimim süresince akademik ve manevi desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen, bana öğrettiği her bilgi ve deneyim için teşekkür kelimesinin yetersiz kalacağı kıymetlim Uzm. Biyolog Dilnur İLERİ'ye her zaman minnettar olacağım. Deney sürecinde bana yardımcı olan Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Deney Hayvanları Üretim ve Deneysel Araştırma Merkezi sorumlu veteriner hekimi Dr. Simge GARLI'ya, danışmanlarımızı aratmayan desteği, tatlı dostluğu, her zor anımda bir telefon kadar yakınlığım Vet. Hek. Doğuş ÖZALKAN'a deney sürecinde yardımları için teşekkür ederim. Yaşadığım her türlü sıkıntıda bana yardımcı olan, tüm lisansüstü öğrencilerine enstitüden bir ilgili gibi değil hep bir ağabey olan Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü sekreteri Sn. Hüseyin NARİN'e, maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen Sn. Vural BAKAN, Dr. Ali İhsan KARAÇOLAK, Dr. Öğr. Üyesi Seda YAKUT, Vet. Hek. Şeyma Nur ŞAHİN, Vet. Hek. Hilal AKI, Doç. Dr. Duygu MUTLUAY KÖSE, Dr. Öğr. Üyesi Erdi ŞEN, Vet. Hek. Muhammed Ali YAMAÇ, Dila TAŞBAŞ, Hacer ablaya, Ülkü teyzeye, Mahmut, Şerafettin, Misket, Chia, Maya, Biber ve Nuri'ye, yer kalmadığından adını buraya değil kalbime yazdığım diğer tüm dostlarıma çok teşekkür ederim. Evrensel favorilerim annem Fatma ÇERİ, anneannem Ayşe OKUMUŞ ve teyzem Hülya Benek KUYUCU'ya, hislerimi yazarak anlatmamın mümkün olmaması sebebiyle ancak sonsuz kez teşekkür edebilirim.

ETİK BEYAN

“Farelerde Kronik Kolitis Modelinde Sivelestat’ın DNA Hasarı, Oksidatif Stres ve Yangısal Yanıt Üzerine Etkileri” başlıklı tez çalışmamdaki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, kullandığım verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı, yararlandığım kaynaklara bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu, tezimin kaynak gösterilen durumlar dışında özgün olduğunu, Doç. Dr. Volkan İPEK ve Doç. Dr. Burcu Menekşe BALKAN danışmanlığında Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kılavuzuna göre yazıldığını beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı: Leyla Elif Özgü AYÖZGER

Tarih:

İmza:

İÇİNDEKİLER

İÇ KAPAK SAYFASI	ii
KABUL ve ONAY SAYFASI	iii
TEŞEKKÜR	iv
ETİK BEYAN	v
İÇİNDEKİLER	vi
ŞEKİLLER	viii
TABLolar	xi
SİMGELER ve KISALTMALAR	xii
TÜRKÇE ÖZET	xiv
ABSTRACT	xv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Yangısal Bağırsak Hastalığı	3
2.1.1. Ülseratif Kolitis	4
2.1.2. Kolitis ve Kolorektal Kanseri İlişkisi	7
2.1.3. Ülseratif Kolitisin Yangısal Kompozisyonu ve Nötrofillerin Rolü	8
2.1.4. Nötrofil Elastaz (NE) ve Sivelestat	9
2.1.5. Reaktif Oksijen Türleri	10
2.1.6. DNA Hasarı ve DNA Hasarı ile Oksidatif Stresin İlişkisi	12
2.1.7. Kimyasal Olarak İndüklenmiş Ülseratif Kolitis Hayvan Modelleri	14
3. GEREÇ ve YÖNTEM	16
3.1. Deney Modeli	16
3.2. Patolojik Analizler	21
3.2.1. Hematoksilen & Eozin Boyaması	21
3.2.2. Histopatolojik Analizler	19
3.2.3. İmmunohistokimyasal Boyamalar	22
3.2.4. İmmunohistokimyasal Ekspresyonların Değerlendirilmesi	23
3.3. Biyokimyasal Analizler	24
3.4. İstatistiksel Değerlendirme	24
4. BULGULAR	26
4.1. Canlı Ağırlık Analizi	26
4.2. Histopatolojik Bulgular	27
4.3. İmmunohistokimyasal Bulgular	38
4.3.1. 4-Hidroksinonenal (4HNE) Ekspresyonu	38
4.3.2. NRF2 Ekspresyonu	40
4.3.3. PARP1 Ekspresyonu	42
4.3.4. H2AX Ekspresyonu	43
4.3.5. γ H2AX Ekspresyonu	45
4.3.6. 8OHdG Ekspresyonu	46
4.3.7. TNF α Ekspresyonu	47
4.3.8. COX-2 Ekspresyonu	49

4.3.9. LY6G Ekspresyonu	51
4.3.10 ELA2 (NE) Ekspresyonu	53
4.4. İmmunohistokimyasal Bulguların Korelasyonları	55
4.4.1 Kolitis Grubu IHC Parametlerinin Yalnız Değerlendirilmesi	55
4.4.1.1 Distal Kolon (Dhskor) Bulguları	55
4.4.1.2 Mid Kolon (Mhskor) Bulguları	56
4.4.1.3 Proksimal Kolon (Phskor) Bulguları	57
4.4.1.4 Total Ortalama H Skoru (Thskor) Bulgusu	58
4.4.2 Sivelestat Grubunun Yalnız Değerlendirilmesi	59
4.4.2.1 Distal Kolon (Dhskor) Bulguları	59
4.4.2.2 Mid Kolon (Mhskor) Bulguları	60
4.4.2.3 Proksimal Kolon (Phskor) Bulguları	61
4.4.2.4 Total Ortalama H Skoru (Thskor) Bulgusu	62
4.5. Biyokimyasal Bulgular	63
5. TARTIŞMA	67
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	76
KAYNAKLAR	77
ÖZGEÇMİŞ	87

ŞEKİLLER

Şekil 3.1.	Deneyde uygulanan modelin şematik olarak gösterimi	16
Şekil 3.2.	Deney hayvanlarından alınan kolon dokularının makroskopik görünümü	18
Şekil.3.3.	Swiss Rolling tekniğinin uygulanması. A ve B kolon lümeninin yıkanması, C Kolon lümeninin longitudinal olarak açılması, D lümenin roll için düzgün biçimde yayılması, E Swiss Rolling, F dokunun kasete aktarılması	20
Şekil 4.1.	Hayvanların canlı ağırlık değişimleri	26
Şekil 4.2.	Kontrol grubuna ait kolon dokusu. Alanda daha çok distal ve mid kolon segmentleri görülüyor. Kript boyları, goblet hücreleri ve mukoza kalınlığı normal görünümde. H&E, X4, 200µm Bar.	27
Şekil 4.3.	Kontrol grubuna ait kolonun distal segmenti. Az sayıda yangı hücresi mevcut. H&E, X20, 50µm Bar.	28
Şekil 4.4.	Kontrol grubunda mid segment kolon dokusu. Sağlam olan epitel, goblet hücreleri ve Liberkühn kriptleri görülüyor. Az miktarda yangı hücresi mevcut. H&E, X20, 50µm Bar	29
Şekil 4.5.	Kontrol grubu proksimal bölgeye ait kolon dokusu. Tüm katmanların görünümü normal histolojik yapıya benzerlik gösteriyor. H&E, X20, 50µm Bar.	29
Şekil 4.6.	Kolitis grubuna ait bir farenin kolonu. Distal bölgede geniş ülserasyonlar (oklar), Liberkühn kriptlerinin hemen hemen tamamı gözden silinmiş, mukoza yangı nedeniyle kalınlaşmış (yıldız), infiltrasyon serozaya kadar yayılmış (ok başı), H&E, X4, 200µm Bar.	30
Şekil 4.7.	Kolitis grubuna ait kolon dokusunda ülserasyon bölgesi. Mukozada epitel hasarı ve kriptlerin yokluğu. Propria mukoza ve ülserasyonun olduğu alanın lümeninde çok yoğun yangısal hücre infiltrasyonları, hiperemik damarlar. H&E, X10, 100µm Bar.	30
Şekil 4.8.	Kolitis grubunda distal kolonda yangısal infiltrasyon. İnfiltrasyon propriadan serozaya kadar yayılmış halde, kas liflerinin arasında yangı hücreleri; tek tük kalan liberkühn kriptleri ve goblet hücreleri görülüyor. H&E, X10, 100µm Bar.	31
Şekil 4.9.	Kolitis grubunda mid kolon dokusunda hücre infiltrasyonu. Goblet hücreleri ve kriptlerin sayısı azalmış. H&E, X20, 50µm Bar.	32
Şekil 4.10.	Şekil 4.10. Kolitis grubuna ait kolon dokusunda propriada yangısal hücre infiltrasyonu. Nötrofil, lenfosit ve plazma hücrelerinden oluşan yangısal hücreler, hiperemik damar (yıldızlar). H&E, X40, 20µm Bar.	32
Şekil 4.11.	Kolitisli mid kolon. Kript çevresinde (oklar), propriada (ince ok) ve muskuler katmanda (ok başı) yangısal hücre infiltrasyonu, goblet hücre sayısında belirgin azalma. H&E, X20, 50µm Bar.	33
Şekil 4.12.	Kolitisli proksimal kolonda yangının görünümü ve damarlarda hiperemi. H&E, X20, 50µm Bar.	33

Şekil 4.13.	Sivelestat grubuna ait bir kolonda distal segmentte ülserasyon (oklar), yangısal infiltrasyon (yıldız) ve mid kolon serozasında ödemle birlikte hiperemik damarlar (ok başı). H&E, X20, 50µm Bar.	34
Şekil 4.14.	Sivelestat grubu mid kolon dokusunda nötrofil, lenfosit, plazma hücrelerini içeren yangısal hücre infiltrasyonu, goblet hücre sayısında azalma ve hiperemik damar. H&E, X40, 20µm Bar.	35
Şekil 4.15.	Sivelestat grubu mid kolon dokusunun görünümü. Propriadan muskuler katmana kadar yayılan yangısal infiltrasyon, goblet hücre sayısında azalma, yer yer kript sayısında azalma. Mukoza kalınlaşmış. H&E, X10, 100µm Bar.	35
Şekil 4.16.	Sivelestat grubu proksimal kolon görünümü. Mukozada yangısal infiltrasyon ve hiperemik damarlar. H&E, X10, 100µm Bar.	36
Şekil 4.17.	Farelerin kolon dokularının segmentlerine göre ve total olarak yapılan histopatolojik değerlendirmesi ve istatistik sonuçları (*: P <0,05; **: P <0,01; ***: P <0,001)	37
Şekil 4.18.	Farelerin kolon dokularının histopatolojik değerlendirmesi ve gruplar arasındaki istatistik sonuçları (*: p <0,05; ***: p <0,001)	38
Şekil 4.19.	4HNE immunreaksiyonları. IHC, DAB Kromojen, X20, 50µm Bar.	39
Şekil 4.20.	Tüm kolon segmentlerindeki ve total 4HNE ekspresyonlarının istatistiksel grafikleri (*: p <0,05; **: p<0,01; ***: p <0,001).	39
Şekil 4.21.	Kolon dokularında NRF2 immunreaksiyonları. IHC, DAB Kromojen, X20, 50µm Bar.	41
Şekil 4.22.	Tüm kolon segmentlerindeki ve total NRF2 ekspresyonlarının istatistiksel grafikleri (*: p <0,05).	41
Şekil 4.23.	Gruplarda PARP1 ekspresyonları. IHC, DAB Kromojen, X20, 50µm Bar.	42
Şekil 4.24.	Tüm kolon segmentlerindeki ve total PARP1 ekspresyonlarının istatistiksel grafikleri (*: p <0,05; **: p<0,01).	43
Şekil 4.25.	Kolon dokularında gruplara göre H2AX immunpozitif boyanmalar. IHC, DAB Kromojen, X20, 50µm Bar.	44
Şekil 4.26.	Tüm kolon segmentlerindeki ve total H2AX ekspresyonlarının istatistiksel grafikleri (*: p <0,05; **: p<0,01; ***: p <0,001).	44
Şekil 4.27.	Kolon dokularında gruplara göre γH2AX immunpozitif boyanmalar. IHC, DAB Kromojen, X20, 50µm Bar.	45
Şekil 4.28.	Tüm kolon segmentlerindeki ve total γH2AX ekspresyonlarının istatistiksel grafikleri (*: p <0,05; **: p<0,01; ***: p <0,001).	46
Şekil 4.29.	Gruplarda 8OHdG ekspresyonları. IHC, DAB Kromojen, X20, 50µm Bar.	47
Şekil 4.30.	Tüm kolon segmentlerindeki ve total 8OHdG ekspresyonlarının istatistiksel grafikleri (*: p <0,05; ***: p <0,001).	47
Şekil 4.31.	Kolon dokularında TNFα immunreaksiyonları. IHC, DAB Kromojen, X20, 50µm Bar.	48
Şekil 4.32.	Tüm kolon segmentlerindeki ve total TNFα ekspresyonlarının istatistiksel grafikleri (*: p <0,05; **: p<0,01; ***: p <0,001).	49

Şekil 4.33.	Tüm kolon segmentlerinde COX-2 immunreaksiyonları. IHC, DAB Kromojen, X20, 50µm Bar.	50
Şekil 4.34.	Tüm kolon segmentlerindeki ve total COX-2 ekspresyonlarının istatistiksel grafikleri (*: p <0,05; **: p<0,01; ***: p <0,001).	50
Şekil 4.35.	Kolonun tüm segmentlerinde Ly6G pozitif immunreaksiyon veren nötrofillerin görünümü. IHC, DAB Kromojen, X20, 50µm Bar.	52
Şekil 4.36.	Sivelestat grubu distal kolonda Ly6G immunpozitivite veren bir nötrofil lökosit. IHC, DAB Kromojen, X40, 20µm Bar.	52
Şekil 4.37.	Tüm kolon segmentlerindeki ve total Ly6G ekspresyonlarının istatistiksel grafikleri (*: p <0,05; **: p<0,01; ***: p <0,001).	53
Şekil 4.38.	Kolonun tüm segmentlerinde ELA2 immunreaksiyonlarının görünümü. IHC, DAB Kromojen, X20, 50µm Bar.	54
Şekil 4.39.	Kolitis grubu distal kolonda ELA2 immunpozitivite veren nötrofil lökositler. IHC, DAB Kromojen, X40, 20µm Bar.	54
Şekil 4.40.	Tüm kolon segmentlerindeki ve total ELA2 ekspresyonlarının istatistiksel grafikleri (**: p<0,01; ***: p <0,001).	55
Şekil 4.41.	Distal kolonda kolitis grubu verilerinin korelasyon analiz sonuçları	56
Şekil 4.42.	Mid kolonda kolitis grubu verilerinin korelasyon analiz sonuçları	57
Şekil 4.43.	Proksimal kolonda kolitis grubu verilerinin korelasyon analiz sonuçları	58
Şekil 4.44.	Total kolonda kolitis grubu verilerinin korelasyon analiz sonuçları	59
Şekil 4.45.	Distal kolonda sivelestat grubu verilerinin korelasyon analiz sonuçları	60
Şekil 4.46.	Mid kolonda sivelestat grubu verilerinin korelasyon analiz sonuçları	61
Şekil 4.47.	Proksimal kolonda sivelestat grubu verilerinin korelasyon analiz sonuçları	62
Şekil 4.48.	Total kolonda sivelestat grubu verilerinin korelasyon analiz sonuçları	63
Şekil 4.49.	Çalışma dokularından elde edilen SOD verilerinin istatistiksel değerlendirmesi (**: p <0,01; ***: p <0,001).	64
Şekil 4.50.	Kolon dokusunun GSH düzeylerinin biyokimyasal olarak değerlendirilmesi ve istatistik sonuçları (***: p <0,001)	65
Şekil 4.51.	Kolon dokusunun MDA düzeylerinin biyokimyasal olarak değerlendirilmesi ve istatistik sonuçları (**: p <0,01)	66

TABLÖLAR

Tablo 3.1. İmmunohistokimyada kullanılan antikorlar.

23



SİMGELER ve KISALTMALAR

ABCB1	ATP Binding Cassette Subfamily B Member 1
µg	Mikrogram
AOM	Azoksimetan
ATM	Adenin-Timin Mutasyona Uğramış Gen
ATR	Ataksi Telangiektazi ve Rad3 ile İlgili
Br	Brom
BRCA1	Breast Cancer Type 1 Susceptibility Protein (Meme Kanseri Tip 1 Duyarlılık Proteini)
CAC	Colitis Associated Colorectal Cancer (Ülseratif Kolitis İlişkili Kolorektal Kanseri)
Cl	Klor
COX	Cyclooxygenase (Siklooksijenaz-Prostaglandin endoperoksit sentetaz)
CRC	Colorectal Cancer (Kolorektal Kanseri)
DNA	Deoksiribonükleik Asit
DNA-PKcs	DNA-Bağımlı Protein Kinaz Katalitik Alt Birimi
DSS	Dekstran Sodyum Sülfat
GWAS	Genome-Wide Association Study (Genom Çapında İlişki Çalışması)
H2AX	H2A Histone Family Member X (H2A Histone Ailesi Üyesi X)
H₂O₂	Hidrojen Peroksit
HLA	Human Leukocyte Antigen (İnsan Lökosit Antijeni)
HRP	Horseradish Peroxidase (Yabancıturpu Peroksidaz)
HSP	Heat Shock Protein (Isı Şoku Proteini)
IFN	İnterferon
IL	İnterleukin
kg	Kilogram
Ly6G	
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase (Mitojenle Aktifleşen Protein Kinaz)
MDA	Malondialdehit
mg	Miligram
ml	Mililitre
MPO	Miyeloperoksidaz
NADP	Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat
NE	Nötrofil Elastaz
NK	Natural Killer Cell (Doğal Öldürücü Hücre)
NRF2	Nuclear Factor Erythroid-2 Related Factor 2
OH	Hidroksit
OHdG	Hidroksideoksiguanozin
OXA	Oksazolon
OxodG	Oxodeoksiguanozin
PARP1	Poli (ADP-Riboz) Polimeraz1
RNS	Reactive Nitrogen Species (Reaktif Nitrojen Türleri)
ROS	Reactive Oxygen Species (Reaktif Oksijen Türleri)
SCN	Tiyosiyanat

SOD	Süperoksit Dismutaz
TGF	Dönüştürücü Büyüme Faktörü Alfa
TNBS	2,4,6-Trinitrobenzenesulfonik Asit
TNF	Tümör Nekroz Faktörü
TNFSF	TNF Superfamily Member (TNF Süper Aile Üyesi)
ÜK	Ülseratif Kolitis
α	Alfa
γ	Gamma



ÖZET

Farelerde Kronik Kolitis Modelinde Sivelestat'ın DNA Hasarı, Oksidatif Stres ve Yangısal Yanıt Üzerine Etkileri

Bu tez çalışmasında, ülseratif kolitisin patogenezi, yangısal süreçleri, oksidatif stres ve DNA hasarı mekanizmaları, AOM/DSS ile indüklenen deneysel bir kolitis modeli üzerinden incelendi. Çalışmanın amacı, ülseratif kolitisin kolorektal kanser gelişimiyle ilişkisini ve Sivelestat uygulamasının belirtilen süreçler üzerindeki etkilerini araştırmaktır. Çalışmada, toplam 24 adet 10±2 haftalık BALB/c cinsi fare, kontrol, kolitis ve kolitis + Sivelestat grupları olmak üzere üç gruba ayrıldı. Deneysel modelde, kolitis ve kolitis + Sivelestat gruplarında sıfırıncı ve dördüncü günlerde intraperitoneal 12 mg/kg dozunda AOM uygulandı, ardından %3 oranında içme suyuna eklenen 5 kDa DSS 7 gün süreyle ad libitum verildi ve bu süreç 4 tur tekrarlanarak kronik yangısal model oluşturuldu. Son DSS periyodundan sonra Sivelestat grubu farelerine 50 mg/kg dozunda Sivelestat 5 gün boyunca intraperitoneal olarak uygulandı. Tüm fareler deney sonunda eksanguinasyon yöntemiyle ötenazi edildi; histopatolojik, immunohistokimyasal ve biyokimyasal analizler yapıldı. Histopatolojik analizlerde, DSS uygulamasının yangısal hücre infiltrasyonu, epitel hiperplazisi, kript kaybı ve ülserasyon gibi belirgin doku hasarlarına neden olduğu gözlemlendi. Kolitis grubunda distal kolonda lezyonların daha şiddetli olduğu, mid-kolon ve proksimal kolon dokularında ise daha hafif lezyonların bulunduğu tespit edildi. Sivelestat uygulaması sonrası ise yangısal yanıt ve histopatolojik hasarın azaldığı, ancak bu azalmanın istatistiksel olarak anlamlı düzeyde olmadığı belirlendi. İmmunohistokimyasal değerlendirmelerde, kolitis grubunda 4-HNE, NRF-2, PARP1, ELA2, Ly6G, H2AX, γ H2AX, 8-OHdG, COX-2 ve TNF- α protein ekspresyonlarının kontrol grubuna kıyasla anlamlı şekilde arttığı görüldü. Sivelestat tedavisi sonrası γ H2AX, 4-HNE, ELA2, Ly6G, COX2 ve TNF- α ekspresyonlarında kolitis grubuna göre anlamlı bir azalma gözlemlendi. Ancak, NRF-2 ve 8-OHdG ekspresyonlarında kolitis grubuna kıyasla belirgin bir azalma izlenmezken, PARP1 ekspresyonu her iki grupta da yüksek bulunmuş ve anlamlı fark saptanmamıştır. H2AX ekspresyonu ise kolitis grubuna kıyasla sivelestat grubunda daha yüksek tespit edilmiştir. Biyokimyasal analizler de histopatolojik ve immunohistokimyasal bulguları desteklemiş, Sivelestat uygulamasının oksidatif stres göstergesi olan MDA seviyelerini düşürdüğü ve antioksidan kapasite göstergesi GSH seviyelerini artırdığı belirlenmiştir. SOD seviyesinde ise bir farklılık görülmemiştir. Sonuç olarak, bu çalışma sivelestatın nötrofil elastaz inhibitörü olarak inflamasyonu, DNA hasarını ve oksidatif stres belirteçlerini baskılama potansiyeline sahip olduğunu göstermektedir. Bulgular, nötrofil elastaz inhibitörlerinin ülseratif kolitis ve komplikasyonlarının yönetiminde potansiyel terapötik ajanlar olarak değerlendirilebileceğini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: DNA hasarı, Nötrofil elastaz, Oksidatif stres, Sivelestat, Ülseratif kolitis

ABSTRACT

Effects of Sivelestat on DNA Damage, Oxidative Stress and Inflammatory Response in a Chronic Colitis Model in Mice

In this thesis study, the pathogenesis, inflammatory processes, oxidative stress, and DNA damage mechanisms of ulcerative colitis were investigated through an experimental colitis model induced by AOM/DSS. The aim of the study was to investigate the relationship between ulcerative colitis and the development of colorectal cancer, as well as the effects of Sivelestat administration on the aforementioned processes. In the study, a total of 24 BALB/c mice, aged 10±2 weeks, were divided into three groups: control, colitis, and colitis + Sivelestat. In the experimental model, 12 mg/kg AOM was administered intraperitoneally on days zero and four to the colitis and colitis + Sivelestat groups. Then, 5 kDa DSS was added to the drinking water at a concentration of 3% and given ad libitum for 7 days. This process was repeated four times to create a chronic inflammatory model. After the final DSS period, 50 mg/kg Sivelestat was administered intraperitoneally to the Sivelestat group for 5 days. All mice were euthanized by exsanguination at the end of the experiment; histopathological, immunohistochemical, and biochemical analyses were performed. Histopathological analyses revealed that DSS administration caused significant tissue damage, including inflammatory cell infiltration, epithelial hyperplasia, crypt loss, and ulceration. In the colitis group, lesions were more severe in the distal colon, while milder lesions were found in the mid-colon and proximal colon. Following Sivelestat administration, it was determined that the inflammatory response and histopathological damage decreased, although this decrease was not statistically significant. In immunohistochemical evaluations, the expression levels of 4-HNE, NRF-2, PARP1, ELA2, Ly6G, H2AX, γ H2AX, 8-OHdG, COX-2, and TNF- α proteins were significantly increased in the colitis group compared to the control group. After Sivelestat treatment, a significant decrease was observed in γ H2AX, 4-HNE, ELA2, Ly6G, COX-2, and TNF- α expression levels compared to the colitis group. However, no significant decrease was observed in NRF-2 and 8-OHdG expression levels, while PARP1 expression remained high in both groups, with no significant difference. H2AX expression was higher in the Sivelestat group than in the colitis group. Biochemical analyses also supported the histopathological and immunohistochemical findings. It was determined that Sivelestat administration decreased MDA levels, an indicator of oxidative stress, and increased GSH levels, an indicator of antioxidant capacity. No difference was observed in SOD levels. In conclusion, this study demonstrates that Sivelestat has the potential to suppress inflammation, DNA damage, and oxidative stress markers as a neutrophil elastase inhibitor. The findings suggest that neutrophil elastase inhibitors may be evaluated as potential therapeutic agents in the management of ulcerative colitis and its complications.

Keywords: DNA damage, Neutrophil elastase, Oxidative stress, Sivelestat, Ulcerative colitis

1. GİRİŞ

Kolorektal kanser (CRC); kanser nedeniyle meydana gelen ölümlerde Amerika’da 2, dünyada ise 3. sırada yer almaktadır (Siegel ve ark., 2023). CRC vakalarının büyük bir kısmı kalıtsal genetik değişikliklerden ziyade çevresel nedenlerle meydana gelir. Risk faktörleri arasında çevresel ve gıda kaynaklı mutajenler, spesifik bağırsak parazitleri, patojenler ve yangısal bağırsak hastalığı sayılabilir (Rustgi, 2007). Buna ek olarak gelişmiş veya gelişmekte olan (insan gelişim endeksine göre) ülkelerde görülen artışın nedeni yaşam tarzı ve diyet farklılığı nedeniyledir. Hayvansal gıda alımındaki artış, hareketsiz yaşam, fiziksel aktivitenin azalması, aşırı yeme prevalansının artması, ağır alkol tüketimi, sigara kullanımı, kırmızı veya işlenmiş et ürünlerinin tüketilmesi önemli risk faktörlerinden sayılırken, kalsiyum takviyesi, yeterli tam tahıl, lif ve süt tüketimi CRC riskini azaltmaktadır (Siegel ve ark., 2023).

Yangısal bağırsak hastalığı altında değerlendirilen Crohn hastalığı ve ülseratif kolitis gibi hastalıklar CRC’nin başlıca nedenlerinden sayılabilmektedir. Kronik bağırsak yangısı ile kanser arasında pozitif bir korelasyon bulunmaktadır. Her yıl kolitisli hastaların yaklaşık %3,5-4’ü kolorektal kansere yakalanmaktadır (Eaden ve ark., 2001), insanlarda görülen kolorektal kanserlerin yaklaşık %20’sinin ise kanser öncesi meydana gelen yangıyla ilişkili olduğu bildirilmiştir. Bununla beraber ülseratif kolitis ve Crohn hastalığı da dahil olmak üzere yangısal bağırsak hastalığı olan hastalarda CRC riski olduğu bilinmektedir (de Robertis ve ark., 2011). Ayrıca kolorektal kanser öyküsü görülen hastalarda hastalığın çeşitli genlerle familial aktarımının olduğu da bilinmektedir. Bu nedenle ülseratif kolitis, patogenezi iyi anlaşılması gereken hastalıklardan biridir.

Akut respiratorik disstres sendromu, kronik böbrek hastalıkları gibi hastalıklarda yangısal cevabın azaltılması ve hastalığın şiddetinin baskılanması amacıyla nötrofil elastaz inhibitörlerinin kullanımı yaygınlaşmaya başlamıştır (Ding ve ark., 2023). Bununla birlikte, bilgimize göre nötrofil elastaz inhibitörlerinin ülseratif kolitis modellerindeki etkinliği ve beraberinde DNA hasarı ve oksidatif stres üzerindeki etkileri hakkında da bilgi bulunmamaktadır. Bu bilgilere dayanarak yapılan

bu tezin amacı; Balb/c farelerde AOM/DSS modelini kullanarak kolorektal kanser oluşturmada, kolorektal kanser oluşumu için gereken inisiyasyonu sağlayarak yalnızca ülseratif kolitis oluşturmak, ülseratif kolitisli hayvanlarda bir nötrofil elastaz inhibitörü olan Sivelestat'ın, hastalık nedeniyle meydana gelen yangıya, oksidatif strese ve DNA hasarına karşı etkilerini histopatolojik, immunohistokimyasal ve biyokimyasal olarak ortaya koymaktır.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Yangısal Bağırsak Hastalığı

Yangılı ve diyare ile izleyen hastalıklar tüm dünyada yaygın görülen sağlık problemlerinden biridir. Kuzey Amerika’da 1,5 milyon, Avrupa’da 2 milyondan fazla insan bu hastalıktan mustarıptır ve halen dünyada bu hastalıkla yaşayan insan sayısı belirsizdir. Yapılan epidemiyolojik çalışmalar hastalığın patogenezi ve çevresel nedenleri ile ilgili çeşitli bilgiler vermektedir. Sanayileşen ülkelerde insidansının sıklığı morbidite ile ilişkilendirilmiştir. Bu tip hastalıklar çeşitli etiyolojilere sahip olabilirler. Genellikle enterik patojenler veya sistemik kronik hastalıklar, yangısal bağırsak hastalıkları altında değerlendirilen Crohn hastalığı ve ülseratif kolitis gibi hastalıkların başlıca nedenlerinden sayılabilmektedir. Bazı kaynaklarda Behçet ve Çölyak hastalıkları bu iki hastalık yanında yangısal bağırsak hastalığının diğer ana alt tipleri olarak değerlendirilmektedir. Yapılan çalışmalar intestinal mikrobiyotanın, bağırsakta oluşan hasarla patojen hale geçtiği ve Toll-like reseptörlerin bu yangının oluşmasıyla ilgili olduğu bildirilmiştir. Yani hastalığın oluşması için gerekli patojen bağırsakta bulunmaktadır ancak hastalığın oluşması için çevresel tetikleyiciler gereklidir. Bahsedilen tüm yangısal bağırsak hastalıkların etiyolojileri farklı olmasına karşın patogenezi benzer olduğundan yangısal bağırsak hastalıkları altında değerlendirilmektedir (Barry ve ark., 2020; Ng ve ark., 2017; Ohkusa ve Koido, 2015).

Yangısal bağırsak hastalıklarının ortak görünümüleri bulunmaktadır: Disbiyozis, mukozal bariyerin bozulması ve şiddetli derecede yangı en sık görülen ortak lezyonlardan sayılabilmektedir (Barry ve ark., 2020). Örneğin ülseratif kolitis kolon ve rektumla sınırlı kalır, her zaman rektumu tutar beraberinde kolonun bir bölümünü veya tümünü tutacak şekilde proksimale doğru devam eder ancak bundan farklı olarak Crohn hastalığı her zaman rektumu tutmaz ve kolonda farklı bölümlerde multifokal olarak görülebilir (Kumar ve ark., 2023).

Yangısal bağırsak hastalıklarının sonu, hastalığın şiddetine göre değişmektedir. Orta dereceye kadar olan hastalık tedaviye yanıt verebilmekteyken hastalığın şiddetli

formlarında; etkenin direnci, hastanın bağışıklığı gibi durumlara göre değişmek üzere hastalarda terminal sonuçlar oluşabilmektedir (Barry ve ark., 2020).

2.1.1. Ülseratif Kolitisi

Önceki bölümde de belirtildiği gibi ülseratif kolitis yangısal bağırsak hastalığının ana alt tipinden biridir. Rektumdan proksimal kolona doğru tutulum gösteren, değişen derecelerde sürekli mukozal yangıya neden olan, idiopatik, kronik yangısal hastalıktır. Hastalık sürekli tekrarlayan yapıda ve değişen derecelerde ülserlerle karakterize bir seyirle izlenmektedir. Hastalık ilk olarak 1859 yılında Samuel Wilks tarafından tanımlanmıştır ve dünya çapında Crohn hastalığından daha yaygın görülmektedir. Hastalığın 2019'daki insidansı 1,2-20,3/100.000 kişi/yıl ve yaygınlığı da 7,6-245/100.000 kişi/yıl olarak bildirilmiştir (Gajendran ve ark., 2019; Kumar ve ark., 2023; Nakov, 2019).

Hastalığın genel risk faktörleri arasında genetik, çevre, otoimmün durum ve bağırsak mikrobiyotası sayılabilir (Gajendran ve ark., 2019).

Yaş ve cinsiyet risk faktörleri arasında önemli bir yer tutar. İnsanlarda 20-30 ve 50-80 yaşları arasında çok daha sık görülen hastalıkta erkekler ve kadınlar arasında önemli bir fark gözlenmemiş olmasına karşın, bazı çalışmalar erkeklerde daha yaygın görüldüğünü bildirmiştir (Langholz ve ark., 1987; Loftus, 2004).

Bunun dışında insanlarda ırklar arasında da farklılıklar görülmüştür. Yahudilerde ve özellikle Aşkenazi Yahudilerinde Yahudi olmayanlara göre 3 kat daha fazla ülseratif kolitise yakalanma riski vardır. Afro-Amerikan ve Hispanik popülasyonun diğer popülasyonlara göre daha yüksek insidansa sahip olduğu belirtilmiştir (Karban ve ark., 2004; Veluswamy ve ark., 2010).

Ülseratif kolitisli hastaların %8-15'inde yangısal bağırsak hastalığı ve daha yaygın olarak ülseratif kolitis hikayesi bulunduğu bildirilmiştir. Genom çapında ilişki çalışması (GWAS) yapılan araştırmalarda TNFSF15 (TL1A) lokusunun bulunması, IL1 beta geni, ABCB1/MDR17, HSP708 ve HLA-DR29'daki polimorfizmlerin şiddetli ülseratif kolitis riskini artırdığı ortaya konmuştur (Kopylov ve ark., 2016).

Tütün ve sigara kullanımıyla ilgili farklı görüşler mevcuttur. Bazı kaynaklar sigaranın hastalığın oluşma riskini artırdığını bildirirken bu konuda yapılan diğer çalışmalar; sigara kullanımı ve buna bağlı olarak nikotin alımının ülseratif kolitis riskini azalttığını belirtmektedir. Ancak ülseratif kolitise nikotin etkisinin araştırıldığı bir çalışmada nikotin hastalığın gelişmesinde herhangi bir etkisinin olmadığını göstermiştir (Biedermann ve ark., 2014; Kumar ve ark., 2023; Mahid ve ark., 2006).

Yangısal bağırsak hastalığı olarak değerlendirildiğinde gıda antijenlerinin hastalığın gelişiminde önemli bir yeri olduğu ortaya konmuştur. İşlenmiş et ürünleri, rafine karbonhidratlar, infant dönemde alınan inek sütü gibi gıdalar ülseratif kolitis gelişme riskini artırmaktadır. Diyetle alınan kolesterol, hayvansal yağ ve çoklu doymamış yağ asitlerinin de benzer etkide bulunduğu bilinmektedir (Geerling ve ark., 2000; Glassman ve ark., 1990; Martini ve Brandes, 1976).

Bağırsak mikrobiyotasında oluşan disbiyozun daha yoğun olarak Crohn hastalığına neden olduğu bilinmektedir ancak son yapılan çalışmalarda ülseratif kolitis gelişen hastalarda da bağırsak mikrobiyotasında disbiyotik değişiklikler meydana geldiği gösterilmiştir (Gajendran ve ark., 2019).

Makroskobik olarak: kolon mukozası hafif kırmızı ve granüler görünümlü olabilir. Yaygın olarak geniş tabanlı ülserler içerir. Hastalıklı ve sağlam kolon arasındaki geçiş keskindir. Ülserler kolon lümenine paralel şekilde uzanırlar. Mukozal atrofi ve düz bir mukozal yüzey ile sonuçlanır. Mural kalınlaşma yoktur, serozal yüzey normaldir, strüktür gelişimi olmaz. Yangı ve yangısal mediatörler muscularis propriaya zarar verebilir, nöromuskuler fonksiyonları bozabilir. Kolon dilatasyonu, toksik megakolon gibi sendromlar çok şiddetli yapıdaki ülseratif kolitisin sonuçları olarak gözlemlenebilir. Hastalığın şiddetine göre pankolitis görülebilir. Mikroskobik lezyonlar arasında yangısal infiltrasyon, kriptte apostematöz değişiklikler, kript distorsiyonu, epitelyal metaplazi sayılabilir. Ağır vakalarda mukoza hasarına submukozadan derine inen ülserler eşlik eder, buna rağmen muskuler propria nadiren tutulur. Ülseratif kolitisin patognomik bulgusu eritem, normal vasküler yapının kaybı,

granüler yangı hücrelerinin sayıca artışı, erozyon, fragil yapıdaki kolon, kanama ve ülserasyonlardır (Gajendran ve ark., 2019; Kumar ve ark., 2023).

Hastalığın şiddetinin belirlenmesinde Amerikan Gastroenteroloji Kurulu, Avrupa Crohn ve Kolitis Organizasyonu, Japon Gastroenteroloji Derneği'nin ortak olarak oluşturduğu Truelove-Witts kriterleri takip edilmektedir. Buna göre; “hafif şiddetteki ülseratif kolitis günde 4’ten az sayıda kanlı veya kansız dışkılama, sistemik hastalık belirtisi yok, normal eritrosit sedimentasyon hızı, hafif kramplı karın ağrısı, zaman zaman tenesmus, nadiren kabızlık; orta şiddetteki hastalık günde 4 veya daha fazla karın ağrısının da eşlik ettiği yumuşak dışkılama, hafif anemi, düşük dereceli ateş, normal beslenme, kilo kaybı yok; yüksek şiddetli hastalık ise şiddetli krampla birlikte sık yumuşak ve kanlı dışkılama, yüksek ateş, taşikardi, yükselmiş eritrosit sedimentasyon hızı, sistemik hastalık bulguları, kısa zamanda şiddetli kilo kaybı” olarak tanımlanmıştır (Dignass ve ark., 2012; Kornbluth ve Sachar, 2010; Peyrin-Biroulet ve ark., 2016).

Hastalığın tanısında “altın standart” olarak gösterilebilen bir tanı kiti yoktur. Tanıda klinik bulgular, laboratuvar testleri, görüntüleme araçları ve histopatoloji hastalığın hekim tarafından düşünülmesine yardımcı olur. Bunun yanında bazı kaynaklar tarafından kolonoskopi ile beraber alınan biyopsinin incelenmesi kesin tanı için tek yol olarak gösterilmektedir. Ayrıca histopatoloji hastalığın teşhisinde, şiddetin değerlendirilmesinde kolonik mukozadaki displazi, neoplazi ve maligniteyi belirlemede kesin araçtır (Gajendran ve ark., 2019; Nakov, 2019).

Ülseratif kolitisin tedavi hedefinde hastanın yaşam kalitesini iyileştirmek, kalıcı remisyona ulaşmak ve hastalığın kansere ilerlemesini önlemek bulunmaktadır. Temel yaklaşım hastalığın şiddetine, dağılımına, süresine, seyrine, hastanın yaşına, nüks sıklığına, önceki kullanılan ilaçlara, kullanılacak ilaçların yan etkilerine, hastalığın sistemik belirtilerine göre yapılmaktadır. Klinisyenler tarafından dikkat edilen en önemli noktalar hastalığın klinik remisyonunun uzun vadeli ve büyük ölçüde olması, kolektomi riskinin azalması ve kortikosteroid kullanımına mümkün olduğunca ihtiyaç duymamaktır. Bu amaçla en sık kullanılan ilaç sulfasalazine, beselamine ve 5-aminosalisilik asit -aminosalisilik asit aynı zamanda kanser önleyici etkiye de sahiptir-

etken maddeleridir (Gajendran ve ark., 2019; Rogler, 2013). Bunun dışında prednizon, immunsupresanlar, anti-TNF ve anti-integrin antikorları daha şiddetli vakalarda kullanılmaktadır (Rogler, 2013). Ayrıca nutrisyonel terapilerin de etkinliği araştırılmıştır (Persson ve ark., 1993). Operasyon öncesinde yapılan elemental protein içerikli diyetin hastalığa karşı olumlu etkisinin olduğunu düşünen O'Morain ve arkadaşları ile Sanderson ve arkadaşları bununla ilgili anlamlı sonuçlar bulamamalarına karşın; beslenmenin etkilerini araştıran sınırlı sayıda çalışma yapılmıştır. Bu nedenle Gastroenteroloji dernekleri, beslenme dernekleri, Crohn ve Kolitis Örgütü enteral beslenmenin teşvik edilmesi üzerine durmuşlardır (McIlroy ve ark., 2018; Shah ve ark., 2016). Bunların dışında operatif tedavi de uygulanmaktadır. İleostomi, parsiyel veya total kolostomi, poş veya ileorektal anastomoz, proktokolektomi gibi yöntemlerle tekrarlayan yangı bölgesinin uzaklaştırılması ya da “pas geçilmesi” kullanılan operatif tedavi yöntemlerindendir. Her ne kadar kalıcı çözüm gibi görülse de yapılan operatif müdahalelerin çoğunluğu irreversibl değişikliklerdir ve son çare olarak operasyon kararı alınmaktadır (Andersson ve Soderholm, 2009).

Ülseratif kolitis hastalığının sonu, hastalığın şiddetine ve tedaviye verilen yanıtı göre değişmektedir. İyileşme olduğunda ülserli kolon bölgesinde submukozal fibrozis, mukozal atrofi, mukoza yapısında düzensizlik görülebilir. İyileşmeden sonra geçen uzun remisyon döneminden sonra kolon normal histolojik yapısına yakın görünebilir (Kumar ve ark., 2023). İyileşmenin olmadığı veya hastalığın sürekli tekrarlama durumunda ülseratif kolitis kolon displazi/metaplazileri ve kolorektal kansere (CRC) evrilebilir (Yashiro, 2014).

2.1.2. Kolitis ve Kolorektal Kanser İlişkisi

Crohn ve Rosenberg 1925 yılında bir ülseratif kolitis hastasında hastalığın devamında görülen ilk CRC vakasını bildirmişlerdir (Dobbins, 1984). Sonrasında yapılan çalışmalarda ülseratif kolitis ile CRC arasındaki ilişki daha detaylı olarak ortaya konmuştur (Grivennikov, 2013). CRC, ülseratif kolitisli neoplastik olmayan yangısal epitelin displaziye sonra da neoplazi ve kansere dönüşümü şeklinde de geliştiği düşünülmektedir. Ülseratif kolitisli hastalarda tam remisyon

sağlanamadığında sürekli devam eden veya ara ara alevlenen yangı mukozanın epitel katmanını tekrar tekrar hasara uğratar. Epitel hücrelerinin kaybı sonunda kontrolden çıkıp CAC'a yol açabilecek bir onarım mekanizması olan epitel proliferasyonu ile tamir edilmeye çalışılır (Rogler, 2014).

Ülseratif kolitis ilişkili kolorektal kanser (CAC) tüm ülseratif kolitis vakalarının %1'ini oluşturur (Gyde ve ark., 1982). Bununla birlikte ülseratif kolitis pankolitis şeklinde daha şiddetli seyreden patogeneze sahip ise CAC oluşma olasılığının %3,7 olduğu da Eaden ve arkadaşları tarafından ortaya konmuştur (Eaden ve ark., 2001). CRC riski ülseratif kolitis tanısından yaklaşık 8 ila 10 yıl sonra artmaya başlar (Bernstein ve ark., 2001; Ekbom ve ark., 1990; Langholz ve ark., 1992). Yapılan çalışmalarda ülseratif kolitisli hastalarda hastalığın süresiyle birlikte CAC oluşma olasılığının arttığı bildirilmiştir. Ülseratif kolitis başlangıcından 10 yıl sonra %1,6, 20 yıl sonra %8,3 ve 30 yıl sonra %18,4 olasılıkla CAC oluşma riski olduğu belirtilmektedir (Eaden ve ark., 2001). Başka bir çalışmada ise yangısal bağırsak hastalarının %21'inde teşhisten sonraki 10 yıl içinde CAC geliştiği bildirilmiştir (Brackmann ve ark., 2009).

2.1.3. Ülseratif Kolitisin Yangısal Kompozisyonu ve Nötrofillerin Rolü

Ülseratif kolitisin ayırıcı özelliği doğal immun hücrelerin (nötrofiller, makrofajlar, dendritik hücreler ve NK hücreleri) ve adaptif immun hücrelerin (B hücreleri ve T hücreleri) lamina propriaya belirgin bir şekilde infiltrasyonudur. Bağırsak mukozasında bu hücrelerin sayısının artması ve aktivasyonu, tümör nekroz faktörü α (TNF- α), interlökin-1 β (IL-1 β), interferon- γ (IFN- γ) ve interlökin-23–Th17 yolunun sitokinlerinin lokal seviyelerini yükseltir (Abraham ve Cho, 2009).

Ülseratif kolitiste bağırsak dokularında nötrofil akümülyasyonu meydana gelir. Ancak, nötrofillerin hastaya zararlı olup olmadığı veya ona karşı koruyucu bir rol oynayıp oynamadığı belli değildir (Colgan, 2015; Köhl ve ark., 2007). Çünkü buradaki akümülyasyonu sonrası nötrofillerin bağırsak propriasındaki kapillar damarlara adezyonu ve buralarda toplanması artar, TNF- α ve interlökin-1 tarafından vasküler endotelial hücrelerdeki adezyon orta derecede yukarı regüle edilir. Bununla birlikte

dokudaki yangısal sitokinlerin artışı da bölgeye nötrofil göçünü artırır. Mikrovasküler anomalilikler yangı, iskemi ve mukozal rejenerasyonun bozulmasına yol açar. İskemi sonucunda bölgede hipoksi meydana gelir, bunun sonucunda hem hasar hem de korumaya yardımcı olan faktörler düzenlenir (Abraham ve Cho, 2009; Hatoum ve ark., 2006; Hegazi ve ark., 2005; Robinson ve ark., 2008).

2.1.4. Nötrofil Elastaz ve Sivelestat

Nötrofil elastaz, polimorfonükleer nötrofiller ve monositler/makrofajlar tarafından üretilen bir serin proteazdır (Werb ve Gordon, 1975). NE, elastin, interstisyel kollajenler, proteoglikanlar, fibronektin, laminin ve tip IV kollajenler gibi geniş bir hücre dışı matris ve hücre yüzey proteinleri spektrumunu bozar (Janoff, 1985; Janoff ve Schere, 1968; Mainardi ve ark., 1980; McDonald ve Kelley, 1980). Elastaz, geniş bir dizi hedefe karşı güçlü bir antimikrobiyal aktiviteye sahip olmasıyla bilinir. Normal fizyolojik koşullar altında, genç nötrofiller tarafından salınan elastazın proteolitik aktivitesi, alfa1-proteaz inhibitörü gibi antiproteazlar tarafından sıkı bir şekilde düzenlenir. Bununla birlikte, neoplazmaların varlığı, cerrahi stres veya yangı gibi fizyolojik rahatsızlık koşulları altında, elastaz ve antiproteaz arasındaki denge bozulur ve baskın elastolitik aktivite, ekstraselüler matriksin yok olmasına neden olur. Kontrolsüz serbest bırakılması durumunda, elastaz çevredeki dokulara zarar verebilir ve yangının gelişimine katkıda bulunabilir. NE ayrıca pro-TGF- α 'yı proteolitik aktivitesi aracılığıyla insan solunum yolu epitel hücrelerinin yüzeyinde ayırır ve insan solunum yolu epitel hücreleri üzerinde olgun, çözünür TGF- α salgılar. Bu da periferik hava yollarında tehlikeli miktarda müsinoz eksudat salgılanmasına yol açar (Kohri ve ark., 2002; Naito ve ark., 2007).

Sivelestat; nötrofil elastazın sentetik, spesifik, düşük moleküler ağırlıklı bir inhibitörüdür. Sivelestat'ın akut akciğer hasarı (ALI) üzerindeki etkinliği çeşitli araştırmalarda gösterilmiştir ve bu ilacın insanlarda sistemik inflamatuvar yanıt sendromu (SIRS) ile ilişkili ALI için kullanımı onaylanmıştır. Ayrıca, bazı yazarlar sivelestat'ın antikanser özelliklere sahip olduğunu bildirmiştir (Wada ve ark., 2006; Kamohara ve ark., 1997). Sivelestat, hücre zarından NE kaynaklı TGF- α salınımını ve elastaz aktivitesini inhibe eder (Wada ve ark., 2006). Elastazın aktivitesini inhibe

etmek, nötrofiller tarafından yapılan yangısal yanıtı ve dolayısıyla oksidatif stresi azaltabilir. Sivelestatın kanda SOD ve MDA seviyeleri üzerindeki etkisi, nötrofiller tarafından oluşturulan oksidatif stresin azaltılmasını yansıtabilir. Sivelestat, ROS üretimini azaltabilir ve bu da SOD ve MDA seviyelerinde bir azalmaya yol açabilir. Doku düzeyinde, sivelestatın 8-OHdG üzerindeki etkileri, hücre hasarının ve oksidatif stresin azalmasını gösterebilir. 8-OHdG, DNA'da oksidatif hasarı gösteren bir belirteçtir. Sivelestatın bu belirteçlerin düzeylerini azaltması, oksidatif stresin ve hücre hasarının azaldığını gösterebilir (Naito ve ark., 2007).

2.1.5. Reaktif Oksijen Türleri

Nötrofiller, vücudun hücrel savunma sistemlerinin bir parçası olan beyaz kan hücreleridir. Enfeksiyonlar veya yangı durumunda, nötrofiller etkilenen bölgeye hareket eder ve potansiyel patojenlere karşı savaşırlar. Nötrofiller, bu saldırıyı gerçekleştirirken çeşitli şekillerde oksidatif stres oluşturabilir. Nötrofiller, hücre içerisindeki NADPH oksidaz aracılığıyla süperoksit radikalleri ($O_2 \bullet^-$) oluşturur. Bu süperoksit radikalleri hızla hidrojen peroksit (H_2O_2) ve hidroksil radikalleri ($\bullet OH$) oluşturur. Bu reaktif oksijen türleri (ROS), hücre zarlarına yakın bir yerde üretildiklerinde, oksidatif stres oluştururlar ve hücre zarlarında bulunan fosfolipitlerin oksidasyonunu (lipid peroksidasyonu) tetiklerler. Bu durum, hücre zarlarının bütünlüğünün bozulmasına ve hücre hasarına neden olabilir. Nötrofiller ayrıca, MPO denilen bir enzim kullanarak H_2O_2 'nin toksisitesini artırır. MPO, hücre dışı ve hücre içi halidlerin (örneğin Cl^- , Br^- , I^- , SCN^-) oksidasyonunu katalizler, bu da hipohalous asitleri oluşturur. Bunlar, çeşitli hedeflerde oksidatif hasara neden olabilir. MPO aktivitesi, nitrotirozin oluşumuna yol açabilir. Nitrotirozin, yangısal durumların erken dönemlerinde, ülseratif kolit, Crohn hastalığı ve romatoid artrit gibi durumlarda gözlenen oksidasyonun önemli bir parçasıdır (Naito vd., 2007).

Reaktif oksijen türleri (ROS), hücrelerde üretilen yüksek reaktif oksijen molekülleridir. Hücre içi ROS seviyeleri sıkı kontrol edilmelidir. Yüksek ROS, oksidatif hasara neden olurken, düşük/orta seviyeleri hücrel fonksiyonlarda rol alır. ROS seviyesindeki dengesizlik, oksidatif stresin ciddiyetini belirler. Hücre içindeki ROS lokalizasyonları ile düzenlenebilir ve hücreler ROS'a karşı koruyucu

mekanizmalara sahiptir (Cheung ve Vousden, 2022). Birçok protümörojenik olay ROS üretimini teşvik eder. Süperoksit bağımlı oksidatif stresin yangı, fibrozis ve kanser patofizyolojisinde rol oynayabileceği gösterilmiştir (Church ve ark., 1993; Hybertson ve ark, 2011). ROS, MAPK ailesini aktive eder (Runchel ve ark., 2011) ve bu üyeler, hücrel bağlama özgü işlevler görür (Wada ve Penninger, 2004; Wagner ve Nebreda, 2009).

Oksidatif stres, reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimi ile bunların antioksidanlar tarafından nötralizasyonu arasındaki dengesizlik ile karakterize edilir. Hücreler, ROS'a karşı korunmak için antioksidan savunma mekanizmaları geliştirir, bu mekanizmalar enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanları içerir (Karihtala ve Soini, 2007; Lubos ve ark., 2011; McCord ve Fridovich, 1969; Valko ve ark., 2007).

ROS, hücrel biyomoleküllerle hızlı bir şekilde reaksiyona girerek sonunda hücre hasarına ve ölümüne yol açan oksidatif olarak değiştirilmiş ürünler verir. Proteinlerin ve DNA'nın oksidatif olarak değiştirilmiş ürünleri olan protein karbonil ve 8-hidroksideoksiguanozin (8-OHdG), oksidatif stres için belirteçler olarak yaygın şekilde kullanılmaktadır (Dalle-Donne ve ark., 2006).

HO•'nun DNA zincirinin nükleobazları, örneğin guanin ile etkileşimi, C8-hidroksiguanin (8-OHGua) veya bunun nükleosid formu olan deoksiguanozin (8-hidroksi-2'-deoksiguanozin) oluşumuna yol açar. Başlangıçta HO• ilavesinin reaksiyonu, oksijen radikal eklentilerin oluşumuna yol açar, ardından bir elektron çıkarılması ile 8-hidroksi-2'-deoksiguanozin (8-OH-dG) oluşur. 8-OHdG, oksitlenmiş ürün 8-okso-7,8-dihidro-2'-deoksiguanozini (8-oksodG) destekleyen keto-enol tautomerizmine maruz kalır. Bilimsel literatürde aynı bileşik için 8-OHdG ve 8-oxodG kullanılmaktadır (Kasai, 1997).

DNA'nın diğer nükleobazları HO• ile benzer şekilde reaksiyona girse de 8-oxodG lezyonu en bol bulunan DNA lezyonudur çünkü nispeten kolayca oluşur ve promutajeniktir ve bu nedenle potansiyel bir karsinogenez biyobelirteçidir (Kasai, 1997). Deneyler, 8-oxodG'nin mutajenik potansiyelinin, baz çifti özgüllüğünün kaybı, bitişik pirimidinlerin yanlış okunması veya lezyonların karşısına adenin eklenmesi ile

desteklendiğini gösterdi (Kasai, 2002). Bu mutasyonlar GC → TA transversiyon mutasyonlarını içeren 8-oxodG oluşumu nedeniyle ortaya çıkabilmektedir (Cheng ve ark., 1992; Lunec ve ark., 2002). OHdG'nin belirlenmesi ve analizi, oksidatif stres, yaşlanma ve karsinogenezisin bir biyobelirteci olarak hayvan organlarında ve insan numunelerinde (idrar, insan organları, lökosit DNA'sı) gerçekleştirilebilir (Valavanidis ve ark., 2005).

NRF2 (Nuclear Factor Erythroid 2-Related Factor 2) hücrelerde antioksidan yanıtı düzenleyen bir protein ve transkripsiyona faktördür. NRF2, hücreleri oksidatif hasara ve yangıya karşı korur. Bu koruma, belirli genlerin ekspresyonu aktive edilerek gerçekleşir; bu genler antioksidan enzimler ve detoksifikasyon enzimleri üretir (Motohashi ve Yamamoto, 2004).

Oksidatif stres, hücrelerde hasara yol açabilen serbest radikallerin birikmesi durumunda meydana gelir. NRF2'nin aktivasyonu, bu serbest radikallerin nötralize edilmesine yardımcı olur ve bu da hücre hasarını ve çeşitli hastalıkların gelişimini önler. NRF2 ayrıca yangıyı azaltır ve programlı hücre ölümünü (apoptoz) düzenler (Sajadimajd ve Khazaei, 2018).

NRF2'nin işlevi, kanser, nörolojik hastalıklar, kalp hastalığı ve otoimmün hastalıklar dahil olmak üzere bir dizi sağlık durumuyla ilişkilendirilmiştir. Bununla birlikte, çok fazla NRF2 aktivasyonu da problemli olabilir çünkü bazı kanser türleri NRF2'yi kendi yararına kullanabilir ve bu sayede tedavilere direnç gösterebilir. Bu nedenle, NRF2'nin düzgün bir şekilde düzenlenmesi önemlidir (Cheng ve ark., 2015).

Oksidatif strese yanıt olarak, nükleer faktör eritroid 2 ile ilişkili faktör 2 (NRF2 veya NFE2L2), ROS ile savaşmak için upregüle edilir ve etkinleştirilir. NRF2'nin kanser hücrelerinde hiperaktivasyonu, aşırı oksidatif bir ortamda hayatta kalmaları, ilerlemeleri ve terapötik ilaçlara direnç göstermeleri için onlara fayda sağlar (Menegon ve ark., 2016).

2.1.6. DNA Hasarı ve DNA Hasarı ile Oksidatif Stresin İlişkisi

DNA organizmanın genetik bilgilerini içeren, birçok iç ve dış hasara açık ve bunlardan etkilenebilen bir biyomoleküldür. DNA'da meydana gelen bazı mutasyonlar veya çevresel etkiler DNA sarmalı üzerinde hasar oluşturabilir. UV ışını, gıdalar, ilaçlar vb. DNA üzerinde mutajen etkilere sahip olan çevresel faktörlerin hepsi DNA üzerine etkiye sahiptir ancak DNA koruma mekanizmaları sayesinde bu etkilerin - pozitif veya negatif yönde olsun- tamamı DNA'da değişiklik oluşturmaz. DNA sürekli olarak farklı yapıdaki hasarlara maruz kalır, hücre hasarı tolere ve tamir etmek için birçok mekanizmayı kullanır. Bu mekanizmalar replikasyon, rekombinasyon ve onarımdır. ROS ve reaktif nitrojen türleri (RNS), nükleik asitler, proteinler ve lipitler gibi çeşitli hücresel bileşenlere zarar verebilir. ROS ve RNS'nin oksidatif ve nitratif DNA hasarı yoluyla karsinogenezisde önemli bir rol oynadığı düşünülmektedir. PARP1 (Polimeraz (ADP-riboz) polimeraz 1), hücrelerin DNA onarım sürecinde önemli bir rol oynayan bir proteindir. DNA hasarını tespit ettiğinde, PARP1, DNA onarım mekanizmalarını aktive etmek için bir moleküler işaret görevi görür. Özellikle tek iplikli DNA hasarının onarımında görevlidir. Ayrıca, hücresel stres yanıtları, inflamasyon, hücre ölümü ve diğer birçok biyolojik süreçte de etkilidir. PARP1 üzerinde çok sayıda araştırma yapılmıştır ve bu protein, özellikle kanser tedavisinde hedef olarak önemlidir. DNA hasarının onarılmasını engelleyen PARP inhibitörleri, özellikle BRCA1 ve BRCA2 gen mutasyonlarına sahip olan ve dolayısıyla normal DNA onarım mekanizmaları zayıflamış olan bireylerde etkili olmuştur. Bu durum, kanser hücrelerinin DNA hasarına karşı daha savunmasız hale gelmesini ve sonuçta ölmesini sağlar. Bu yaklaşım özellikle meme ve yumurtalık kanseri tedavilerinde kullanılmaktadır (De Vos vd., 2012; Lord ve Ashworth, 2012; Lord ve Ashworth, 2017; Rouleau ve ark., 2010).

Oksidatif stres, vücutta serbest radikal olarak adlandırılan zararlı moleküllerin (genellikle oksijenli moleküller) artmasıdır. Bunlar, DNA hasarına neden olabilirler ve hücrelerin normal işleyişini bozabilirler. Oksidatif stres, bir dizi hastalıkla ilişkilendirilmiştir, örneğin kanser, kalp hastalıkları ve nörodejeneratif hastalıklar. PARP1, oksidatif stres ile ilişkilidir çünkü bu tür stres durumları genellikle DNA hasarına neden olur ve bu da PARP1'in aktivasyonunu tetikler. Aktif hale gelen PARP1, ADP-ribozilasyon adı verilen bir süreç ile diğer proteinlere sinyaller gönderir. Bu, hücrenin DNA hasarına yanıt vermesini ve onarım mekanizmalarını harekete

geçirmesini sağlar. Oksidatif stres durumlarında, özellikle ciddi veya uzun süreli durumlarda, PARP1'in aşırı aktivasyonu hücre enerjisini tüketebilir ve hücre ölümüne (nekroz veya apoptozis) neden olabilir. Bu nedenle, PARP1'in düzgün bir şekilde düzenlenmesi ve kontrol edilmesi, oksidatif stresin hücrelere ve doku bütünlüğüne verdiği hasarı yönetme konusunda önemlidir (Andrabi ve ark., 2008).

H2AX, histon H2A'nın bir varyantıdır ve DNA hasarına yanıt olarak ATM, DNA-PKcs veya ATR tarafından fosforile edildiği bilinmektedir, γ H2AX olarak anılmıştır ve iyonlaştırıcı radyasyonun etkisi γ H2AX odak oluşumu iyi bilinmektedir (Keogh ve ark., 2006, Mah ve ark., 2010a). γ H2AX odaklarının oluşumu, UV'ye maruz kalma, metabolik stres ve endojen DNA süreçleri gibi genotoksik etkilere yanıt olarak ortaya çıkabilir. γ H2AX, DNA hasar yanıtında epigenetik modifikasyonlar olarak iyi çalışılmış histon varyantlarından biridir. Ek olarak, γ H2AX, kromatini değiştiren faktörlerin alınması için bir adaptör olarak da işlev görür. Memelilerde, γ H2AX'in yaşlanma ve kanserin bir belirtisi olarak potansiyel uygulaması önerilmiştir (Mah ve ark., 2010a; Mah ve ark., 2010b).

2.1.7. Kimyasal Olarak İndüklenmiş Ülseratif Kolitis Hayvan Modelleri

Ülseratif kolitis hastalığının patogenezi detaylı bir şekilde incelemek, hastalığın mekanizmasını ve yollarını araştırmak, hastalık üzerine ilaçların veya besinlerin etkinliğini değerlendirmek, hastalığı önlemek veya tedavi etmek gibi amaçlar için hastalığın farklı görünümünü veya hastalığı total olarak taklit edebilen hayvan modelleri geliştirilmiştir. Bu amaçla çeşitli kimyasal maddeler ile indüklenebilen modeller veya genetik olarak *knockout*lanmış immunsuprese deney hayvanları ile oluşturulan modeller geliştirilmiştir (do Nascimento ve ark., 2020).

Etanol içinde çözündürülmüş trinitrobenzenesulfonik asitin (TNBS) fare, rat, guinea pig ya da tavşanlara intrarektal uygulaması ilk olarak 1989 yılında geliştirilmiş, bu yolla yangısal bağırsak hastalığı benzeri kolitis oluşturulduğu bildirilmiştir. Modelde diffuz kolon yangısı ile karakterize artmış nötrofil infiltrasyonu, yaygın ülserler ve hiperemi oluşturulabilir. Kısa süreli kullanımı akut yangısal değişiklikler meydana getirirken, 2 haftadan uzun süreli kullanımda kronik kolitis

oluşturulabilmektedir (do Nascimento ve ark., 2020). TNBS modeli kullanılarak patolojik görünüm olarak ülseratif kolitise en benzer model oluşturuyor olmasına karşın yangısal infiltrasyon ve immunofizyolojik davranış olarak model Crohn hastalığına benzer.

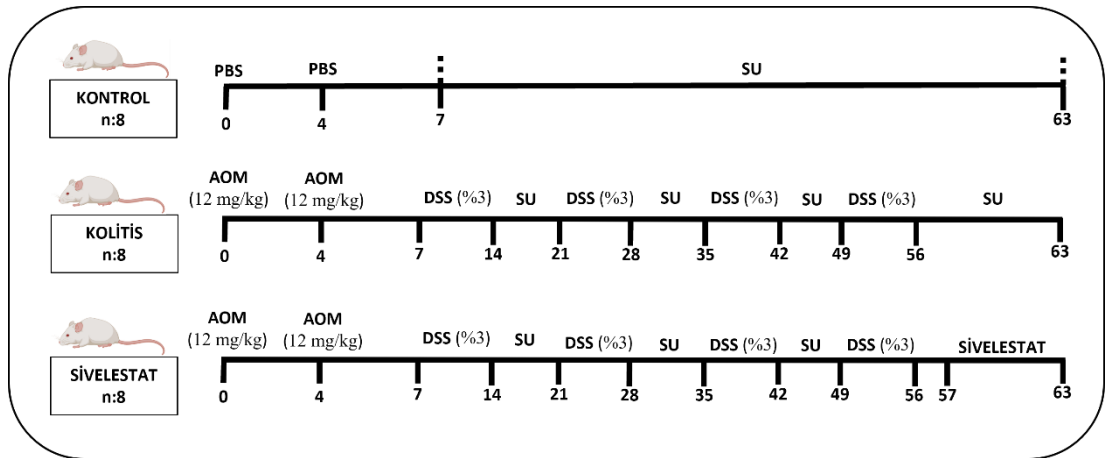
Oksazolon (OXA) kolitis oluşturma amaçlı ilk olarak Boirivant ve arkadaşları tarafından 1998 yılında kullanılmıştır. OXA kolon mukozasında hemoraji, kript apseleri, goblet hücrelerinde deplesyon, bağırsak duvarında kalınlaşma ve submukozada sınırlı kalan yangısal infiltrasyon oluşturmaktadır. Th-1 yanıtı açısından Crohn hastalığından daha çok ülseratif kolitisi taklit eden model negatif bir yön olarak sadece distal kolona etkiyebilmektedir ayrıca mortalite oranı doza bağlı olarak %40'a varabilir (do Nascimento ve ark., 2020).

Dekstran sodyum sülfatla (DSS) oluşturulan ülseratif kolitis modeli en sık kullanılan hayvan modelidir. Kullanılan maddeye karşı oluşan yangısal yanıt açısından insanda görülen hastalığa en benzer yapıyı bu model oluşturmaktadır. Bu reaktifin yaygın olarak bulunabilmesi, uygulamasının pratik oluşu, uygun maliyetli olması ve UC'nin bazı klinik, histolojik ve immünofizyolojik yönlerini taklit edebilme yeteneği nedeniyle kemirgenlerde ülseratif kolitis indüksiyonu için dünyada en yaygın kullanılan kimyasaldır. DSS'in olası mekanizması epitelyal bariyerde hasar oluşturmaları ve bu yolla bağırsak permeabilitesini artıran erozyonlar meydana getirmesi şeklindedir. İçme suyuna %1-5 DSS uygulanması, insanlardaki ülseratif kolitis hastalığına benzeyen ve ishal, ülserasyonlar, intestinal yangı, vücut ağırlığı kaybı ve kolon uzunluğunun kısalması ile karakterize şiddetli bir kolitis oluşumuna yol açar. DSS, kalın bağırsağın epitel tabakasına zarar vererek proinflatuvar faktörlerin dokuya yayılmasına izin verir. DSS konsantrasyonlarındaki ve uygulama sıklığındaki farklılıklar, akut ve kronik intestinal inflamasyonun modellenmesine olanak tanır. DSS, farklı molekül ağırlıklarında üretilebilir ve farklı molekül ağırlığında etkilediği kolon segmenti ve etki şekli farklı olmaktadır. Hastalığın ilerlemesi insanlardakiyle birçok benzerlik gösterse de bu fare modelinde hastalığın gelişimine T ve B lenfositlerin katkıda bulunmaması gibi farklılıklar vardır (do Nascimento ve ark., 2020; Herrero-Cervera ve ark., 2022).

3. GEREÇ ve YÖNTEM

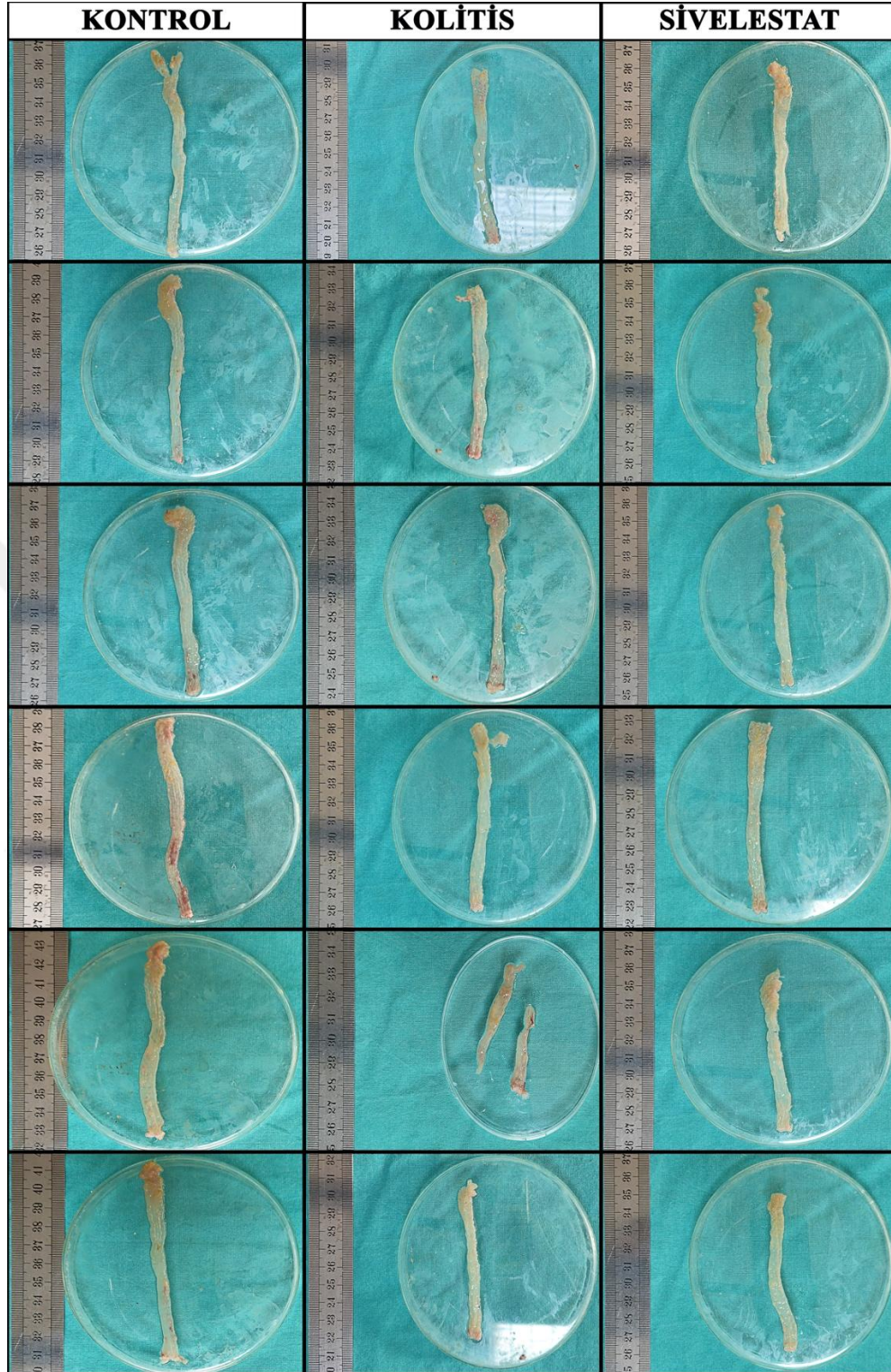
3.1. Deney Modeli

Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan alınan 8.12.2024 tarih ve 1397 numaralı izinle tezin deneysel modeli için 3 grup halinde toplam 24 adet 10 ± 2 haftalık yaştaki Balb/c ırkı fareler kullanıldı. Modelin CAC öncesi ülseratif kolitis hastalığını taklit etmesi ve kolorektal kanserde oluşan ilgili DNA hasarlarının hayvanlarda oluşturulabilmesi için kolitis ve kolitis+sivelestat gruplarına Parang ve arkadaşlarının (2016) AOM/DSS modeli modifiye edilerek sıfırinci ve dördüncü günlerde, her bir uygulama 12 mg/kg olacak şekilde 2 kez, 1mg/ml steril PBS ile sulandırılmış azoksimetan enjeksiyonu intraperitoneal olarak uygulandı. Aynı günlerde kontrol (K) grubu hayvanlarına da ağırlıklarına uygun olarak hesaplanan hacimde steril PBS enjeksiyonu gerçekleştirildi. Yedinci günden itibaren toplamda 4 tur olacak şekilde aralarında birer haftalık dinlenme periyodu bırakılarak %3 oranında içme suyu ile sulandırılmış 5 kDa molekül ağırlığındaki DSS 7 gün süreyle, toplamda 28 gün boyunca ad libitum içme suyu olarak verildi. Dinlenme periyotlarında suluklar yıkanarak normal içme suyu hayvanlara bu sürelerde ad libitum olarak 7 gün süreyle, toplamda 21 gün verildi. Son DSS periyodunun bitimi ve normal su verilen dinlenme periyoduna başlanılan elli altıncı günden itibaren steril PBS ile 1 mg/ml dozunda sulandırılan Sivelestat hayvanlara 5 gün boyunca günde 1 kez 50 mg/kg miktarında verildi.



Şekil 3.1. Deneyde uygulanan modelin şematik olarak gösterimi.

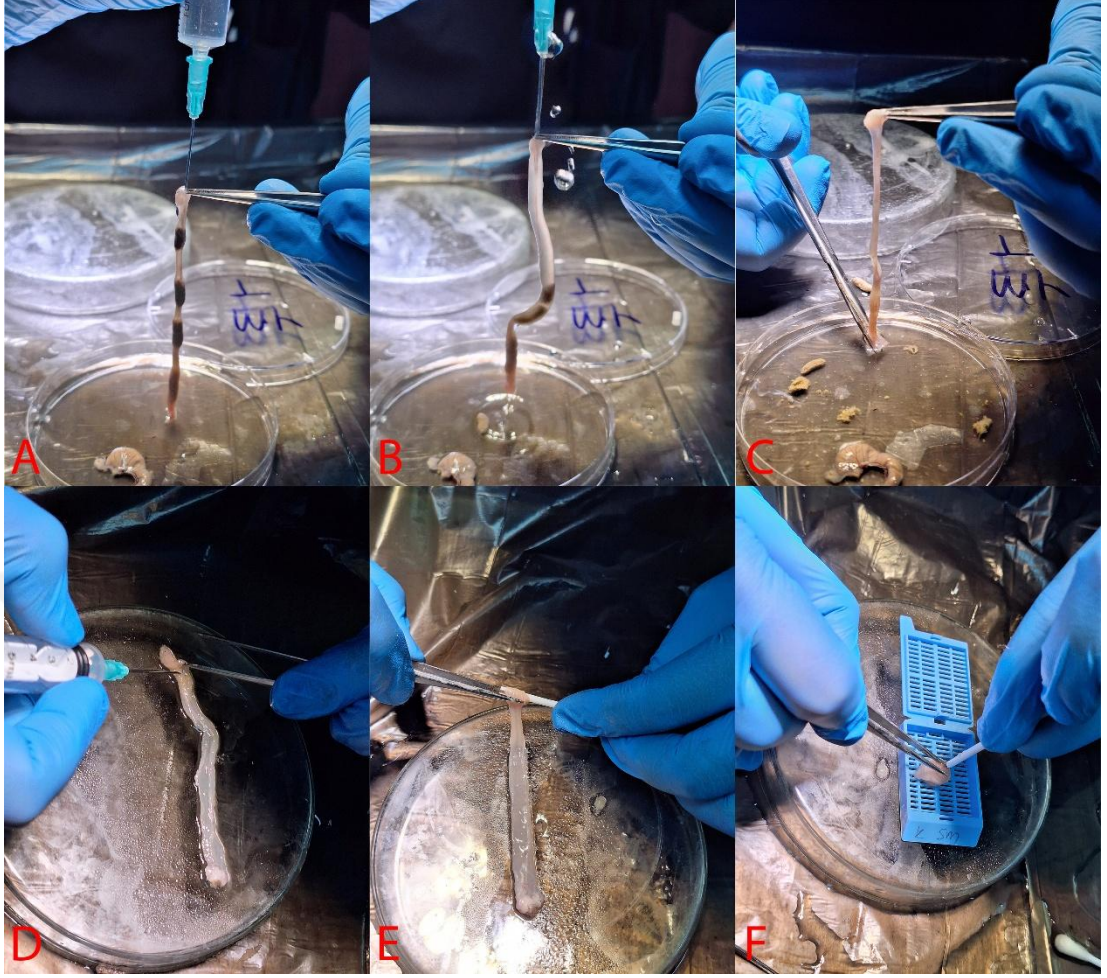
Fareler, 12 saatlik aydınlık/karanlık döngüsü olan, kontrollü uygun sıcaklık (21-23°C) ve nem koşullarında (%55-65), konvansiyonel bir ortamda barındırıldı. Gıda ve su sürekli olarak sağlandı ve farelerin herhangi bir rahatsızlık veya hastalık belirtisi gösterip göstermediği düzenli olarak kontrol edildi. İçme suyu günlük olarak tazelandı ve yem tüketimi her 1-3 gün aralığında kontrol edildi. Yem kapları ve su şişeleri düzenli olarak temizlendi ve azami hijyenik koşullar sağlandı. Fareler, genel sağlık, vücut ağırlığı ve anormal davranış veya rahatsızlık belirtileri açısından günlük olarak incelendi. Toksik belirtiler letarji, zayıflık, kilo kaybı ve dehidrasyon açısından takip edildi. Bunun yanında dışkı, idrar, deri, tüyler, gözler, kulaklar, kuyruk renkleri ve solunum gibi fiziksel belirtiler de kontrol edildi. Anormal dışkı (örneğin, kanlı, kanlı-köpüklü, anüse bulaşacak kıvamda veya sulu dışkı), idrar renginde değişiklik, deri ve tüylerde yıpranma/yapağımsı bir görünüm, kulaklarda kıvrılma/ısıruk izi/rengi değişikliği, gözlerde akıntı veya şişme ve hızlı veya zorlu solunum vb. herhangi bir fare ağır rahatsızlık belirtileri göstermesi veya başlangıç vücut ağırlığının %20'sinden fazla kilo kaybı yaşaması durumunda acı çekmelerini en aza indirmek için insani yöntemlerle ötenazi uygulanması kararlaştırıldı. Farelere daha önce de belirtildiği gibi atanan tedavi gruplarına göre çalışma ilaçları intraperitoneal olarak uygulandı.



Şekil 3.2. Deney hayvanlarından alınan kolon dokularının makroskobik görünümü

Deney modeli ve enjeksiyonlar tamamlandıktan sonra fareler ketamin (90 mg/kg; i.p.) ve ksilazin (10 mg/kg; i.p.) uygulanarak anestezi altına alındı ve eksanguinasyon yöntemi ile insancıl bir şekilde ötenazi edildi. Eksanguinasyon

sırasında alınan kanlar sarı kapaklı serum tüplerine konuldu; farelerin kolon dokuları ise histopatolojik ve biyokimyasal değerlendirmeler için ayrı ayrı toplandı. Sonrasında kolonun kayıpsız bir şekilde kolekte edilebilmesi için kolon, rektumu ve sekumu içerecek şekilde alındı. Bağırsak içindeki dışkının temizlenmesi için peristaltik yönü doğrultusunda, ucuna fare gavaj aparatı takılmış bir enjektörle bağırsak lümenine FTS enjekte edildi. Lümen içerisindeki dışkının yeterince temizlendiğinden emin olduğunda bağırsak lümeni mezenterial sınır kılavuz alınarak longitudinal bir biçimde diseke edildi. Lümen açıldıktan sonra olabildiğince rektum ve sekum bitimine yakın alanlar kolondan uzaklaştırıldı ve tüm kolon dokuları lümenleri yukarıya gelecek şekilde dizilerek fotoğraflandı (Şekil 3.1.). Biyokimyasal analizler için tüm gruplardaki farelerin her bir kolon dokusunun yaklaşık 0,5 gramı longitudinal olarak ayrıldı. Kalan kolon dokusunda, tüm kolon segmentlerinin detaylı olarak incelenebilmesi için “Swiss Rolling” tekniği kullanıldı. Bunun için FTS ile yıkanmış ve longitudinal diseke edilmiş kolon dokusu, pamuklu ucu kesilmiş bir swab çubuğunun kesik ucu tarafına, distal ucundan başlayarak proksimal sonuna kadar lümen dışarıya bakacak, doku katları birbiri üzerinden kaymayacak ve çok sıkı olmamasına dikkat edilecek bir biçimde sarıldı (Şekil 3.3).



Şekil.3.3. Swiss Rolling tekniğinin uygulanması. A ve B kolon lümeninin yıkanması, C Kolon lümeninin longitudinal olarak açılması, D lümenin roll için düzgün biçimde yayılması, E Swiss Rolling, F dokunun kasete aktarılması.

Doku takip kaseti içinde swiss roll yapılan dokuların gevşememesini sağlamak için sarılı halde iken 10 dakika boyunca %10'luk tamponlu formaldehitte bekletildi, sonrasında swab çubuğundan dikkatli bir biçimde kaydırılarak doku takip kasetlerine alındı ve %10'luk tamponlu formaldehitte 24 saat tesbit edildi. Süre sonunda tam otomatik doku takip cihazında (Leica ASP300S, Leica Microsystems, Wetzlar, Almanya) dokuların takibi yapıldı, işlem sonunda metal basemoldlar yardımıyla parafine gömülerek bloklandı. Doku bloklarından histopatolojik değerlendirme ve immunohistokimyasal boyama için mikrotom (Leica Rotary Microtome RM2155, Leica Microsystems, Wetzlar, Almanya) ile 4µm kalınlığında kesitler sırasıyla normal ve polilizinli lamlara alındı.

3.2. Patolojik Analizler

3.2.1. Hematoksilen & Eozin Boyaması

Normal lamlara alınan kesitler 70°C'lik etüvde 1 saat boyunca bekletilerek dokulardaki parafinin yumuşaması sağlandı, sonrasında dört adet seri ksilolden 15'er dakika geçirilerek deparafinize edildi. Dokulardaki ksilolün uzaklaştırılması için sırasıyla absölü, %70 ve %50'lik alkollerden geçirildi, dokulara suyunu geri kazandırmak için distile suda 10 dakika bekletilerek dokuların rehidrasyonu sağlandı. Hematoksilen & Eozin boyama protokolü olarak Harris Hematoksilen kullanıldı (Presnell ve Schreiber, 1997). Bunun için rehidrasyonu sağlanan dokular 3 dakika boyunca Harris Hematoksilen'de tutuldu, sonrasında akar su altında kolorizasyonu sağlandı. Eozin işlemi için amonyaklı sudan geçirildi ve 1 dakika Eozin'le boyandı. Fazla eozin çeşme suyunda akıtıldıktan sonra düşük dereceli alkollerden yüksek dereceli alkollere en sonunda absölü alkolden geçirilerek dokular tekrar dehidre edildi. Ksilolle parlatıldıktan sonra entellan kullanılarak lamelle kapatıldı.

3.2.2. Histopatolojik Analizler

Tüm gruptaki kolon dokuları Bleich ve arkadaşlarının 2004 yılında bildirdikleri TJJL skorlaması kullanılarak semikantitatif olarak yapıldı (Bleich ve ark., 2004). Buna göre kolon proksimal mid ve distal kolon olarak ayrı ayrı değerlendirildi ve değerlendirme 4 genel kriter kullanılarak gerçekleştirildi. Tüm kesitler; şiddet, hiperplazi derecesi, ülserasyon derecesi ve etkilenen alanın segmente göre yüzdesi kriterleri göz önünde bulundurularak değerlendirildi.

Lezyonların şiddeti; normal (0), etkilenen alan küçük, fokal ya da multifokal alanlar halinde ve yangı lamina propriada sınırlı kalmışsa hafif (1), lezyonlar multifokal ya da diffuz lokal alanlar şeklinde ve yangı submukozaya kadar uzanmışsa orta (2), ülserlerle kaplı geniş alanlar mevcutsa şiddetli (3) olarak değerlendirildi.

Hiperplazi derecesi; normal (0), morfolojik olarak normal yapıdaki epitel bitişindeki veya kontrol dokusunun mukozasına göre 2-3 kat kalınlaşmış ise hafif (1), lamina epitelyalis 2-3 kat kalınlaşmış ancak kript hücreleri hiperkromatik, goblet

hücre sayısı azalmış, az sayıda liber kühn kriptleri dağılmış veya ağaç benzeri görünüme sahip ise orta (2), belirgin şekilde kalınlaşmış epitelyum ile birlikte hücrelerde belirgin hiperkromazi, az sayıda ya da yok olmuş goblet hücreleri, yüksek mitotik indekse sahip kript hücreleri, fazla sayıda ağaç benzeri görünüme sahip kript varsa şiddetli (3) olarak değerlendirildi.

Ülserasyon; ülser yoksa (0), 1-2 adet ülser var ve ülserlerin boyutu en fazla 20 kript kadarsa (1), 1-4 adet ülser var ve ülserlerin boyutu 20-40 kript kadarsa (2), önceki kriterden daha şiddetli en az 1 ülser varsa (3) olarak skorlandı.

Etkilenen alanın segmente göre yüzdesi; %0 (0), %10-30 (1), %40-70 (2), %70'ten fazla ise (3) olarak skorlandı.

Tüm skorlamalar istatistiksel değerlendirmede kullanılmak üzere not edildi.

3.2.3. İmmunohistokimyasal Boyamalar

Parafin bloklardan mikrotom (Leica RM 2125) yardımı ile polilizinli lamalar (Menzel Polysine Slides, J2800AMNZ) üzerine 4 µm kalınlığında kesitler alındı. Dokudaki parafinin yumuşamasını sağlamak için 70°C'lik etüvde 1 saat boyunca bekletildi, sonrasında dört adet seri ksilolden 15'er dakika geçirilerek dokular deparafinize edildi. Dokulardaki ksilolün uzaklaştırılması için sırasıyla absölü, %70 ve %50'lik alkollerden geçirildi, dokulara suyunu geri kazandırmak için distile suda 10 dakika bekletilerek dokuların rehidrasyonu sağlandı. Olası antijen maskelenmelerini engellemek amacıyla dokular antigen retrieval işlemine tabii tutuldu. Antigen retrieval için 10 kat sulandırılmış sitrat tampon (Citrata Buffer Heat-Induced Epitope Retrieval pH:6.0 Thermo Scientific: AP-9003-999) ile 121°C'de 15 dakika otoklavlandı. Sonrasında 20-30 dakika soğumaya bırakılan lamalar PBS (Phosphate buffered saline Sigma: P4417) solüsyonunda 15 dakika yıkandı. Kullanılan primer antikor hostuna uygun sekonder kit seçilerek (ImmPRESS® HRP Goat Anti-Rat IgG, Mouse adsorbed Polymer Detection Kit, Peroxidase, MP-7444 ya da ImmPRESS® Excel Amplified Polymer Staining Kit, Anti-Rabbit IgG, Peroxidase, MP-7601, VectorLabs, CA, ABD) kit protokolüne göre immunohistokimyasal boyama gerçekleştirildi. Soğuyan kesitlere eksojen proteinlerin bloklanması için bloxall ile

muamele edildi ve 10 dakika bekletildi, süre sonunda 5 dakika boyunca PBS ile yıkandı. Primer antikorun nonspesifik bağlanmasını engellemek amacıyla at serumu (Anti-Rabbit IgG kiti için) veya keçi serumu (Goat Anti-Rat IgG kiti için) kullanıldı, 20 dakika bekletildi. Süre sonunda fazla serum lamlardan uzaklaştırıldı, Tablo 3.1.'de verilen sulandırma oranlarında dilüe edilen antikorlar kesitlere uygulanarak 1 gece boyunca +4°C'de bekletildi. Sonrasında 5 dakika boyunca PBS ile yıkanan dokulara sekonder antikorun bağlanmasını artırmak amacıyla (Anti-Rabbit IgG kiti için) yükseltgeyici antikor damlatılarak 15 dakika inkübe edildi. Süre sonunda tekrar 5 dakika boyunca PBS ile yıkandı. Sekonder antikor (her kite uygun olan non-biotin horseradish peroxidase) uygulanarak 30 dakika bekletildi. Sonrasında kesitler iki defa 5'er dakika PBS ile yıkanıp, 3-3 diaminobenzidin (DAB) kullanılarak ışık mikroskobu vasıtasıyla kontrollü boyanma sağlandı. DAB reaksiyonunu durdurmak ve DAB fazlasını uzaklaştırmak amacıyla distile su ile yıkandı. Arka plan boyaması için 10 saniye Mayer Hematoksilen ile muamele edildi. Süre sonunda çeşme suyunda kolorizasyonu yapıldıktan sonra ksilolle parlatılıp entellan kullanılarak lamelle kapatıldı. Kullanılan primer antikorlar, marka, kod ve dilüsyon listesi Tablo 3.1.'de verilmiştir.

Tablo 3.1. İmmunohistokimyada kullanılan antikorlar.

Primer antikor	Marka	Kod	Sulandırma	Host
NRF2	PTG	ptg16396	1:200	Rabbit
H2AX	PTG	ptg10856	1:500	Rabbit
PARP1	PTG	ptg13371	1:200	Rabbit
8OHdG	Bioss	bs1278r	1:200	Rabbit
4HNE	Bioss	bs6313r	1:200	Rabbit
TNF α	Bioss	bs10802	1:300	Rabbit
Ly6G	Cell signaling	19003	1:600	Rabbit
ELA2 (NE)	RD	Nb100-2284	5 μ g/mL	Rat
γ H2AX	BT Lab	BT-AP09928	1:400	Rabbit
COX-2	PTG	ptg27308	1:200	Rabbit

3.2.4. İmmunohistokimyasal Ekspresyonların Değerlendirilmesi

Kolon dokularının immunohistokimyasal ekspresyonlarının değerlendirmesinin yapılması amacıyla kantitatif verilerin toplanabilmesi için; her bir farenin her bir kolon segmentlerinden ışık mikroskobu altında (Carl Zeiss Axioscope 5, 07745 Jena, Almanya) x20'lik büyütmede 3 farklı alanın mikrofotoğrafı alındı. Her bir fotoğraftan kolonun tüm katmanlarını içerecek şekilde 100.000 μm^2 'lik alanlar QuPath 0.5.1 (The Queen's University of Belfast, Northern Ireland) programı kullanılarak değerlendirildi. Değerlendirme sonunda her alanın histo (H) skoru istatistiksel analizlerde kullanılmak için toplandı.

Ly6G ve NE immunohistokimyasal ekspresyonlarının skorlaması için kolon dokusunda rastgele 5 farklı 100.000 μm^2 'lik alan seçildi ve pozitiflik gösteren hücreler sayıldı. Her μm^2 alan başına düşen pozitif hücre ile toplam hücre sayısı ve pozitif hücrelerin belirlenen alandaki toplam hücrelere olan yüzdesi QuPath 0.5.1 programı ile belirlendi. Elde edilen sayısal verilere göre istatistiksel analizler gerçekleştirildi.

3.3. Biyokimyasal Analizler

Biyokimyasal analizler için alınan kolon dokusu örnekleri, %0,9'luk NaCl ile yıkandıktan sonra kurutulup, analiz zamanına kadar -20 °C'de saklandı. Doku örnekleri PBS (0.05 mol/l, pH 7.4) içinde 1/10 oranında sulandırılarak homojenize (Ultra Turrax Type T25-B, IKA Labortechnik, Germany) edildi. Santrifüj sonrası elde edilen süpernatantta analizler gerçekleştirildi. Dokularda antioksidan ve oksidan parametreler ölçülerek oksidatif stres durumu değerlendirildi. Bu amaçla; SOD, MDA ve GSH aktiviteleri belirlendi. SOD aktivitesi Sun ve ark. (1988), GSH Sedlak ve Lindsay (1968), MDA ölçümü Yoshioka ve ark. (1979) tarafından bildirilen yöntemlerle ölçüldü.

3.4. İstatistiksel Değerlendirme

Grupların istatistiksel değerlendirilmesi ve grafiklerin çizimi GraphPad Prism 10.1.0 (GraphPad Software Boston, MA, ABD) programında, korelasyon testleri ise Jamovi 2.4.8 (The Jamovi Project, Sydney, Avustralya), korelasyon ısı grafikleri ise yine Graphpad kullanılarak elde edildi. Shapiro-Wilk testi ile gruplardaki veri setinin

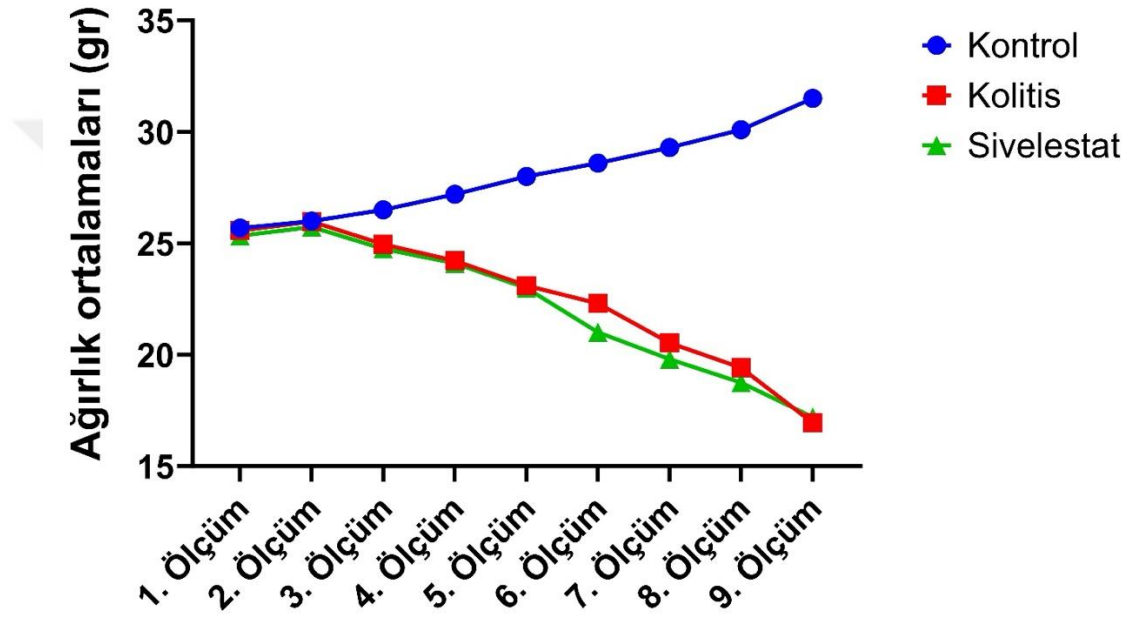
normalitesi değerlendirildi. Shapiro-Wilk testi sonucuna göre normal dağılım gösteren verilerde Bartlett's testi ile grupların varyansının homojenliğine bakıldı ve P değeri 0,05'ten büyük çıkması sonucu varyansların homojen olduğu kabul edildi. Gruplar homojenlik ve normal dağılım göstermesi sonrası gruplar arasında anlamlı bir farkın olup olmadığını değerlendirmek için One-Way Anova testi kullanıldı. Gruplar arasındaki p değerleri *:0,01≤p<0,05, **:0,001≤p<0,01 ve ***: p<0,001 durumlarında istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Verilerin normal dağılım göstermemesi durumunda Kruskal-Wallis testi uygulandı. Yine aynı şekilde gruplar arasındaki p değerleri *:0,01≤p<0,05, **:0,001≤p<0,01 ve ***: p<0,001 durumlarında istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

Korelasyon analizlerinin gerçekleştirilmesi amacıyla kullanılacak veri setleri; immünohistokimyasal değerlendirmeler sonucunda elde edilen H-skorları, kolon dokusunun distal (Dhskor), mid (Mhskor), proksimal (Phskor) segmentlerinden ayrı ayrı ve ayrıca tüm segmentlerin ortalaması alınarak (total H-skor; Thskor) analiz edildi. Her bir segmentte ölçülen biyobelirteçler (γ H2AX, H2AX, PARP1, 8-OHdG, NRF2, 4-HNE, TNF- α ve COX2) arasındaki ilişki Spearman sıra korelasyon testi kullanılarak değerlendirildi. Korelasyon analizleri, kontrol grubu hariç tutularak, öncelikle yalnızca kolitis oluşturulan grup verileriyle ve ardından sivelestat grubu verileriyle gerçekleştirildi. Böylece kolitisin indüklediği patolojik süreçlerin sivelestat uygulamasıyla değişimleri ele alınmış ve süreçlerin hangi parametreler arasındaki ilişkileri etkilediği ortaya konulmaya çalışıldı. İstatistiksel anlamlılık için p<0,05 eşiği esas alındı, ancak korelasyon gücünün biyolojik yorumlanabilirliği açısından yalnızca p-değeri ile değerlendirilmedi. Spearman korelasyon katsayılarının değerlendirilmesi için veriler “0,00–0,30: Önemsiz, 0,30–0,50: Düşük, 0,50–0,70: Orta, 0,70–0,90: Yüksek, 0,90–1,00: Çok yüksek” şeklinde sınıflandırılarak yorumlandı (Hinkle et al., 2003; Mukaka, 2012). Bu kapsamda, istatistiksel olarak anlamlı olmayan ancak Spearman $\rho \geq 0,30$ olan korelasyonlar da biyolojik anlamlılık taşıyabilecek potansiyel ilişkiler olarak not edildi.

4. BULGULAR

4.1. Canlı Ağırlık Analizi

Hayvanların canlı ağırlıkları 8 hafta boyunca deney başlangıcından itibaren haftada bir kez olmak üzere dokuz kez tartıldı ve canlı ağırlık değişimleri şekil 4.1’de gösterildi.



Şekil 4.1. Hayvanların canlı ağırlık değişimleri

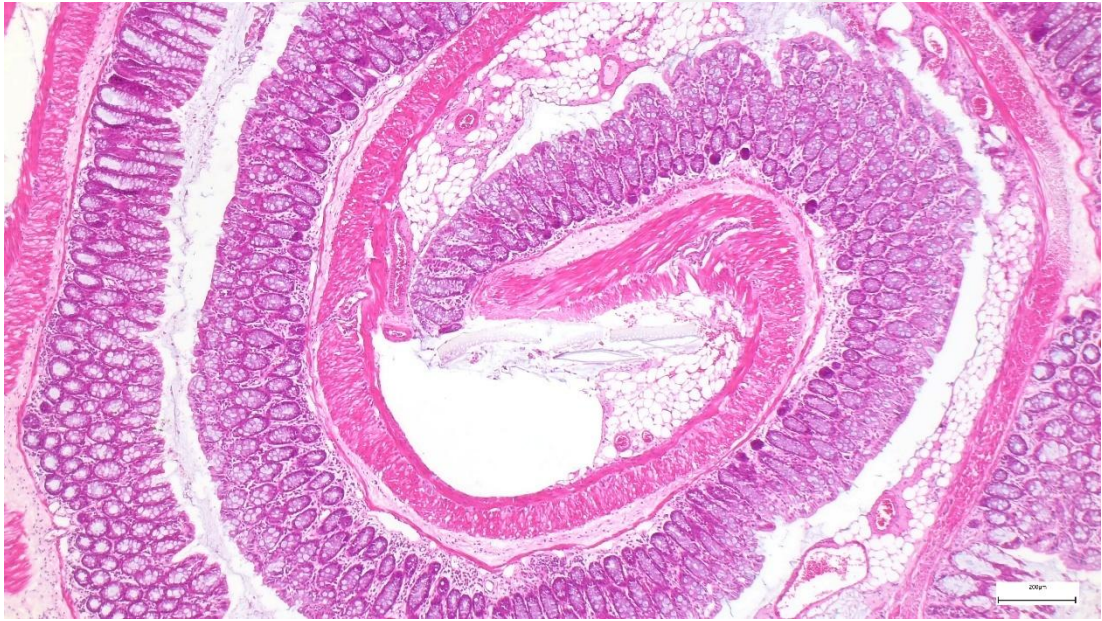
Ölçüm verileri deney modelinin uygulamalarıyla karşılaştırıldığında; DSS uygulamalarıyla eş zamanlı olarak kontrol grubuna kıyasla kolitis ve sivelestat gruplarında belirgin ağırlık kaybının olduğu görüldü. Kontrol grubundaki farelerde ise beklenen fizyolojik ağırlık artışı tespit edildi. Deney uygulamaları sırasında DSS verilen gruplarda bulunan farelerde gözlemlenen bu seviyedeki ağırlık kayıpları ile karşılaştırıldığında, deney hayvanlarının refahı nedeniyle prosedür gereği deney hayvanlarının ötenazisinin yapılacağı ve deneyin sonlandırılacağı daha önceden belirtilmişti. Ancak literatür taramalarında; DSS kullanılan diğer kolitis ve kolorektal kanser deney modellerinde DSS kullanılan gruplarda, bu tezde uygulanan deney modeli sırasında karşılaşılan benzer ağırlık değişimlerinin bildirildiğinin görülmesi sebebiyle, farelerdeki ağırlık değişimleri hayvan refahına azami dikkat gösterilerek

kontrollü bir şekilde göz ardı edildi. Deney uygulamalarına devam edilerek deney modeli planlandığı şekil ve zamanda sonlandırıldı.

4.2. Histopatolojik Bulgular

Farelerin kolon dokularının histopatolojik değerlendirmesi Bleich ve arkadaşlarının 2004 yılında bildirdikleri TJL skorlamasına göre yapıldı. Bu değerlendirme kriterlerine göre tüm kolon üç bölgeye ayrıldı ve bu bölgeler ayrı ayrı değerlendirildi. Histopatolojik değerlendirme esnasında incelenen kesitlerde belirlenen kriterlerde bulunmayan diğer histopatolojik lezyonlar ise bireysel olarak not edildi.

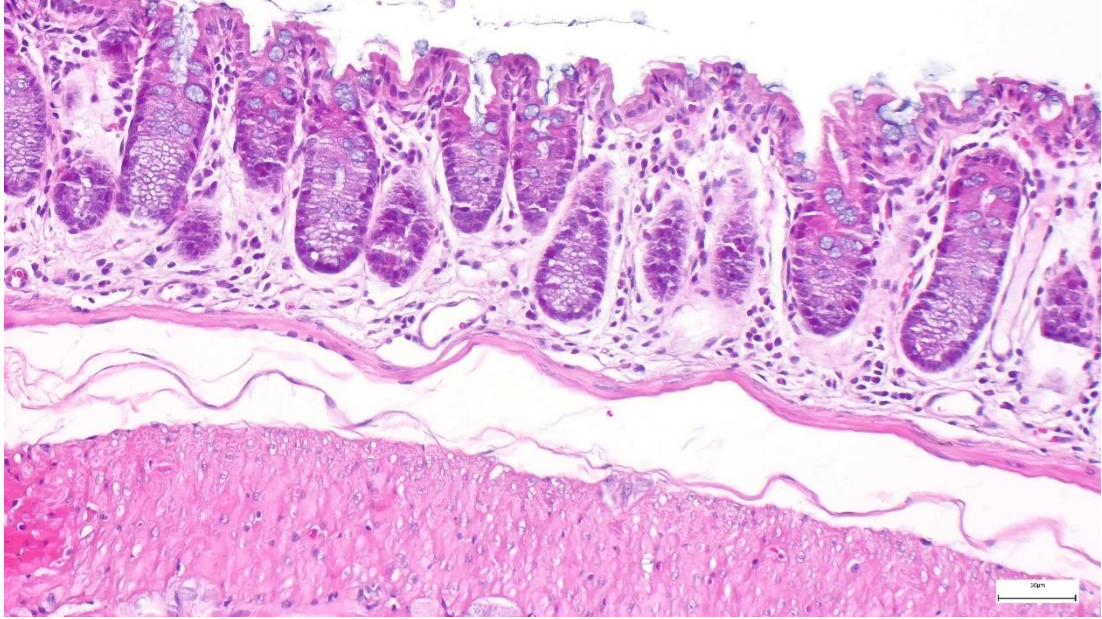
Hematoksilen & Eozin kesitlerin histopatolojik değerlendirmesinde kontrol grubundaki farelerin kolonları genellikle normal doku histolojisi göstermekteydi (Şekil 4.2-4.5).



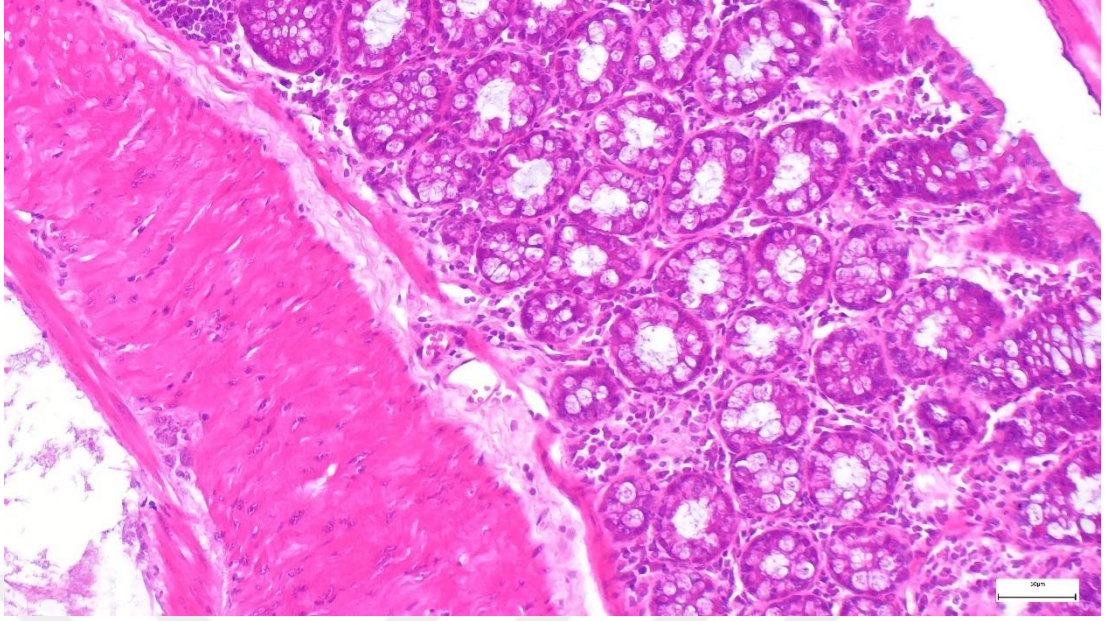
Şekil 4.2. Kontrol grubuna ait kolon dokusu. Alanda daha çok distal ve mid kolon segmentleri görülüyor. Kript boyları, goblet hücreleri ve mukoza kalınlığı normal görünümde. H&E, X4, 200µm Bar.

Kontrol grubunda az sayıdaki farede, özellikle distal kolonlarında teorik olarak beklenen histolojik görünüm yerine görülen hafif derecedeki histopatolojik lezyonlar,

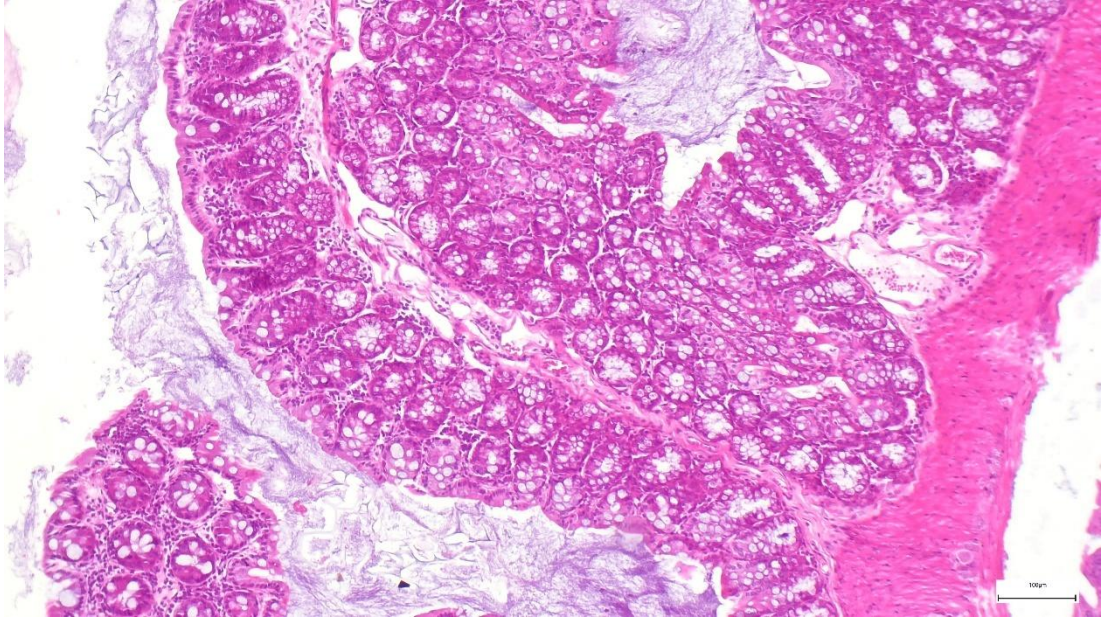
çalışmada kullanılan deney hayvanlarının konvansiyonel şartlarda bakım-besleme koşullarına tabii tutulması nedeniyle “beklenen/olası” durum olarak düşünöldü. Ancak kontrol grubundaki farelerden birkaçında, sadece distal kolon bölgesinde tespit edilen hafif derecede epitelyal hiperplazi ve az sayıda mononökleer ile birlikte polimorfonökleer seriden yangı hücresi gibi TJL kriterleri içinde değerdendirilen bulgular da istatistiksel değerdendirmeye dahil edildi. Belirtilen kriterler dışında kontrol grubundaki bazı farelerin distal kolon bölgelerindeki lenf foliköllerinde hafif derecede reaksiyon varlığı dikkati çekti. Bunların yanında hafif şiddette yangılı olan distal kolon bölgelerinde serozadaki küçük damarlarda hiperemi de göröldü. Kontrol grubundaki hayvanların mid-kolon ve proksimal kolon dokularında dikkate değerdır herhangi bir patolojiye rastlanmadı (Şekil 4.2-4.5).



Şekil 4.3. Kontrol grubuna ait kolonun distal segmenti. Az sayıda yangı hücresi mevcut. H&E, X20, 50µm Bar.



Şekil 4.4. Kontrol grubunda mid segment kolon dokusu. Sağlam olan epitel, goblet hücreleri ve Liberkühn kriptleri görülüyor. Az miktarda yangı hücresi mevcut. H&E, X20, 50µm Bar.

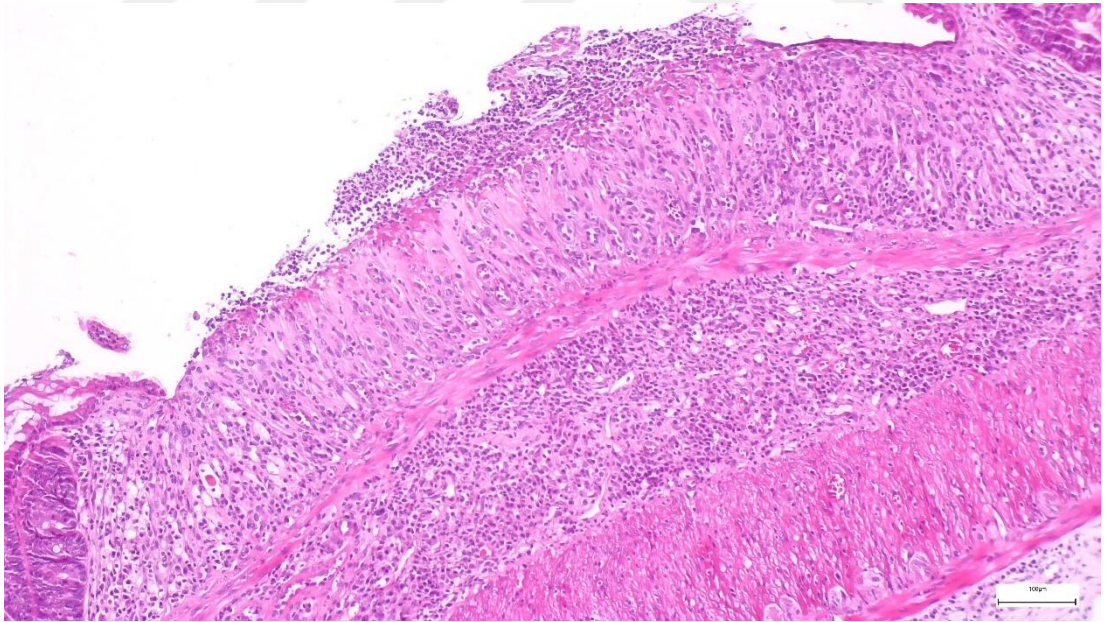


Şekil 4.5. Kontrol grubu proksimal bölgeye ait kolon dokusu. Tüm katmanların görünümü normal histolojik yapıya benzerlik gösteriyor. H&E, X20, 50µm Bar.

Kolitis grubundaki farelerin kolonları incelendiğinde distal kolonda değişken yaygınlıkta ve şiddette ülseratif alanlar dikkati çekti (Şekil 4.6-4.7).



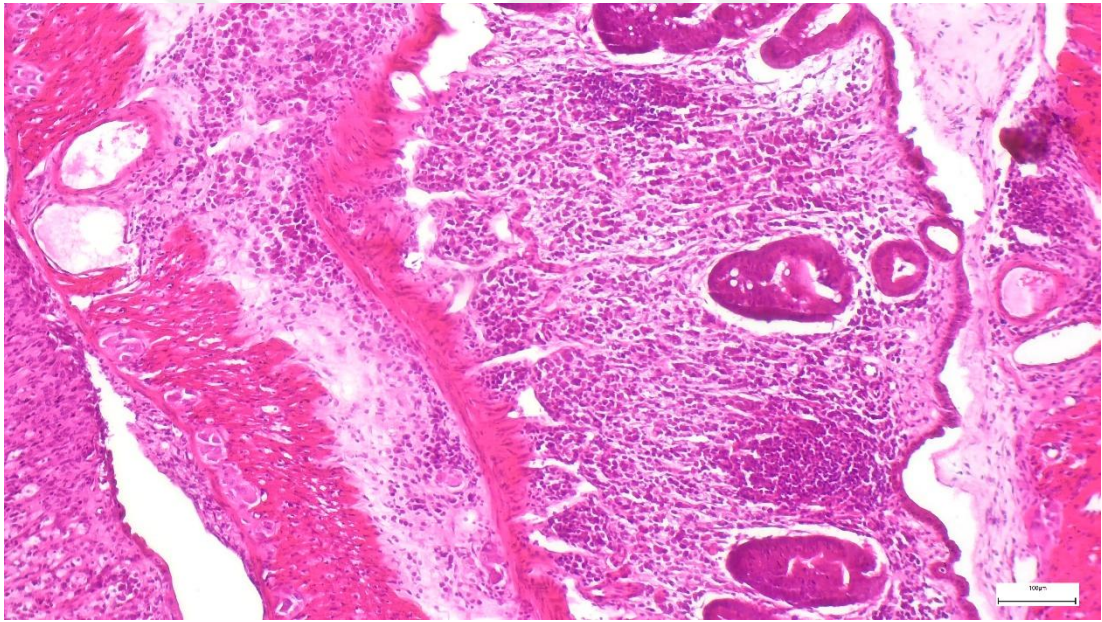
Şekil 4.6. Kolitis grubuna ait bir farenin kolonu. Distal bölgede geniş ülserasyonlar (oklar), Liberkühn kriptlerinin hemen hemen tamamı gözden silinmiş, mukoza yangı nedeniyle kalınlaşmış (yıldız), infiltrasyon serozaya kadar yayılmış (ok başı), H&E, X4, 200μm Bar.



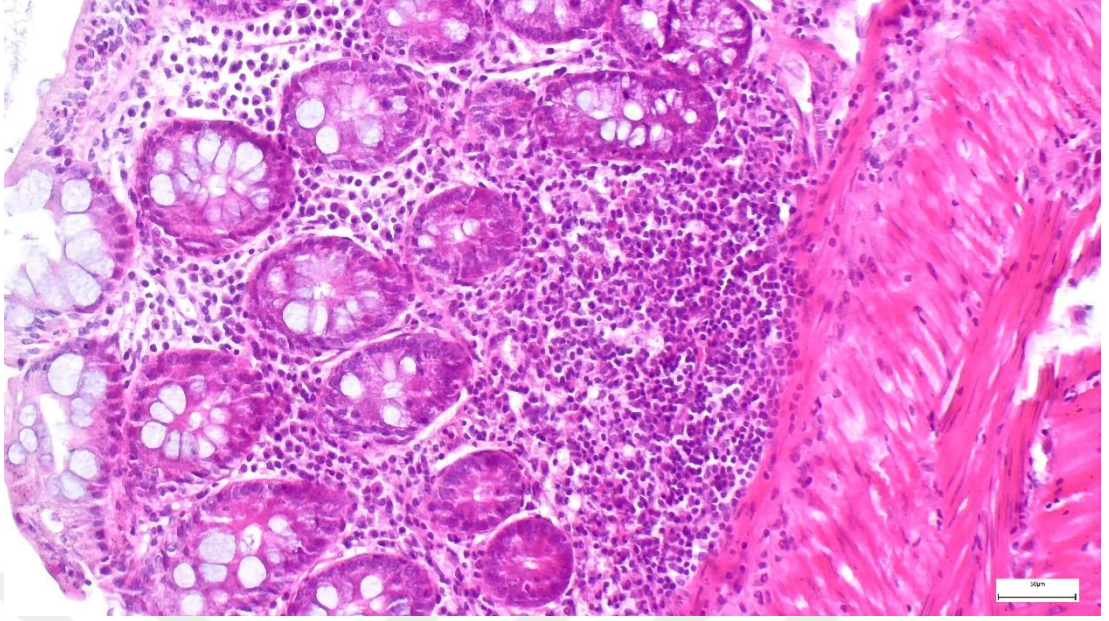
Şekil 4.7. Kolitis grubuna ait kolon dokusunda ülserasyon bölgesi. Mukozada epitel hasarı ve kriptlerin yokluğu. Propria mukoza ve ülserasyonun olduğu alanın lümeninde çok yoğun yangısal hücre infiltrasyonları, hiperemik damarlar. H&E, X10, 100μm Bar.

Ülserasyonun bulunmadığı alanlara bakıldığında, bu alanlardaki epitelyal katmanın goblet hücrelerini çoğunlukla yitirdiği, rektum ile distal kolonun birleştiği

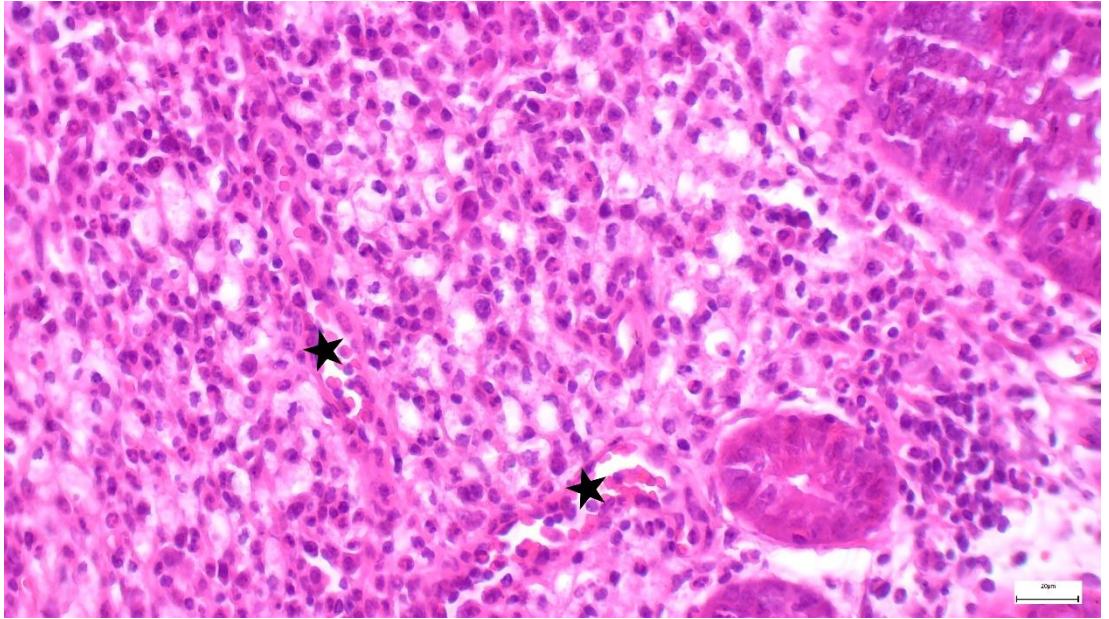
alanlarda epitelyal katmanda polipoid kalınlaşmaların varlığı gözlemlendi. Propria mukozada, yer yer muskuler laminaya ve hatta serozaya kadar inen, orta şiddetten çok şiddetliye değişen derecelerde, mononükleer ve polimorfonükleer seriden yangısal hücre infiltrasyonları mevcuttu. Bazı alanlarda liberkühn kriptlerinin gözden silindiği görüldü. Muskuler katmanda kas demetlerinin aralarına yangısal hücrelerin infiltrasyonu göze çarptı. Genel olarak tüm katmanlardaki kapillarlarda hiperemi ve serozada yer yer ödem varlığına rastlandı. Kolitis grubunun mid-kolon kesitlerine bakıldığında, kriptlerin belirgin şekilde kütleştiği görüldü. Goblet hücrelerinin bazı alanlarda dejenere olduğu ve sayıca azaldığı, bazı alanlarda ise bu hücrelerin hiç bulunmadığı dikkati çekti. Liberkühn kriptlerinin aralarında yoğun hücresellik göze çarptı. Bu infiltrasyonlar nedeniyle mukozanın kalınlaştığı gözlemlendi. Bunlar dışında kolonun diğer katmanlarında değişken derecelerde yangı bulguları mevcuttu (Şekil 4.8-4.12).



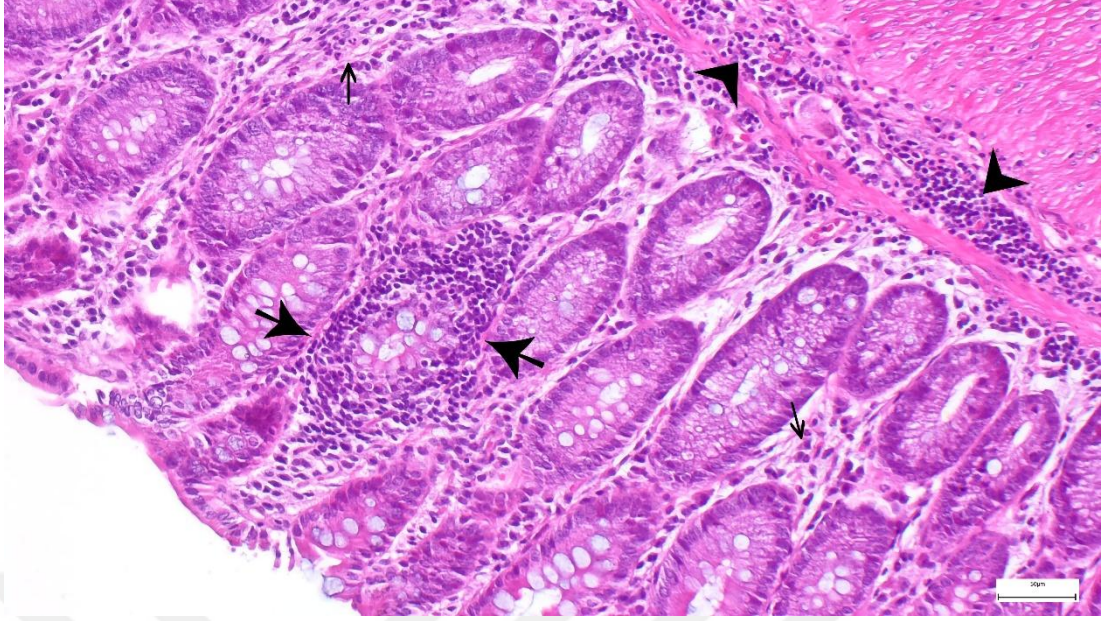
Şekil 4.8. Kolitis grubunda distal kolonda yangısal infiltrasyon. İnfiltrasyon propriadan serozaya kadar yayılmış halde, kas liflerinin arasında yangı hücreleri; tek tek kalan liberkühn kriptleri ve goblet hücreleri görülüyor. H&E, X10, 100µm Bar.



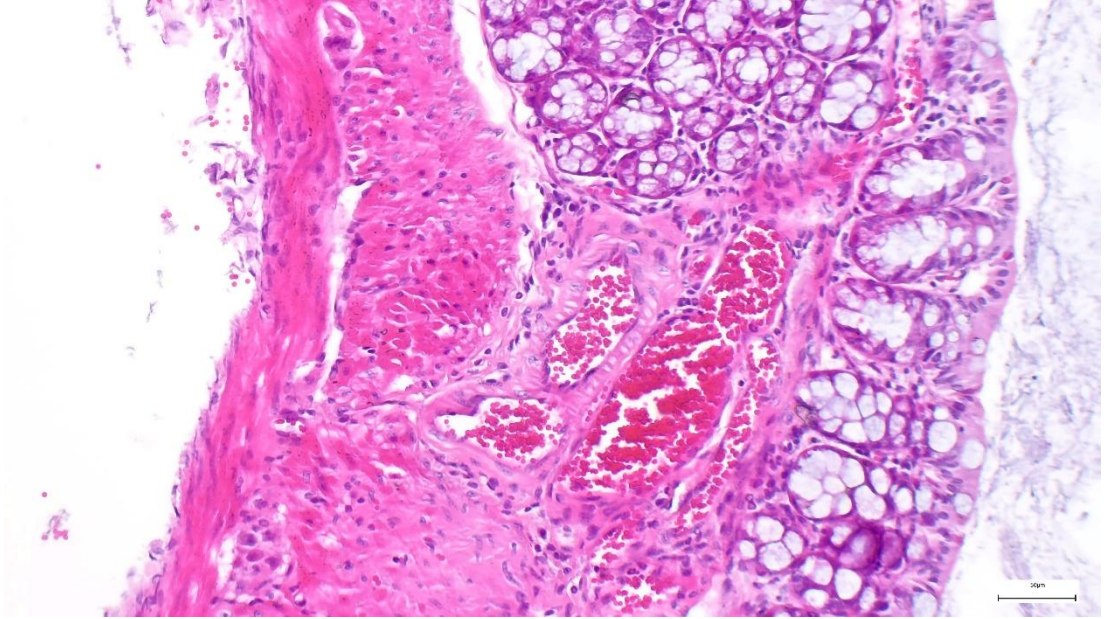
Şekil 4.9. Kolitiste mid kolon dokusunda hücre infiltrasyonu. Goblet hücreleri ve kriptlerin sayısı azalmış. H&E, X20, 50µm Bar.



Şekil 4.10. Kolitisi grubuna ait kolon dokusunda propriada yangısal hücre infiltrasyonu. Nötrofil, lenfosit ve plazma hücrelerinden oluşan yangısal hücreler, hiperemik damar (yıldızlar). H&E, X40, 20µm Bar.



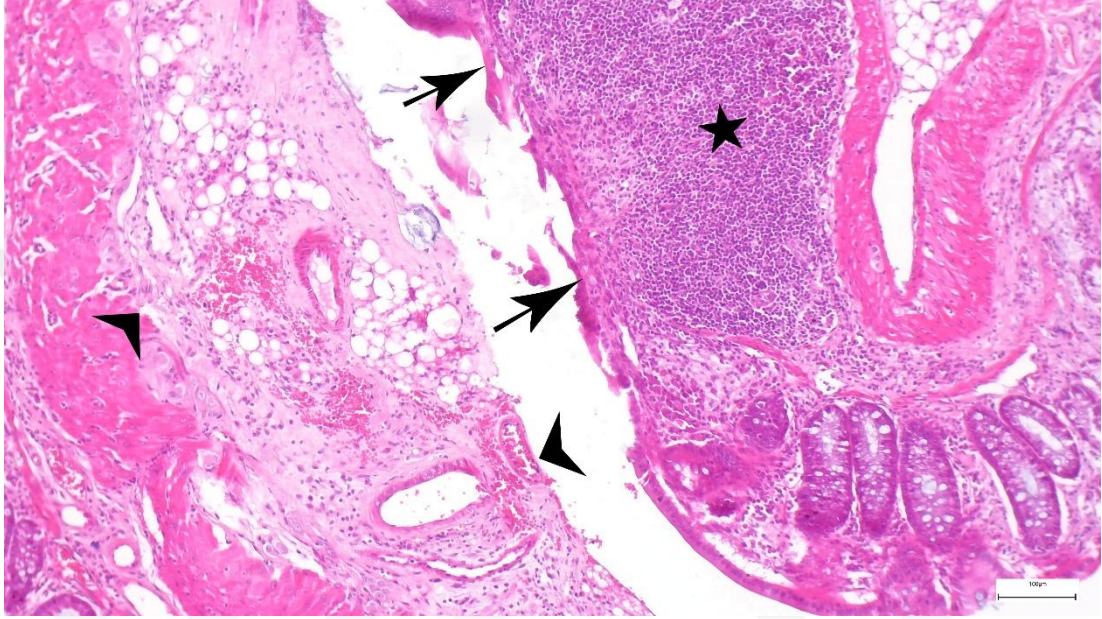
Şekil 4.11. Kolitisli mid kolon. Kript çevresinde (oklar), propriada (ince ok) ve muskuler katmanda (ok başı) yangısal hücre infiltrasyonu, goblet hücre sayısında belirgin azalma. H&E, X20, 50µm Bar.



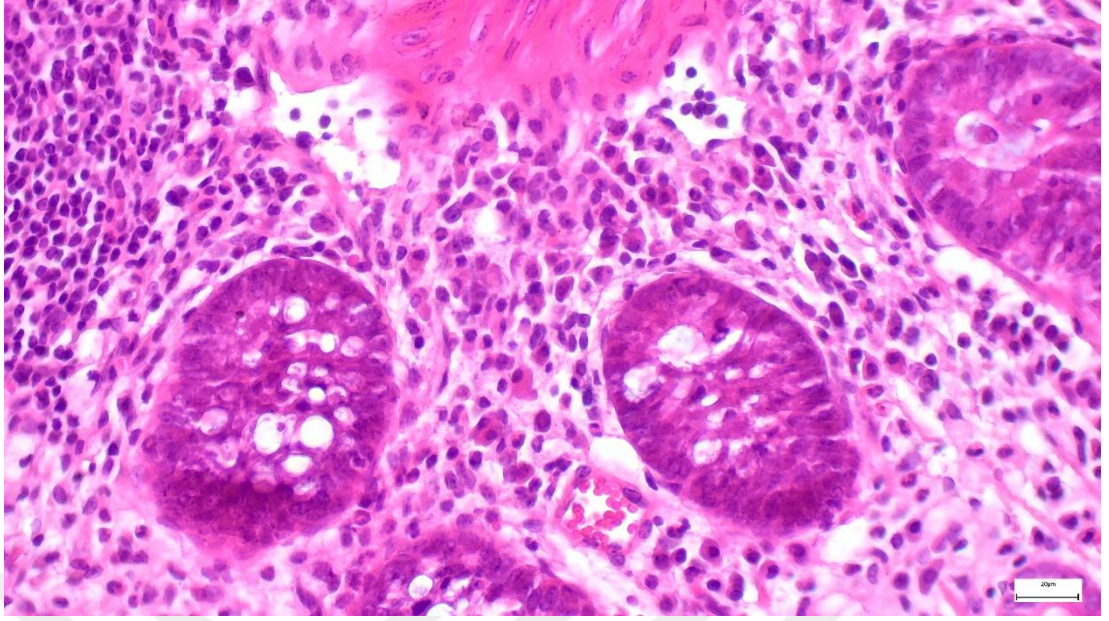
Şekil 4.12. Kolitisli proksimal kolonda yangının görünümü ve damarlarda hiperemi. H&E, X20, 50µm Bar.

Sivelestat grubuna ait dokuların histopatolojik bulgularının, kolitis grubu dokularına benzerlik gösterdiği tespit edildi. Distal kolonda mukozada geniş alanlar halinde ülserasyonlar, goblet hücre sayısında belirgin seviyede azalma, kayda değer

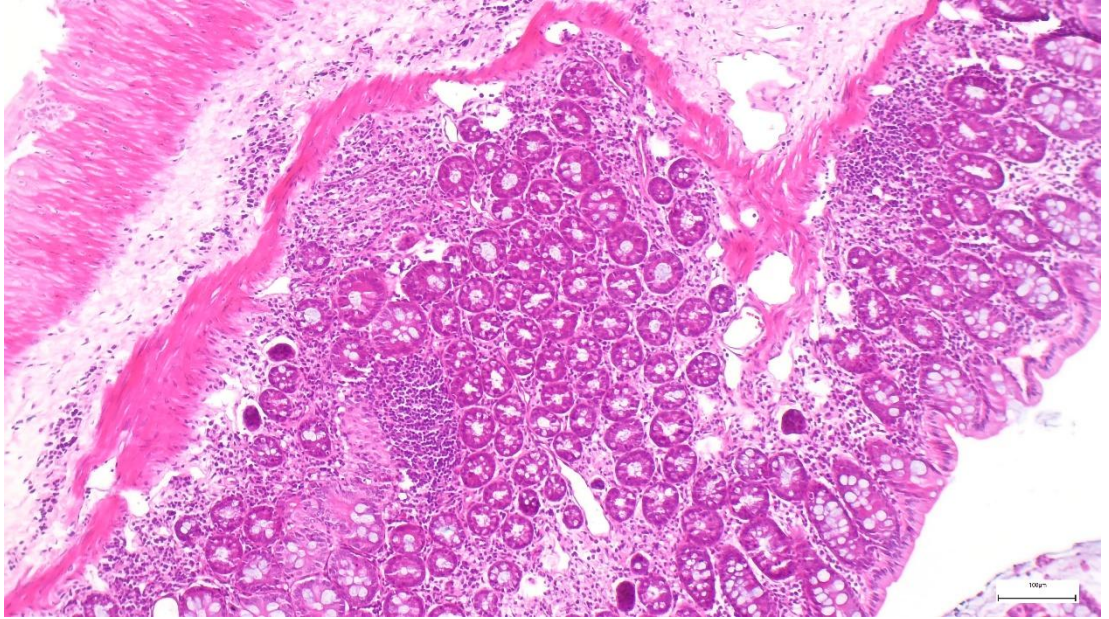
miktarda kriptlerin gözden silinmesi gibi bulgular kolitis grubunda gözlenen bulgular ile paraleldi. Serozadaki damarlarda hiperemi, muskuler katmana kadar yayılan yangısal infiltrasyonlar, mukozadaki belirgin kalınlaşma kolitis grubuyla benzer şiddette lezyonlardı. Distalde görülen patolojilerin şiddeti ve yoğunluğunun proksimal kolona doğru gidildikçe hafiflediği ve seyrekleştiği görüldü (Şekil 4.13-4.16).



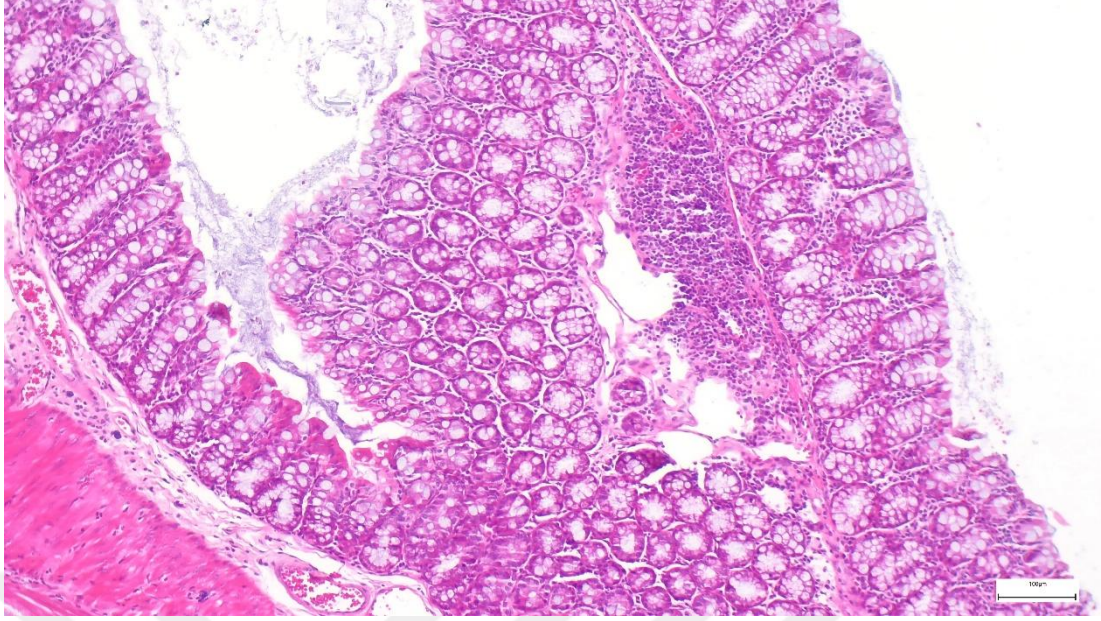
Şekil 4.13. Sivelestat grubuna ait bir kolonda distal segmentte ülserasyon (oklar), yangısal infiltrasyon (yıldız) ve mid kolon serozasında ödemle birlikte hiperemik damarlar (ok başı). H&E, X20, 50µm Bar.



Şekil 4.14. Sivelestat grubu mid kolon dokusunda nötrofil, lenfosit, plazma hücrelerini içeren yangısal hücre infiltrasyonu, goblet hücre sayısında azalma ve hiperemik damar. H&E, X40, 20µm Bar.

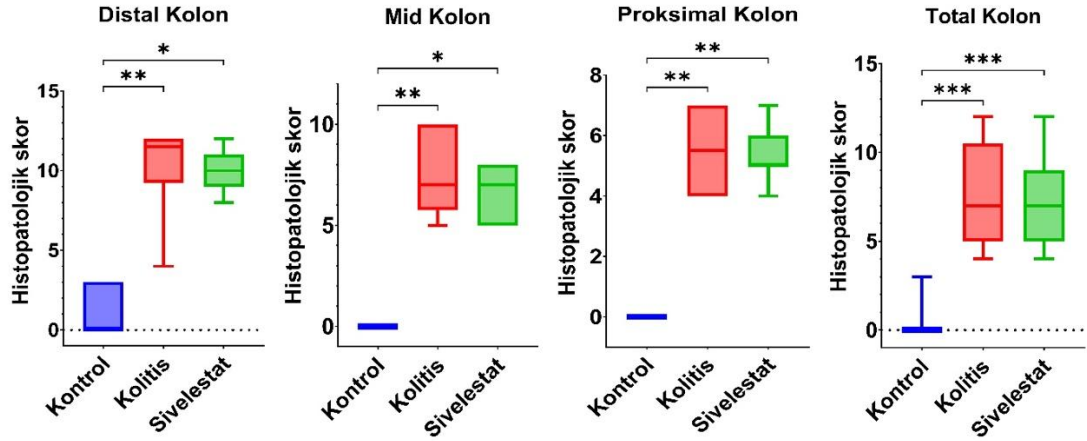


Şekil 4.15. Sivelestat grubu mid kolon dokusunun görünümü. Propriadan muskuler katmana kadar yayılan yangısal infiltrasyon, goblet hücre sayısında azalma, yer yer kript sayısında azalma. Mukoza kalınlaşmış. H&E, X10, 100µm Bar.



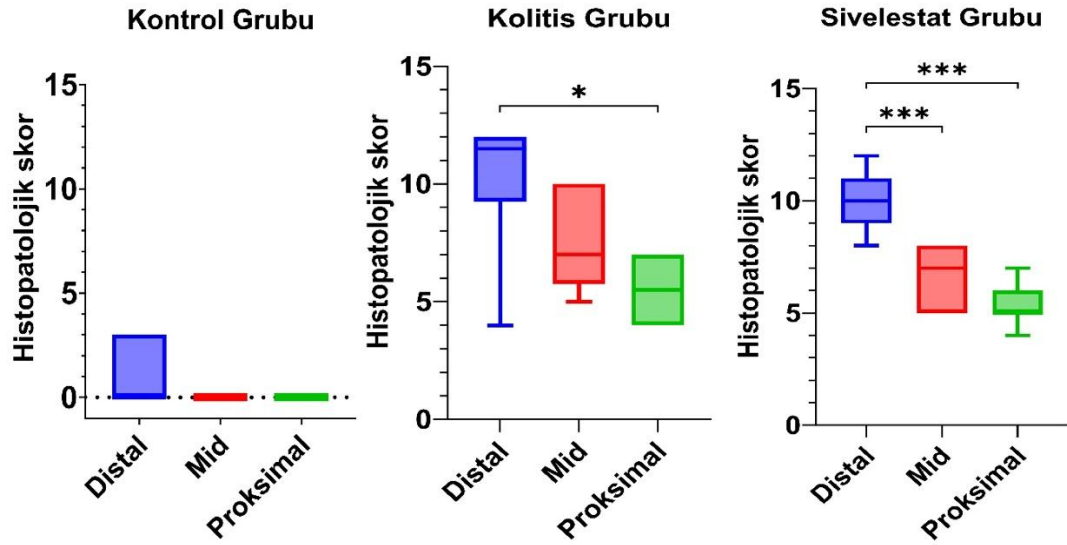
Şekil 4.16. Sivelestat grubu proksimal kolon görünümü. Mukozada yangısal infiltrasyon ve hiperemik damarlar. H&E, X10, 100μm Bar.

Histopatolojik bulguların istatistiksel değerlendirmesi yapıldığında; kolitis grubu ile sivelestat grubu arasında distal kolonda istatistiksel bir fark olmadığı görüldü ancak kontrol grubu ile kolitis ($p<0,01$) ve sivelestat ($p<0,05$) grupları arasında distal kolonda anlamlı bir farklılık vardı. Mid-kolonun histopatolojik verilerinin istatistiksel olarak değerlendirilmesi yapıldığında istatistiksel anlamlılığın distal kolon verilerine benzer olduğu görüldü. Proksimal kolonda ise kontrol grubu ile kolitis ve sivelestat gruplarındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü ($p<0,01$). Tüm kolon dokuları total olarak incelendiğinde ise yine aynı şekilde kontrol grubu dokularının kolitis ve sivelestat gruplarındaki kolon dokularıyla arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu dikkati çekti ($p<0,001$). Gruplar arasındaki istatistiksel farkın grafikleri Şekil 4.17’de verildi.



Şekil 4.17. Farelerin kolon dokularının segmentlerine göre ve total olarak yapılan histopatolojik değerlendirmesi ve istatistik sonuçları (*: $P < 0,05$; **: $P < 0,01$; ***: $P < 0,001$)

Her grup kendi içinde değerlendirildiğinde histopatolojik lezyonların kolon bölgelerine göre dağılımlarının istatistiksel değerlendirmesi yapıldı. Buna göre kontrolde istatistiksel olarak anlamlı bir histopatolojik lezyon görülmedi. Ancak kolitis grubunda lezyonların dağılımının distal kolonda proksimal kolona göre daha yüksek olduğu ve dağılımların farkının istatistiksel olarak anlamlı olduğu dikkati çekti ($p < 0,05$). Bununla birlikte sivelestat grubundaki lezyonların ise istatistiksel olarak her kolon bölgesinde belirgin farklılığının olduğu, ayrıca distal kolon lezyonları ile mid-kolon lezyonları ($p < 0,001$) ve distal kolon lezyonları ile proksimal kolon lezyonları ($p < 0,001$) arasındaki farkın da istatistiksel olarak önemli olduğu ortaya konuldu. Grupların kendi içinde yapılan istatistiksel değerlendirmeye ait grafik Şekil 4.18’de verildi.



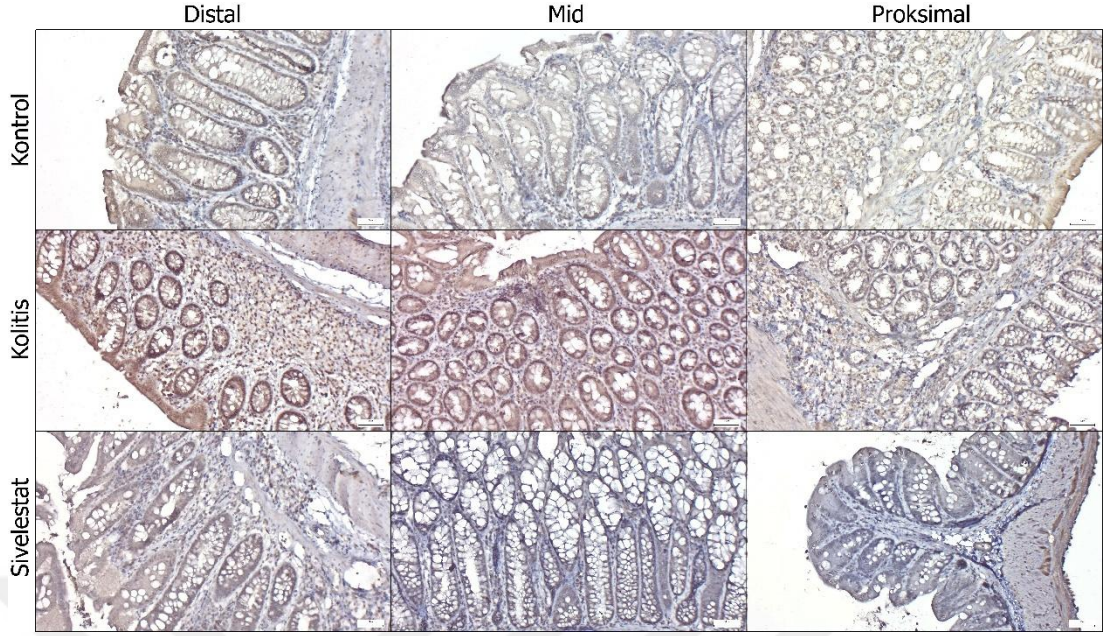
Şekil 4.18. Farelerin kolon dokularının histopatolojik değerlendirmesi ve gruplar arasındaki istatistik sonuçları (*: $p < 0,05$; ***: $p < 0,001$).

4.3. İmmunohistokimyasal Bulgular

İmmunohistokimyasal ekspresyonlar gruplar arasında hem total kolon dokusu hem de her bir kolon segmenti 4hne, 8ohdg, gh2ax, h2ax, nrf2, parp1, tnfa ve cox2 immunreaksiyonları için ayrı ayrı değerlendirildi. Ly6g ve ELA2 ekspresyonlarının değerlendirilmesinde ise aynı şekilde gruplar arasında total kolon dokusu ve her bir kolon segmentindeki nötrofil infiltrasyonlarının immunreaksiyonları değerlendirmeye alındı.

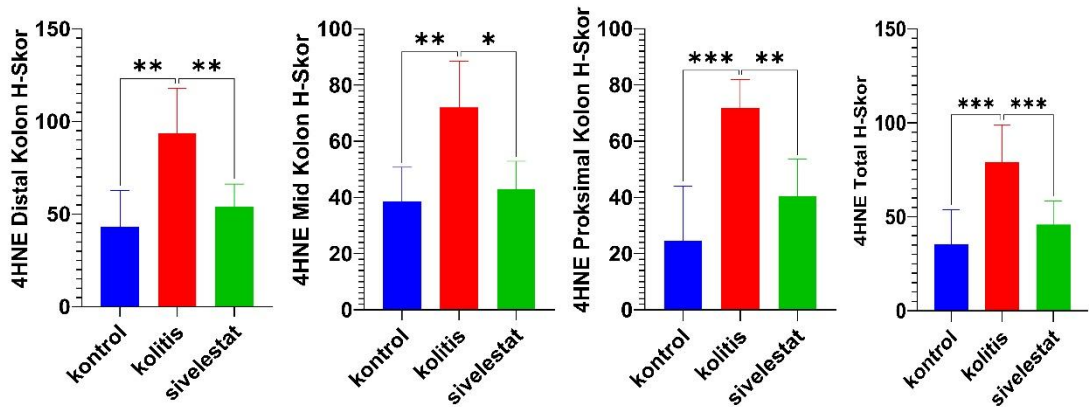
4.3.1. 4 Hydroxynonenal (4HNE) Ekspresyonu

Kolon dokularındaki 4HNE ekspresyonları incelendiğinde; kontrol grubu kolon dokularında genel anlamda ekspresyonun çok zayıf pozitiflik ile negatif arasında değişkenlik gösterdiği görüldü. Kolitis grubunda ise ekspresyonların özellikle distal bölgelerde daha yoğun olduğu, mid ve proksimal kolon segmentlerinde ise ortadan şiddetliye değişen kuvvette olduğu dikkati çekti. İmmunreaktivite genel anlamda lümen enterositleri, liberkühn kriptleri, propria mukozadaki mononükleer seri yangı hücrelerinde gözlemlendi.



Şekil 4.19. 4HNE immunreaksiyonları. IHC, DAB Kromojen, X20, 50µm Bar.

Tüm kolon segmentlerine total olarak bakıldığında 4HNE ekspresyonlarının diğer gruplara nazaran kolitis grubunda daha yüksek immunreaksiyon varlığı gösterdiği dikkati çekti. Sivelestat grubunda, kolitis grubuna göre daha zayıf ekspresyonlar vardı ve bu istatistiksel olarak anlamlıydı ($p < 0,001$). Ayrıca sivelestat grubunun kontrol grubuna göre daha kuvvetli ekspresyonlar gösterdiği görüldü ancak bu görünüm istatistiksel olarak anlamlı değildi. Buna ek olarak kolitis grubundaki kuvvetli ekspresyonlar ile kontrol grubundaki çok zayıf hatta negatif ekspresyonlar arasında görülen büyük fark aynı zamanda istatistiksel olarak da anlamlıydı ($p < 0,001$).



Şekil 4.20. Tüm kolon segmentlerindeki ve total 4HNE ekspresyonlarının istatistiksel grafikleri (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$).

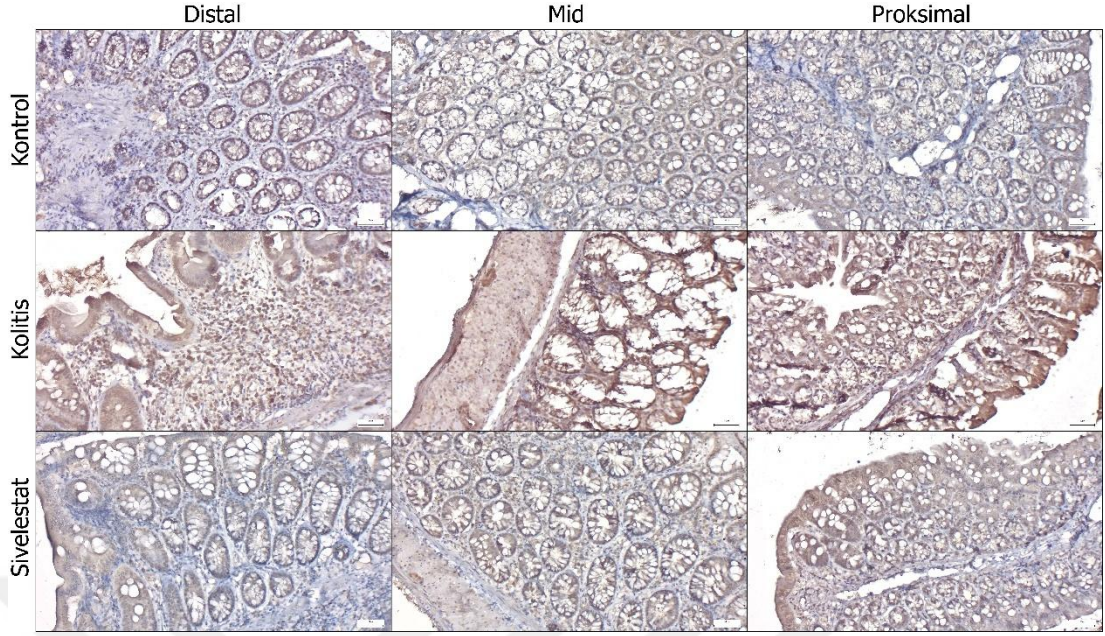
Tüm gruplarda kolon dokularının distal segmentindeki 4hne immunreaksiyonları değerlendirildiğinde; kontrol grubu ile sivelestat grubu dokularındaki ekspresyonların benzer olduğu ancak kolitis grubu ekspresyonlarının diğer gruplardaki ekspresyonlardan daha kuvvetli olduğu görüldü. Benzer şekilde kolitis grubu ile sivelestat grubu ve kolitis grubu ile kontrol grubu arasındaki ekspresyon farkı istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0,01$), kontrol grubu ile sivelestat grubu ekspresyonları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktu ($p=0,594$).

Mid kolon segmenti ekspresyonlarının gruplar arasındaki değerlendirmesinde; kontrol ile sivelestat arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farkın olmadığı ($p>0,999$) ancak kolitis grubu ile kontrol grubu ekspresyonları ($p<0,01$) ve kolitis grubu ile sivelestat grubu ekspresyonları ($p<0,05$) arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu dikkati çekti.

Proksimal kolon dokusu ekspresyonları incelendiğinde; kontrol ve sivelestat grupları arasında ekspresyon farkı gözlenmedi. Kolitis grubunun ekspresyon şiddeti kontrol ve sivelestat gruplarına göre yüksekti. Ekspresyonlar arasındaki bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu (sırasıyla $p<0,001$; $p<0,01$).

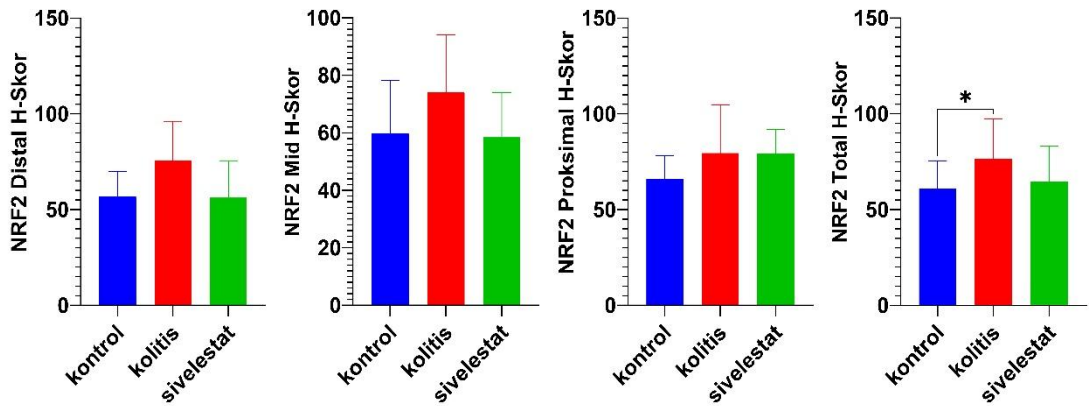
4.3.2. NRF2 Ekspresyonu

Kolon dokularındaki NRF2 ekspresyonları incelendiğinde; kontrol grubu kolon dokularında genel anlamda hafif ile orta şiddette ekspresyon varlığı mevcuttu. Kolitis grubuna bakıldığında şiddetli immunreaksiyonlar dikkati çekti. Sivelestat grubunda ise ortadan şiddetliye değişen ekspresyonlar görüldü. İmmunreaksiyonların kontrol grubunda çoğunlukla enterositler ve liber kühn kriptlerinde olduğu, kolitis ve sivelestat gruplarında ise enterosit, liber kühn kriptleri, propria mukozaya infiltre yangı hücreleri ve damar endotelinde olduğu izlendi.



Şekil 4.21. Kolon dokularında NRF2 immunreaksiyonları. IHC, DAB Kromojen, X20, 50µm Bar.

Tüm kolon segmentleri birlikte incelendiğinde; NRF2 ekspresyonlarının kolitis grubunda daha şiddetli olduğu, kontrol ve sivelestat grupları ile karşılaştırıldığında, kolitis grubu ile kontrol grubu arasındaki ekspresyon farkının istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü ($p < 0,05$). Sivelestat grubundaki ekspresyonların kolitis grubuna göre daha zayıf olduğu dikkati çekti ancak bu farklılık istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p = 0,134$).

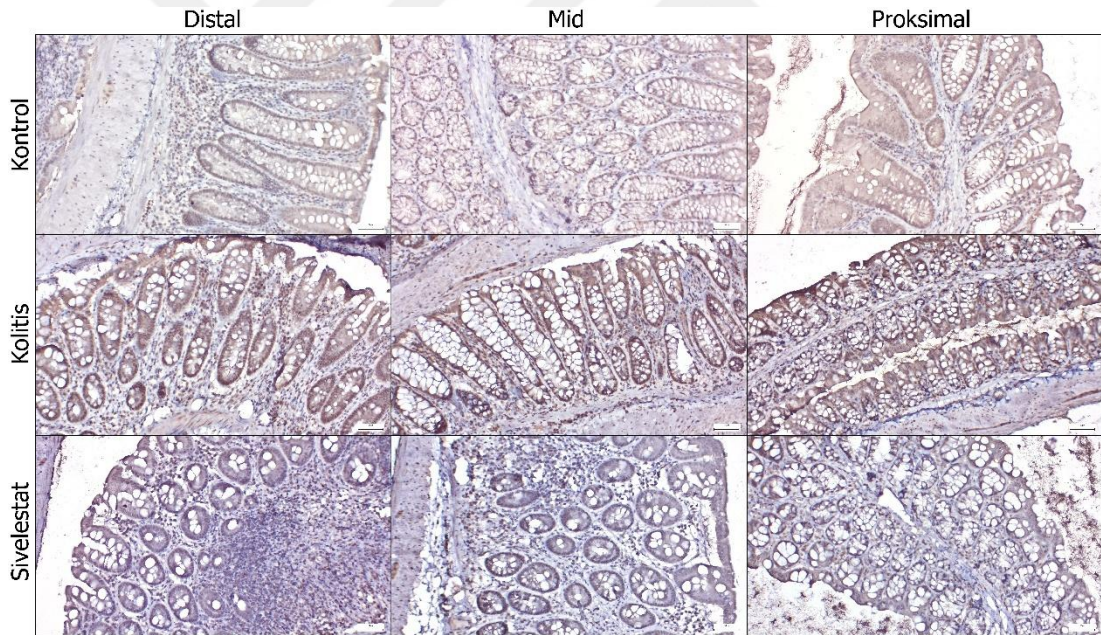


Şekil 4.22. Tüm kolon segmentlerindeki ve total NRF2 ekspresyonlarının istatistiksel grafikleri (*: $p < 0,05$).

Her bir kolon segmenti ayrı ayrı değerlendirildiğinde; her segmentte genel olarak kolitis grubunda görülen ekspresyonların diğer gruplara göre şiddetli olduğu gözlemlendi ancak istatistiksel değerlendirmede segment bazında gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmamaktaydı.

4.3.3. PARP1 Ekspresyonu

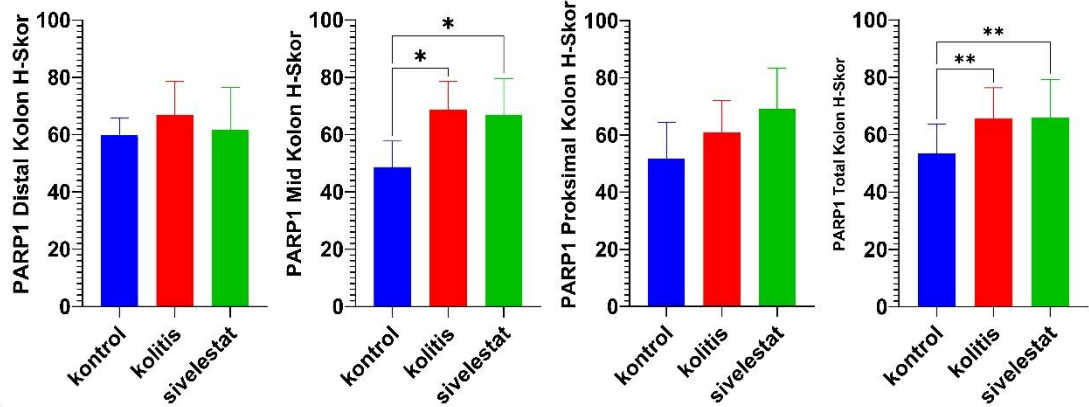
Tüm kolon segmentlerinin immunreaktiviteleri total olarak incelendiğinde; tüm gruplarda PARP1 ekspresyonu varlığı görüldü. Kolitis ve sivelestat gruplarında kontrol grubuna göre immunreaktivitenin daha yüksek olduğu dikkati çekti. Kontrol ile kolitis ($p<0,01$) ve kontrol ile sivelestat ($p<0,01$) grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark mevcuttu. Ancak kolitis ile sivelestat grupları arasında istatistiksel olarak fark görülmedi ($p=0,995$).



Şekil 4.23. Gruplarda PARP1 ekspresyonları. IHC, DAB Kromojen, X20, 50µm Bar.

Distal kolon ekspresyonlarına bakıldığında, sivelestat grubundaki ekspresyonların kontrol grubu ekspresyonlarından yüksek ancak kolitis grubu ekspresyonlarına göre daha düşük olduğu gözlemlendi. Proksimal kolonda ise kolitis grubundaki ekspresyonların kontrol grubundan yüksek ancak sivelestat grubundaki ekspresyonlardan daha düşük olduğu görüldü. Fakat bu veriler istatistiksel olarak

değerlendirildiğinde distal ve proksimal kolon segmentlerindeki ekspresyonların gruplar arasında anlamlı bir fark göstermediği dikkati çekti.

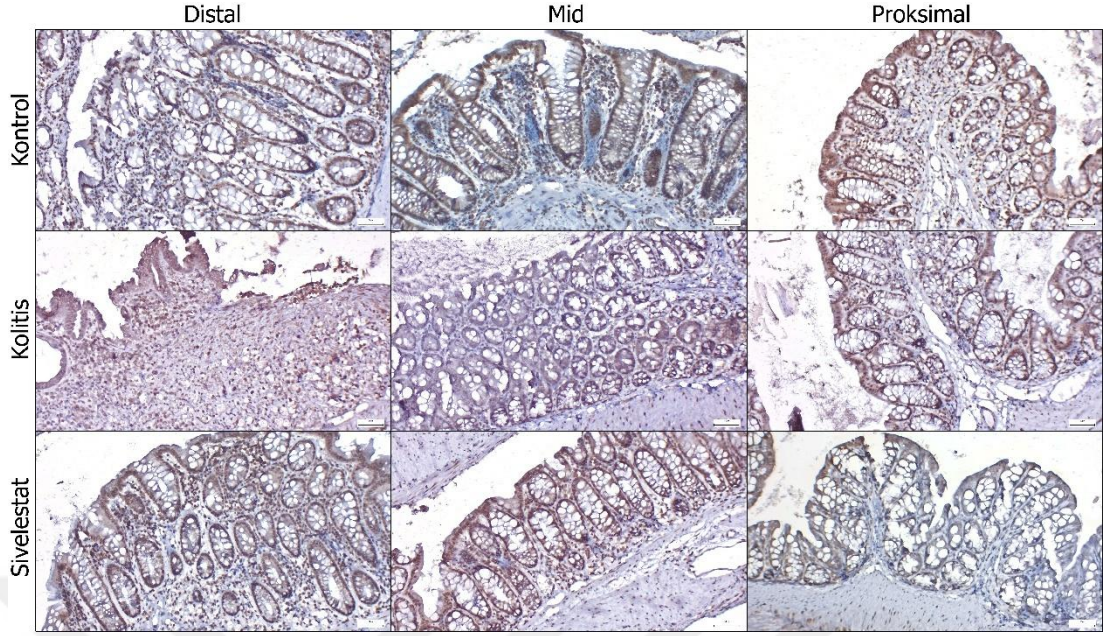


Şekil 4.24. Tüm kolon segmentlerindeki ve total PARP1 ekspresyonlarının istatistiksel grafikleri (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$).

Mid kolon segmentindeki immunreaksiyonlar incelendiğinde; kolitis ve sivelestat gruplarında görülen ekspresyonların kontrol grubu ekspresyonlarından daha yüksek olduğu ve bu farkın ise istatistiksel olarak anlamlı olduğu gözlemlendi (her iki grup için $p < 0,05$). Kolitis ile sivelestat grupları arasında istatistiksel olarak bir fark görülmedi.

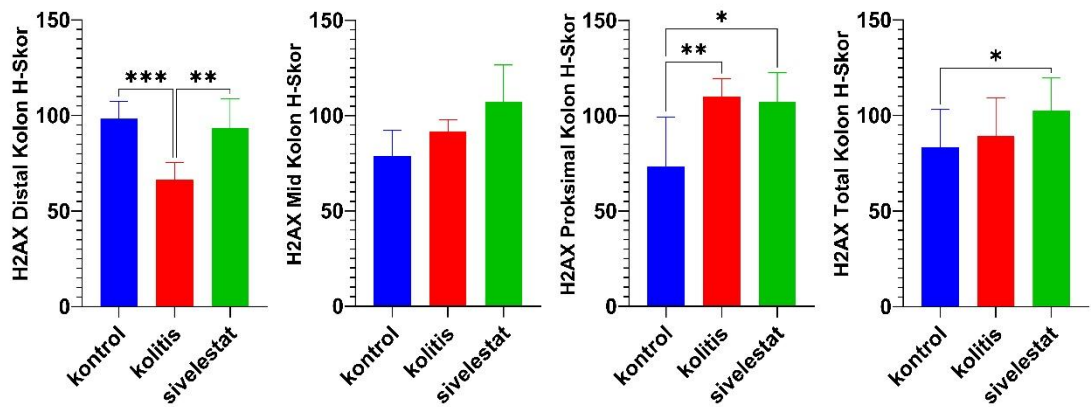
4.3.4. H2AX Ekspresyonu

Tüm kolon segmentleri birlikte incelendiğinde; H2AX ekspresyonlarının genel anlamda kuvvetli olduğu görüldü. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında hem kolitis hem de sivelestat gruplarındaki ekspresyonların nazaran daha yüksek olduğu, sivelestat grubunda ise en yüksek seviyede olduğu gözlemlendi. Bu veriler istatistiksel olarak incelendiğinde yalnızca kontrol ile sivelestat grupları arasında anlamlı bir fark olduğu dikkati çekti ($p < 0,05$). Kontrol ile kolitis ve kolitis ile sivelestat grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktu.



Şekil 4.25. Kolon dokularında gruplara göre H2AX immunpozitif boyanmalar. IHC, DAB Kromojen, X20, 50µm Bar.

Distal kolon dokularında kontrol ve sivelestat grubu ekspresyonlarının, kolitis grubu ekspresyonlarına göre yüksek olduğu gözlemlendi. Sivelestat ile kolitis grubu ($p<0,01$) ve kontrol ile kolitis grupları ($p<0,001$) arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olduğu dikkati çekti. Kontrol ile sivelestat grupları arasında anlamlı bir istatistiksel fark yoktu ($p=0,762$).



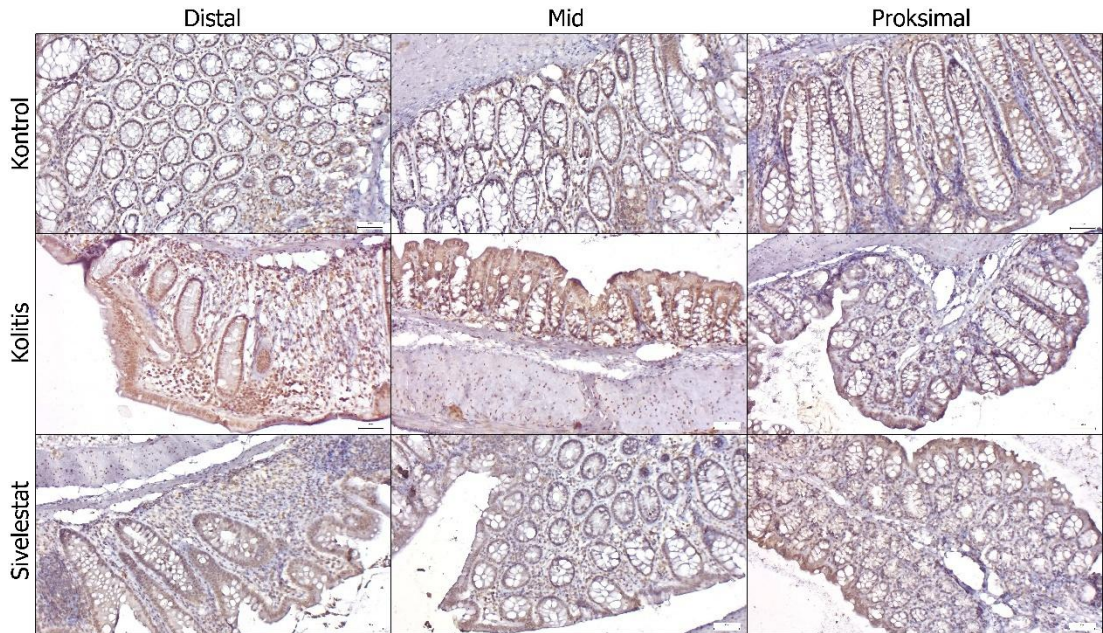
Şekil 4.26. Tüm kolon segmentlerindeki ve total H2AX ekspresyonlarının istatistiksel grafikleri (*: $p<0,05$; **: $p<0,01$; ***: $p<0,001$).

Mid kolon dokularının ekspresyonları incelendiğinde kolitis grubundaki ekspresyonun kontrol grubundan yüksek olduğu, sivelestat grubundaki immunreaktivitenin ise diğer gruplardan daha yüksek olduğu görüldü ancak bu farklılık istatistiksel olarak anlamlı değildi.

Proksimal kolon dokularının ekspresyonlarına bakıldığında, kolitis ve sivelestat gruplarında görülen immunreaksiyonun kontrol grubuna göre yüksek olduğu dikkati çekti. Kontrol grubuyla hem sivelestat ($p<0,05$) hem de kolitis ($p<0,01$) grupları arasındaki bu farklılık istatistiksel olarak anlamlıydı. Kolitis ile sivelestat grupları arasında ise anlamlı bir istatistiksel fark yoktu ($p=0,958$).

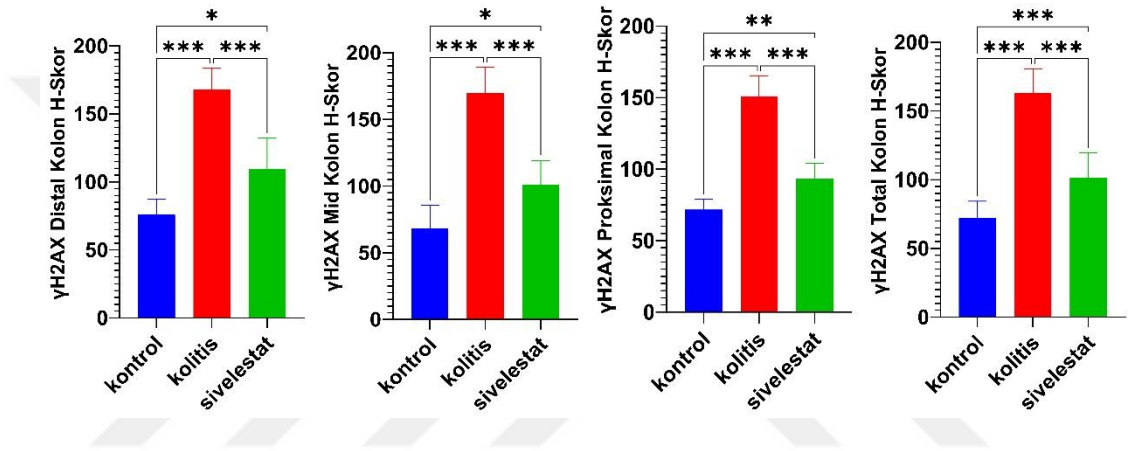
4.3.5. γ H2AX Ekspresyonu

Tüm kolon dokularındaki ekspresyonlar birlikte değerlendirildiğinde kolitis grubundaki γ H2AX immunreaksiyonunun diğer iki gruba göre çok yüksek olduğu görüldü. Kolitis grubunda kontrol grubuna göre çok yüksek olan γ H2AX ekspresyonunun sivelestat grubunda azaldığı dikkati çekti. Her üç grup arasındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlı idi ($p<0,001$).



Şekil 4.27. Kolon dokularında gruplara göre γ H2AX immunpozitif boyanmalar. IHC, DAB Kromojen, X20, 50 μ m Bar.

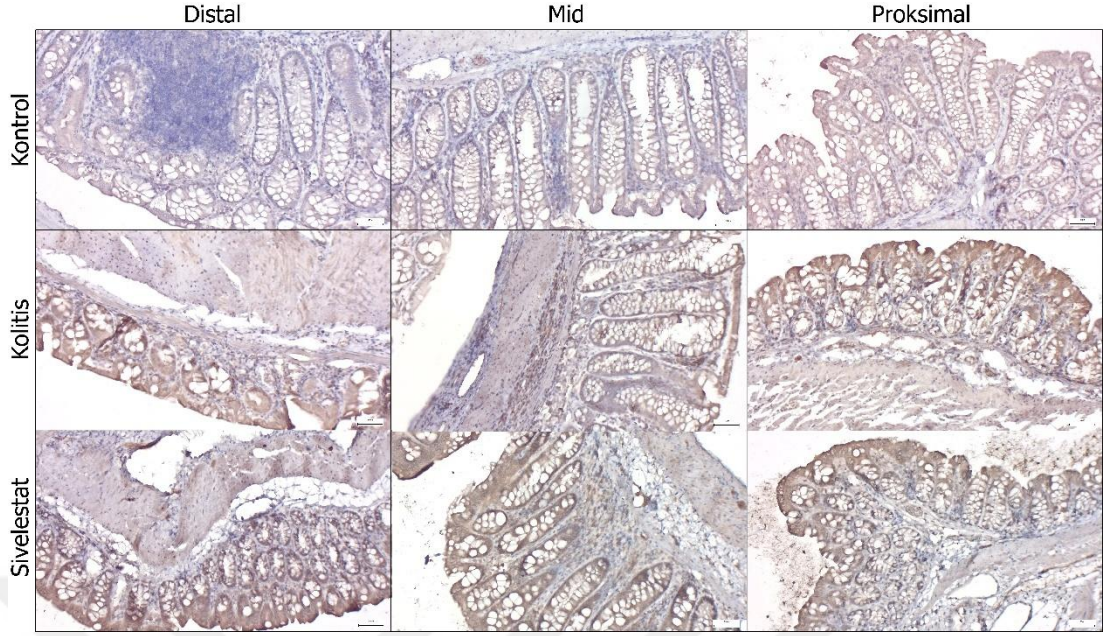
Distal ve mid kolon dokuları değerlendirildiğinde γ H2AX ekspresyonlarının kolitis grubunda diğer gruplara göre en yüksek seviyede olduğu tespit edildi. Kontrol grubundaki ekspresyonların sivelestat grubuna göre daha düşük olduğu, bu farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü ($p<0,05$). Bunun dışında kolitis ile kontrol ($p<0,001$) ve kolitis ile sivelestat ($p<0,001$) grupları arasındaki ekspresyon farkının ise aynı şekilde istatistiksel olarak anlamlı olduğu dikkati çekti. Proksimal kolon dokularında da aynı istatistiksel farkın olduğu ancak sivelestat ile kontrol grupları arasındaki farkın anlamlı ancak daha önemli olduğu gözlemlendi ($p<0,01$).



Şekil 4.28. Tüm kolon segmentlerindeki ve total γ H2AX ekspresyonlarının istatistiksel grafikleri (*: $p<0,05$; **: $p<0,01$; ***: $p<0,001$).

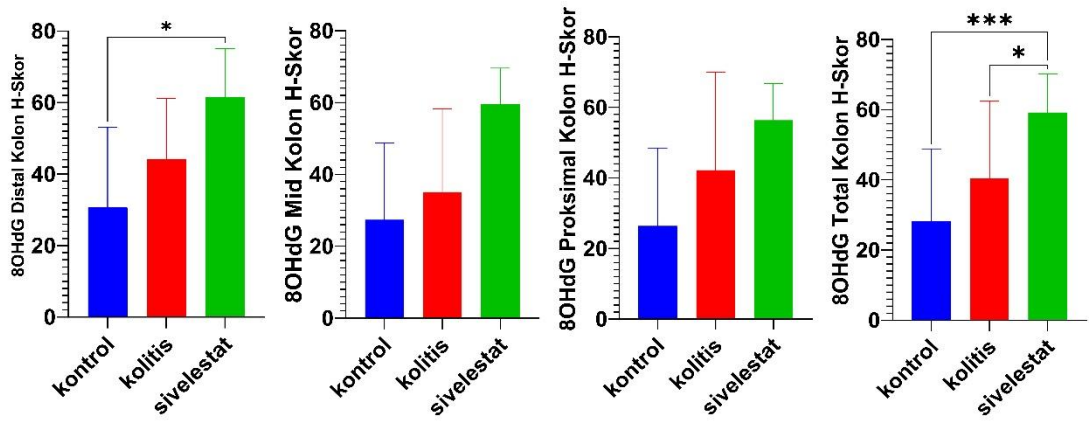
4.3.6. 8OHdG Ekspresyonu

Total kolon dokuları ele alındığında sivelestat grubuyla kontrol ve kolitis grupları arasında belirgin bir ekspresyon farkı dikkati çekti. Sivelestat grubundaki ekspresyon diğer gruplara göre en yüksek seviyedeydi. Sivelestat grubunun ekspresyonu ile kontrol grubu ekspresyonu arasında ($p<0,001$) ve sivelestat grubuyla kolitis grubu arasında ($p<0,05$) istatistiksel olarak anlamlı bir fark göze çarptı.



Şekil 4.29. Gruplarda 8OHdG ekspresyonları. IHC, DAB Kromojen, X20, 50µm Bar.

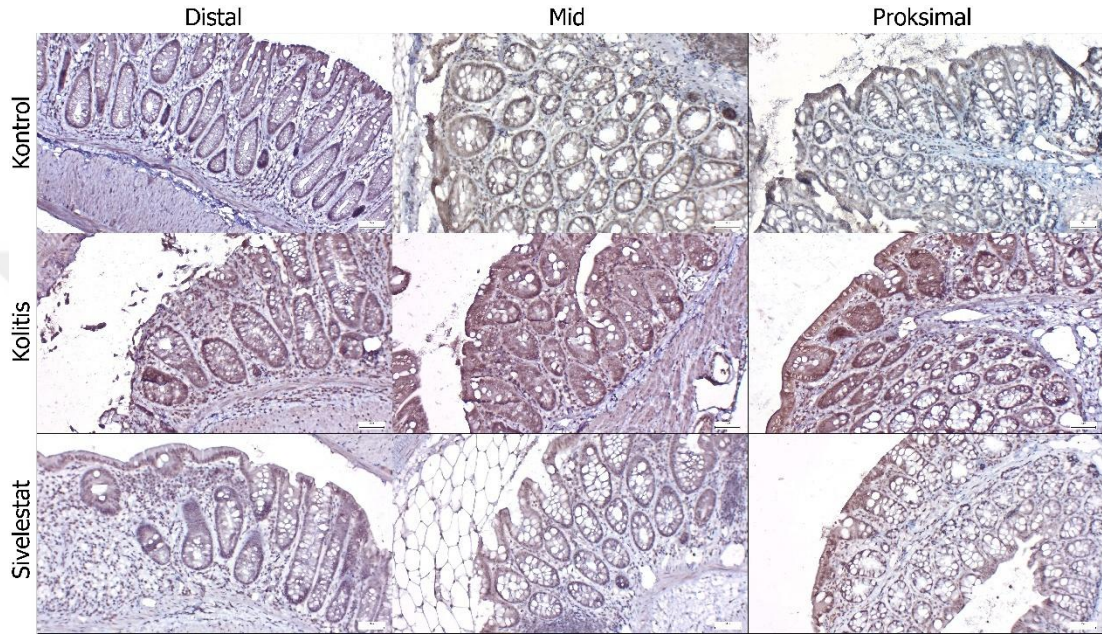
Distal kolon dokularında kontrol grubu ile sivelestat grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık varken ($p < 0,05$), distal kolondaki diğer gruplarda ve diğer kolon segmentlerindeki ekspresyonlar incelendiğinde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark görülmedi.



Şekil 4.30. Tüm kolon segmentlerindeki ve total 8OHdG ekspresyonlarının istatistiksel grafikleri (*: $p < 0,05$; ***: $p < 0,001$).

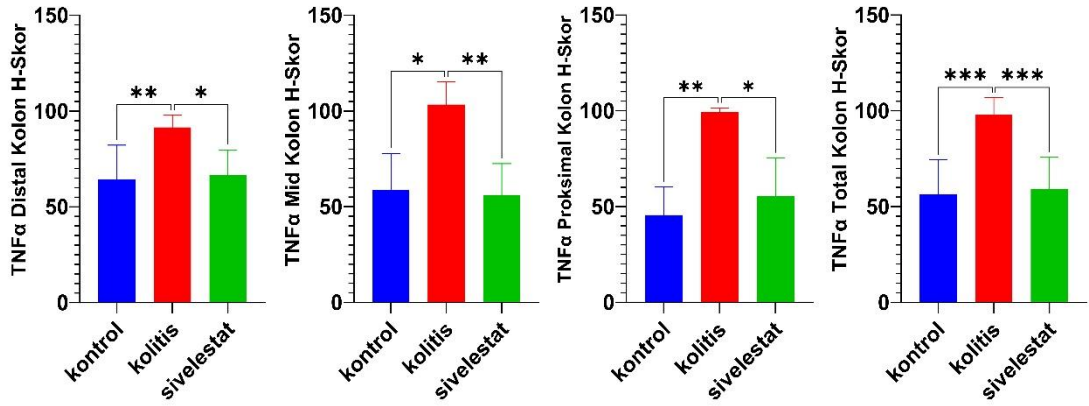
4.3.7 TNF α Ekspresyonu

Tüm kolon dokuları gruplara göre incelendiğinde; TNF α ekspresyonunun kolitis grubunda diğer gruplara göre daha yüksek olduğu görüldü. Kontrol ile kolitis ($p<0,001$) ve kolitis ile sivelestat grupları ($p<0,001$) arasındaki ekspresyon farkının istatistiksel olarak anlamlı olduğu dikkati çekti. Ancak kontrol grubu ile sivelestat grupları ($p=0,830$) arasında istatistiksel olarak anlamlı herhangi bir fark gözlenmedi.



Şekil 4.31. Kolon dokularında TNF α immunreaksiyonları. IHC, DAB Kromojen, X20, 50µm Bar.

Distal ve proksimal kolon dokularında kontrol grubu ile kolitis ($p<0,01$) grubu arasında ayrıca kolitis ile sivelestat ($p<0,05$) grubu arasında anlamlı bir fark mevcuttu fakat kontrol ile sivelestat grupları ($p>0,999$) arasında anlamlı bir farklılık yoktu.

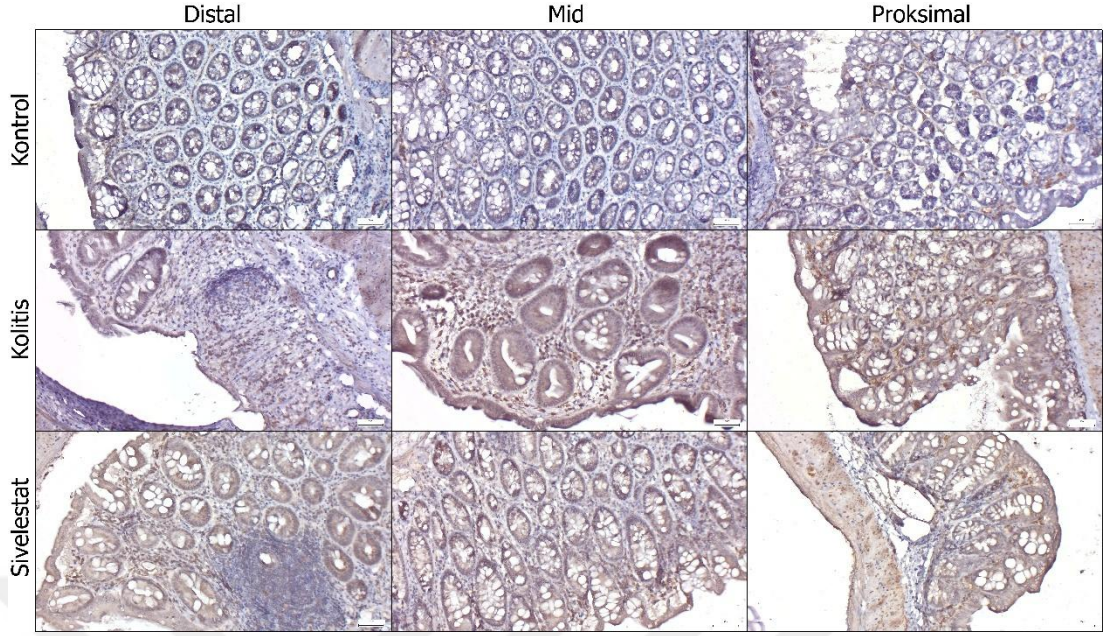


Şekil 4.32. Tüm kolon segmentlerindeki ve total TNFα ekspresyonlarının istatistiksel grafikleri (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$).

Distal ve proksimal kolona benzer şekilde mid kolon dokularında gruplar arasında farklılıklar tespit edildi. Sivelestat ile kolitis grubu ($p < 0,01$) ve kolitis ile kontrol grubu ($p < 0,05$) arasında anlamlı istatistiksel farklılıklar göze çarptı. Aynı şekilde kontrol ile sivelestat grupları ($p > 0,999$) arasında bir farklılık yoktu.

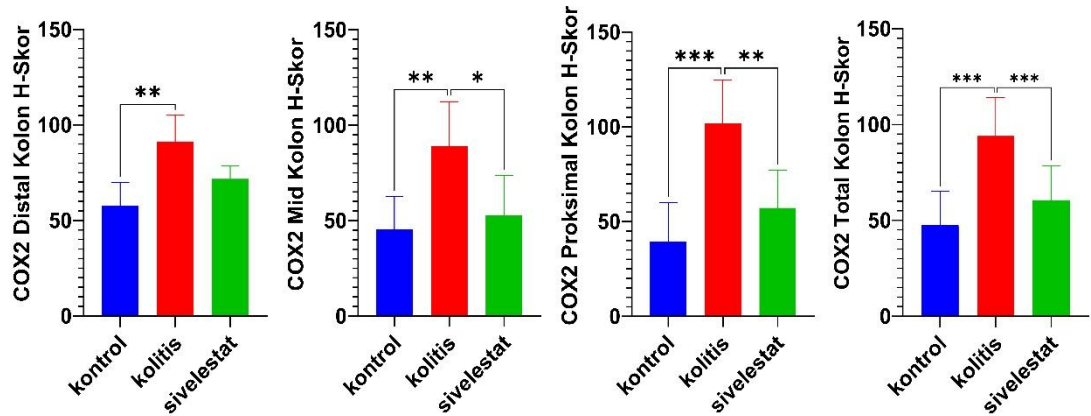
4.3.8 COX-2 Ekspresyonu

COX-2 enziminin dokulardaki varlığı incelendiğinde; total kolon dokusundaki ekspresyonu kontrol grubunda düşük seviyelerde bulunurken kolitis grubundaki örneklerde kontrol grubuna göre yükselmiş olduğu, sivelestat grubunda ise yine düşük seviyelere geldiği görüldü. İstatistiksel olarak bakıldığında kontrol grubu ile kolitis grubu ($p < 0,001$) ve kolitis grubu ile sivelestat grubu ($p < 0,001$) arasında belirgin bir fark olduğu ve bu farkın anlamlı olduğu tespit edildi. Kontrol grubu ile sivelestat grubu ($p = 0,343$) arasında ise istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktu.



Şekil 4.33. Tüm kolon segmentlerinde COX-2 immunreaksiyonları. IHC, DAB Kromojen, X20, 50µm Bar.

Distal kolon segmenti değerlendirildiğinde kontrol grubunda görülen ekspresyonların zayıf, kolitis grubunda görülen ekspresyonların ise kontrol grubuna göre daha kuvvetli olduğu dikkati çekerken, sivelestat grubunda ise ekspresyonlar kolitis grubuna göre daha zayıftı. Kontrol ile kolitis ($p < 0,01$) arasındaki görülen bu ekspresyon farkı istatistiksel olarak anlamlıyken kontrol ile sivelestat ve kolitis ile sivelestat grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı.



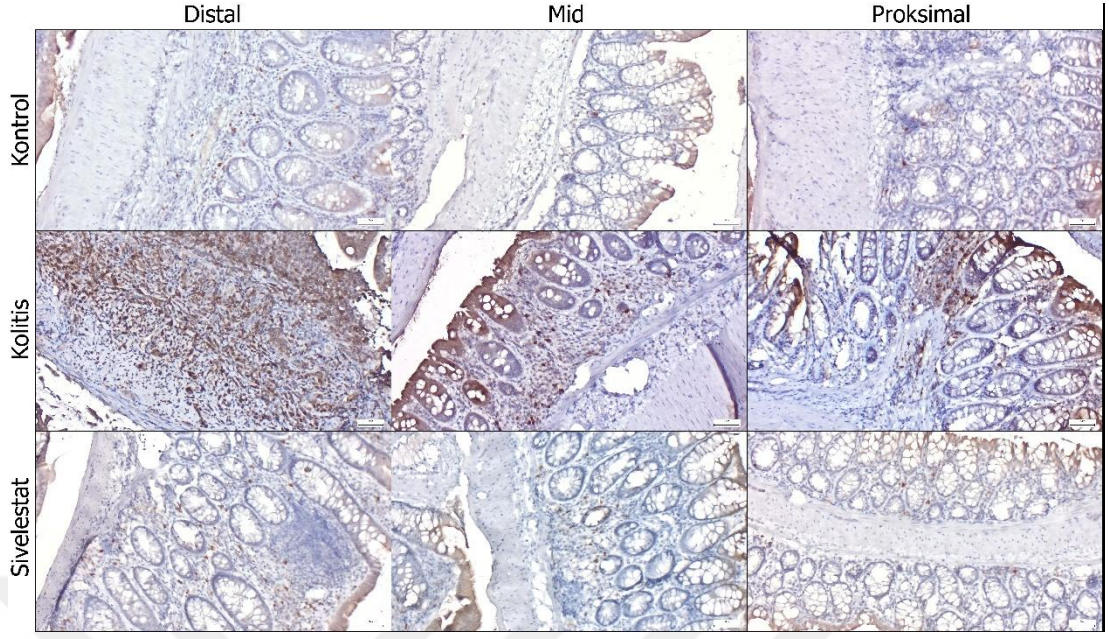
Şekil 4.34. Tüm kolon segmentlerindeki ve total COX-2 ekspresyonlarının istatistiksel grafikleri (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$).

Mid kolon segmentine bakıldığında, kontrol ile kolitis grubu ($p<0,01$) ve kolitis ile sivelestat grupları ($p<0,05$) arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ekspresyon farkı göze çarparken, kontrol ile sivelestat grupları ($p=0,811$) arasındaki ekspresyon farkı istatistiksel olarak önemsizdi.

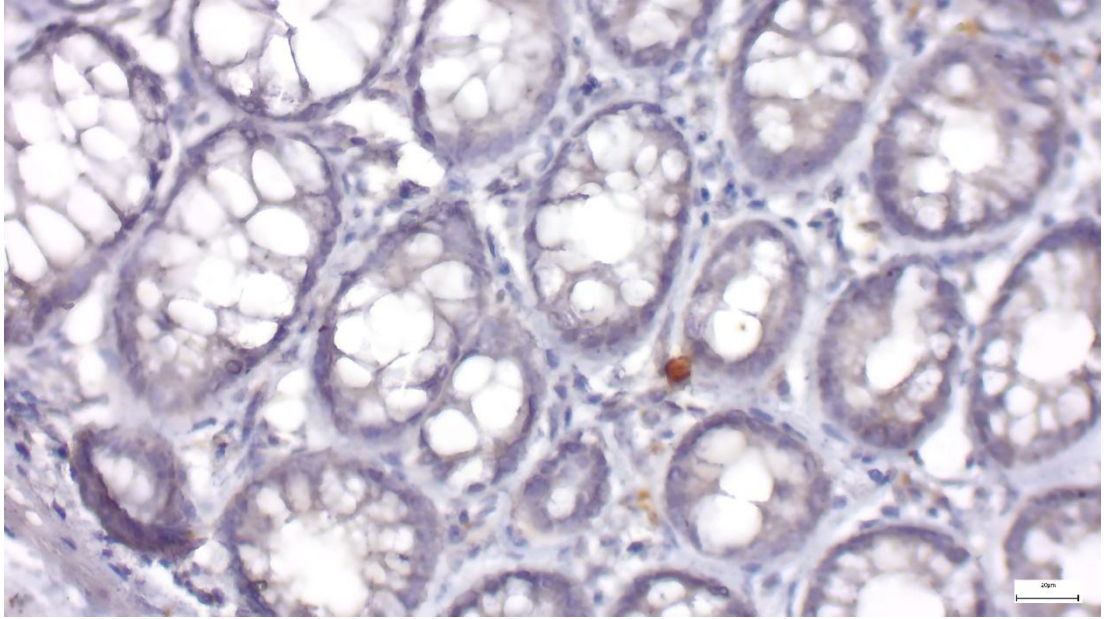
COX-2'nin proksimal kolondaki ekspresyonları dikkate alındığında; belirgin derecede düşük olan kontrol grubu ile kuvvetli pozitifliklerin görüldüğü kolitis grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark ($p<0,001$) mevcuttu. Benzer şekilde kolitis grubu ile sivelestat grubu arasında da istatistiksel olarak anlamlı ekspresyon farkı ($p<0,01$) görüldü. Ancak kontrol grubu ile sivelestat grubu arasında anlamlı bir ekspresyon farkı dikkati çekmedi ($p=0,345$).

4.3.9. LY6G Ekspresyonu

Ly6G nötrofil lökositlerin genel markerıdır. Bu primer antikor dokulardaki var olan nötrofillerin gösterilmesi ve bu sayede kantitatif veriye dönüştürülmesi amacıyla kullanıldığından boyanma yoğunlukları değerlendirilmedi. Tüm kolon dokularındaki Ly6G ekspresyonu veren nötrofil lökositler değerlendirildiğinde; kontrol grubunda eksprese olan nötrofil sayısının az, kolitis ve sivelestat gruplarında ise fazla olduğu görüldü. Gruplar birbirleriyle karşılaştırıldığında kontrol ile kolitis ($p<0,001$) ve kontrol ile sivelestat ($p<0,001$) grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark not edildi. İstatistiksel olarak kolitis ile sivelestat grupları arasında anlamlı bir fark yoktu ($p=0,535$).

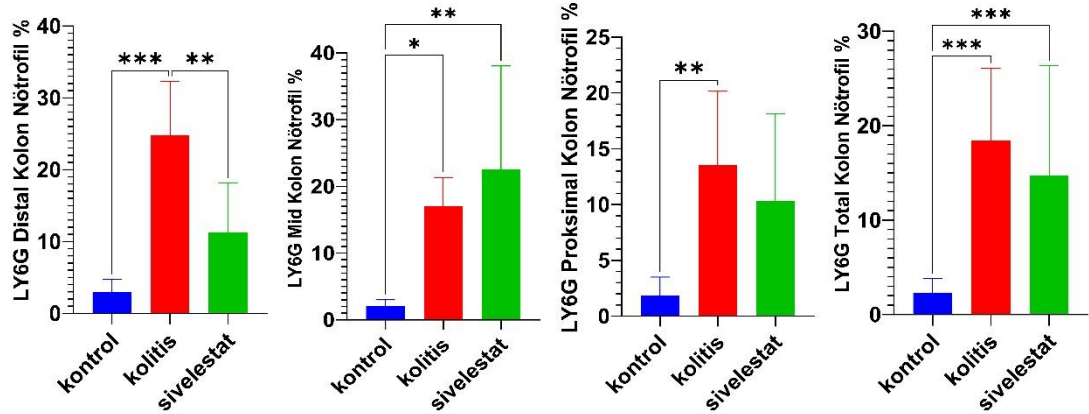


Şekil 4.35. Kolonun tüm segmentlerinde Ly6G pozitif immunreaksiyon veren nötrofillerin görünümü. IHC, DAB Kromojen, X20, 50µm Bar.



Şekil 4.36. Sivelestat grubu distal kolonda Ly6G immunpozitivite veren bir nötrofil lökosit. IHC, DAB Kromojen, X40, 20µm Bar.

Distal kolondaki nötrofiller gruplara göre değerlendirildiğinde; kontrol ile kolitis ($p<0,001$) ve kolitis ile sivelestat ($p<0,01$) grupları arasında nötrofil sayısındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu ancak kontrol ile sivelestat arasındaki farkın anlamlı olmadığı görüldü ($p=0,073$).



Şekil 4.37. Tüm kolon segmentlerindeki ve total Ly6G ekspresyonlarının istatistiksel grafikleri (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$).

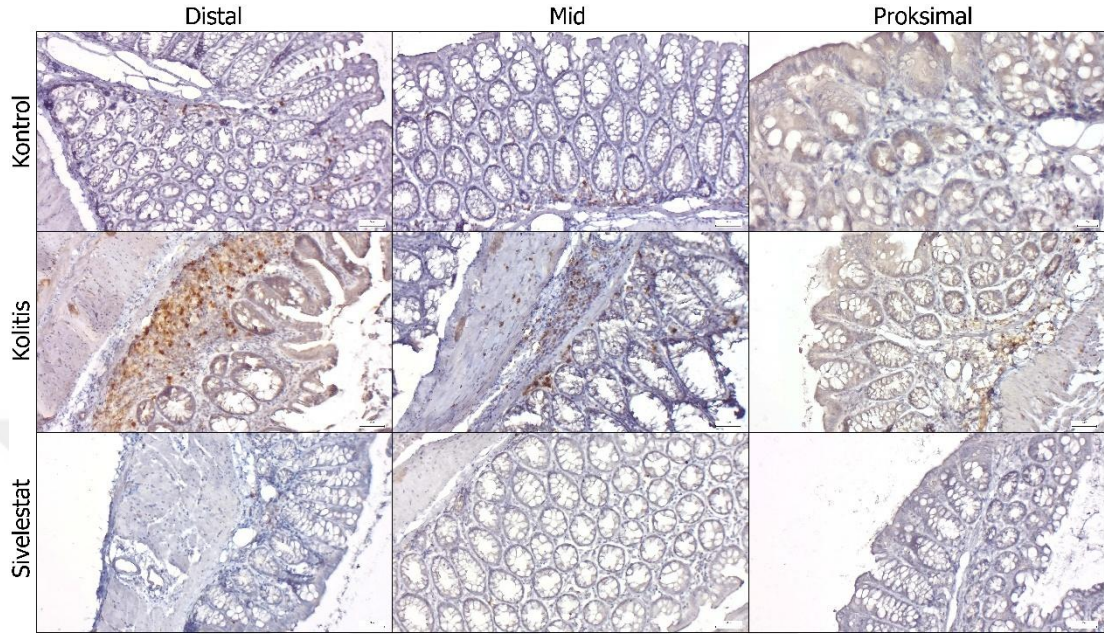
Mid kolon verileri değerlendirildiğinde; kontrol ile sivelestat ($p < 0,01$) grupları arasında görülen istatistiksel olarak anlamlı fark, kontrol ile kolitis ($p < 0,05$) grupları arasındaki istatistiksel olarak anlamlı farktan büyüktü. Fakat kolitis ile sivelestat grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmedi ($p = 0,568$).

Proksimal kolonda istatistiksel olarak anlamlı olan tek fark kontrol ile kolitis grupları arasındaydı ($p < 0,01$). Diğer gruplar arasında anlamlı bir fark görülmedi.

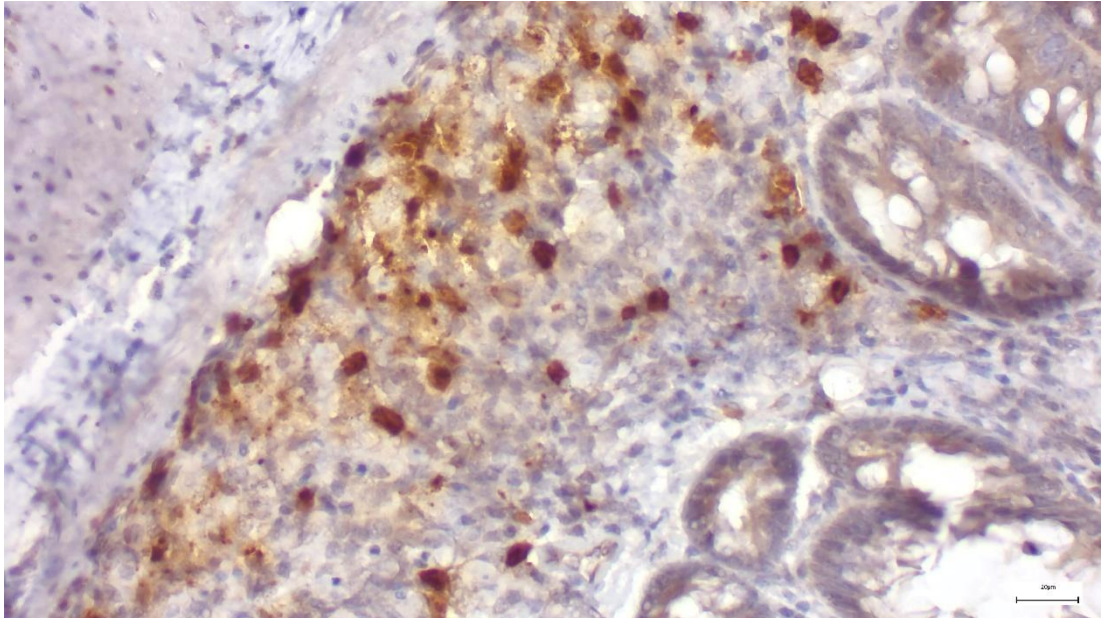
4.3.10 ELA2 (NE) Ekspresyonu

ELA2 elastaz aktivitesi gösteren nötrofillerin markerıdır. Ly6G’de olduğu gibi ELA2 markerı da NE aktivitesi gösteren nötrofillerin gösterilmesi ve sayısal veriye dönüştürülmesi amaçlanarak kullanıldığından boyanma yoğunlukları değerlendirilmedi. Total kolon dokusuna bakıldığında sivelestat gruplarında görülen tek tük boyanmalar haricinde ekspresyon sonuçları negatife yakındı. Kontrol grubu ile kolitis grubu ($p < 0,001$) arasında ve kolitis grubu ile sivelestat grubu ($p < 0,001$) arasında istatistiki olarak anlamlı fark görüldü. Kontrol ile sivelestat grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu ($p = 0,589$). Distal kolon ekspresyonları incelendiğinde; gruplar arasındaki farkın total kolon ekspresyonlarına benzerlik gösterdiği dikkati çekti. Total kolon değerlendirmesinde olduğu gibi kontrol grubu ile kolitis grubu ($p < 0,001$) arasında ve kolitis grubu ile sivelestat grubu ($p < 0,001$)

arasında istatistiki olarak anlamlı fark görüldü. Kontrol ile sivelestat grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu ($p=0,480$).

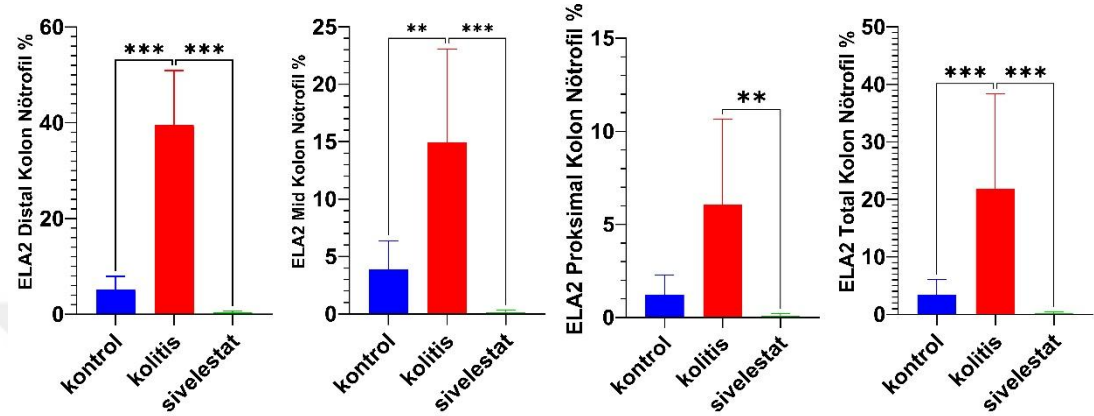


Şekil 4.38. Kolonun tüm segmentlerinde ELA2 immunreaksiyonlarının görünümü. IHC, DAB Kromojen, X20, 50µm Bar.



Şekil 4.39. Kolitis grubu distal kolonda ELA2 immunpozitivite veren nötrofil lökositler. IHC, DAB Kromojen, X40, 20µm Bar.

Mid kolona bakıldığında kontrol grubu ile kolitis grubu ($p<0,01$) arasında ve kolitis grubu ile sivelestat grubu ($p<0,001$) arasında istatistiki olarak anlamlı fark görüldü. Kontrol ile sivelestat grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu ($p=0,402$).



Şekil 4.40. Tüm kolon segmentlerindeki ve total ELA2 ekspresyonlarının istatistiksel grafikleri (**: $p<0,01$; ***: $p<0,001$).

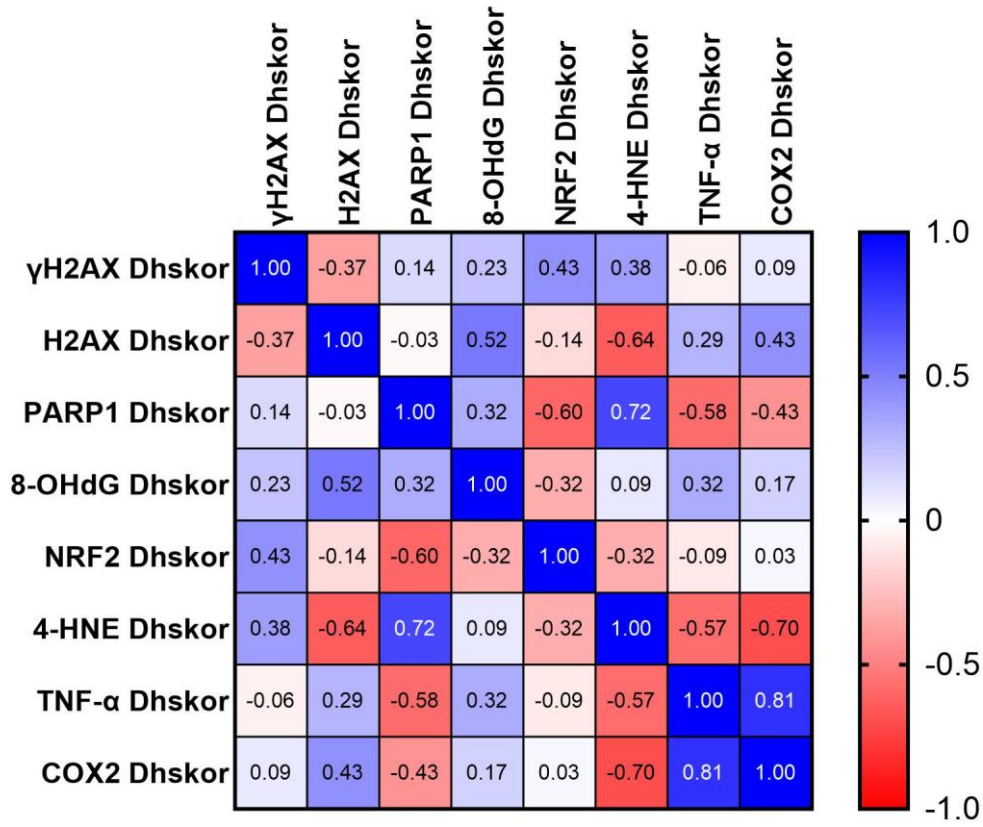
Proksimal kolon ekspresyonları değerlendirildiğinde; kolitis ile sivelestat grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu ($p<0,01$) görüldü ancak diğer gruplar arasında herhangi bir fark dikkati çekmedi.

4.4 İmmünohistokimyasal Bulguların Korelasyonları

4.4.1 Kolitis Grubu IHC Parametlerinin Yalnız Değerlendirilmesi

4.4.1.1 Distal Kolon (Dhskor) Bulguları

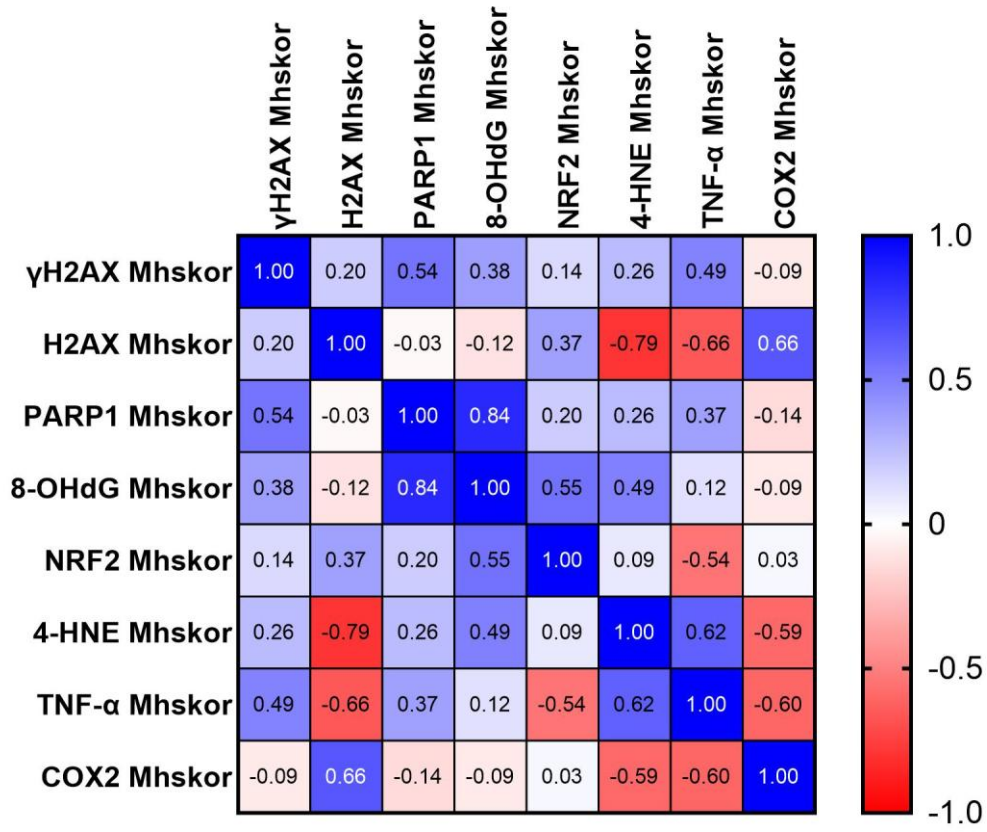
Kolitis grubunun distal segmentinde TNF- α -COX2 arasında yüksek düzeyde ve istatistiksel olarak anlamlı pozitif korelasyon belirlendi ($r=0.812$, $p=0.050$). Anlamlı olmayan ancak yüksek düzeyde pozitif korelasyon 4-HNE-PARP1 çiftinde saptandı ($r=0.725$, $p=0.103$). Orta düzey korelasyonlar H2AX-8-OHdG ($r=0.522$), NRF2-PARP1 ($r=-0.600$), 4-HNE-H2AX ($r=-0.638$) ve COX2-4-HNE ($r=-0.696$) çiftlerinde görüldü. γ H2AX-4-HNE ($r=0.377$), γ H2AX-NRF2 ($r=0.429$), COX2-H2AX ($r=0.429$) ve TNF- α -8-OHdG ($r=0.324$) ilişkileri düşük düzeyde korelasyon göstermiştir (Şekil 4.41).



Şekil 4.41. Distal kolonda kolitis grubu verilerinin korelasyon analiz sonuçları

4.4.1.2 Mid Kolon (Mhskor) Bulguları

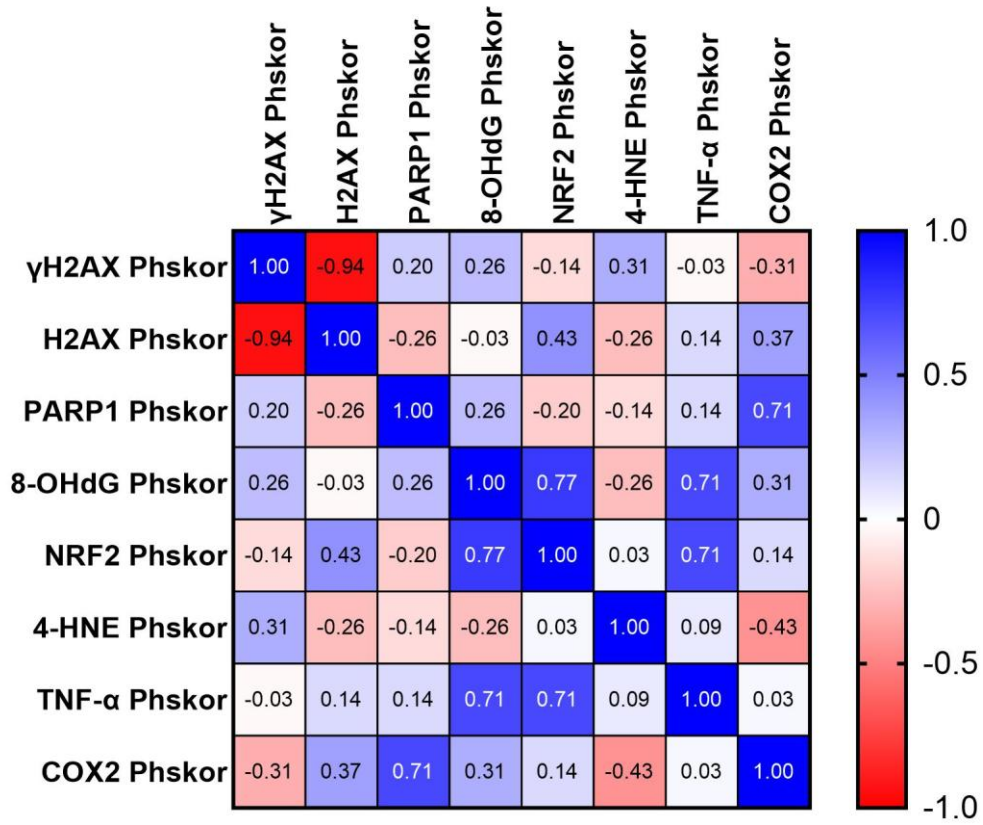
Kolitis grubunun mid segmentinde 8-OHdG-PARP1 arasında yüksek ve istatistiksel olarak anlamlı pozitif korelasyon saptandı ($r=0.841$, $p=0.036$). Anlamlı olmayan ancak yüksek düzeyde korelasyon H2AX-4-HNE arasında negatif yönde gözlemlendi ($r=-0.794$). Orta düzeyde korelasyonlar şunlardı: H2AX-TNF- α ($r=-0.657$), H2AX-COX2 ($r=0.657$), COX2-TNF- α ($r=-0.600$), COX2-4-HNE ($r=-0.588$), NRF2-TNF- α ($r=-0.543$), γ H2AX-PARP1 ($r=0.543$) ve 8-OHdG-NRF2 ($r=0.551$) (Şekil 4.42).



Şekil 4.42. Mid kolonda kolitis grubu verilerinin korelasyon analiz sonuçları

4.4.1.3 Proksimal Kolon (Phskor) Bulguları

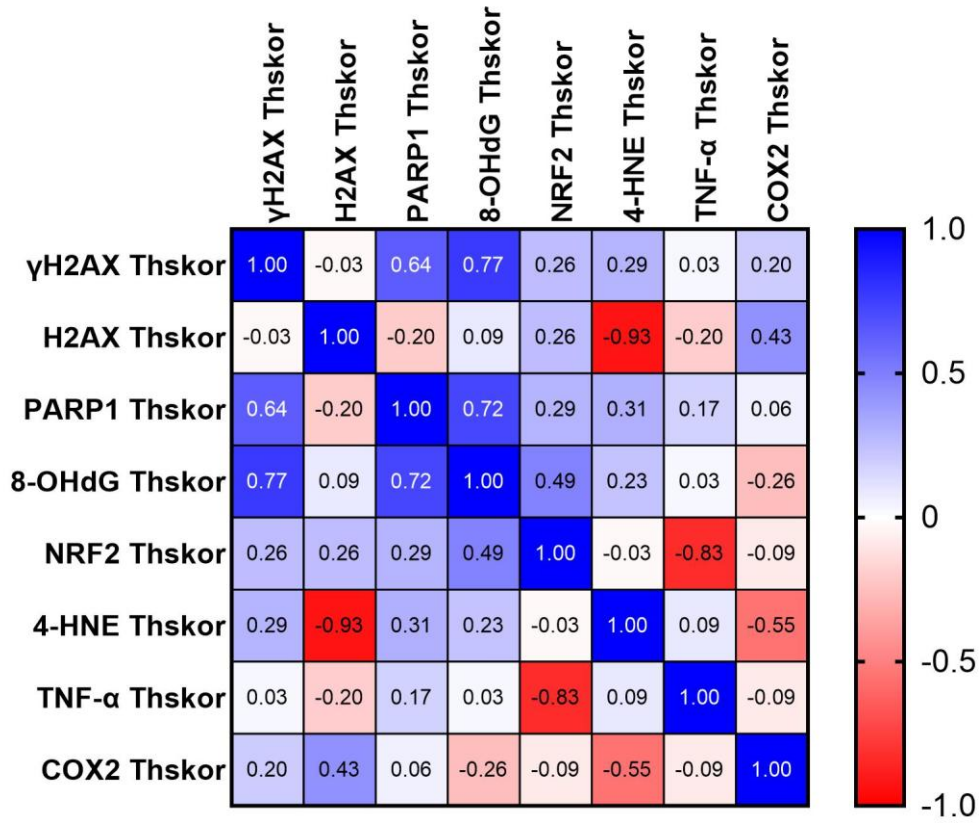
Proksimal segmentte (Phskor) γH2AX-H2AX arasında çok yüksek düzeyde ve istatistiksel olarak anlamlı negatif korelasyon saptandı ($r=-0.943$, $p=0.017$). Anlamlı olmayan ancak yüksek düzeyde korelasyonlar 8-OHdG-NRF2 ($r=0.771$), 8-OHdG-TNF- α ($r=0.714$), NRF2-TNF- α ($r=0.714$) ve PARP1-COX2 ($r=0.714$) çiftlerinde gözlemlendi (Şekil 4.43).



Şekil 4.43. Proksimal kolonda kolitis grubu verilerinin korelasyon analiz sonuçları

4.4.1.4 Total Ortalama H Skoru (Thskor) Bulgusu

Kolitis grubunun total skorunda H2AX-4-HNE arasında çok yüksek düzeyde ve istatistiksel olarak anlamlı negatif korelasyon saptandı ($r=-0.928$, $p=0.008$). Anlamlı olmayan ancak yüksek düzeyde korelasyonlar γ H2AX-NRF2 ($r=0.829$), γ H2AX-TNF- α ($r=0.771$) ve PARP1-8-OHdG ($r=0.725$) çiftlerinde görüldü. Orta düzeyde korelasyonlar γ H2AX-H2AX ($r=-0.600$), H2AX-NRF2 ($r=0.829$), 4-HNE-COX2 ($r=-0.551$) ve γ H2AX-4-HNE ($r=0.522$) çiftlerinde bulundu (Şekil 4.44).

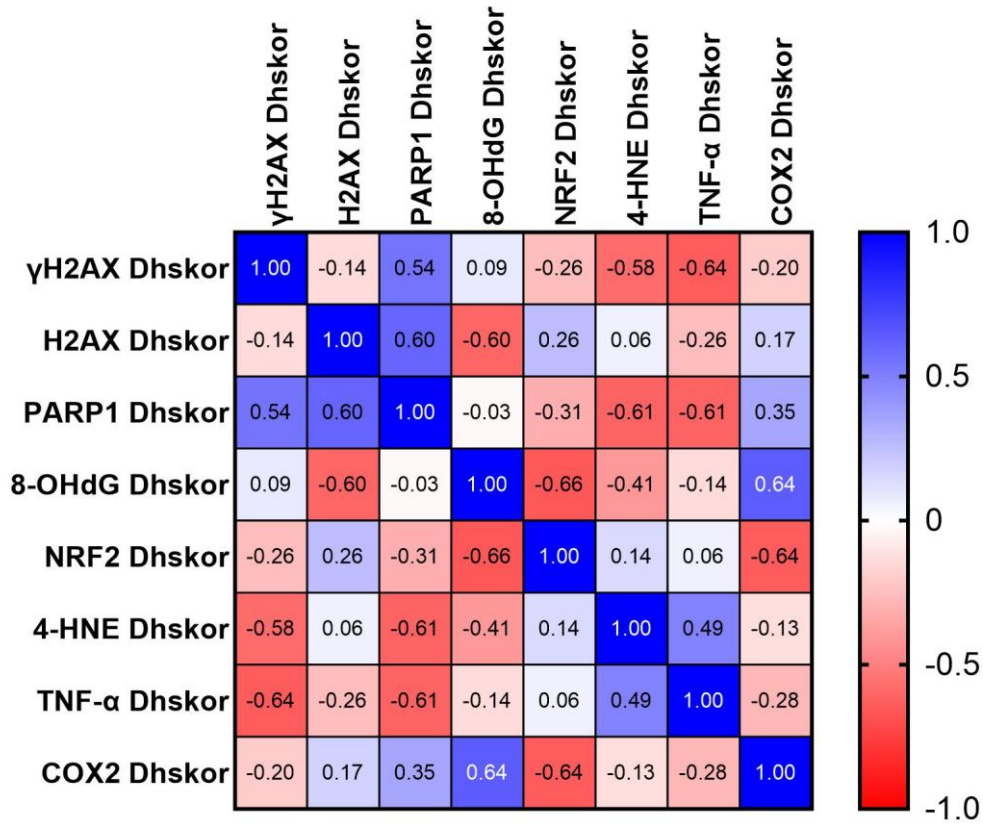


Şekil 4.44. Total kolonda kolitis grubu verilerinin korelasyon analiz sonuçları

4.4.2 Sivelestat Grubunun Yalnız Değerlendirilmesi

4.4.2.1 Distal Kolon (Dhskor) Bulguları

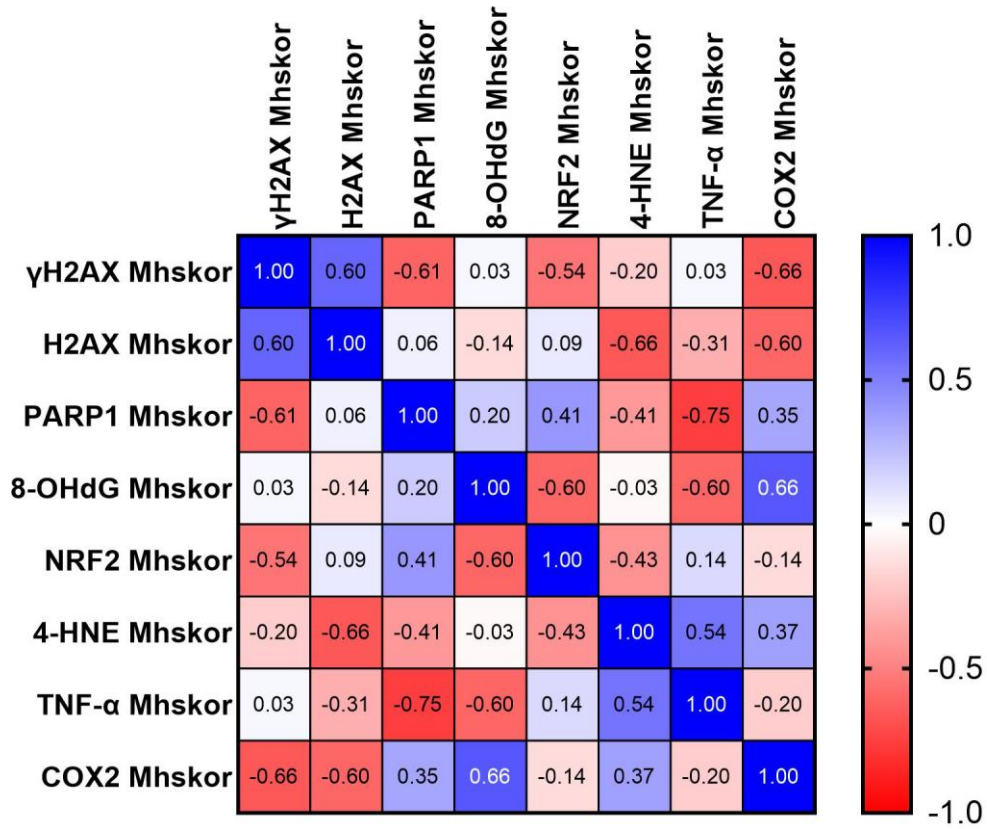
Sivelestat grubunun distal segmentinde istatistiksel olarak anlamlı hiçbir korelasyon belirlenmedi. Anlamlı olmamakla birlikte orta düzeyde korelasyonlar γ H2AX-PARP1 ($r=0.543$), γ H2AX-4-HNE ($r=-0.580$), γ H2AX-TNF- α ($r=-0.638$), H2AX-8-OHdG ($r=-0.600$), PARP1-4-HNE ($r=-0.609$), PARP1-TNF- α ($r=0.609$), 8-OHdG-NRF2 ($r=-0.657$), 8-OHdG-COX2 ($r=0.638$) ve NRF2-COX2 ($r=-0.638$) çiftlerinde gözlemlendi (Şekil 4.45).



Şekil 4.45. Distal kolonda sivelestat grubu verilerinin korelasyon analiz sonuçları

4.4.2.2 Mid Kolon (Mhskor) Bulguları

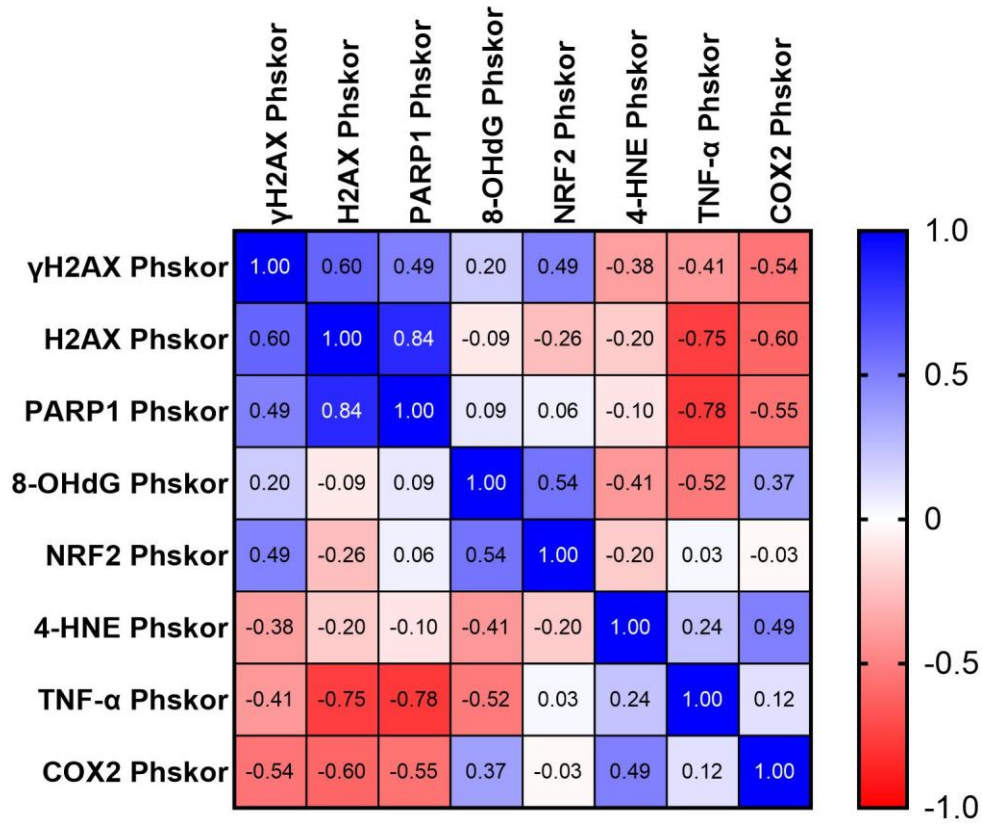
Sivelestat grubunun mid segmentinde istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki görülmedi; buna karşın TNF- α -PARP1 arasında yüksek düzeyde negatif korelasyon izlendi ($r=-0,754$, $p=0,084$). Orta düzeyde ilişkiler γ H2AX-H2AX ($r=0,600$), γ H2AX-PARP1 ($r=-0,609$), γ H2AX-COX2 ($r=0,657$), H2AX-4-HNE ($r=-0,657$), NRF2-8-OHdG ($r=-0,600$), COX2-8-OHdG ($r=0,657$), γ H2AX-NRF2 ($r=-0,543$) ve 4-HNE-TNF- α ($r=0,543$) çiftlerinde kaydedildi (Şekil 4.46).



Şekil 4.46. Mid kolonda sivelestat grubu verilerinin korelasyon analiz sonuçları

4.4.2.3 Proksimal Kolon (Phskor) Bulguları

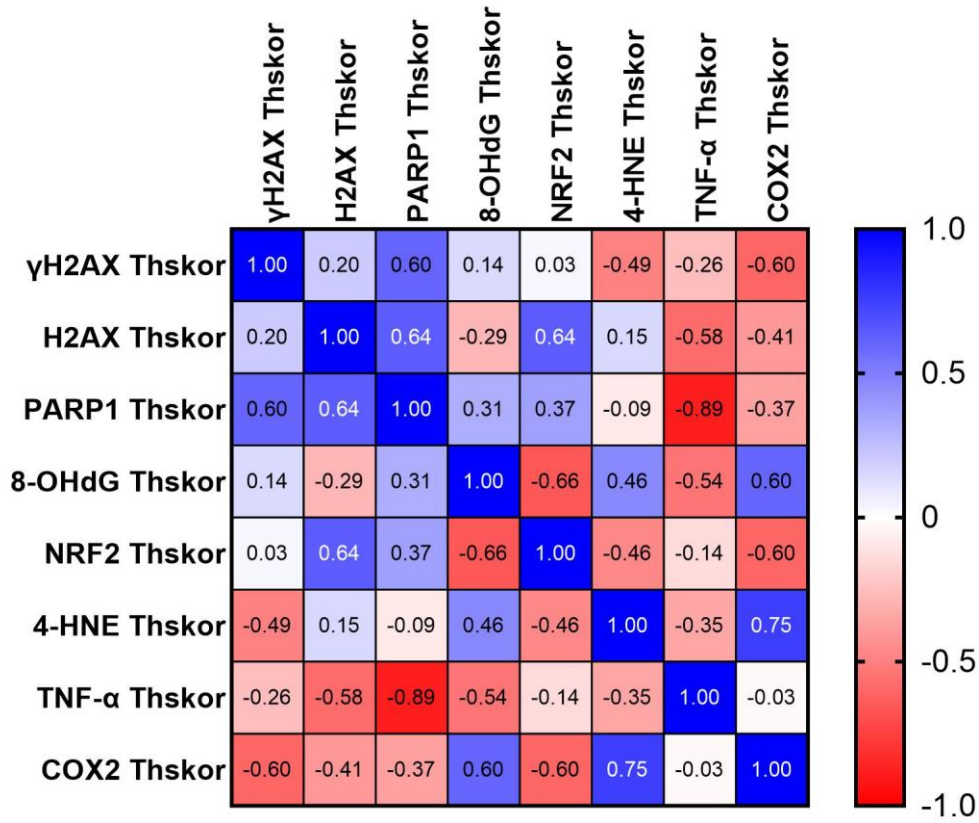
Sivelestat grubunun proksimal segmentinde yalnızca H2AX-PARP1 arasında anlamlı ve yüksek düzeyde pozitif korelasyon saptandı ($r=0,841$; $p=0,036$). Anlamlı olmamakla birlikte yüksek düzeye ulaşan diğer ilişkiler H2AX-TNF- α ($r=-0,754$) ve PARP1-TNF- α ($r=-0,779$) çiftlerinde negatif yönde görüldü. Orta düzey korelasyonlar γ H2AX-H2AX ($r=0,600$), H2AX-COX2 ($r=-0,600$), PARP1-COX2 ($r=-0,551$), γ H2AX -COX2 ($r=-0,543$) ile 8-OHdG-NRF2 ($r=0,543$) eşleşmelerinde kaydedildi (Şekil 4.47).



Şekil 4.47. Proksimal kolonda sivelestat grubu verilerinin korelasyon analiz sonuçları

4.4.2.4 Total Ortalama H Skoru (Thskor) Bulgusu

Sivelestat grubunun toplam H-skor analizinde yalnızca PARP1-TNF- α çifti istatistiksel olarak anlamlı ve yüksek düzeyde negatif korelasyon gösterdi ($r=-0,886$; $p=0,033$). Anlamlı olmamakla birlikte yüksek düzeyli ilişkiler γ H2AX-COX2 ($r=0,771$), γ H2AX-H2AX ($r=0,783$) ve 4-HNE-COX2 ($r=0,754$) çiftlerinde saptandı. Orta düzey korelasyonlar γ H2AX-PARP1 ($r=0,657$), H2AX-PARP1 ($r=0,638$), H2AX-NRF2 ($r=0,638$), NRF2-8-OHdG ($r=-0,657$), H2AX-TNF- α ($r=-0,580$) ve NRF2-COX2 ($r=-0,600$) çiftlerinde izlendi (Şekil 4.48).

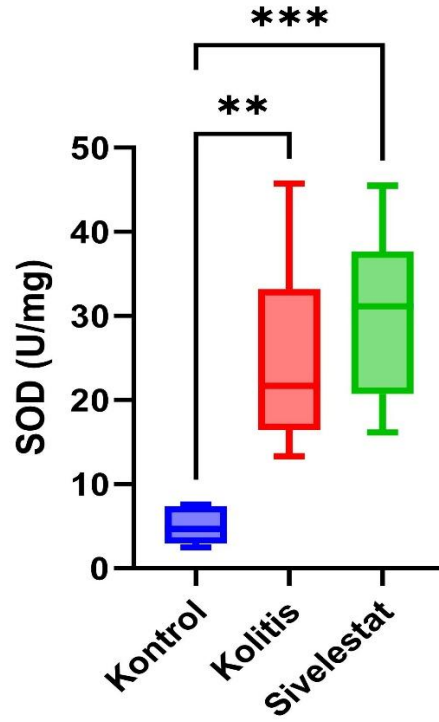


Şekil 4.48. Total kolonda sivelestat grubu verilerinin korelasyon analiz sonuçları

4.5. Biyokimyasal Bulgular

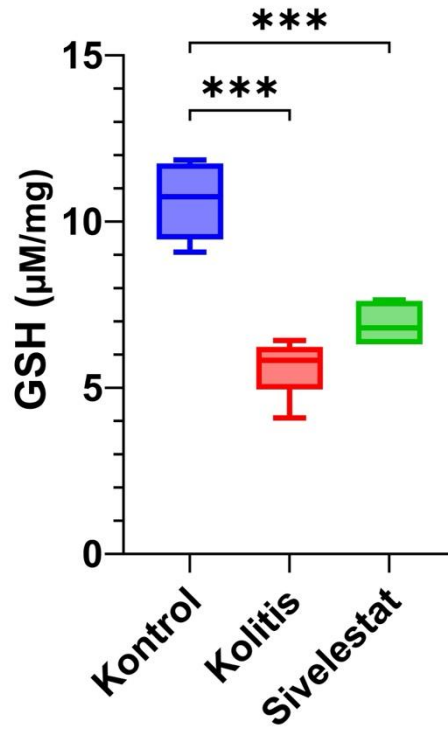
Fare kolon dokularından alınan örneklerle yapılan biyokimyasal analiz sonuçlarında SOD, GSH ve MDA seviyeleri değerlendirildi.

Verilere bakıldığında kontrol grubunda düşük seviyelerde bulunan SOD düzeylerinin kolitis ve sivelestat gruplarında yüksek olduğu görüldü. İstatistiksel değerlendirme yapıldığında kontrol ile kolitis ($p<0,01$) ve kontrol ile sivelestat ($p<0,001$) grupları arasındaki farkın anlamlı olduğu görüldü (Şekil 4.49).



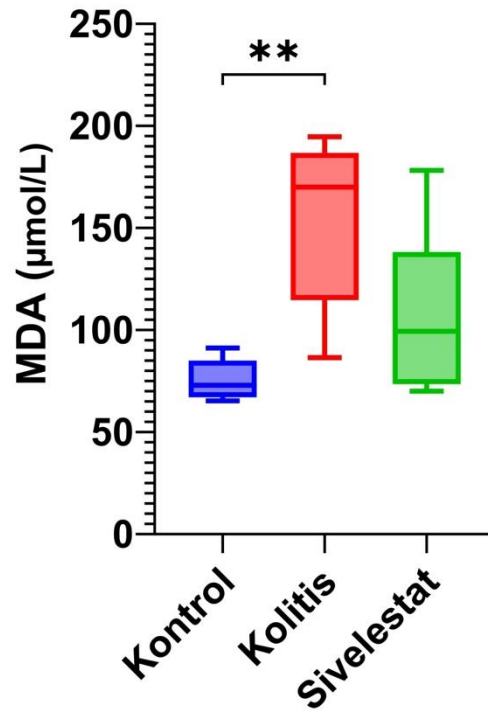
Şekil 4.49. Çalışma dokularından elde edilen SOD verilerinin istatistiksel değerlendirmesi (**: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$).

Kontrol grubunda yüksek olan GSH seviyelerinin kolitis grubunda belirgin olarak düştüğü gözlemlendi. Sivelestat grubunda ise kolitis grubuna göre GSH seviyelerinin belirgin şekilde arttığı dikkati çekti. Analiz sonuçlarının değerlendirilmesi yapıldığında; GSH seviyesindeki farkın kontrol ile kolitis ($p < 0,001$) ve kontrol ile sivelestat ($p < 0,001$) grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı olduğu gözlemlendi (Şekil 4.50).



Şekil 4.50. Kolon dokusunun GSH düzeylerinin biyokimyasal olarak değerlendirilmesi ve istatistik sonuçları (***: $p < 0,001$)

MDA sonuçları incelendiğinde ise kontrol grubunda MDA seviyelerinin yüksek olduğu ancak kolitis grubuna bakıldığında, kolitis grubunda kontrol grubuna göre MDA seviyelerinin belirgin derecede arttığı dikkati çekti. Sivelestat grubu ile kolitis grubu karşılaştırıldığında sivelestat grubundaki MDA seviyelerinin kolitis grubuna göre azaldığı görüldü. MDA seviyesi dikkate alındığında kolitis ile sivelestat grupları ($p < 0,01$) arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu dikkati çekti (Şekil 4.51).



Şekil 4.51. Kolon dokusunun MDA düzeylerinin biyokimyasal olarak değerlendirilmesi ve istatistik sonuçları (**: $p < 0,01$)

5. TARTIŞMA

Ülseratif kolitis sürekli tekrarlayan, değişen derecelerde ülserasyonla karakterize, yangısal bağırsak hastalığının Crohn hastalığıyla birlikte iki alt tipinden biridir ve dünyada Crohn hastalığına göre daha sık görülme insidansı bulunmaktadır (Gajendran ve ark., 2019). Bu çalışmada ülseratif kolitis hastalığının önemi üzerine duruldu ve hastalığın genel yapısı, insidansı, risk faktörleri, klinik belirtileri, patogenezi, histopatolojik bulguları, tanı ve tedavide kullanılan yaklaşımlar, prognoz ve hastalığın sonu ile ilgili bilgiler güncel literatür taranarak ortaya konuldu.

Ülseratif kolitis hastalarında kolitis ilişkili kolorektal kanser gelişme riski olduğu bilinmektedir. Kolorektal kanser oluşum bakımından genetik veya sporadik nedenlere bağlı meydana gelebilir, buna ek olarak tekrarlayan kolon enfeksiyonuna bağlı da şekillenebilir (Eaden ve ark., 2001). Enfeksiyöz kolorektal kanser oluşumunun moleküler gelişimi familial ve sporadik gelişimden farklıdır. Ülseratif kolitis sırasında ortaya çıkan oksidatif stres ve DNA'da oluşan hasar, kolorektal kanser gelişimi için gerekli olan mutasyonu sağlayabilir. Tez çalışmasında kolorektal kanserin gelişiminde nedenlerden biri olan ülseratif kolitis hastalığının, kolon dokusunda oksidatif stres ve DNA hasarı bakımından oluşturduğu değişiklikleri farelerde indüklenen deneysel kolitis modeli üzerinden araştırma hedeflendi.

Ülseratif kolitis, patogenezi hala tam olarak ortaya konulamamış bir hastalıktır. Bununla birlikte bazı vakalarda tedavi etkinliği de yetersiz kalabilmektedir. Ülseratif kolitis tedavisi yapılmaz veya tam remisyonu sağlanamazsa oldukça ciddi sonuçlara yol açabilen bir hastalıktır. Bu sonuçlardan biri de kolitis ilişkili kolorektal kanserdir ve ülseratif kolitis tanısı konulmuş hastaların en az %1-3,7'sinde kolitis ilişkili kolorektal kanser görülür (Gyde ve ark., 1982). Ülseratif kolitis hastalığının patogenezi detaylı bir şekilde incelemek, hastalığın mekanizmasını ve yollarını araştırmak, hastalık üzerine ilaçların veya besinlerin etkinliğini değerlendirmek, hastalığı önlemek veya tedavi etmek gibi amaçlar için hastalığın farklı görünümelerini veya hastalığı total olarak taklit edebilen hayvan modelleri geliştirilmiştir. Ancak yazarların araştırmasına göre bu hayvan modelleri hastalığın kolitis ilişkili kolorektal kanser modelini taklit etmemektedir. AOM/DSS ile oluşturulan kolorektal kanser

hayvan modelinde, AOM kolon dokusunda kolorektal kanser oluşumu için genlerde inisiyator etkide, 35-50 kDa moleküler ağırlıktaki DSS de promotör etkide bulunmaktadır. Kolutis hayvan modelinde kullanılan DSS ise 5 kDa moleküler ağırlıktadır ve bu moleküler ağırlıktaki DSS kolorektal kanser modelinde kullanılmamaktadır. Belirtildiği gibi ülseratif kolutisin en önemli sonlarından biri de kolorektal kansere dönüşümüdür. Hayvan modelinin bunu taklit etmesi için DSS ile oluşturulan kolutis hayvan modeli ile AOM/DSS ile oluşturulan kolorektal kanser hayvan modeli birbirine modifiye edilmiştir. Bunun için hayvanlara sıfırncı ve dördüncü günlerde AOM uygulaması yapılarak beklenen inisiyator etki oluşturulmuş, sonrasında kolorektal kanser modelinde kullanılmayan, sadece kolutise neden olan moleküler ağırlıktaki DSS, deney hayvanlarında kolutisi uyarmak için kullanılmıştır. Bu sayede bu tez çalışmasında hem kolorektal kanser oluşturmada genlerde istenen DNA hasarı oluşturulmuş hem de kolutis geliştirilmiştir.

Çalışmada, AOM ve DSS kullanılarak kronik kolutis modeli oluşturulmuş ve elde edilen histopatolojik bulgular literatürdeki benzer çalışmalarla uyum göstermiştir. Yu ve arkadaşlarının (Yu ve ark., 2023) DSS ile indüklenen kronik kolutis üzerine yaptıkları çalışmada, DSS'in 5 gün süreyle kullanılması, ardından 5 günlük ara verilmesi şeklinde uyguladıkları DSS döngüsünün üç kez tekrarlanmasıyla kronik kolutis modelinin başarıyla oluşturulduğu bildirilmiştir. Bu çalışmada benzer bir protokol izlenerek, DSS'in kronik yangı oluşturma kapasitesi doğrulandı. Özellikle, Yu ve arkadaşlarının modelinde tarif edilen submukoza ve kas tabakasındaki yangısal hücre infiltrasyonu, mukozal ödem ve fibrotik doku proliferasyonu gibi belirgin histopatolojik değişikliklerin, bu tez çalışması modelinde de net bir şekilde gözlemlenmiş olması dikkat çekicidir.

Tez çalışmasında, DSS uygulamasının yanı sıra AOM'un etkisi de değerlendirildi ve bu iki ajan arasındaki sinerjinin kolon mukozasında daha belirgin bir hasara yol açtığı gözlemlendi. Yu ve arkadaşlarının çalışmasında (Yu ve ark., 2023) rapor edilen, DSS'in mukozal yapıyı bozarak kronik yangısal bir ortam oluşturduğu bulgusu, bu çalışmada uygulanan modeldeki sonuçlarla da uyumlu bir şekilde ortaya çıkmıştır. Bununla birlikte, AOM eklenmesiyle DSS'in etkisinin daha şiddetli yangısal yanıt ve histopatolojik değişikliklerle birleştiği gösterilmiştir.

Kitajima ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada (Kitajima ve ark., 2000), 5 kDa moleküler ağırlığa sahip DSS'in farelerde kolitis indüksiyonundaki etkileri incelenmiştir. Bahsedilen çalışmada, 5 kDa DSS uygulamasının özellikle sekum ve proksimal kolon bölgelerinde yoğunlaşan histopatolojik değişikliklere yol açtığı rapor edilmiştir. Belirtilen lezyonlar arasında kript kaybı, mukozal ve submukozal yangısal hücre infiltrasyonu, submukozal ödem, erozyon ve ülserasyon yer almaktadır. Ayrıca, lezyonların şiddeti ve dağılımının DSS'in moleküler ağırlığına bağlı olarak değiştiği vurgulanmıştır. Bu tezde 5 kDa moleküler ağırlığa sahip DSS kullanarak oluşturulan kronik kolitis modelinde elde edilen histopatolojik bulguların benzer olmasına karşın, lezyonların yoğunluk gösterdiği bölge açısından Kitajima ve arkadaşlarının bulgularından farklıdır. Tez çalışmasında özellikle distal kolon dokularında mukozayı geniş alanlarda kaplayan şiddetli lezyonlar gözlenmiştir. Bu lezyonlar arasında geniş ülserasyonlar, kript kaybı, epitel hiperplazisi, belirgin hücresel hiperkromazi, goblet hücrelerinin azalması veya yokluğu ve dallanan kript yapıları dikkati çekmiştir. Mid-kolon ve proksimal kolon dokularında ise daha hafif ile orta derecede şiddetli lezyonlar gözlenmiş, ülser alanlarının azaldığı ve epitel hiperplazisinin daha sınırlı olduğu tespit edilmiştir. Tüm bu bulgular, 5 kDa ağırlığındaki DSS ile indüklenen kolitis modeliyle oluşturulmuş Pengkumsri ve arkadaşlarının yaptığı çalışma ile benzerlik göstermektedir (Pengkumsri ve ark., 2015).

Çalışmada kullanılan sivelestat uygulamasının kolondaki patolojik bulguları azalttığı gözlemlenmiştir. Sivelestat grubundaki farelerde, kolitis grubuna kıyasla histopatolojik olarak tespit edilen lezyonların şiddetinde azalmalar görülmüş olsa da bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Bu durum, sivelestatın kolitis üzerindeki potansiyel terapötik etkilerinin daha derinlemesine araştırılması gerektiğini işaret etmektedir. Genel olarak, bulgularımız DSS'in 5 kDa moleküler ağırlığının histopatolojik etkilerini ortaya koymakta ve kronik kolitisin patogeneze dair mevcut literatürle uyum içinde önemli bilgiler sunmaktadır.

Ülseratif kolitis patogenezinde nötrofillerin kritik bir rol oynadığı uzun süredir bilinmektedir. Literatürde, nötrofillerin mukozal kriptler ve bağırsak mukozasına birikiminin hastalık aktivitesi ve epitel hasarı ile doğrudan ilişkili olduğu belirtilmiştir (Naito ve ark., 2007). Aktive olmuş nötrofiller, reaktif oksijen türleri (ROS) ve azot

türleri üreterek oksidatif stresin oluşumuna neden olur. Bu süreç, epitel bütünlüğünün bozulmasına ve yangının şiddetlenmesine yol açar (Natsui ve ark., 1997; Okayasu ve ark., 1990). Bu tezde elde edilen bulgular, kolitis grubunda nötrofil elastaz (NE) ve Ly6G ekspresyonlarının belirgin şekilde artış gösterdiğini ortaya koymuş, literatürde belirtilen bu mekanizmalarla uyum göstermiştir.

Kolon kesitlerine yapılan immunohistokimyasal analizler, kolitis grubunda NE ve Ly6G eksprese eden hücrelerin özellikle distal kolonda yoğunlaştığını, mid-kolonda azaldığını ve proksimal kolonda en düşük düzeyde olduğunu göstermiştir. Bu bulgu, DSS ile indüklenen deneysel kolitis modellerinde DSS uygulamasının mukozada nötrofil birikimini artırdığına dair literatür verileriyle tutarlıdır (Morohoshi ve ark., 2006; Natsui ve ark., 1997). Bunun yanı sıra, kontrol grubunda NE ve Ly6G ekspresyonlarının düşük düzeyde olması, normal fizyolojik koşullarda nötrofil aktivitesinin sınırlı derecede varlığını göstermektedir. Sivelestat grubunda hem NE hem de Ly6G eksprese eden hücrelerin sayısındaki azalma dikkat çekicidir ve bu bulgu, literatürde nötrofil elastaz inhibitörlerinin DSS ile indüklenen kolitis modellerinde yangıyı azalttığını belirten çalışmalarla paraleldir (Morohoshi ve ark., 2006).

Sivelestat uygulamasının etkileri, NE ve Ly6G ekspresyonlarının özellikle kontrol grubu distal kolon dokusu başta olmak üzere genel olarak benzer seviyelere düşmesini sağlamış ve bu bulgu istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Sivelestat grubunda, kolitis grubuna göre belirgin şekilde azalan nötrofil infiltrasyonu, nötrofil elastazın yangının şiddetlenmesindeki rolünü bir kez daha doğrulamaktadır. Bu sonuç, nötrofillerin DSS ile indüklenen kolitis modellerinde oksidatif stres ve yangısal yanıtın ana belirleyicilerinden biri olduğunu ve nötrofil elastaz inhibitörlerinin terapötik potansiyel taşıdığını göstermektedir.

Oksidatif stresin ülseratif kolitis patogenezindeki rolü, nötrofillerin ROS üretimi ve bunun yol açtığı lipid peroksidasyonu mekanizmaları ile yakından ilişkilidir. Literatürde, DSS ile indüklenen deneysel kolitis modellerinde ROS üretiminin oksidatif stresi artırdığı ve hücresel hasara yol açtığı belirtilmiştir (Naito ve ark., 2007; Wang ve ark., 2023). 4-HNE gibi lipid peroksidasyon ürünleri, oksidatif

stresin önemli bir göstergesi olarak ön plana çıkmaktadır. Çalışmamızda, 4-HNE ekspresyonunun kontrol grubuna kıyasla kolitis grubunda belirgin şekilde artması, lipid peroksidasyonunun ülseratif kolitisteki kritik rolünü desteklemektedir. MDA seviyelerinin kolitis grubunda kontrol grubuna göre artış göstermesi, bu bulguyu biyokimyasal olarak doğrulamakta ve oksidatif stresin ülseratif kolitisteki etkisini bir kez daha vurgulamaktadır.

Oksidatif stresin kontrol altına alınmasında antioksidan mekanizmaların önemi büyüktür. GSH, hücrelerin oksidatif stresle mücadelede en önemli bileşenlerinden biri olarak bilinmektedir. Çalışmamızda, GSH seviyelerinin kontrol grubunda yüksek, ancak kolitis grubunda belirgin şekilde düşük olduğu gözlenmiştir. Bu durum, ROS birikiminin antioksidan savunma sistemlerini tükettiğini ve oksidatif hasarı artırdığını göstermektedir. Sivelestat tedavisinin, GSH seviyelerini artırması ve MDA seviyelerini düşürmesi, oksidatif stresin nötrofil elastaz inhibitörleriyle azaltılabileceğini ve hücresel dengenin yeniden sağlanabileceğini göstermektedir. Literatürde, benzer şekilde, antioksidanların DSS ile indüklenen oksidatif stresi hafifletmede etkili olduğu belirtilmiştir (Wang ve ark., 2014).

Biyokimyasal bulgularımız, immunohistokimyasal analizlerle elde edilen sonuçları desteklemektedir. Özellikle, Sivelestat grubunda hem 4-HNE hem de MDA seviyelerinin azalması, lipid peroksidasyonunun hafiflediğini ve hücresel zar bütünlüğünün daha iyi korunduğunu göstermektedir. Ayrıca, NRF-2 ekspresyonunun kontrol seviyelerine yaklaşması, hücresel savunma mekanizmalarının Sivelestat ile yeniden aktive olduğunu düşündürmektedir. Çalışmamız, oksidatif stresin ülseratif kolitis patogeneziindeki rolünü ve nötrofil elastaz inhibitörlerinin bu süreçteki terapötik potansiyelini ortaya koymaktadır. Hem biyokimyasal hem de immunohistokimyasal bulgular, Sivelestat'ın oksidatif stresi hafifleterek ülseratif kolitisin klinik yönetiminde umut vadeden bir ajan olabileceğini göstermektedir.

Pro-inflamatuar sitokinler, özellikle TNF- α ve IL-6, DSS ile indüklenen kolitiste inflamasyonun ana araçlarından bazılarıdır. Bu sitokinler, mukozal inflamasyonu şiddetlendiren ve doku hasarını artıran önemli moleküllerdir (Kim ve ark., 2012). Siklooksijenaz-2 (COX-2) ise yangısal süreçlerde rol oynayan

enzimlerden biridir. TNF- α gibi proinflamatuvar sitokinler dokuda COX-2 ekspresyonunu artırabilir. Yapılan bir çalışmada deneysel kolitis oluşturulan ratlarda COX-2 ve TNF- α inhibisyonunun oluşturulan yangı üzerine etkileri gösterilmiş, COX-2 ve TNF- α 'nın ilişkili olduğu ortaya konmuştur (Paiotti ve ark., 2012). Çalışmamızda, kolitis grubunda TNF- α seviyelerinin kontrol grubuna göre anlamlı şekilde arttığı tespit edilmiştir. Bununla birlikte, sivelestat tedavisi bu sitokin seviyesinde belirgin bir azalma sağlamış, bu da literatürde bildirilen anti-inflamatuvar mekanizmalarla uyumlu bulunmuştur (Zhang ve ark., 2021). Ayrıca COX-2 verileri de TNF- α ile paralellik göstermektedir; kontrol grubunda düşük seviyelerde iken kolitis grubunda yüksek seviyelerde olduğu, sivelestat grubunda ise azaldığı dikkati çekmiştir. Zhang ve arkadaşlarının çalışmasında, DSS uygulamasının bağırsak mukozasında ciddi inflamasyona yol açtığı ve bu sürecin MAPK/ELK1 sinyal yolları üzerinden düzenlendiği gösterilmiştir. Ayrıca, arbutin gibi doğal anti-inflamatuvar ajanların bu yolla TNF- α ve IL-6 seviyelerini düşürerek inflamasyonu azalttığı bildirilmiştir. Paiotti ve arkadaşları ise ayrı ayrı uyguladıkları COX-2 ve TNF- α inhibitörlerinin etkisini incelemişler; TNF- α inhibitörü uygulanan grupta COX-2 seviyelerinin düştüğünü, COX-2 inhibitörünün uygulandığı grupta TNF- α düzeylerinde herhangi bir değişiklik olmadığını bildirmişlerdir. Çalışmamızda, hem COX-2 ile TNF- α sonuçlarının literatür verileriyle uyumlu olduğu gösterilmiş, hem de sivelestatın arbutine benzer bir etki mekanizması ile inflamasyonu hafiflettiğini düşündürmüştür.

Çalışmamızdaki biyokimyasal analizlerde, GSH seviyelerinin kolitis grubunda belirgin şekilde azaldığını ve SOD ve MDA seviyelerinin ise kontrol grubuna göre arttığını tespit ettik. Bu durum, DSS'in oksidatif stres yoluyla lipid peroksidasyonunu artırdığı ve antioksidan savunma mekanizmalarını tükettiğini göstermektedir (Kim ve ark., 2012; Zhang ve ark., 2021). Sivelestat tedavisi ile dokulardaki GSH seviyelerinin arttığını, SOD seviyelerinde belirgin bir farklılık olmadığı ancak MDA seviyelerinin azaldığını gözlemledik. Bu sonuçlar immunohistokimyasal verilerle paralellik göstermekle birlikte istatistiksel olarak anlamlılığa ulaşmamıştır. Sivelestatın oksidatif stres üzerindeki baskılayıcı etkisinin, anti-inflamatuvar mekanizmalara bağlı olarak şekillendiği düşünülmüş ve bu durum GSH, MDA ve SOD oranlarındaki değişimlerle de kısmen desteklendiği görülmüştür.

Tezde elde edilen bulgular, sivelestatın inflamasyonu ve oksidatif stresi azaltarak DSS ile indüklenen kolitisin tedavisinde umut vadeden bir ajan olabileceğini göstermektedir. İnflamasyonun şiddetini azaltan bu etkiler, özellikle nötrofil elastaz aktivitesini hedefleyen tedavilerin etkinliğini vurgulamaktadır.

Ülseratif kolitiste, DNA hasarı, özellikle ROS ve nitrik oksit türevleri tarafından tetiklenir. ROS, doğrudan DNA çift sarmallı kırıklarına (DSB) neden olmamakla birlikte, DNA üzerindeki tek sarmallı kırıkları (SSB) DSB'lere dönüştürerek genetik instabiliteye yol açabilir (Sawa ve Ohshima, 2006; Vilenchik ve Knudson, 2003). Bu mekanizma, SSB'lerin yakın bölgelerde birikmesi ya da replikasyon çatallarının çökmesi sonucu ortaya çıkar (Cahill ve ark., 2006). Çalışmamızda, γ H2AX ekspresyonunun kolitis grubunda kontrol grubuna kıyasla anlamlı şekilde artmış olması, DSB'lerin ülseratif kolitis patogeneziindeki önemini ve ROS'un bu sürece katkısını doğrulamaktadır. H2AX, DNA çift sarmallı kırıklarına yanıt olarak hızla fosforile olmakta ve DNA tamirinde rol oynayan proteinlerin toplanmasını sağlamaktadır (Dickey ve ark., 2009; Fernandez-Capetillo ve ark., 2004). Literatürde, ülseratif kolitis hastalarından alınan kolon biyopsilerinde γ H2AX seviyelerinin kontrol gruplarına göre arttığı ve bu artışın inflamasyonla ilişkili olduğu belirtilmiştir (Chambers ve ark., 2005). Sivelestat tedavisi sonrası γ H2AX ekspresyonunun kolitis grubuna göre anlamlı derecede düşmesi, nötrofil elastaz inhibisyonunun DNA hasarını önemli ölçüde geri çevirdiği şeklinde yorumlanabilir. Sivelestatın buradaki etkisi; inflamatuvar süreçler sırasında hücredeki oksidatif stres yükünü hafifletmesi sonucu DNA hasarı onarımının başladığı şeklinde yorumlanabilir. Bu bulgu, Sivelestat'ın inflamasyon ve oksidatif stres üzerindeki bazı baskılayıcı etkileriyle birlikte DNA hasarı üzerinde dolaylı etkisinin olabileceğini düşündürmüştür.

8-OHdG, ROS'un neden olduğu oksidatif DNA hasarının spesifik bir göstergesidir ve ülseratif kolitis ile ilişkili neoplazilerde yüksek seviyelerde bulunur (D'Inca ve ark., 2004; Gushima ve ark., 2009). Çalışmamızda, kolitis grubunda 8-OHdG seviyelerinin belirgin şekilde artmış olması, ROS'un DNA üzerindeki yıkıcı etkisini ve ülseratif kolitisin kronik inflamatuvar doğasının genetik stabilite üzerindeki tehditlerini ortaya koymaktadır. Ancak, 8-OHdG ölçümünün analitik zorlukları

nedeniyle sonuçların dikkatle yorumlanması gerekmektedir (ESCODD, 2003). Çalışmamızdaki γ H2AX ve 8-OHdG bulguları, DNA hasarının ülseratif kolitis patogenezindeki kritik rolünü ve bu sürecin ROS tarafından nasıl tetiklendiğini ortaya koymaktadır. γ H2AX ekspresyonunun kolitis grubuna kıyasla sivelestat grubunda düşmüş olması, nötrofil elastaz inhibitörünün DNA hasarını baskıladığını göstermekle birlikte 8-OHdG’de devam eden artış nedeniyle ROS kaynaklı DNA hasarının engellenmesinde sınırlı rolü olduğunu düşündürmektedir. Bu bulgular, nötrofil elastaz inhibisyonunun inflamasyon ve oksidatif stresin bazı göstergeleri üzerinde etkili olsa da oksidatif stres aracılı DNA hasarına karşı koruyucu etkilerinin sınırlı olabileceğini ve ülseratif kolitisin kronik komplikasyonlarını önlemede daha kapsamlı tedavi stratejilerine ihtiyaç olabileceğini düşündürmektedir.

Elde ettiğimiz segment-spesifik ve toplam korelasyonlar, kolitin patofizyolojisinde inflamasyon, oksidatif stres ve DNA hasarı arasındaki çok yönlü etkileşimi ortaya koymaktadır. İstatistiksel olarak anlamlı ilişkiler, bu biyobelirteçlerin birbirlerini karşılıklı olarak etkilediği bir kısır döngüye işaret etmektedir: Pro-inflamatuvar sitokin TNF- α COX-2’yi ve dolayısıyla prostaglandin aracılı inflamasyonu artırmakta; inflamasyon kaynaklı ROT üretimi DNA’da 8-OHdG ve hücre zarlarında 4-HNE birikimine yol açmakta; biriken hasar ürünleri (ör. 4-HNE) epitelyal bariyeri bozup inflamasyonu daha da alevlendirmektedir (Wu ve ark., 2017; Muro ve ark., 2024). Oluşan DNA hasarı karşısında hücreler onarım mekanizmalarını (PARP1, H2AX) devreye soksa da, aşırı hasar durumunda bu mekanizmalar yetersiz kalarak veya kontrolden çıkarak (PARP1 hiperaktivasyonu gibi) doku hasarını derinleştirebilmektedir (Zingarelli ve ark., 2003; Vitali ve ark., 2023). Sivelestat tedavisi, özellikle nötrofil kaynaklı inflamatuvar döngüyü hedef alarak bu etkileşim ağındaki kilit halkaları zayıflatmıştır. Tedavi ile birçok korelasyonun anlamlılığını yitirmesi veya yön değiştirmesi, Sivelestat’ın inflamasyon-oksidatif hasar sarmalını kırdığını göstermektedir. Nitekim, nötrofil elastaz inhibitörlerinin DSS ile tetiklenen kolitte hem klinik hem biyokimyasal iyileşme sağladığı, inflamatuvar sitokinleri azalttığı ve histopatolojik hasarı önlediği literatürde bildirilmiştir (Shioya ve ark., 2014; Morohoshi ve ark., 2006). Bizim bulgularımız da Sivelestat tedavisinin benzer biçimde TNF- α /COX-2 eksenini baskıladığını, ROS üretimini kısıtlayarak 8-OHdG ve 4-HNE birikimini engellediğini ve böylece DNA hasarının (γ H2AX) azaltılıp onarım

kapasitesinin (PARP1, H2AX) daha etkin kullanılmasını sağladığını düşündürmektedir. Sonuç olarak, anlamlı korelasyonların parametre bazında incelenmesi, kolit patogenezinin moleküler düzeyde bir ağ etkileşimi olduğunu ve bu ağın Sivelestat gibi hedefe yönelik tedavilerle modüle edilebileceğini göstermektedir. Bu çalışma, literatürdeki bilgilere ek olarak inflamasyon, oksidatif stres ve DNA hasarı arasındaki bağlantılara dair patogenezi aydınlatarak, nötrofil elastaz inhibisyonunun kolitiste terapötik potansiyelini moleküler düzlemde ortaya koymaktadır.



6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu tez çalışması, AOM/DSS ile oluşturulan kronik ülseratif kolitis modelinde nötrofil elastaz inhibitörü sivelestatın histopatolojik, immunohistokimyasal ve biyokimyasal düzeylerdeki etkilerini kapsamlı biçimde ortaya koymuştur. Model, beklenildiği gibi distalde yoğunlaşan ülserasyon, kript kaybı, infiltratif inflamasyon ve oksidatif/DNA hasarı belirteçlerinde (4-HNE, γ H2AX, 8-OHdG, TNF- α , COX-2) anlamlı artışlar meydana getirmiştir. Sivelestat tedavisi, özellikle nötrofil elastaz (ELA2) ve Ly6G-pozitif hücre birikimini, TNF- α ve COX-2 ekspresyonunu, lipid peroksidasyonu (4-HNE) ve çift zincir kırık işaretini (γ H2AX) istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azaltmış; oksidatif stresin biyokimyasal göstergesi MDA'yı düşürmüş ve GSH'yi yükseltmiştir. Bununla birlikte, NRF2 ve 8-OHdG düzeylerinde anlamlı bir gerileme izlenmemiş, PARP1 ekspresyonu her iki kolitisli grupta da yüksek kalmış, H2AX düzeyi ise sivelestat grubunda artış göstermiştir. Histopatolojik skorlar gerileme eğilimi gösterse de bu fark istatistiksel eşğin altında kalmıştır. Bu veriler, sivelestatın inflamatuvar yanıt ve belirli oksidatif/DNA hasarı parametrelerinde güçlü, ancak bazı antioksidan savunma veya baz hasarı onarım yollarında sınırlı etki gösterdiğini düşündürmektedir. Korelasyon analizleri bağlamında ise bu çalışma, kolitin patogenezinde inflamasyon, oksidatif stres ve DNA hasarının birbirini besleyen bir etkileşim ağı oluşturduğunu ortaya koymuştur. Sivelestat tedavisinin bu ağı kırarak inflamatuvar yanıtı, oksidatif hasarı ve DNA hasarını azalttığı gösterilmiş; böylece nötrofil elastaz inhibisyonunun kolitis tedavisinde moleküler düzeyde etkili bir strateji olabileceği ortaya konulmuştur.

Sonuç olarak, Sivelestat tedavisi inflamasyon ve lipid peroksidasyonu kaynaklı DNA hasarını azaltmada etkili olsa da, NRF2-odaklı antioksidan savunma ve 8-OHdG birikimi üzerinde sınırlı etki göstermiştir. Korelasyon analizleri, baz oksidasyonu ve onarım yanıtlarının segment-spesifik farklılıklar gösterdiğini ortaya koymuştur. Bu bulgular, Sivelestat'ın NRF2 aktivatörleri veya PARP1 modülatörleri ile kombine edilmesinin, kolitiste daha geniş spektrumlu bir genetik koruma sağlayabileceğini düşündürmektedir.

KAYNAKLAR

- Andersson P, Soderholm JD (2009).** Surgery in ulcerative colitis: indication and timing. *Dig. Dis.*, **27**, 335–340.
- Andrabi SA, Dawson TM, Dawson VL (2008).** Mitochondrial and nuclear cross talk in cell death: parthanatos. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **1147**, 233-41. doi: 10.1196/annals.1427.014. PMID: 19076445; PMCID: PMC4454457.
- Barry R, Ruano-Gallego D, Radhakrishnan ST, Lovell S, Yu L, Kotik O, Glegola-Madejska I, Tate EW, Choudhary JS, Williams HRT, Frankel G (2020).** Faecal neutrophil elastase-antiprotease balance reflects colitis severity. *Mucosal Immunol.*, **13**(2), 322-333.
- Bernstein CN, Blanchard JF, Kliewer E, Wajda A (2001).** Cancer risk in patients with inflammatory bowel disease: a population-based study. *Cancer*, **91**, 854-862.
- Biedermann L, Brülisauer K, Zeitz J, Frei P, Scharl M, Vavricka SR, Fried M, Loessner MJ, Rogler G, Schuppler M (2014).** Smoking cessation alters intestinal microbiota: insights from quantitative investigations on human fecal samples using FISH. *Inflamm. Bowel Dis.*, **20**(9), 1496-501.
- Bleich A, Mähler M, Most C, Leiter EH, Liebler-Tenorio E, Elson CO, Hedrich HJ, Schlegelberger B, Sundberg JP (2004).** Refined histopathologic scoring system improves power to detect colitis QTL in mice. *Mamm. Genome*, **15**(11), 865-71.
- Brackmann S, Andersen SN, Aamodt G, Langmark F, Clau- sen OP, Aadland E, Fausa O, Rydning A, Vatn MH (2009).** Relation- ship between clinical parameters and the colitis-colorectal cancer interval in a cohort of patients with colorectal cancer in inflammatory bowel disease. *Scand. J. Gastroenterol.*, **44**, 46-55.
- Cahill D, Connor B, Carney JP (2006).** Mechanisms of eukaryotic DNA double strand break repair. *Front. Biosci.*, **11**, 1958-76. doi: 10.2741/1938. PMID: 16368571.
- Chambers WM, Warren BF, Jewell DP, Mortensen NJ (2005).** Cancer surveillance in ulcerative colitis. *Br. J. Surg.*, **92**(8), 928-36. doi: 10.1002/bjs.5106. PMID: 16034807.
- Cheng KC, Cahill DS, Kasai H, Nishimura S, Loeb LA (1992).** 8-Hydroxyguanine, an abundant form of oxidative DNA damage, causes G----T and A----C substitutions. *J. Biol. Chem.*, **267**(1), 166-72. PMID: 1730583.
- Cheng L, Jin Z, Zhao R, Ren K, Deng C, Yu S (2015).** Resveratrol attenuates inflammation and oxidative stress induced by myocardial ischemia-reperfusion injury: role of Nrf2/ARE pathway. *Int. J. Clin. Exp. Med.*, **8**, 10420-8. PMID: 26379832; PMCID: PMC4565215.
- Cheung EC, Vousden KH (2022).** The role of ROS in tumour development and progression. *Nat. Rev. Cancer.*, **22**(5), 280-297.

Church SL, Grant JW, Ridnour LA, Oberley LW, Swanson PE, Meltzer PS, Trent JM (1993). Increased manganese superoxide dismutase expression suppresses the malignant phenotype of human melanoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **90(7)**, 3113-7.

Colgan SP (2015). Neutrophils and inflammatory resolution in the mucosa. *Semin. Immunol.*, **27**, 177–83.

Dalle-Donne I, Rossi R, Colombo R, Giustarini D, Milzani A (2006). Biomarkers of oxidative damage in human disease. *Clin. Chem.*, **52(4)**, 601-23. doi: 10.1373/clinchem.2005.061408. Epub 2006 Feb 16. PMID: 16484333.

de Robertis M, Massi E, Poeta ML, Carotti S, Morini S, Cecchetelli L, Signori E, Fazio VM (2011). The AOM/DSS murine model for the study of colon carcinogenesis: From pathways to diagnosis and therapy studies. *J. Carcinog.*, **10**, 9.

de Vos M, Schreiber V, Dantzer F (2012). The diverse roles and clinical relevance of PARPs in DNA damage repair: current state of the art. *Biochem. Pharmacol.*, **84(2)**, 137-46. doi: 10.1016/j.bcp.2012.03.018. Epub 2012 Mar 31. PMID: 22469522.

Dickey JS, Redon CE, Nakamura AJ, Baird BJ, Sedelnikova OA, Bonner WM (2009). H2AX: functional roles and potential applications. *Chromosoma.*, **118(6)**, 683-92. doi: 10.1007/s00412-009-0234-4. Epub 2009 Aug 26. PMID: 19707781; PMCID: PMC3094848.

Dignass A, Eliakim R, Magro F, Maaser C, Chowers Y, Geboes K, Mantzaris G, Reinisch W, Colombel JF, Vermeire S, Travis S, Lindsay JO, Van Assche G (2012). Second European evidence-based consensus on the diagnosis and management of ulcerative colitis part 1: definitions and diagnosis. *J. Crohns Colitis*, **6(10)**, 965-90.

D'Incà R, Cardin R, Benazzato L, Angriman I, Martines D, Sturniolo GC (2004). Oxidative DNA damage in the mucosa of ulcerative colitis increases with disease duration and dysplasia. *Inflamm. Bowel. Dis.*, **10(1)**, 23-7. doi: 10.1097/00054725-200401000-00003. PMID: 15058522.

Ding Q, Wang Y, Yang C, Tuerxun D, Yu X (2023). Effect of Sivelestat in the Treatment of Acute Lung Injury and Acute Respiratory Distress Syndrome: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Intensive Care Res.*, **1**, 1-10.

Dobbins WO (1984). Dysplasia and malignancy in inflammatory bowel disease. *Annu. Rev. Med.*, **35**, 33-48.

do Nascimento RPD, Machado APDF, Galvez J, Cazarin CBB, Maróstica Junior MR (2020). Ulcerative colitis: Gut microbiota, immunopathogenesis and application of natural products in animal models. *Life Sci.*, **258**, 118129. doi: 10.1016/j.lfs.2020.118129. Epub 2020 Jul 25. PMID: 32717271.

Eaden JA, Abrams KR, Mayberry JF (2001). The risk of colorectal cancer in ulcerative colitis: a meta-analysis. *Gut*, **48**, 526-535.

Ekbom A, Adami HO, Helmick CG, Jonzon A, Zack MM (1990). Perinatal risk factors for inflammatory bowel disease: a case control study. *Am. J. Epidemiol.*, **132**, 1111-1119 [PMID:2260543]

European Standards Committee on Oxidative DNA Damage (ESCODD) (2003). Measurement of DNA oxidation in human cells by chromatographic and enzymic methods. *Free Radic. Biol. Med.*, **34(8)**, 1089-99. doi: 10.1016/s0891-5849(03)00041-8. PMID: 12684094.

Fernandez-Capetillo O, Lee A, Nussenzweig M, Nussenzweig A (2004). H2AX: the histone guardian of the genome. *DNA Repair (Amst.)*, **3(8-9)**, 959-67. doi: 10.1016/j.dnarep.2004.03.024. PMID: 15279782.

Gajendran M, Loganathan P, Jimenez G, Catinella AP, Ng N, Umapathy C, Ziade N, Hashash JG (2019). A comprehensive review and update on ulcerative colitis. *Dis. Mon.*, **65(12)**, 100851. doi: 10.1016/j.disamonth.2019.02.004. Epub 2019 Mar 2. PMID: 30837080.

Geerling B, Dagnelie P, Badart-Smook A, Russel M, Stockbrügger R, Brummer RJ (2000). Diet as a risk factor for the development of ulcerative colitis. *Am. J. Gastroenterol.*, **95**, 1008–1013.

Glassman MS, Newman L, Berezin S, Gryboski JD (1990). Cow's milk protein sensitivity during infancy in patients with inflammatory bowel disease. *Am. J. Gastroenterol.*, **85**, 838–840.

Grivennikov SI (2013). Inflammation and colorectal cancer: colitis-associated neoplasia. *Semin. Immunopathol.*, **35**, 229-244 [PMID: 23161445 DOI: 10.1007/s00281-012-0352-6]

Gushima M, Hirahashi M, Matsumoto T, Fujita K, Fujisawa R, Mizumoto K, Nakabeppu Y, Iida M, Yao T, Tsuneyoshi M (2009). Altered expression of MUTYH and an increase in 8-hydroxydeoxyguanosine are early events in ulcerative colitis-associated carcinogenesis. *J. Pathol.*, **219(1)**, 77-86. doi: 10.1002/path.2570. PMID: 19479711.

Gyde S, Prior P, Dew MJ, Saunders V, Waterhouse JA, Allan RN (1982). Mortality in ulcerative colitis. *Gastroenterol.*, **83**, 36-43 [PMID: 7075944]

Hatoum OA, Heidemann J, Binion DG (2006). The intestinal microvasculature as a therapeutic target in inflammatory bowel disease. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **1072**, 78-97.

Hegazi RA, Rao KN, Mayle A, Sepulveda AR, Otterbein LE, Plevy SE (2005). Carbon monoxide ameliorates chronic murine colitis through a heme oxygenase 1-dependent pathway. *J. Exp. Med.*, **202**, 1703- 13.

Herrero-Cervera A, Soehnlein O, Kenne E (2022). Neutrophils in chronic inflammatory diseases. *Cell Mol. Immunol.*, **19(2)**, 177-191. doi: 10.1038/s41423-021-00832-3. Epub 2022 Jan 17. PMID: 35039631; PMCID: PMC8803838.

Hybertson BM, Gao B, Bose SK, McCord JM (2011). Oxidative stress in health and disease: the therapeutic potential of Nrf2 activation. *Mol. Aspects Med.*, **32(4-6)**, 234-46. doi: 10.1016/j.mam.2011.10.006. Epub 2011 Oct 15. PMID: 22020111.

Janoff A (1985). Elastase in tissue injury. *Ann. Rev. Med.*, **36**, 207-16. doi: 10.1146/annurev.me.36.020185.001231. PMID: 3888051.

Janoff A, Scherer J (1968). Mediators of inflammation in leukocyte lysosomes. IX. Elastinolytic activity in granules of human polymorphonuclear leukocytes. *J. Exp. Med.*, **128(5)**, 1137-55. doi: 10.1084/jem.128.5.1137. PMID: 5303065; PMCID: PMC2138566.

Kamohara H, Sakamoto K, Mita S, An XY, Ogawa M (1997). Neutrophil elastase inhibitor (ONO-5046.Na) suppresses the proliferation, motility and chemotaxis of a pancreatic carcinoma cell line, Capan-1. *Res. Commun. Mol. Pathol. Pharmacol.*, **98(1)**, 103-8. PMID: 9434320.

Karban A, Waterman M, Panhuysen CI, Pollak RD, Nesher S, Datta L, Weiss B, Suissa A, Shamir R, Brant SR, Eliakim R (2004). NOD2/CARD15 genotype and phenotype differences between Ashkenazi and Sephardic Jews with Crohn's disease. *Am. J. Gastroenterol.*, **99(6)**, 1134-40. doi: 10.1111/j.1572-0241.2004.04156.x. PMID: 15180737.

Karihtala P, Soini Y (2007). Reactive oxygen species and antioxidant mechanisms in human tissues and their relation to malignancies, *APMIS*, **115(2)**, 81-103.

Kasai H (1997). Analysis of a form of oxidative DNA damage, 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, as a marker of cellular oxidative stress during carcinogenesis. *Mutat. Res.*, **387(3)**, 147-63. doi: 10.1016/s1383-5742(97)00035-5. PMID: 9439711.

Kasai H. (2002). Chemistry-based studies on oxidative DNA damage: formation, repair, and mutagenesis. *Free Rad. Bio. Med.*, **33(4)**, 450-456.

Keogh MC, Kim JA, Downey M, Fillingham J, Chowdhury D, Harrison JC, Onishi M, Datta N, Galicia S, Emili A, Lieberman J, Shen X, Buratowski S, Haber JE, Durocher D, Greenblatt JF, Krogan NJ (2005). A phosphatase complex that dephosphorylates gammaH2AX regulates DNA damage checkpoint recovery. *Nature*, **439(7075)**, 497-501. doi: 10.1038/nature04384. Epub 2005 Nov 20. PMID: 16299494.

Kim JJ, Shajib MS, Manocha MM, Khan WI (2012). Investigating intestinal inflammation in DSS-induced model of IBD. *J. Vis. Exp.*, **60**, 3678. doi: 10.3791/3678. PMID: 22331082; PMCID: PMC3369627.

Kitajima S, Takuma S, Morimoto M (2000). Histological analysis of murine colitis induced by dextran sulfate sodium of different molecular weights. *Exp. Anim.*, **49(1)**, 9-15. doi: 10.1538/expanim.49.9. PMID: 10803356.

Kohri K, Ueki IF, Nadel JA (2002). Neutrophil elastase induces mucin production by ligand-dependent epidermal growth factor receptor activation. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.*, **283(3)**, L531-40. doi: 10.1152/ajplung.00455.2001. PMID: 12169572.

Kopylov U, Boucher G, Waterman M, Rivers CR, Patel M, Cho JH, Colombel JF, Duerr RH, Binion D, McGovern DP, Schumm PP, Brant SR, Silverberg MS, Rioux JD, Bitton A (2016). Genetic Predictors of Benign Course of Ulcerative Colitis-A North American Inflammatory Bowel Disease Genetics Consortium Study. *Inflamm. Bowel Dis.*, **22(10)**, 2311-6. doi: 10.1097/MIB.0000000000000913. PMID: 27575496; PMCID: PMC5098421.

Kornbluth A, Sachar DB (2010). Practice Parameters Committee of the American College of Gastroenterology. Ulcerative colitis practice guidelines in adults: American College of Gastroenterology, Practice Parameters Committee. *Am. J. Gastroenterol.*, **105**, 501–523 quiz 24.

Kumar V, Abbas AK, Aster JC, Deyrup AT (2023). Robbins and Kumar basic pathology. *Elsevier Health Sciences*. p:586-90.

Kühl AA, Kakirman H, Janotta M, Dreher S, Cremer P, Pawlowski NN, Loddenkemper C, Heimesaat MM, Grollich K, Zeitz M, Farkas S, Hoffmann JC (2007). Aggravation of different types of experimental colitis by depletion or adhesion blockade of neutrophils. *Gastroenterol.*, **133(6)**, 1882-92. doi: 10.1053/j.gastro.2007.08.073. Epub 2007 Sep 5. PMID: 18054560.

Langholz E, Munkholm P, Davidsen M, Binder V (1992). Colorectal cancer risk and mortality in patients with ulcerative colitis. *Gastroenterol.*, **103**, 1444-1451 [PMID: 1358741]

Langholz E, Munkholm P, Nielsen OH, Kreiner S, Binder V (1991). Incidence and prevalence of ulcerative colitis in Copenhagen county from 1962 to 1987. *Scand. J. Gastroenterol.*, **26**, 1247–1256.

Loftus EV (2004). Clinical epidemiology of inflammatory bowel disease: incidence, prevalence, and environmental influences. *Gastroenterol.*, **126**, 1504–1517.

Lord CJ, Ashworth A (2012). The DNA damage response and cancer therapy. *Nature*, **481(7381)**, 287-94. doi: 10.1038/nature10760. PMID: 22258607.

Lord CJ, Ashworth A (2017). PARP inhibitors: Synthetic lethality in the clinic. *Science*, **355(6330)**, 1152-1158. doi: 10.1126/science.aam7344. Epub 2017 Mar 16. PMID: 28302823; PMCID: PMC6175050.

Lubos E, Loscalzo J, Handy DE (2011). Glutathione peroxidase-1 in health and disease: from molecular mechanisms to therapeutic opportunities, *Antioxid. Redox Signal*, **15(7)**, 1957-97.

Lunec J, Holloway KA, Cooke MS, Faux S, Griffiths HR, Evans MD (2002). Urinary 8-oxo-2'-deoxyguanosine: redox regulation of DNA repair in vivo? *Free Radic. Biol. Med.* **33(7)**, 875-85. doi: 10.1016/s0891-5849(02)00882-1. PMID: 12361799.

Mah LJ, El-Osta A, Karagiannis TC (2010a). GammaH2AX: a sensitive molecular marker of DNA damage and repair. *Leukemia*, **24(4)**, 679-86. doi: 10.1038/leu.2010.6. Epub 2010 Feb 4. PMID: 20130602.

Mah LJ, El-Osta A, Karagiannis TC (2010b). GammaH2AX as a molecular marker of aging and disease. *Epigenetics*, **5(2)**, 129-36. doi: 10.4161/epi.5.2.11080. Epub 2010 Mar 1. PMID: 20150765.

Mahid SS, Minor KS, Soto RE, Hornung CA, Galandiuk S (2006). Smoking and inflammatory bowel disease: a meta-analysis. *Mayo Clin. Proc.*, **81**, 1462–1471.

Mainardi CL, Hasty DL, Seyer JM, Kang AH (1980). Specific cleavage of human type III collagen by human polymorphonuclear leukocyte elastase. *J. Biol. Chem.*, **255(24)**, 12006-10. PMID: 6254989.

Martini GA, Brandes JW (1976). Increased consumption of refined carbohydrates in patients with Crohn's disease. *Klin. Wochenschr.*, **54**, 367–371.

McCord JM, Fridovich I (1969). Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein). *J. Biol. Chem.*, **244(22)**, 6049-55. PMID: 5389100.

McDonald JA, Kelley DG (1980). Degradation of fibronectin by human leukocyte elastase. Release of biologically active fragments. *J. Biol. Chem.*, **255(18)**, 8848-58. PMID: 6902725.

McIlroy J, Ianiro G, Mukhopadhyaya I, Hansen R, Hold GL (2018). Review article: the gut microbiome in inflammatory bowel disease-avenues for microbial management. *Aliment. Pharmacol. Ther.*, **47(1)**, 26-42. doi: 10.1111/apt.14384. Epub 2017 Oct 16. PMID: 29034981.

Menegon S, Columbano A, Giordano S (2016). The Dual Roles of NRF2 in Cancer. *Trends. Mol. Med.*, **22(7)**, 578-593. doi: 10.1016/j.molmed.2016.05.002. Epub 2016 Jun 2. PMID: 27263465.

Morohoshi Y, Matsuoka K, Chinen H, Kamada N, Sato T, Hisamatsu T, Okamoto S, Inoue N, Takaishi H, Ogata H, Iwao Y, Hibi T (2006). Inhibition of neutrophil elastase prevents the development of murine dextran sulfate sodium-induced colitis. *J. Gastroenterol.*, **41(4)**, 318-24. doi: 10.1007/s00535-005-1768-8. PMID: 16741610.

Motohashi H, Yamamoto M (2004). Nrf2-Keap1 defines a physiologically important stress response mechanism. *Trends Mol. Med.*, **10(11)**, 549-57. doi: 10.1016/j.molmed.2004.09.003. PMID: 15519281.

Muro P, Zhang L, Li S, Zhao Z, Jin T, Mao F, Mao Z (2024). The emerging role of oxidative stress in inflammatory bowel disease. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*, **15**, 1390351. doi: 10.3389/fendo.2024.1390351. PMID: 39076514; PMCID: PMC11284038.

Naito Y, Takagi T, Handa O, Ishikawa T, Matsumoto N, Yagi N, Matsuyama K, Nakagawa S, Yamaguchi T, Yoshida N, Yoshikawa T (2001). Role of superoxide and lipid peroxidation in the pathogenesis of dextran sulfate sodium-induced colitis in mice. *ITE Letters*, **2**, 663–667

Naito Y, Takagi T, Yoshikawa T (2007). Neutrophil-dependent oxidative stress in ulcerative colitis. *J. Clin. Biochem. Nutr.*, **41(1)**, 18-26. doi: 10.3164/jcbn.2007003. PMID: 18392100; PMCID: PMC2274988.

Nakov R (2019). New markers in ulcerative colitis. *Clin. Chem. Acta*, **497**, 141-146.

Ng SC, Shi HY, Hamidi N, Underwood FE, Tang W, Benchimol EI, Panaccione R, Ghosh S, Wu JCY, Chan FKL, Sung JJY, Kaplan GG (2017). Worldwide incidence and prevalence of inflammatory bowel disease in the 21st century: a systematic review of population-based studies. *Lancet*, **390(10114)**, 2769-2778. doi: 10.1016/S0140-6736(17)32448-0. Epub 2017 Oct 16. Erratum in: *Lancet*. 2020 Oct 3;396(10256):e56. doi: 10.1016/S0140-6736(20)32028-6. PMID: 29050646.

Ohkusa T, Koido S (2015). Intestinal microbiota and ulcerative colitis. *J. of Infect. and Chemo.*, **21(11)**, 761-768.

Okayasu I, Hatakeyama S, Yamada M, Ohkusa T, Inagaki Y, Nakaya R (1990). A novel method in the induction of reliable experimental acute and chronic ulcerative colitis in mice. *Gastroenterol.*, **98(3)**, 694-702. doi: 10.1016/0016-5085(90)90290-h. PMID: 1688816.

Paiotti AP, Ribeiro DA, Silva RM, Marchi P, Oshima CT, Neto RA, Miszputen SJ, Franco M. (2012). Effect of COX-2 inhibitor lumiracoxib and the TNF- α antagonist etanercept on TNBS-induced colitis in Wistar rats. *J. Mol. Histol.*, **43(3)**, 307-17. doi: 10.1007/s10735-012-9400-8.

Pengkumsri N, Suwannalert P, Sivamaruthi BS, Wongpoomchai R, Sirisattha S, Tammasakchai A, Taya S, Sirilun S, Peerajan S, Chaiyasut C (2015). Molecular, histological, and anti-oxidant evaluation of colitis induction in rats by different concentration of dextran sodium sulfate (5 kDa). *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.*, **7(12)**, 283-7.

Persson PG, Hellers G, Ahlbom A (1993). Use of oral moist snuff and inflammatory bowel disease. *Int. J. Epidemiol.*, **22**, 1101-1103.

Peyrin-Biroulet L, Panés J, Sandborn WJ, Vermeire S, Danese S, Feagan BG, Colombel JF, Hanauer SB, Rycroft B (2015). Defining Disease Severity in Inflammatory Bowel Diseases: Current and Future Directions. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.*, **14(3)**, 348-354.e17. doi: 10.1016/j.cgh.2015.06.001. Epub 2015 Jun 11. PMID: 26071941.

Presnell JK, Schreiberman MP (1997). Humason's animal tissue techniques. Johns Hopkins University Press USA. 5th eds, p. 170.

Robinson A, Keely S, Karhausen J, Gerich ME, Furuta GT, Colgan SP (2008). Mucosal protection by hypoxia-inducible factor prolyl hydroxylase inhibition. *Gastroenterol.*, **134**, 145-55.

Rogler, G. (2013). Top-down or step-up treatment in Crohn's disease?. *Digestive diseases*, **31(1)**, 83-90.

Rogler G (2014). Chronic ulcerative colitis and colorectal cancer. *Cancer letters*, **345(2)**, 235-241.

Rouleau M, Patel A, Hendzel MJ, Kaufmann SH, Poirier GG (2010). PARP inhibition: PARP1 and beyond. *Nat. Rev. Cancer*, **10(4)**, 293-301. doi: 10.1038/nrc2812. Epub 2010 Mar 4. PMID: 20200537; PMCID: PMC2910902.

Runchel C, Matsuzawa A, Ichijo H (2011). Mitogen-activated protein kinases in mammalian oxidative stress responses, *Antioxid. Redox Signal*, **15(1)**, 205–18.

Rustgi AK (2007). The genetics of hereditary colon cancer. *Genes & dev.*, **21(20)**, 2525-2538.

Sajadimajd S, Khazaei M (2018). Oxidative Stress and Cancer: The Role of Nrf2. *Curr. Cancer Drug Targets.*, **18(6)**, 538-557.

Sawa T, Ohshima H (2006). Nitritative DNA damage in inflammation and its possible role in carcinogenesis. *Nitric Oxide*. **14(2)**, 91-100. doi: 10.1016/j.niox.2005.06.005. Epub 2005 Aug 15. PMID: 16099698.

Sedlak J, Lindsay RH (1968). Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent, *Analytical Biochem.*, **25**, 192-205.

Shah SC, Colombel JF, Sands BE, Narula N (2016). Mucosal healing is associated with improved long-term outcomes of patients with ulcerative colitis: a systematic review and meta-analysis. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.*, **14**; 1245-55.e8.

Shioya Y, Katakura K, Ohira H (2014). Neutrophil elastase inhibitor suppresses IL-17 based inflammation of murine experimental colitis. *Fukushima J. Med. Sci.*, **60(1)**, 14-21. doi: 10.5387/fms.2013-2.

Siegel RL, Miller KD, Wagle NS, Jemal A (2023). Cancer statistics, 2023. *CA Cancer J. Clin.*, **73(1)**, 17-48.

Sun Y, Oberley LW, Li Y (1988). A simple for clinical assay of superoxide dismutase, *Clin. Chem.*, **34**, 497-500.

Valavanidis A, Vlahoyianni T, Fiotakis K (2005). Comparative study of the formation of oxidative damage marker 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) adduct from the nucleoside 2'-deoxyguanosine by transition metals and suspensions of particulate matter in relation to metal content and redox reactivity. *Free Radic. Res.*, **39(10)**, 1071-81. doi: 10.1080/10715760500188671. PMID: 16298732.

Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease, *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **39(1)**, 44–84.

Veluswamy H, Suryawala K, Sheth A, Wells S, Salvatierra E, Cromer W, Chaitanya GV, Painter A, Patel M, Manas K, Zwank E, Boktor M, Baig K, Datti B, Mathis MJ, Minagar A, Jordan PA, Alexander JS (2010). African-American

inflammatory bowel disease in a Southern U.S. health center. *BMC Gastroenterol.*, **10**, 104. doi: 10.1186/1471-230X-10-104. PMID: 20828408; PMCID: PMC2944337.

Vilenchik MM, Knudson AG (2003). Endogenous DNA double-strand breaks: production, fidelity of repair, and induction of cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **100(22)**, 12871-6. doi: 10.1073/pnas.2135498100. Epub 2003 Oct 17. PMID: 14566050; PMCID: PMC240711.

Vitali R, Mancuso AB, Palone F, Pioli C, Cesi V, Negroni A, Cucchiara S, Oliva S, Carissimi C, Laudadio I, Stronati L (2023). PARP1 Activation Induces HMGB1 Secretion Promoting Intestinal Inflammation in Mice and Human Intestinal Organoids. *Int. J. Mol. Sci.*, **24(8)**, 7096. doi: 10.3390/ijms24087096.

Wada T, Penninger JM (2004). Mitogen-activated protein kinases in apoptosis regulation, *Oncogene*, **23(16)**, 2838–49.

Wada Y, Yoshida K, Hihara J, Konishi K, Tanabe K, Ukon K, Taomoto J, Suzuki T, Mizuiri H (2006). Sivelestat, a specific neutrophil elastase inhibitor, suppresses the growth of gastric carcinoma cells by preventing the release of transforming growth factor-alpha. *Cancer Sci.*, **97(10)**, 1037-43. doi: 10.1111/j.1349-7006.2006.00278.x. Epub 2006 Aug 17. PMID: 16918998; PMCID: PMC11158772.

Wagner EF, Nebreda AR (2009). Signal integration by JNK and p38 MAPK pathways in cancer development, *Nat. Rev. Cancer*, **9(8)**, 537–49.

Wang QS, Gao T, Cui YL, Gao LN, Jiang HL (2014). Comparative studies of paeoniflorin and albiflorin from *Paeonia lactiflora* on anti-inflammatory activities. *Pharm. Biol.*, **52(9)**, 1189-95. doi: 10.3109/13880209.2014.880490. Epub 2014 Mar 19. PMID: 24646307.

Werb Z, Gordon S (1975). Elastase secretion by stimulated macrophages. Characterization and regulation. *J. Exp. Med.*, **142(2)**, 361-77. doi: 10.1084/jem.142.2.361. PMID: 167096; PMCID: PMC2189888.

Wu D, Liu B, Yin J, Xu T, Zhao S, Xu Q, Chen X, Wang H (2017). Detection of 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG) as a biomarker of oxidative damage in peripheral leukocyte DNA by UHPLC-MS/MS. *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* **1064**, 1-6. doi: 10.1016/j.jchromb.2017.08.033. Epub 2017 Aug 26. PMID: 28886477.

Yashiro M (2014). Ulcerative colitis-associated colorectal cancer. *World J. of Gastroenterol. WJG*, **20(44)**, 16389.

Yoshioka T, Kawada K, Shimada T, Mori M (1979). Lipid peroxidation in maternal and cord blood and protective mechanism against activated-oxygen toxicity in the blood. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, **135(3)**, 372-6. doi: 10.1016/0002-9378(79)90708-7. PMID: 484629.

Yu R, Zhou Q, Liu T, Liu Z, Li Y, Hu Y (2023). Kaempferol relieves the DSS-induced chronic colitis in C57BL/6J mice, alleviates intestinal angiogenesis, and regulates colonic microflora structure. *J. of Funct. Foods*, **107**, 105646

Zhang C, Zhu H, Jie H, Ding H, Sun H (2021). Arbutin ameliorated ulcerative colitis of mice induced by dextran sodium sulfate (DSS). *Bioengineered*, **12(2)**, 11707-11715. doi: 10.1080/21655979.2021.2005746. PMID: 34783296; PMCID: PMC8809946.

Zingarelli B, O'Connor M, Hake PW (2003). Inhibitors of poly (ADP-ribose) polymerase modulate signal transduction pathways in colitis. *Eur. J. Pharmacol.*, **469(1-3)**, 183-94. doi: 10.1016/s0014-2999(03)01726-6. PMID: 12782201.



