

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**ÜLSERATİF KOLİT HAYVAN MODELİNDE İNDOLAMİN 2,3-DİOKSİJENAZ
ENZİM AKTİVİTESİNİN İNCELENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

NESLİHAN BOSTANCI EKER

Tez Danışmanı
Doç. Dr. Yeşim ÖZKAN

ANKARA
HAZİRAN-2012

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**ÜLSERATİF KOLİT HAYVAN MODELİNDE İNDOLAMİN 2,3-DİOKSİJENAZ
ENZİM AKTİVİTESİNİN İNCELENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

NESLİHAN BOSTANCI EKER

Tez Danışmanı
Doç. Dr. Yeşim ÖZKAN

Bu tez Gazi üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından 02/2010-41 proje numarası ile desteklenmiştir.

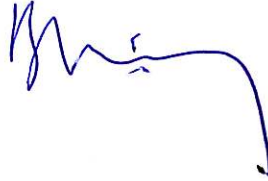
ANKARA
HAZİRAN-2012

**T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü**

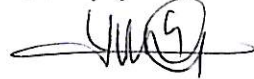
**Biyokimya Ana Bilim Dalı Yüksek Lisans Programı çerçevesinde yürütülmüş
olan bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından Yüksek Lisans Tezi olarak kabul
edilmiştir.**

Tez Savunma Tarihi: 28.06/2012

**İmza
Ünvanı Adı ve Soyadı
GAZİ...Üniversitesi
Jüri Başkanı**



**İmza
Ünvanı Adı ve Soyadı
GAZİ...Üniversitesi**
Prof. Dr. Figen Erkoç
Dr. Erkoç

**İmza
Ünvanı Adı ve Soyadı
GAZİ...Üniversitesi**
Doç. Dr. Yeşim Özkan


İÇİNDEKİLER

Sayfa No:

Kabul ve Onay	I
İçindekiler	II
Şekiller ve Grafikler	III
Tablolar	IV
Kısaltmalar	V
Önsöz.....	VII
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. İnflamatuvar Barsak Hastalığı.....	4
2.1.1. Epidemiyoloji.....	4
2.1.2. Etiyoloji	5
2.1.2.1. Genetik Faktörler	5
2.1.2.2. Çevresel Faktörler ve Kişisel Alışkanlıklar	7
2.1.2.3. Mikrobiyal Faktörler	8
2.1.2.4. İmmünolojik Faktörler.....	9
2.1.3 Tedavi	12
2.2. Triptofan Metabolizması.....	12
2.2.1 Kinürenin Yolağı	15
2.2.2 İndolamin 2,3-dioksijenaz	16
2.3. İnfliximab.....	19
2.4. 3-Aminobenzamid	20
3. GEREÇ VE YÖNTEM	22
3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	22
3.2. Kullanılan Araç ve Gereçler	23
3.3. Ülseratif Kolit Hayvan Modelinin Oluşturulması	24
3.4. Kolon Dokularının Alınması	25
3.5. Serum Numunelerinin Hazırlanması	26
3.6. Doku IDO Enzim Düzeylerinin Tayini	26
3.7. Dokularda Protein Tayini	28

3.8. Serum Kinürenin ve Triptofan Tayini.....	29
3.9. Serum TNF- α Tayini	33
3.10İstatistiksel Değerlendirme.....	34
4. BULGULAR.....	35
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	43
6. ÖZET	49
7. SUMMARY	50
8. KAYNAKLAR	51
9. ETİK KURUL KARARI	62
10.ÖZGEÇMİŞ.....	63

ÖNSÖZ

Öncelikle eğitim hayatımın ilk yıllarından başlayarak bu zamana kadar yardımlarını ve desteklerini esirgemeyen bana her zaman yol gösteren, destek veren Sayın Prof. Dr. Figen ERKOÇ' a teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek Lisans eğitimi aldığım Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı'nın başta Bölüm Başkanımız Sayın Prof. Dr. Bolkan ŞİMŞEK olmak üzere tüm değerli Öğretim Üyelerine bilgi, birikim ve desteklerini benden hiçbir zaman esirgemedikleri için teşekkür eder saygılarımı sunarım.

Bunun yanı sıra Yüksek Lisans eğitimim süresince bana destek olan, Sayın Doç.Dr. Aysel Çağlan KARASU BENLİ'ye ve tezimin hazırlanmasının her aşamasında bilgisi, desteği, sabrı ve özveresi ile her zaman yanımda olan değerli danışman hocam Sayın Doç. Dr. Yeşim ÖZKAN 'a ve yardımcı danışman hocam Doç.Dr. Aylin Sepici-Dinçel'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca tüm hayatım boyunca olduğu gibi bu çalışmamda da bana destek olan babam Fikret BOSTANCI, annem Hatice BOSTANCI kardeşim Batuhan BOSTANCI ve sevgili eşim Onur EKER' e destekleri ve güvenleri için çok teşekkür ederim.

Neslihan BOSTANCI EKER

Haziran, 2012

KISALTMALAR

ÜK	: Ülseratif Kolit
CH	: Crohn Hastalığı
IBH	: İnflamatuvar Bağırsak Hastalığı
TNF-α	: Tümör Nekrozis Faktör
IDO	: İndolamin 2,3-Dioksijenaz
IDO 2	: İndolamin 2,3-Dioksijenaz 2
IFN-γ	: İnterferon-gama
TNBS	: Trinitrobenzen sülfonik asit
PMNL	: Polimorfonükleer lökosit
CTLA-4	: Sitotoksik T Lenfosit İlişkili Antijen-4
NK	: Doğal Öldürücü
PARP	: Poly(ADP-riboz) polimeraz
IL-1	: İnterlökin-1
IL-6	: İnterlökin-6
TDO	: Triptofan-2,3- Dioksijenaz
Kyn/trp	: Kinürenin/Triptofan
Th 1	: T helper 1
Th 2	: T helper 2
NO	: Nitrik oksit
NAD	: Nikotinamid adenin dinükleotid
iNOS	: İndüklenebilir Nitrik Oksit Sentaz
HPLC	: Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi
BSA	: Bovine serum albumini
TCA	: Trikloroasetik Asit

ŞEKİLLER

<u>Şekil No :</u>	<u>Sayfa No:</u>
Şekil 1. İntestinal İmmün Sistem	11
Şekil 2. Triptofan Metabolizması	14
Şekil 3. IDO'nun Fizyopatolojik Rolü	18
Şekil 4. TNF- α 'nın Biyolojik Etkileri	20
Şekil 5. Standart Triptofan ve Kinürenin Kromatogramı.	32
Şekil 6. Serum Örneğine Ait Kromatogram	32

GRAFİKLER

Grafik No:

Sayfa No:

Grafik 1. Doku IDO Standart Kalibrasyon Grafiği	27
Grafik 2. BSA Standart Kalibrasyon Grafiği	28
Grafik 3. Standart Triptofan Kalibrasyon Grafiği.....	30
Grafik 4. Standart Kinürenin Kalibrasyon Grafiği.....	31
Grafik 5. Standart TNF- α Kalibrasyon Grafiği	33
Grafik 6. Negatif Kontrol, Pozitif Kontrol ve Tedavi Gruplarında Ölçülen Parametrelerin Ortalama Değerleri	37
Grafik 7. Negatif Kontrol, Pozitif Kontrol ve Tedavi Gruplarında Ölçülen Parametrelerin Medyan Değerleri	38
Grafik 8. Negatif Kontrol, Pozitif Kontrol ve Tedavi Gruplarında Kinürenin'in Ortalama ve Medyan Değerleri	39
Grafik 9. Negatif Kontrol, Pozitif Kontrol ve Tedavi Gruplarında Triptofan Ortalama ve Medyan Değerleri	40
Grafik 10. Negatif Kontrol, Pozitif Kontrol ve Tedavi Gruplarında Kyn/Trp Oranının Ortalama ve Medyan Değerleri.....	40
Grafik 11. Negatif Kontrol, Pozitif Kontrol ve Tedavi Gruplarında TNF- α Ortalama ve Medyan Değerleri	41
Grafik 12. Negatif Kontrol, Pozitif Kontrol ve Tedavi Gruplarında Doku IDO Enzim Düzeylerinin Ortalama ve Medyan Değerleri	42

TABLÖLER

Tablo No:

Sayfa No:

Tablo 1. Ülseratif Kolit ve Crohn Hastalığı ile İlişkili Genler.....	6
Tablo 2. IDO Enzim Konsantrasyonlarına Karşılık Gelen Absorbans Değerleri	27
Tablo 3. BSA Konsantrasyonlarına Karşılık Gelen Absorbans Değerleri	28
Tablo 4. Standart Triptofan Konsantrasyonlarına Karşılık Gelen Pik Alanları.....	30
Tablo 5. Standart Kinürenin Konsantrasyonlarına Karşılık Gelen Pik Alanları.....	31
Tablo 6. Standart TNF- α Konsantrasyonlarına Karşılık Gelen Absorban Değerleri	33
Tablo 7. Kontrol ve Tedavi Gruplarının Kinürenin, Triptofan, Kyn/Trp Oranı,Doku IDO Enzim Miktarı ve TNF- α Değerleri.	36

1. GİRİŞ VE AMAÇ

İnflamatuvar bağırsak hastalığı (IBH); ülseratif kolit (ÜK) ve Crohn hastalığı (CH)'nı kapsayan, etiyolojisi tam olarak aydınlatılamamış, çevresel risk faktörlerine maruz kalan ve genetik olarak duyarlı kişilerde, immün sistemin aracılık ettiği gastrointestinal sistemin kronik inflamasyonu ile karakterize, aktivasyon ve remisyonlarla seyreden kronik bağırsak hastalıklarını ifade etmektedir.

Genel olarak 20-40 yaş aralığında en yüksek düzeye ulaşan hastalığın insidansı, farklı coğrafik bölgelerde ve farklı zamanlarda değişkenlik gösterse de epidemiyolojik çalışmalar dünya genelinde insidansın giderek arttığını göstermektedir. Coğrafik olarak IBH prevalansı, güneyden kuzeye ve doğudan batıya gidildikçe artış göstermekte, endüstrileşme hastalığın insidans ve prevalansındaki en önemli çevresel faktör olarak ortaya çıkmaktadır. IBH prevalansının ırk ve etnik kökene göre farklılık göstermesi ve ailesel geçişli olması, hastalığın etiyolojisinde endüstrileşme, çevresel kirlenimler, mikrobiyal maruziyet, hijyen, yaşam stili ve diyet gibi faktörlerin yanı sıra genetik faktörlerin de rol oynadığını göstermektedir.¹⁻³

İnflamatuvar bağırsak hastalığının önlenmesi ve tedavi edilebilmesi amacıyla, hastalığın muhtemel nedenleriyle ilgili farklı birçok varsayım bulunmaktadır; ancak bunların hiçbirisi tam bir açıklama sağlamamaktadır. Günümüzde tedavi yaklaşımı, hastalığın tutulum bölgesine, şiddetine ve komplikasyonlarına göre; akut atağın tedavisi ve semptomların kontrolü, hastalığın remisyonunda tutulması ve tedaviye rağmen remisyonunda tutulamayan hastalarda kolektomi uygulamasıdır. Günümüzde CH ve ÜK'de uygulanan yaygın farmakoterapi;

aminosalisilatlar, kortikosteroidler ve azatiyoprin, 6-merkaptopürin gibi immün modölatörlerdir.^{4,5}

Hastalığın tekrar alevlenmesini azaltmak, tedavide kullanılan mevcut ilaçların toksisitesinden kaçınmak, operasyon sonrası hastaların yakınmalarını ve hastalık morbiditesini azaltmak amacıyla yapılan çalışmaların, bu hastalıklarda bozulmuş intestinal immün homeostaz, kontrolsüz intestinal inflamasyon ve bu inflamasyonda tümör nekrozis faktör- α (TNF- α)'nın rolüne dikkati çekmesi araştırmaları inflamatuvar ve immün kaskatdaki mekanizmaları ve molekülleri aydınlatmaya, ve bu spesifik molekülleri hedefleyen yeni biyolojik tedavilerin geliştirilmesine yöneltmiştir.⁶

Aktive olmuş nötrofiller, makrofajlar ve sitotoksik T hücreler gibi immün hücreler, doğrudan doğruya temas yoluyla veya dolaylı olarak sitotoksik proteinler, reaktif oksijen ve nitrojen türevleri ve litik enzimler salgılayarak intestinal bariyeri bozmaktadır. Intestinal epitelyum mukozal immün yanıtın şekillenmesinde kritik rol oynamaktadır. IBH'da inflamatuvar yanıt, erozyon ve ülserasyona neden olan epitelyal hasarla sonuçlanmaktadır. Hem ülseratif kolit hem de Crohn hastalığında, genetik olarak duyarlı kişilerde luminal antijenlere yönelmiş immün yanıtta disregülasyon söz konusu olup; mukozal T hücre disfonksiyonu ve anormal sitokin üretiminin yanı sıra gastrointestinal mukozanın kısmen veya tamamen inflamasyonu söz konusudur.^{7,8}

İndolamin 2,3-dioksijenaz (IDO), birçok immuno-inflamatuvar etkileri olan, triptofanın yıkımını sağlayan bir enzimdir. IDO aktivitesi patolojik olmayan durumlarda minimaldir. Karaciğer dışındaki dokularda, immün aktivasyona, inflamasyona ve enfeksiyona bağlı olarak IDO ekspresyonu up-regüle olarak ekstrahepatik dokularda triptofanın

kinürenine yıkımı artmaktadır. IDO, primer olarak proinflamatuvar sitokin olan interferon- γ (IFN- γ) dışında TNF- α , IFN- β , lipopolisakkarid, sitotoksik T-lenfositle ilişkili antijen 4 (CTLA-4) gibi moleküllerle indüklenmektedir.⁹⁻¹¹ Özellikle gastrointestinal sistemde yüksek düzeylerde eksprese edilen IDO'nun intestinal inflamasyonun kontrolünde rol oynadığı düşünülmekle birlikte intestinal immünitedeki rolü tam olarak anlaşılamamıştır.

Bu tez kapsamında, trinitrobenzen sulfonik asit (TNBS) ile kolit oluşturulmuş ratlara, TNF- α inhibitörü infliximab ve poly(ADP-riboz)polimeraz inhibitörü 3-aminobenzamid uygulanarak, bu farmakolojik ajanların, IDO'nun kolon doku düzeyleri ve enzim aktivitesi üzerindeki etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. İnflamatuvar Bağırsak Hastalığı

İnflamatuvar Bağırsak Hastalığı; etiyojisi ve patojenezi tam olarak anlaşılamamış, ülseratif kolit ve Crohn hastalığını ifade eden, gastrointestinal sistemin kronik, immün aracılıklı inflamatuvar bozukluklarını tanımlamaktadır. ÜK; kalın barsağın mukozal kısmını etkileyen, rektumu tutan ve proksimal olarak kolona yayılan bir hastalıkken, CH; ileum ve kalın barsağı tutmakta, gastrointestinal sistemin herhangi bir bölümünü etkileyebilmektedir. ÜK'in aksine CH'da anatomik lezyonlar devamlılık arz etmemekte ve kronik inflamasyon transmuraldır. Her iki hastalık intestinal inflamasyonun alevlenmesi ve remisyonu ile seyretmekte ve semptomları birbirine benzemektedir. Kanlı mukuslu diyare, abdominal ağrı, kilo kaybı, artralji, ateş, anoreksiya, bulantı ve kusma gibi semptomlar görülmektedir. Ekstraintestinal belirtiler de her iki hastalıkta benzerdir. Gastrointestinal dokudaki enfeksiyöz, inflamatuvar, iskemik ve neoplastik hastalıklar da benzer klinik tablo gösterebildiğinden ayırıcı tanı zordur. Tanıda; endoskopik bulgular, kolon biyopsisi ve radyolojik testlerden yararlanılmaktadır ancak yine de tanıda zorlanılabilmektedir.^{5,12-14}

2.1.1. Epidemiyoloji

Sistematik literatür taraması sonucu MEDLINE ve EMBASE kaynaklı, 1950-2010 yılları arasında yapılan 267 makaleden elde edilen veriler, IBH'nın, insidans ve prevalansının farklı coğrafik bölgelerde ve farklı zamanlarda değişkenlik gösterdiğini ve endüstrileşmeye bağlı olarak dünya genelinde arttığını göstermektedir. IBH insidans ve prevalansı en yüksek batılılaşmış ülkelerde, Kuzey Amerika ve Avrupa'da görülürken, en

düşük olarak Asya'da bildirilmiştir. Avrupa için prevalansın, ÜK'te 505/100.000, CH'da 322/100.000 olduğu, insidansın en yüksek beyazlarda ve yahudilerde olduğu, hispaniklerde ve Asya toplumlarında insidansın giderek arttığı görülmüştür. Cinsiyete bağlı bir farklılık ortaya çıkmayıp, IBH'nın her iki cinste de eşit görüldüğü, sadece ÜK'in erkeklerde, CH'nın kadınlarda biraz daha fazla gözlemlendiği bildirilmiştir.^{15,1}

İnflamatuvar bağırsak hastalığının ülkemizdeki durumuna baktığımızda, bütün bölgeleri içeren hastalığın insidansı ve karakteristiğini bildiren çalışmaya ulaşamamıştır. Ancak Ankara, İstanbul ve Trakya bölgesinde yapılan çalışmalardan elde edilen veriler, ÜK insidansının CH insidansından yüksek olduğunu ve ancak Kuzey Batı Avrupa ülkelerine kıyasla insidansın düşük olduğunu göstermektedir, ancak bu veriler sınırlı sayıda hastadan elde edilen veriler olduğu için ülkemizdeki insidans ve prevalans hakkında yeterli veri bulunmamaktadır.¹⁶⁻¹⁸

2.1.2. Etiyoloji

Farklı genetik, çevresel ve immünolojik faktörlerin inflamatuvar bağırsak hastalıklarının etiyolojisinde rol oynadığı düşünülmektedir.

2.1.2.1. Genetik Faktörler

Klasik olarak genetik bir hastalık olmasa da, IBH'da ailesel geçiş söz konusudur. IBH'nin nedeninin genetik mi yoksa çevresel faktörler mi olduğu sorusu hala tartışmaya açık olsa da, genetik yatkınlığı olan kişilerde çevresel faktörlere maruziyetin hastalığa neden olduğu kabul edilmektedir.^{2,3,19} ÜK ve CH ile ilişkili genler Tablo 1'de verilmiştir.

Tablo 1. Ülseratif Kolit ve Crohn Hastalığı ile İlişkili Genler.¹⁹

Gen	Genomik Bölge	CH	ÜK	Fonksiyon
<u>Doğal İmmün Yanıt</u>				
<i>NOD2</i>	16q12	var	yok	Hücre sinyal iletimini aktive edecek bakteriyel peptidoglikanları algılamak
<i>ATG16L1</i>	2q37	var	belirsiz	Otofaji kompleks bileşeni
<i>IRGM</i>	5q33	var	yok	Otofajide rolü vardır, intrasellüler patojenlerin IFN- γ aracılı uzaklaştırılmasına gereklidir
<u>İnterlökin 23- Th17 Yolağı</u>				
IL23R	1p31	var	var	Heterodimerik interlökin-23 reseptör bileşeni
IL12B	5q33	var	var	İnterlökin-23 sitokin bileşeni
STAT3	17q21	var	var	İnterlökin-6, 10,17,21,22,23 gibi farklı sitokinlerin baskılanmasında majör STAT
CCR6	6q27	var	yok	İnflamatuvar hücrelerin göçüne aracılık eden hücre membran proteini
<u>Diğer Genler</u>				
PTGER4	5q13	var	yok	İnflamatuvar mediatör PGE2 reseptörlerinden
ZNF365	10q21	var	yok	Mitozda rolü vardır
SLC22A4	5q31	var	belirsiz	Plazma membranı polispesifik organik katyon taşıyıcısı
PTPN2	18p11	var	yok	STAT proteinleriyle etkileşim, ayrıca tip 1 diyabetle ilişkilidir

Genomik				
Gen	Bölge	CH	ÜK	Fonksiyon
MHC	6p21	var	var	ÜK ve CH ile ilişkili farklı bir MHC class II
NKX2-3	10q24	var	var	Lenfoid ve dalak gelişimini etkileyen transkripsiyon faktörü içeren homeodomain
MST1	3p21	var	var	Proinflamatuvar sinyali takiben makrofaj kemotaksis ve aktivasyonunda yer alır
PLA2G2E	1p36	yok	var	Membran fosfolipidlerinden araşidonik asit salınımı
IL10	1q32	belirsiz	var	İntestinal inflamasyonda merkezi rol oynayan immünosupresif sitokin
IFNG	12q15	yok	var	İntrasellüler patojenlere karşı gelişen doğal ve adaptif immünitede kritik sitokin

2.1.2.2.Çevresel Faktörler ve Kişisel Alışkanlıklar

Az gelişmiş ülkelerde endüstrileşme ve kentleşmeyle IBH'nın artması bu hastalığın patojenezinde çevresel faktörlerin rolünün olduğunu desteklemektedir. Batı toplumlarında hastalığın yüksek oranda bulunmasına bağlı olarak bunda diyetin rolü araştırıldığında, her ne kadar rafine yiyecekler, ve fast-food beslenmenin bir faktör olabileceği öngörülse de bunların hastalığın nedeni veya hastalığa etki eden faktörler olduğunu doğrulayan kesin deliller bulunmamaktadır.¹⁵

Epidemiyolojik çalışmalarda, sigara kullanımı ve apendektominin IBH riskini etkilediği gösterilmiş, her iki faktörün ÜK riskini

azaltırken aktif sigara içiminin CH riskini artırdığı görülmüştür. Bununla birlikte ağır sigara içicilerin olduğu Asya gibi bölgelerde CH insidansının düşük olması gibi veriler bu faktörlerin IBH insidans ve prevalansındaki artıştan tamamen sorumlu olamayacağını göstermiştir.^{20-22,14}

Kontraseptif kullanımının, IBH'na benzer mukozal değişikliklere neden olması nedeniyle kadın seks hormonlarının IBH'da nedensel faktör olabileceği öne sürülmüştür ancak kontraseptif kullanımının hastalığın insidansını artırdığı yönündeki bulgular çelişkilidir.^{23,15}

2.1.2.3. Mikrobiyal Faktörler

İmmunolojik, mikrobiyolojik ve genetik çalışmalar, IBH'nın patojenezini anormal konakçı-mikrobiyal etkileşimi ile ilişkilendirmektedir. İnsan gastrointestinal sistemi 10^{14} bakteri içermektedir. İntestinal mukoza konakçı-kommensal flora etkileşiminde merkezi rol oynamakta, immün sistemle eksternal çevre arasında primer bariyer görevi görmektedir. İntestinal mikrobiyotanın bileşimini belirlemeye yönelik metodların gelişimi, IBH'nin patojenezinde mikrobiyotanın rolünü ortaya koymuştur. IBD'li hastalarda bakteriyal floranın sağlıklı kontrollerden farklı olduğu görülmüştür. Paralel olarak hayvan modellerinde yapılan çalışmalar intestinal inflamasyonun başlamasında intestinal mikrobiyotanın kalitatif ve kantitatif olarak bileşiminin önemini göstermiştir. ÜK ve CH, tanımlanmış intestinal enfeksiyonlar bakımından birbirine benzediğinden ve lümenal bakteriyal konsantrasyonun en yüksek olduğu bölgede meydana geldiklerinden birçok mikrobiyal patojen IBH'nın nedeni olarak öne sürülmüştür. Bu patojenler arasında öne çıkanlar; *Mycobacterium paratuberculosis*, *M. kansai*, *E. coli*, *Diplostreptococcus sp.*, *Lysteria*

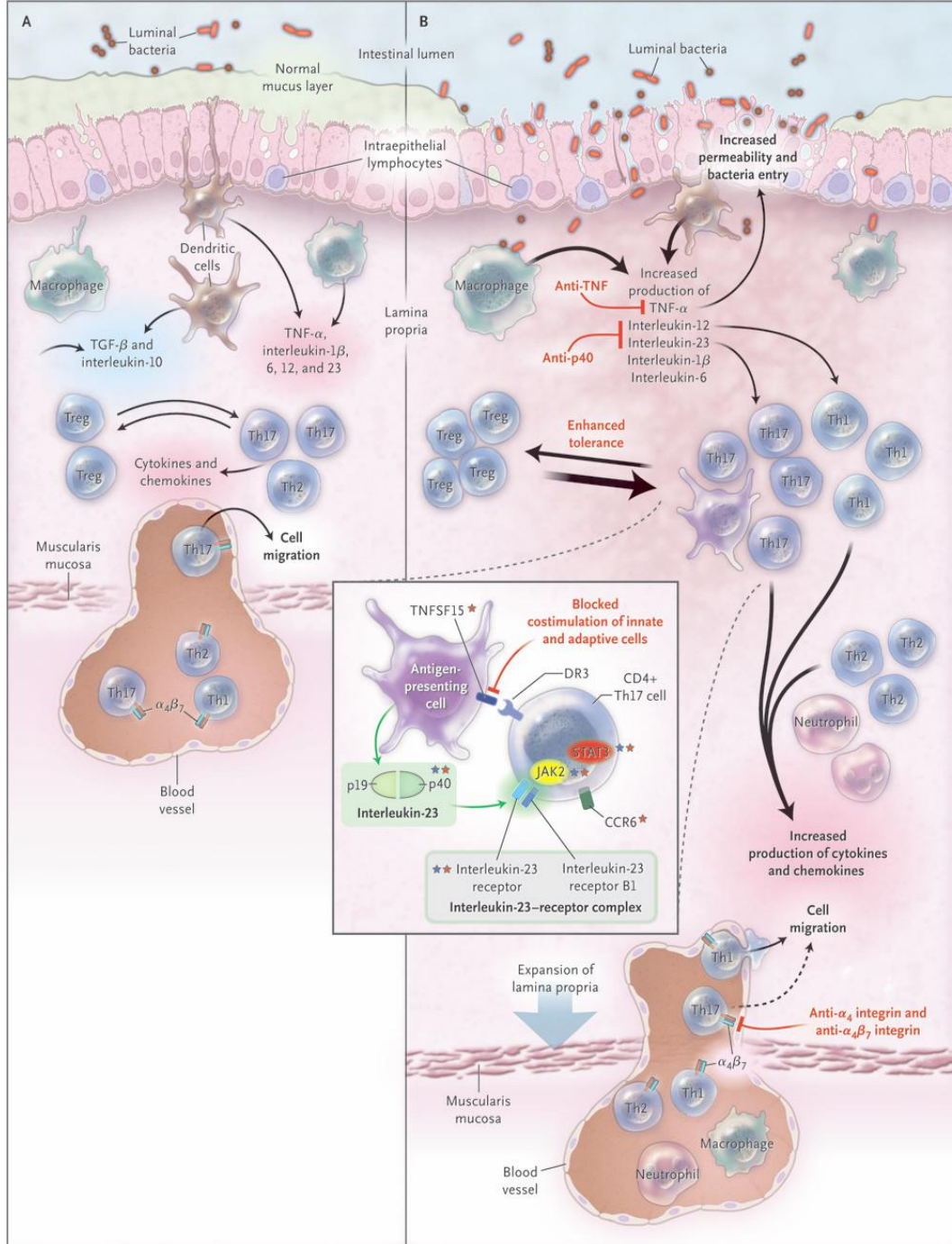
monocytogenes, *Fusobacterium necrophorum*, *Chlamydia sp.*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomona maltophilia*, *Helicobacter hepaticus*'dur.^{24,25}

2.1.2.4. İmmünolojik Faktörler

Sağlıklı kişilerde intestinal flora nispeten stabildir. Bakteriyal fonksiyondaki ve kompozisyonundaki değişiklikler, mukozal bariyer fonksiyonunda ve immün cevapta etkili olmaktadır. İntestinal mukozal bariyerin bozulması antijenlerin, endotoksin ve diğer bakteriyal ürünler gibi inflamatuvar moleküllerin mukozaya infiltrasyonunu artırmakta, mukozal permeabilite artmaktadır. Bakteriyal bileşenler, sitokin, eikozanoid, oksijen metabolitleri, nitrik oksit ve proteazlar gibi bileşikler salgılayan immün hücreleri, endotelial hücreleri ve epitelyal hücreleri aktive edebilmektedir. Bakteriyel uyarıdan sonra akut inflamasyonun ilerlemesi veya çözülmesi proinflamatuvar ile immünosupresif mekanizmalar arasındaki dengeye bağlıdır.²⁵

Inflamatuvar bağırsak hastalığında, nötrofil, makrofaj, dendritik hücreler ve nötral killer T hücrelerden oluşan doğal immün hücrelerin ve B ve T hücrelerinden oluşan adaptif immün hücrelerin lamina propria'ya infiltrasyonu olmaktadır. İntestinal mukozada bu hücrelerin sayısında ve aktivasyonundaki artış TNF- α , IL-1 β , IFN- γ ve IL 23-Th17 yolağındaki sitokinlerin lokal düzeylerini yükseltmektedir. İntestinal mikroorganizmalara karşı oluşan doğal immün yanıt sıkı bir şekilde regüle olmaktadır ve bu regülasyon, immün toleransın mı yoksa defansif inflamatuvar cevabın mı oluşacağını belirlemektedir. Homeostatik denge regülatuar T hücreler (Treg) ve efektör T hücreler (Th1, Th2, Th17) arasındaki dengeyle sağlanmaktadır. Bu cevaplar arasındaki dengenin bozulması IBH'na yol açabilmektedir (Şekil 1).^{12,24,25}

Crohn hastalığında daha çok Th1 yolağı daha etkin görülürken, ülseratif kolitte kısmen azalmış Th-1 immün cevap vardır ve sitokin ekspresyon paterni humoral Th-2 immün cevabın atipik bir formudur. Ancak Th2 ve Th17 gibi efektör T hücre alt tipleri etkin olmakla birlikte, yapılan çalışmalar, ülseratif kolitte hem Th1 hem de Th2 immün yanıtın rol oynadığını, aktif ülseratif kolitli hastalarda IL-1 β , IL-4, IL-5, IL-8, IL-12, IL-13, IFN- γ ve TNF- α düzeylerinin yüksek olduğunu ve ÜK'in patojenezinde hem humoral hem de hücre aracılı immünitinin rol oynadığını göstermektedir.^{26,27} ÜK ve CH arasında immünolojik ve klinik farklılıklar olmakla birlikte her iki hastalık da kısmen ortak sitokin profili ve yüksek TNF- α düzeyleri göstermektedir.⁸



Şekil 1. İntestinal İmmün Sistem. (A) Sağlıklı Koşullar (B) Hastalık Durumunda

2.1.3. Tedavi

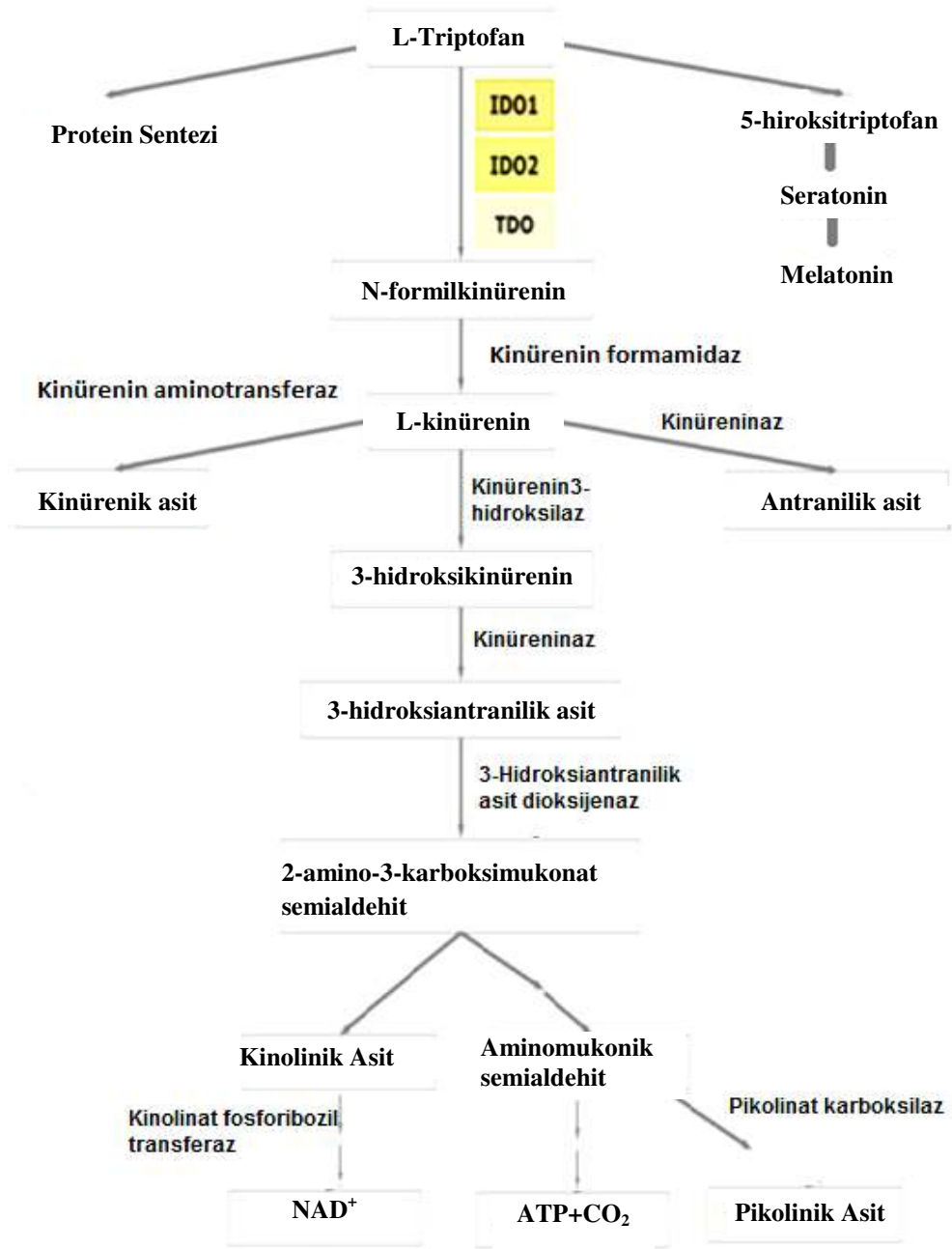
İnflamatuvar bağırsak hastalığında tedavi yaklaşımı, yaşam stilinde değişiklikler, medikal tedavi ve cerrahiden oluşmaktadır. Medikal tedavi, aminosalisilatlar, kortikosteroidler ve immünmodülatörleri içermektedir. Aminosalisilatlar hafif ve orta şiddette seyreden hastalarda tercih edilmekte, çok şiddetli hastalarda etkin olmamaktadır. Kortikosteroidler, aminosalisilatların optimal dozuna yanıt vermeyen orta ve şiddetli düzeyde hastalığı olanlarda kullanılmakla birlikte, uzun süreli kullanımlarında yan etkileri tedavinin devam ettirilmesinde bu ilaçların kullanımını kısıtlamaktadır. Kolektomi mevcut medikal tedaviye cevap vermeyen şiddetli kolit vakalarında son tedavi seçeneği olmaktadır. Hastalık, aktivasyon ve remisyonlarla seyrettiğinden, cerrahiden kaçınmak, şiddetli ataklarda remisyon dönemine geçişi sağlamak ve hastaları remisyonda tutmak, etkin medikal tedavinin bulunmasını ve uygulanmasını gerektirmektedir. Bu nedenle çalışmalar, IBH için etkin terapötik hedeflerin bulunması ve bu hedeflere uygun tedavilerin geliştirilmesine yönelmiştir.²⁸⁻³¹

2.2. Triptofan Metabolizması

Triptofan (Trp) IUPAC sistemine göre; 2-amino-3-(1H-indol-3-il) propanoik asit olarak adlandırılan indol halkası içeren esansiyel bir amino asittir. Triptofan için minimum gereksinim günlük ortalama 200 mg'dır. Gelişmiş ülkelerde diyet ile ortalama günlük Trp alımının yetişkinler için önerilen günlük alım miktarı 3.5-6.0 mg/kg/gün olarak belirlenmiştir.³²

Diyetle alınan triptofan hepatik portal sistemle karaciğere taşınır. Protein sentezi için kullanılmayan triptofan karaciğerde yıkılır veya hücrelerde kullanılır. Kan dolaşımında triptofan serbest ve %90 oranında plazma albüminine bağlı olarak bulunmaktadır. Kan beyin bariyerinden öncelikle bağlı olmayan, serbest Trp kompetitif olarak spesifik olmayan L-aminoasit taşıyıcılarıyla geçiş yapmaktadır. Ancak Trp'ın kan beyin bariyerindeki taşıyıcılara afinitesi albümine olan afinitesinden daha yüksek olduğundan, kan beyin bariyerine yakın bulunan ve albümine bağlı Trp'ın albüminden ayrılarak beyine geçişi mümkündür.^{32,33} Glia hücreleri tarafından alınan triptofan burada serotoninin yanı sıra 3-hidroksikinürenin, kinolinik asit gibi nöroaktif triptofan metabolitlerine dönüşmektedir.^{34,35}

Triptofan vücutta patolojik olmayan durumlarda genel protein sentezine, serotonin sentezi için hidrosilasyon yoluna veya kinürenin sentezinin gerçekleştiği oksidasyon yoluna katılmaktadır. Hem periferik hem de santral sistemde triptofan metabolizması büyük oranda kinürenin yolağı üzerinden olmaktadır (Şekil 2). Normal şartlarda triptofanın %1'i serotonin sentezine, %95'i ise kinürenin yolağına girmektedir.³⁶ Trp, bütün canlı hücrelerde elektron transfer reaksiyonları için gerekli olan nikotinamid adenin dinükleotidlerin (NAD^+ , $NADP^+$), serotonin ve melatonin gibi biyolojik olarak önemli birçok bileşiğin öncü maddesidir. Serotonin, triptofanın hidrosilaz enzimiyle reaksiyonun sonucunda 5-hidroksitriptofan ve sonrasında aromatik L-amino asit ile dekarboksilasyonundan meydana gelmektedir.³⁷



Şekil 2: Triptofan Metabolizması. IDO; İndolamin 2,3-dioksijenaz, TDO; Triptofan 2,3-dioksijenaz.

2.2.1. Kinürenin Yolağı

Memelilerde Trp'ın major katabolik yolu son ürün olarak NAD⁺ biyosentezinin gerçekleştiği kinürenin yolağıdır. Kinürenin 1927 yılında izole edilmiş ve yapısı aydınlatılmıştır. Triptofanın kinürenine dönüşümünde ilk enzimatik ve hız kısıtlayıcı basamak olan triptofanın N-formilkinürenine oksidasyonu olup bu basamağın karaciğerde bulunan triptofan 2,3-dioksijenaz (TDO, EC.1.13.11.11) tarafından katalizlendiği 1936 yılında keşfedilmiştir. Memelilerde keşfedilen ilk indüklenebilen enzim sistemi olan TDO, triptofan ve glukokortikoidlerin yanı sıra histidin, kinürenin ve çok az oranda da tirozin ve fenilalaninle indüklenmektedir. Çeşitli hastaların idrarında farklı triptofan metabolitlerinin düzeylerinin bulunmasına karşın bu hastaların karaciğerinde TDO aktivitesinin yükselmemesi triptofan katabolizmasında ikinci bir enzimin varlığını düşündürmüştür, karaciğer dışı dokularda triptofanı kinürenine çeviren ikinci bir enzim izole edilmiştir. D-triptofan, L-triptofan, triptamin, 5-hidroksitriptofan ve serotonin gibi indolamin türevlerini substrat olarak kullandığından bu enzim indolamin 2,3-dioksijenaz (IDO, EC.1.13.11.17) olarak adlandırılmıştır.³⁸

Her iki enzim aynı reaksiyonu katalizlemelerine rağmen ekspresyonlarının dokular arası farklılık gösterdiği ve farklı biyolojik rollere sahip oldukları görülmüştür. Sağlıklı koşullarda hepatik kinürenin yolağı aktif olup dokularda IDO ekspresyonu oldukça düşüktür. Ancak inflamasyon ve immün aktivasyonda IDO ekspresyonunun upregülasyonuna bağlı olarak ekstrahepatik kinürenin yolağı baskın hale gelmektedir. TDO ve IDO tarafından triptofanın indol halkasına moleküler oksijen katılarak katalizlenen enzimatik reaksiyon sonucu oluşan N-formil kinürenin enzimatik veya non-enzimatik reaksiyonla kinürenine

dönüşmektedir. Kinürenin yolağı diğer kinürenin türevlerinin oluşumunun yanı sıra sitrik asit siklusuna girerek tamamen CO₂ ve H₂O'ya dönüşebildiği gibi diyetle alınan niasinin yetersizliğinde, *de novo* NAD⁺ sentezine yönelmektedir.³⁹

Triptofan düzeyleriyle doğrudan ilişkili olan kinürenin konsantrasyonu diyetel triptofan alımındaki yetersizliğe bağlı olarak düşmektedir. TDO ve IDO'nun katalizlediği reaksiyonun ürünü olan kinüreninin bu enzimlerin substratı olan triptofana oranı, triptofan yıkımının ve IDO aktivitesinin uygun bir göstergesi olmaktadır.⁴⁰ Yapılan çalışmalarda immün aktivasyon belirteçlerinin düzeylerindeki artışa bağlı olarak kinürenin triptofan oranının arttığı gösterilmiştir.^{41,42}

2.2.2. İndolamin 2,3-Dioksijenaz

İndolamin 2,3-dioksijenaz enzimi, 45 kD'luk, kofaktör olarak Hem *b* grubu içeren sitozolik, monomerik bir proteindir. IDO enzim aktivitesi için esansiyel olan Hem grubundaki demirin, ferrik formdan ferröz forma redüklenmesi için bir elektron transferi süperoksit radikalinden sağlanmakta, böylece enzimin aktif bölgesine triptofan bağlanmaktadır. IDO, gen ekspresyonu ve enzimatik aktivite düzeyinde sıkı bir şekilde regüle olmaktadır. IDO aktivitesinin sağlık için vazgeçilmez veya zararlı olması arasındaki denge, *in vivo* IDO aktivitesinde regülatuar etkisi olan spesifik moleküllere bağlıdır. Plasenta, akciğer, bağırsak, kolon, dalak, böbrek, mide ve karaciğer hücrelerinde bulunan IDO, dendritik hücreler monosit, makrofaj, epitelyal hücreler, fibroblast, endotelyal hücreler ve bazı tümör hücre kültürlerinde IFN- γ ile indüklenmektedir. IDO, IFN- γ

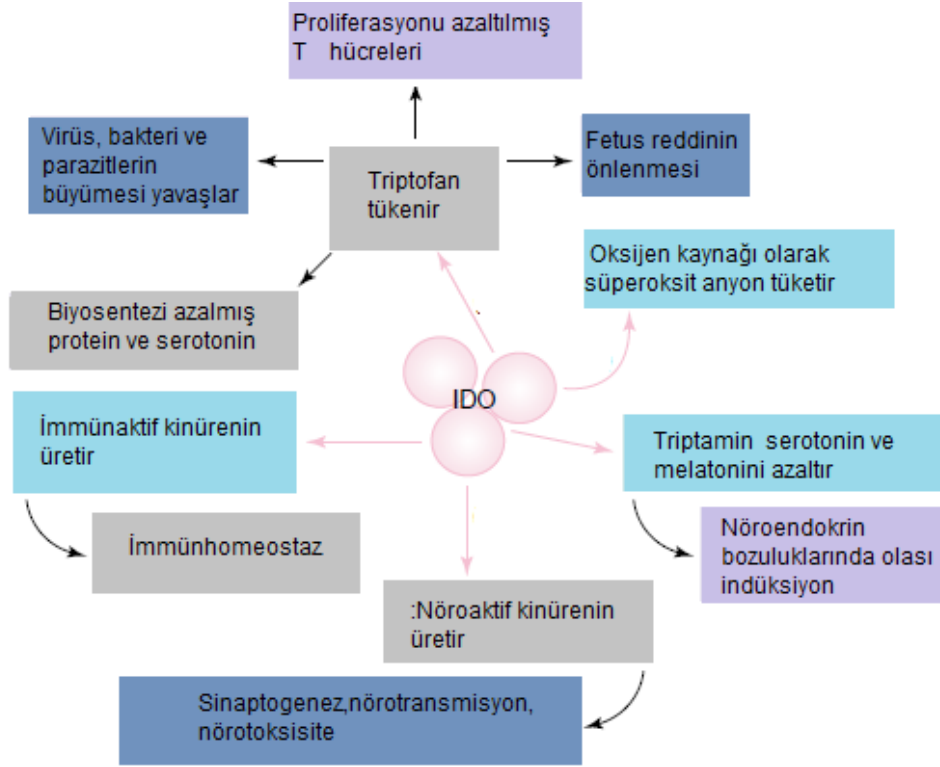
dışında TNF- α , IFN- α / β , IL-10 gibi sitokinlerle de indüklenmektedir.^{37,43} Ayrıca IDO, immün hücrelerde üretilen indüklenebilir nitrik oksit sentaz enzimi (iNOS) ile meydana gelen nitrik oksit (NO) tarafından indüklenmekte, NO etkisiyle IDO protein düzeyi ve aktivitesi azalmaktadır.⁴⁴

Kinürenin sentezinde ilk hız sınırlayıcı basamağın doku ve hücre tipine bağlı olarak TDO veya IDO tarafından katalizlendiği bilinmekle birlikte, 2007 Murray ve arkadaşları⁴⁵ tarafından triptofanı katabolize eden IDO benzeri ikinci bir enzimin varlığı gösterilmiş, bu enzim IDO'ya yapısal benzerliği nedeniyle indolamin 2,3-dioksijenaz 2 (IDO2) olarak adlandırılmıştır. Çok yakın yıllarda keşfedilmesi nedeniyle IDO2'nin biyolojik rolü tam olarak aydınlanmamıştır ancak ekspresyonunun böbrek, üreme sistemi ve dendritik hücrelerde gösterilmesi böbrek fonksiyonu, fertilité ve immün modülasyonda rolü olduğunu düşündürmektedir.⁴⁶

IDO enziminin iki fizyolojik fonksiyonu gözü UV hasarından koruyan triptofan metabolitlerinin oluşumunu sağlamak ve hem patojenlerin hem de immün hücrelerin proliferasyonunu baskılamaktır.^{47,48}

IDO enziminin immün sistemdeki rolü ile ilgili iki ana hipotez öne sürülmüştür. Birincisi; mikroçevredeki triptofan tüketiminin hücre proliferasyonunu baskılayabildiği ve böylece immünomodülatör veya antimikrobiyal etkiler oluşturabileceğidir. Patolojik koşullarda hızla bölünen hücreler, parazit, bakteri ve virüs gibi patojenlere karşı immün cevap olarak IDO'nun aşırı düzeyde ekprese edildiği gösterilmiştir.^{36,49} İkincisi; IDO'nun kazanılmış immün toleransta rol oynadığı, T-hücreleri baskılayarak, triptofan düzeylerini tüketerek özellikle tümör hücrelerinin T-hücre cevabından kaçmasını sağladığıdır. IDO enzimi immün tolerans ve

atak arasındaki dengeyi etkileyerek uygun immün cevabın oluşmasını sağlamaktadır.^{37,43,46}



Şekil 3: IDO' nun Fیزیopatolojik Rolü⁵¹

IDO aktivitesinin, proliferasyonu inhibe edici etkisi iki mekanizmayla açıklanmıştır:

- 1) Tryptofanın tüketilmesi; yani IDO aktivitesinin fizyolojik bir sonucu olarak triptofanın azalması.
- 2) Tryptofanın kullanılması; sitotoksik ve sinyal molekülü olan kinürenin metabolitlerinin oluşumu için triptofanın kullanılması^{37,50,51}.

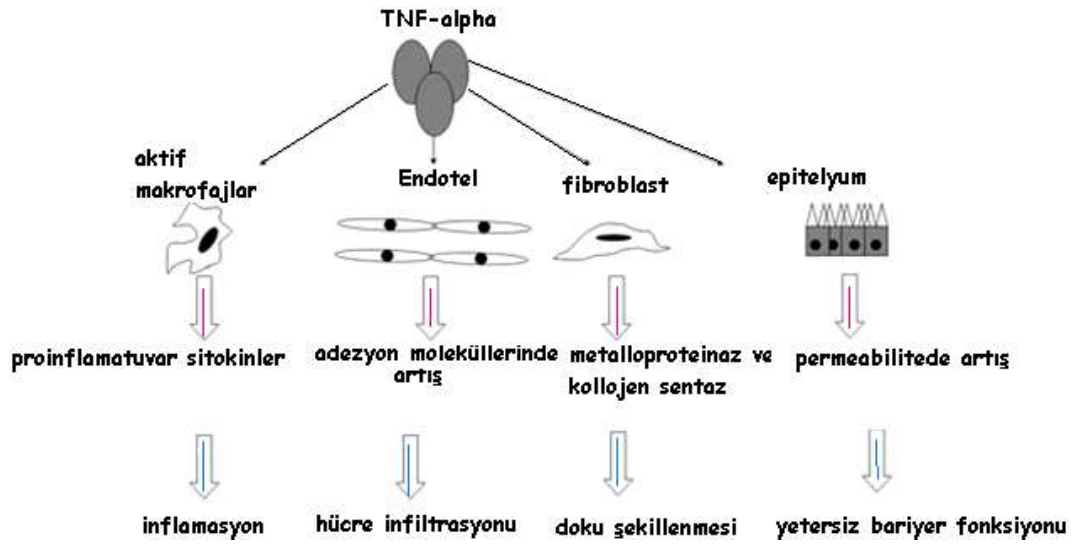
IDO aktivitesi genel antiproliferatif etki oluşturduğundan, IDO ekprese eden hücrelerin kendi proliferasyonlarını da baskılayabileceği Takikawa ve arkadaşları tarafından gösterilmiştir. Bu nedenle IDO

eksprese eden hücrelerin hem kendilerini IDO aktivitesinin etkilerinden koruyup hem de triptofan tüketim ve kullanım mekanizmalarını devam ettirmelerinde sıkı bir IDO regülasyonu söz konusudur.^{36,47}

Fizyolojik homeostaz yabancı antijenlere cevap veren immun sisteme ihtiyaç duymaktadır. IDO'nun immun hücre proliferasyonunu kontrol etmesi gebelikte olduğu gibi tolerans indüksiyonunun kritik bir bileşenidir. İmmün sistem stimülasyonunun yüksek olduğu otoimmun patolojilerle yetersiz IDO aktivite ve ekspresyonunun ilişkili olduğunu gösteren çalışmalar gittikçe artmaktadır.⁵²

2.3. İnfliximab

Tümör nekrozis faktör- α ; monositler, makrofajlar, B ve T lenfositler, polimorfonükleer lökositler (PMNL), doğal öldürücü (NK) hücreler ve endotelial hücrelerden salınan ve inflamasyonda rol oynayan bir sitokindir (Şekil 4). Konakçı yanıtının oluşmasında en etkili mediatörlerden biri olması nedeniyle TNF- α inhibitörleri IBH tedavisinde önem kazanmıştır. IBH olan hastaların kan, intestinal doku ve gaitalarında yapılan çalışmalarda, inflamatuvar sitokin ve TNF- α düzeyleri bakımından değişken sonuçlar elde edilmiştir.^{53,54} TNF- α inhibitörlerinin kullanıldığı, faklı hayvan modellerinde yapılan çalışmaların bazılarında TNF blokasyonu koliti önlerken⁵⁵, bazı çalışmalarda aktif koliti baskılamış⁵⁶, bazılarında ise etkisiz olmuştur.⁵⁵



Şekil 4: TNF- α 'nın Biyolojik Etkileri⁵⁷

TNF- α 'nın IBH'daki rolü nedeniyle infliximabın orta ve şiddetli düzeydeki IBH'da etkili olabileceği düşünülmüştür. Kimerik anti-TNF- α monoklonal antikoru olan infliximabın etki mekanizması tam olarak aydınlatılmamış ancak yapılan çalışmalar TNF- α eksprese eden inflamatuvar hücrelerin apoptozu yoluyla olabileceğini göstermektedir.⁵⁸

2.4. 3-Aminobenzamid

3-Aminobenzamid; PARP kompetitif inhibitörüdür ve laboratuvar araştırmalarında kullanılan bir ajandır. PARP; DNA-binding proteinlerin poli(ADP) ribozilasyonunu katalizleyen enzimdir. Poli(ADP)ribozilasyonu DNA tamiri ve genomik stabilitenin sağlanmasında önemli bir mekanizmadır. Serbest radikallerin, reaktif oksijen türlerinin ve peroksinitritin oluşumu PARP'ın aşırı aktivasyonuna neden olmakta, bu aktivasyon da NAD⁺ ve ATP'nin tüketimi ve hücre ölümüyle sonuçlanmaktadır. PARP, ayrıca çeşitli nükleer transkripsiyon faktörlerini

aktive ederek birçok proinflamatuvar genin up-regölasyonunda rol oynayarak inflamatuvar hastalıkların patojenezine katılmaktadır.^{59,60}

2. GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

L-Triptofan.....	(Sigma-Aldrich)
L-Kinürenin.....	(Sigma)
Asetik asit	(Merck)
Asetonitril (gradient grade).....	(J.T. Baker)
Rat TNF- α ELISA kit.....	(eBioscience Platinum ELISA)
Bradford protein assay kit.....	(QuantiChrom Protein Assay)
IDO ELISA kit.....	(Uscn Life Science Inc.)
Metanol.....	(Merck)
Perklorik asit.....	(Merck)
Trinitrobenzen sülfonik asit (TNBS).....	(Sigma)
3-Aminobenzamid.....	(Sigma)
Ketamin.....	(Pfizer)
Xylazin.....	(Bayer)
İnfliximab.....	(Schering-Plough)
NaCl.....	(Merck)
KCl.....	(Merck)
NaHPO ₄	(Merck)
KH ₂ PO ₄	(Sigma)
NaOH.....	(Merck)

3.2 Kullanılan Araç ve Gereçler

Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi (HPLC).....	ThermoFinnigan Surveyor
Analitik Kolon.....	Develosil ODS (5µ 150x4.6 mm)
Guard Kolon.....	Develosil ODS Kolon
Homojenizatör.....	Ultra Turrax IKA T18 Basic
Ultrasonik homojenizatör.....	Sonics Vibra cell VCX 130
Hassas Terazî.....	AND GR-200
Vortex.....	Vibrolabo
pH Metre.....	WTW-Inolab
Manyetik Karıştırıcı.....	Nüve
Ultrasonik Banyo.....	Bandelin Sonorex
Yüksek Devirli Soğutmalı Santrifüj.....	Jouan MR 1822
Derin Dondurucu.....	Jouan
Otomatik Pipetler (50,100,1000µl).....	Eppendorf
0,45 µm Membran Filtre.....	Millipore
Elisa Okuyucu.....	Versa Max

3.3. Ülseratif Kolit Hayvan Modelinin Oluşturulması

Bu deneysel çalışmada hayvansal kolit modelinin oluşturulması Ankara Eğitim ve Araştırma Hastanesi Etik Kurulu'ndan 04.04.2007/227 tarihinde, Eğitim, Planlama ve Koordinasyon Kurulu Karar Defteri'nde kayıtlı 1631 no.'lu kararıyla alınan izinle, Ankara Eğitim ve Araştırma Hastanesi hayvan laboratuvarında yapıldı.

Çalışmada ağırlıkları 250-300 gram arasında değişen 42 adet erkek Wistar Albino rat kullanıldı. Denekler 5 ayrı gruba ayrıldı ve çalışma sonuna kadar ayrı kafeste doğal gece-gündüz siklusları korunarak tutuldu. Deneklerin hepsinin standart günlük kafes temizlikleri yapıldı ve dışkılarını yememeleri için kafes altına ağ şeklinde delikli tel tabakalar yerleştirildi. Tüm gruplar standart yem ile beslendi. Deneklere rektal yolla ülseratif kolit oluşturmak amacıyla trinitrobenzen sülfonik asit (TNBS) veya kontrol grubu için serum fizyolojik verilmesinden 24 saat önce yem verilmesi kesildi ve sadece su içmelerine izin verildi.

Denek Hayvan Grupları:

GRUP 1: (n=6) Negatif kontrol grubu. Kolit oluşturulmadı ve tedavi verilmedi (intraperitoneal 2x1 mL saline, 7 gün boyunca).

GRUP 2: (n=9) Pozitif kontrol grubu. TNBS ile kolit oluşturuldu ancak tedavi verilmedi (rektal 1.2 mL TNBS, intraperitoneal 2x1 mL saline, 7 gün boyunca).

GRUP 3: (n=9) 3-Aminobenzamid tedavisi verilen grup (rektal 1.2 mL TNBS, 3-aminobenzamid 10 mg/kg IP, 7 gün boyunca).

GRUP 4: (n=9) İnfliximab tedavisi verilen grup (rektal 1.2 mL TNBS, infliximab 10 mg/kg IP, 7 gün boyunca).

GRUP 5: (n=9) 3-Aminobenzamid + infliximab tedavisi verilen grup (rektal 1.2 mL TNBS, 3-aminobenzamid 10 mg/kg IP+ infliximab 10mg/kg IP 7 gün boyunca).

Grup 1'e, oda sıcaklığında 2 mL serum fizyolojik rektal yoldan verildi. Grup 2, 3, 4 ve 5 'e ise önce 80 mg/kg ketamin ile 4 mg/kg %2'lik xylazin intramüsküler verilerek genel anestezi sağlandı, ardından kolit oluşturmak amacıyla 1,2 mL oda sıcaklığında TNBS-etanol karışımı rektal yoldan verildi. Kolit oluşturmak amacıyla deneklere rektal yoldan verilen TNBS-etanol karışımı 0.7 mm çaplı polietilen kateter anüs içine 8 cm ilerletilerek yavaşça uygulandı, maddenin kolon yüzeyine iyice yayılabilmesi için denekler 30 saniye süreyle baş aşağı pozisyonunda tutuldu.

3.4 Kolon Dokularının Alınması

Çalışmanın tamamlanmasının planlandığı 7. gün sonunda, sakrifikasyon işlemleri öncesinde, 80 mg/kg ketamin ile 4 mg/kg %2'lik xylazin kullanılarak genel anestezi sağlandı. Genel anestezi altında servikal diskolasyon yöntemi ile sakrifikasyon işlemi gerçekleştirildi ve denekler supin pozisyonunda median kesi ile laparotomi yapılarak eksplere edildi.

Makroskopik değerlendirmeyi takiben organlar patolojik incelemeler için eksize edildi. Kolonun eksplorasyonunda Grup 2, 3, 4 ve 5'de kolitli segment rektumun en fazla 10 cm proksimalinde, yaklaşık 2 cm'lik alanda gözlemlendi ve lezyonun proksimal ve distalinde 2 cm'lik sağlam sınırları içerecek şekilde; grup 1 için ise rektumun 6 cm'lik segmentini

içerecek şekilde kolon rezeke edilip, materyal dışarı alındı. Daha sonra fekal içerik hem mekanik hem de serum fizyolojikle yıkama yoluyla temizlendi. Kolon dokuları analiz süresine kadar -80°C' de saklandı.

3.5. Serum Numunelerinin Hazırlanması

Deneklerden kan örnekleri STS-jel tüplere alınarak 2000g'de 15 dak. santrifüj edildikten sonra, serum örnekleri triptofan ve kinürenin tayini için -80°C'de analiz süresine kadar saklandı.

3.6. Doku IDO Enzim Düzeylerinin Tayini

PBS Tamponun Hazırlanması:

0.4 g NaCl

0.01 g KCl

0.072 g Na₂HPO₄

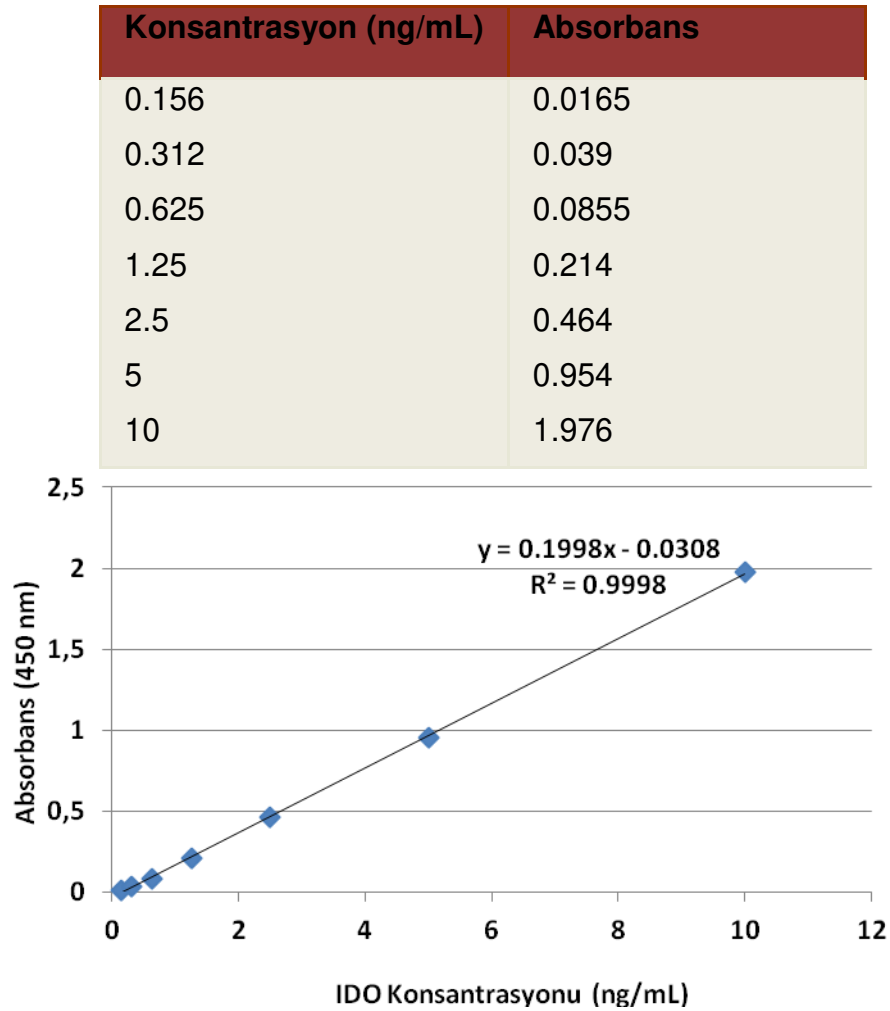
0.012 g KH₂PO₄

Doku homojenizasyonunda kullanılacak PBS tamponun hazırlanması için yukarıda belirtilen miktarlarda tartılan kimyasallar bir balon jöjeye aktararak deiyonize su ile 50 ml'ye tamamlandıktan sonra pH'sı 7.2'ye ayarlandı.

Yaklaşık 100 mg bağırsak doku örneklerine 1 mL PBS tampon katılıp mekanik olarak homojenize edildikten sonra, hücre membranının parçalanması için 15 sn. ultrasonik homojenizatörde homojenize edildi.

Homojenat 5000 g'de 10dak. santrifüj edildikten sonra süpernatanda doku IDO enzim miktarı ELISA yöntemiyle USCNK-Rat IDO ELISA kiti kullanılarak tayin edildi. Standartlar için elde edilen kalibrasyon denkleminin (Tablo 2, Grafik 1) homojenatlardaki enzim miktarı hesaplandı. Doku IDO enzim miktarı, homojenatlarda protein tayini yapıldıktan sonra ng/mg protein olarak verildi.

Tablo 2: IDO Enzim Konsantrasyonlarına Karşılık Gelen Absorbans Değerleri



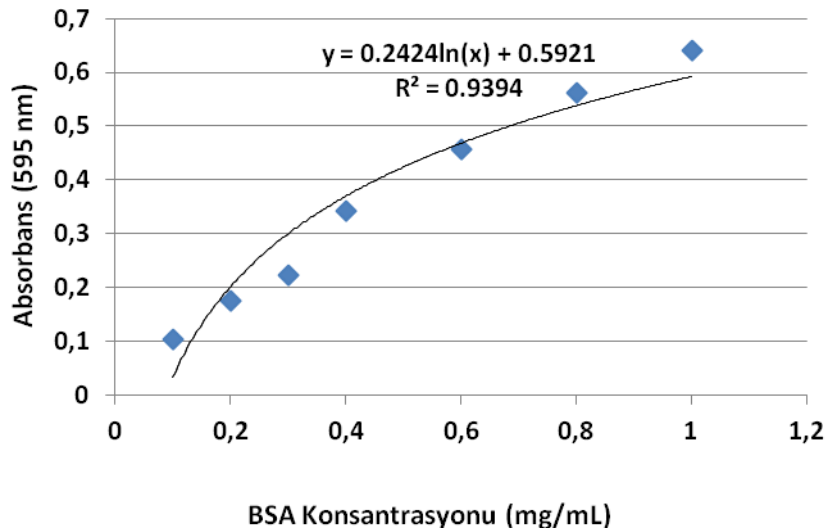
Grafik 1: Doku IDO Standart Kalibrasyon Grafiği

3.7. Dokularda Protein Tayini

Homojenize edilen dokularda protein tayini, Bradford metodu ile Quanti Chrom Protein Assay kiti kullanılarak yapıldı. Standart olarak bovine serum albumini (BSA) kullanıldı. Standartlar için elde edilen kalibrasyon denkleminin (Tablo 3, Grafik 2) homojenatlardaki protein miktarı hesaplandı.

Tablo 3: BSA Konsantrasyonlarına Karşılık Gelen Absorbans Değerleri

BSA (mg/mL)	Absorbans
0.1	0.103
0.2	0.176
0.3	0.224
0.4	0.343
0.6	0.4565
0.8	0.5625
1	0.6395



Grafik 2: BSA Standart Kalibrasyon Grafiği

3.8. Serum Kinürenin ve Triptofan Tayini

100 µl serum 13 µl perklorik asit (%40 v/v) ile karıştırılıp vortexlendikten sonra 13.000g'de santrifüj edilerek proteinlerin ayrılması sağlandı. Supernatan HPLC'ye uygulandı⁶¹.

HPLC deney koşulları:

Analitik kolon: Develosil ODS 5µ 150x4.6 mm

Mobil faz; Asetat tamponu:asetonitril (85:15) (pH:4.0)

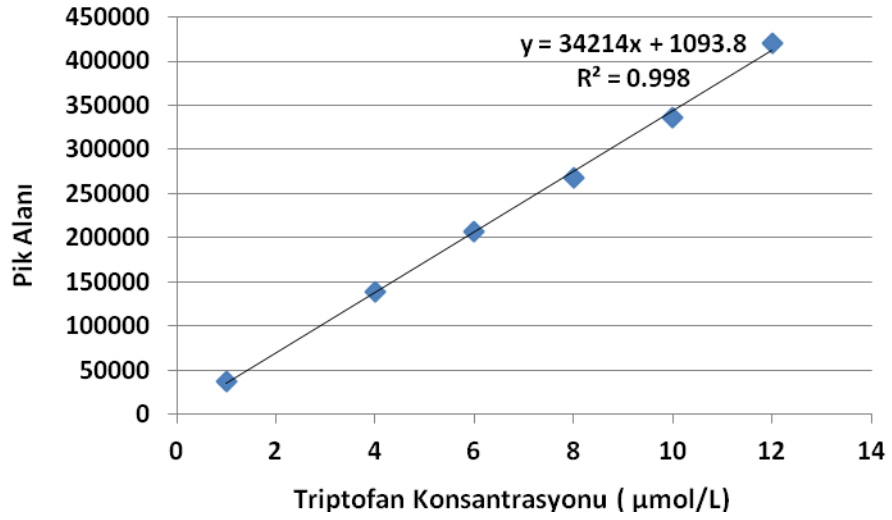
Dedektör: UV (PDA; Triptofan için 278 nm, Kinürenin için 360 nm)

Alıkonma Zamanı: Kinürenin Rt: 5.483 dak. ; Triptofan: 8.877 dak.

Standartlar metanolde çözüldü. Triptofan standartları 1-12 µM, kinürenin standartları 1-10 µM konsantrasyon aralığında olacak şekilde mobil faz ile seyreltilerek hazırlandı. Standartlar için oluşturulan doğru denklemlerinden hareketle serum triptofan ve kinürenin miktar tayini yapıldı (Tablo 4, Grafik 3 ve Tablo 5, Grafik 4). Standartlar ve serum örneklerine ait kromatogram Şekil 5 ve Şekil 6'de verilmiştir.

Tablo 4: Standart Triptofan Konsantrasyonlarına Karşılık Gelen Pik Alanları

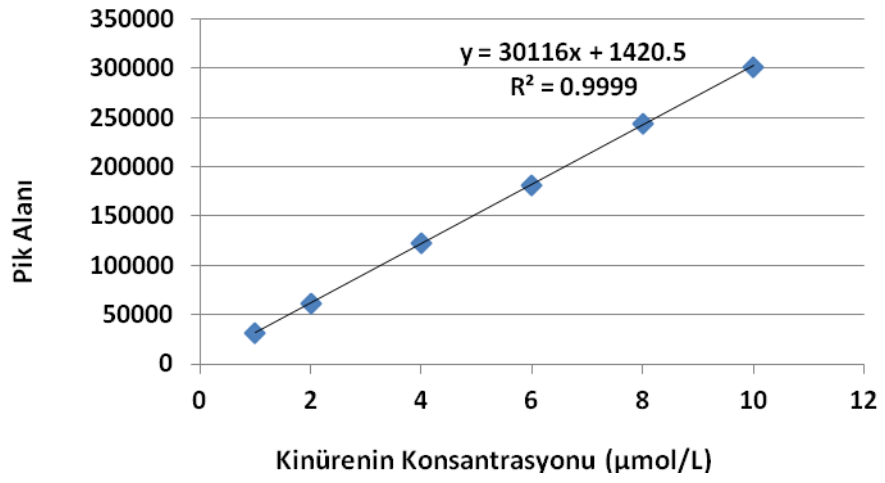
Konsantrasyon (μmol/L)	Pik alanı
1	37902
4	139120
6	207113
8	267513
10	336673
12	421021



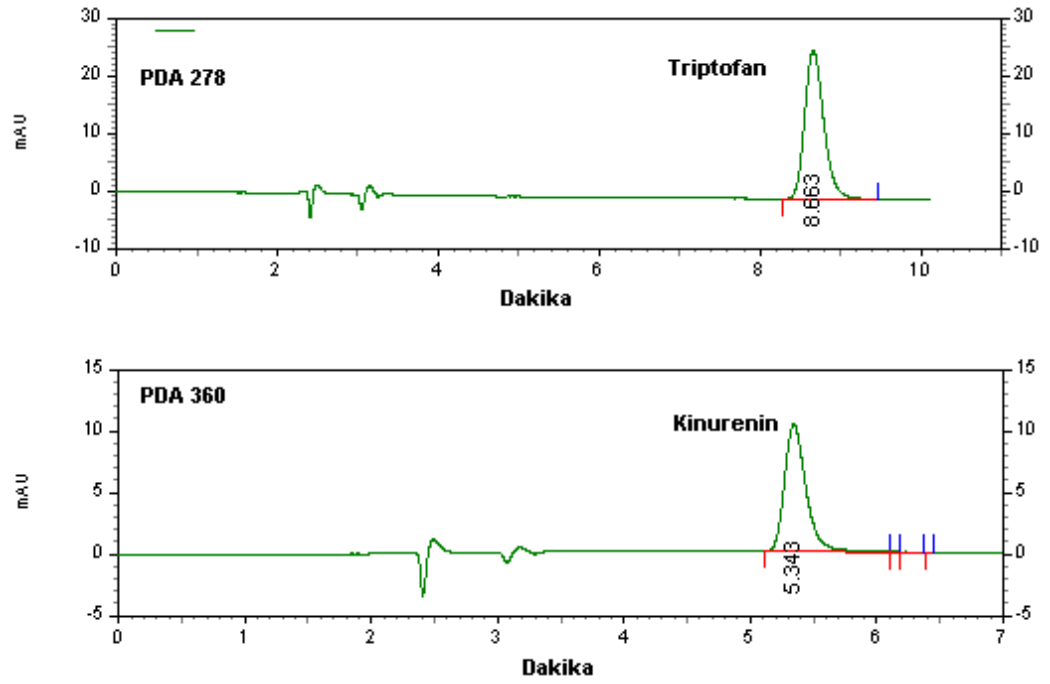
Grafik 3: Standart Triptofan Kalibrasyon Grafiği

Tablo 5: Standart Kinürenin Konsantrasyonlarına Karşılık Gelen Pik Alanları

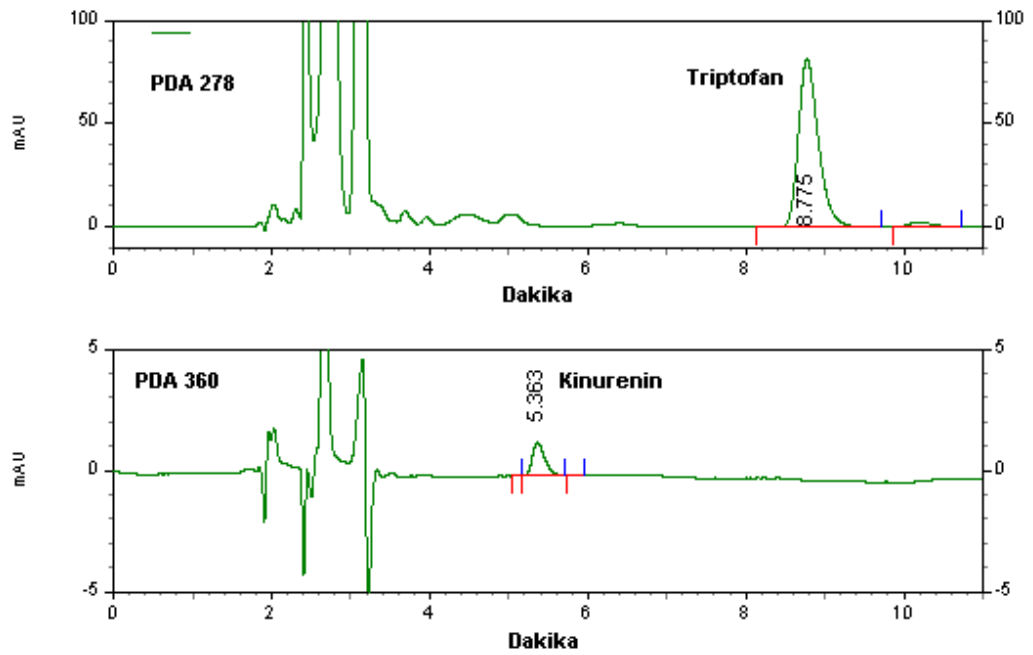
Konsantrasyon($\mu\text{mol/L}$)	Pik alanı
1	31292
2	61122
4	122824.5
6	181668.5
8	243658.5
10	301561.5



Grafik 4: Standart Kinürenin Kalibrasyon Grafiği



Şekil 5: Standart Tryptofan (12 $\mu\text{mol/L}$) ve Kinürenin (4 $\mu\text{mol/L}$) Kromatogramları.



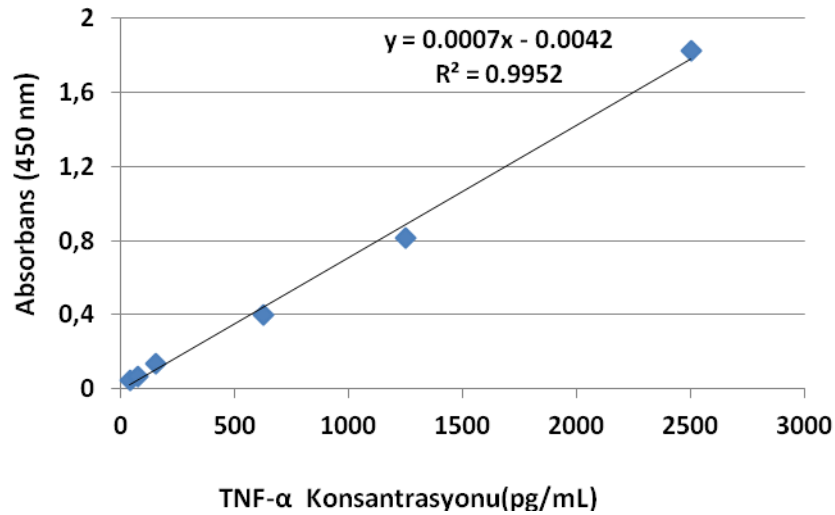
Şekil 6: Serum Örneğine Ait Kromatogram

3.9. Serum TNF- α Tayini

Serum TNF- α düzeyleri, Rat TNF- α ELISA kiti kullanılarak tayin edildi. Standartlar için elde edilen kalibrasyon denkleminde (Tablo 6, Grafik 5) doku enzim miktarı hesaplandı.

Tablo 6: Standart TNF- α Konsantrasyonlarına Karşılık Gelen Absorban Değerleri

TNF- α Konsantrasyon (pg/mL)	Absorbans
39.1	0.049
78.1	0.068
156.3	0.138
62.5	0.4
1250	0.812
2500	1.826



Grafik 5: Standart TNF- α Kalibrasyon Grafiği

3.10. İstatistiksel Değerlendirme

Çalışma sonucu elde edilen veriler, kontrol ve tedavi gruplarında ortalama±standart sapma, medyan değerleri ile 25. ve 75. yüzdelerik değır aralıkları (Inter Quartile Range, IQR) olarak ifade edilmiştir. İstatistiksel değırlendirmede SPSS 10.0 istatistik programı kullanılmıştır. Kolmogorof Simirnov testi, Kruskal Wallis varyans analizi, Mann-Whithney *U* testi, ve spearman *Rho* korelasyon analizi uygulanmıştır. Anlamlılık $p<0.05$ düzeyinde değırlendirilmiştir.

4. BULGULAR

Çalışmamızda, TNBS ile kolit oluşturulmuş 36 adet ve kolit oluşturulmamış 6 adet erkek rat kullanılmıştır. Kolit oluşturulmamış negatif kontrol grubu, kolit oluşturulmuş ancak herhangi bir tedavi uygulanmamış pozitif kontrol grubu ile PARP inhibitörü (PARPi), TNF- α inhibitörü (infliximab) ve her ikisinin kombine olarak uygulandığı tedavi gruplarında (PARPi+infliximab), bağırsak dokusu IDO enzim miktarı, IDO enzim aktivitesinin bir göstergesi olarak değerlendirilen Kyn/Trp oranını belirlemek için serum triptofan ve kinürenin konsantrasyonları ve serum TNF- α düzeyleri ölçülmüştür.

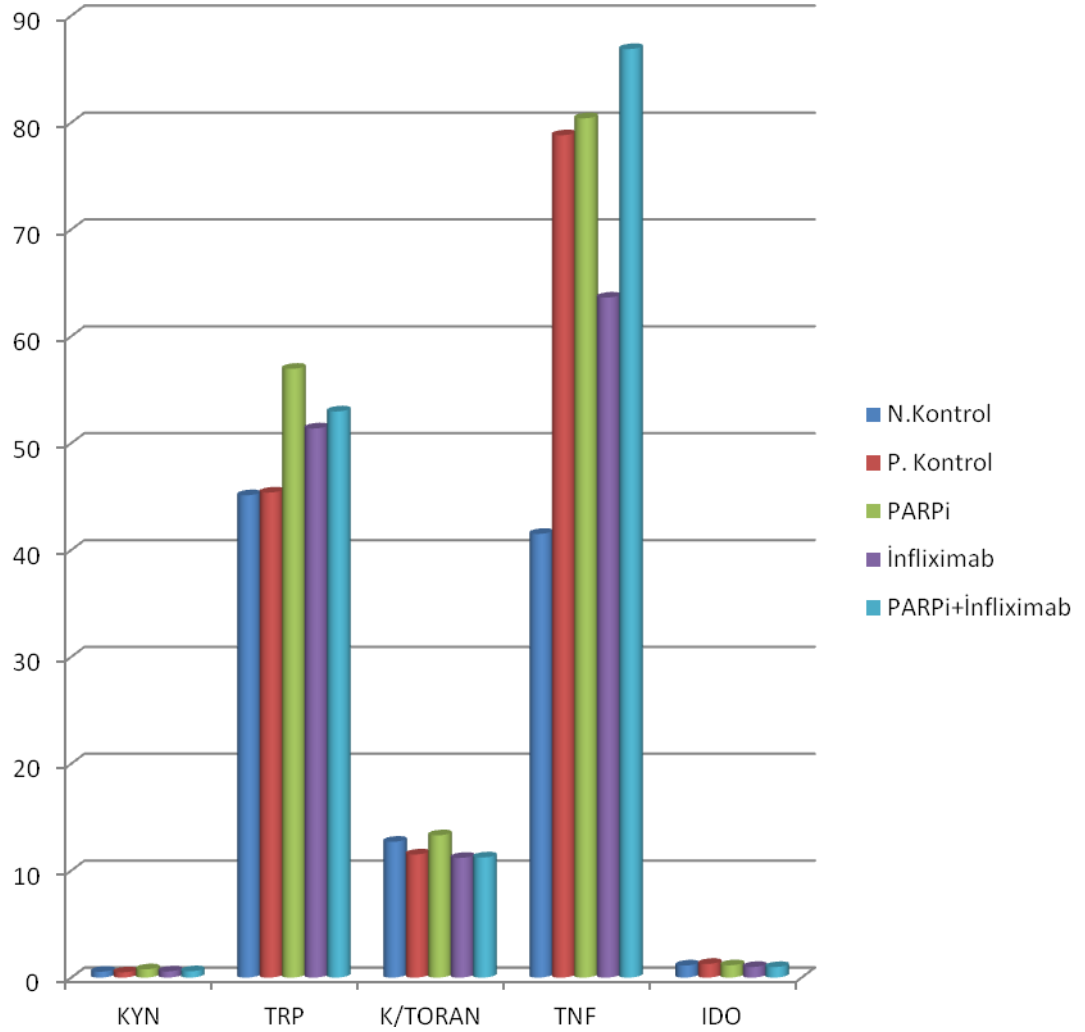
Kontrol ve tedavi gruplarında ölçülen parametrelerin ortalama ve medyan değerleri ile 25. ve 75. yüzdalık değer aralıkları Tablo 7’de verilmiştir.

Tablo 7: Kontrol ve Tedavi Gruplarının Kinürenin, Triptofan, Kyn/Trp Oranı, Doku IDO Enzim Miktarı ve TNF- α Değerleri.

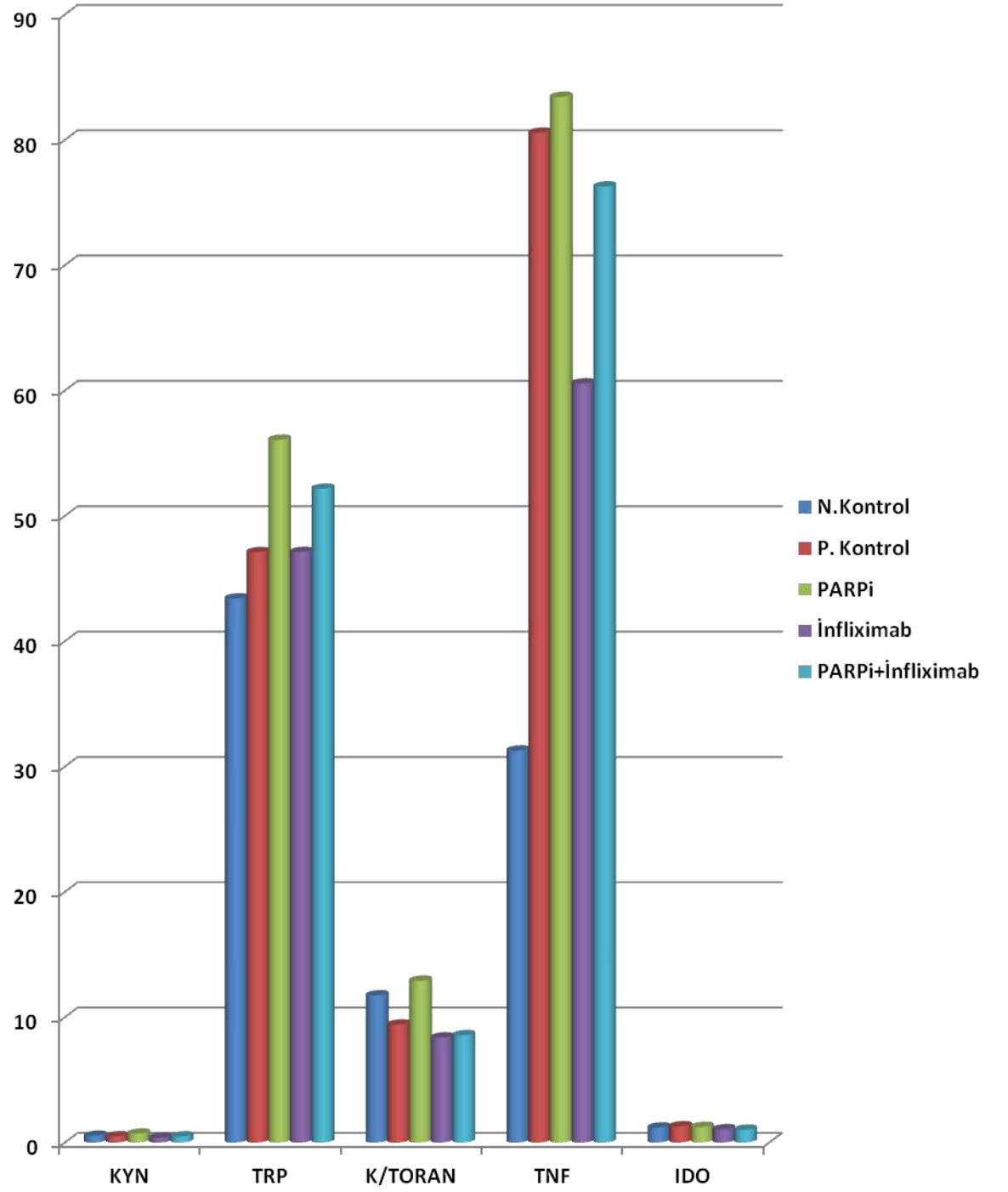
GRUPLAR	KYN ($\mu\text{mol/L}$) Ortalama $\pm$ SS Medyan (IQR)	TRP($\mu\text{mol/L}$) Ortalama $\pm$ SS Medyan (IQR)	KYN/TRP($\times 10^3$) Ortalama $\pm$ SS Medyan (IQR)	IDO(ng/mg) Ortalama $\pm$ SS Medyan (IQR)	TNF- α (pg/mL) Ortalama $\pm$ SS Medyan (IQR)
NEGATİF KONTROL (n=6)	0.55 $\pm$ 0.24 0.54 (0.33-0.80)	45.13 $\pm$ 12.39 43.41 (36.08-55.31)	12.71 $\pm$ 6.11 11.74 (7.19-18.42)	1.13 $\pm$ 0.19 1.19 (0.97-1.27)	41.52 $\pm$ 22.94 31.28 (24.49-70.57)
POZİTİF KONTROL (n=9)	0.49 $\pm$ 0.16 0.50 (0.35-0.62)	45.39 $\pm$ 11.22 47.12 (37.14-49.37)	11.52 $\pm$ 5.04 9.41 (7.22-15.39)	1.28 $\pm$ 0.55 1.29 (0.99-1.80)	78.82 $\pm$ 24.43 ^a 80.57 (61.28-92.71)
PARPi (n=9)	0.77 $\pm$ 0.49 0.71 (0.42-0.94)	56.97 $\pm$ 10.54 56.07 (48.70-64.40)	13.31 $\pm$ 6.72 12.91 (8.60-18.12)	1.15 $\pm$ 0.37 1.24 (1.00-1.37)	80.41 $\pm$ 38.55 ^b 83.43 (51.99-96.99)
İNFLİXİMAB (n=9)	0.58 $\pm$ 0.51 0.37 (0.32-0.63)	51.39 $\pm$ 13.21 47.12 (40.64-64.46)	11.20 $\pm$ 7.63 8.38 (6.11-15.28)	0.99 $\pm$ 0.40 1.06 (0.69-1.27)	63.63 $\pm$ 39.47 60.57 (22.00-93.43)
PARPi + İNFLİXİMAB (n=9)	0.59 $\pm$ 0.33 0.48 (0.32-0.84)	53.98 $\pm$ 5.17 52.17 (49.12-56.55)	11.24 $\pm$ 6.75 8.56 (6.14-16.18)	0.98 $\pm$ 0.43 1.02 (0.58-1.32)	86.89 $\pm$ 31.45 ^a 76.28 (59.14-122.0)

Negatif kontrol grubu ile karşılaştırıldığında; a; p<0.02, b; p<0.04.

İstatistiksel olarak değerlendirdiğimizde, ölçülen serum TNF α düzeyleri hariç parametreler bakımından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlenmedi ($p>0.05$) (Grafik 6, Grafik 7).

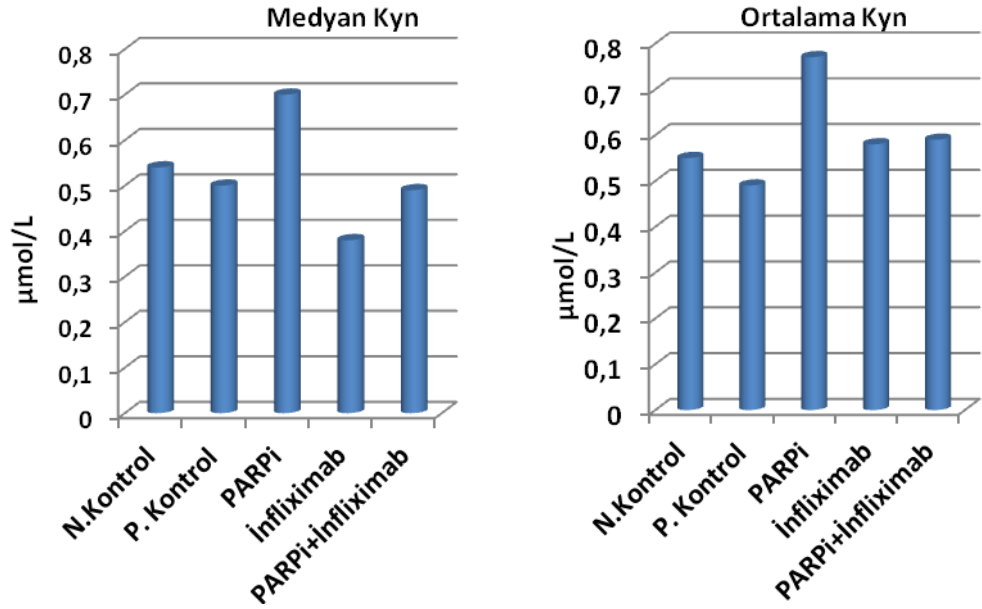


Grafik 6: Negatif Kontrol, Pozitif Kontrol ve Tedavi Gruplarında Ölçülen Parametrelerin Ortalama Değerleri.

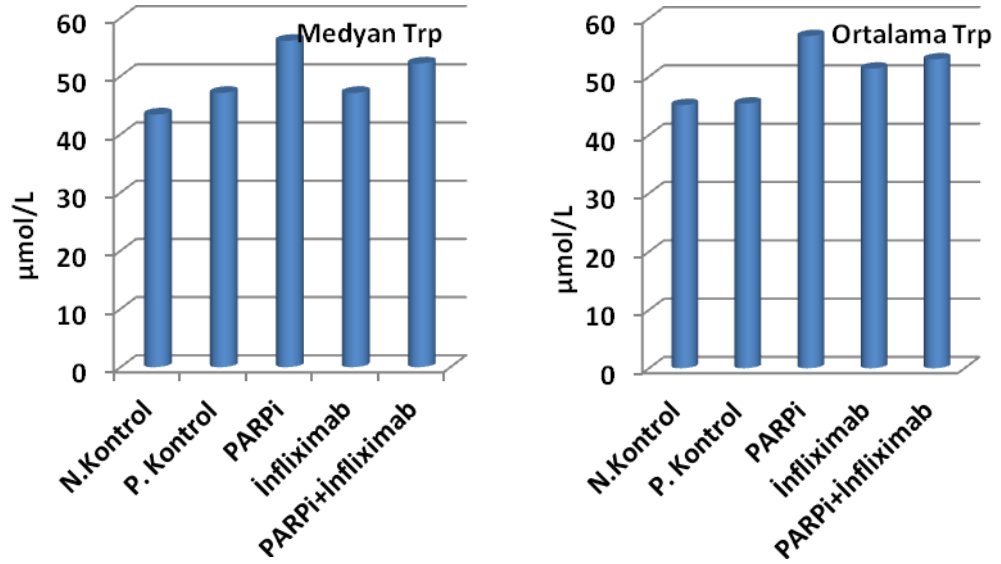


Grafik 7: Negatif Kontrol, Pozitif Kontrol ve Tedavi Gruplarında Ölçülen Parametrelerin Medyan Değerleri.

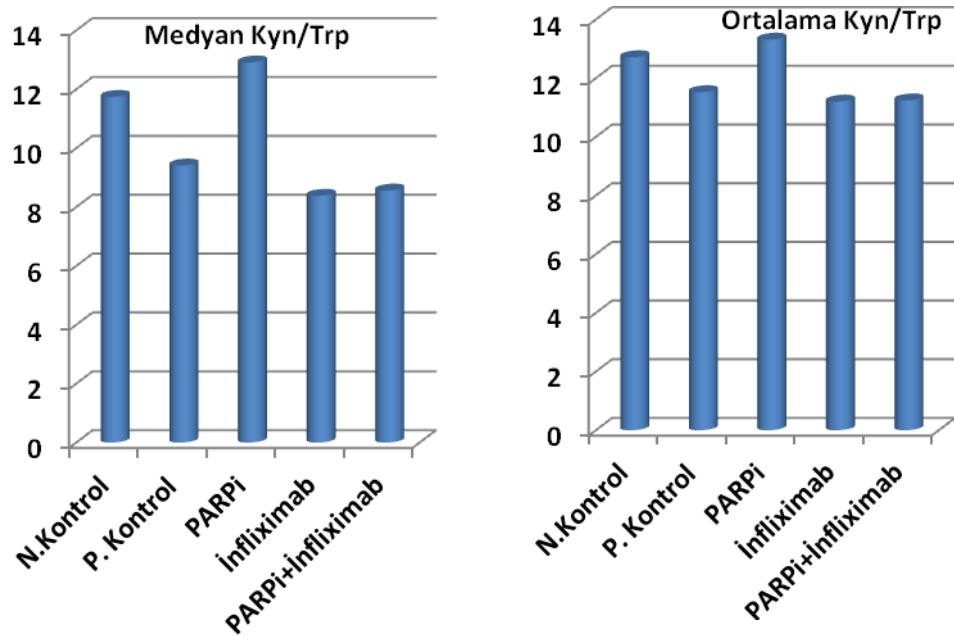
Çalışmamızda, PARP inhibitörü kullanılan grupta; kinürenin, triptofan ve IDO enzim aktivitesinin göstergesi olarak değerlendirilen Kyn/Trp oranı ortalama ve medyan değerleri, ülseratif kolit oluşturulmamış negatif kontrol grubu, ülseratif kolit oluşturulmuş ancak tedavi almamış pozitif kontrol grubu, ülseratif kolit oluşturulup TNF- α inhibitörü tedavisi ve kombine tedavi uygulanmış gruplara kıyasla yüksek olmakla birlikte istatistiksel olarak anlamlı bir düzeye ulaşmamıştır ($p>0.05$) (Grafik 8).



Grafik 8: Negatif Kontrol, Pozitif Kontrol ve Tedavi Gruplarında Kinürenin'in Ortalama ve Medyan Değerleri.

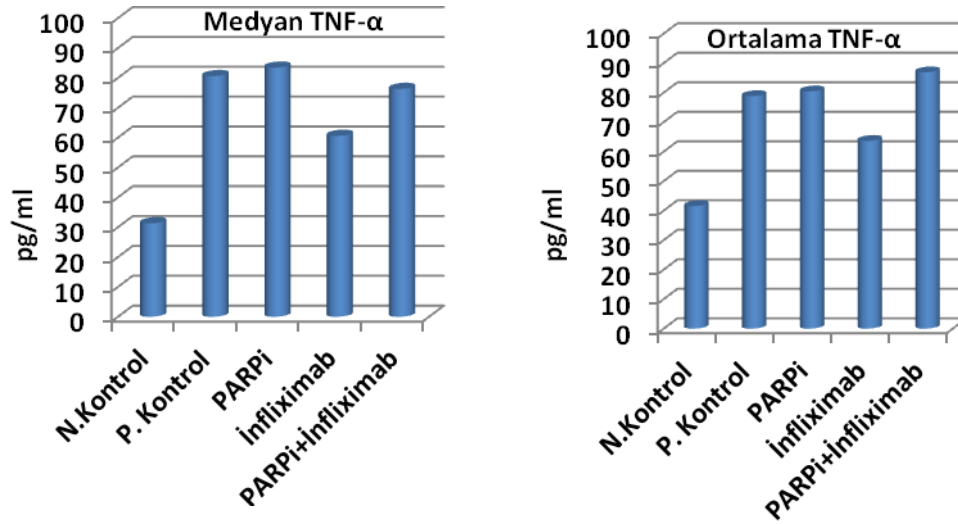


Grafik 9: Negatif Kontrol, Pozitif Kontrol ve Tedavi Gruplarında Triptofan Ortalama ve Medyan Değerleri.

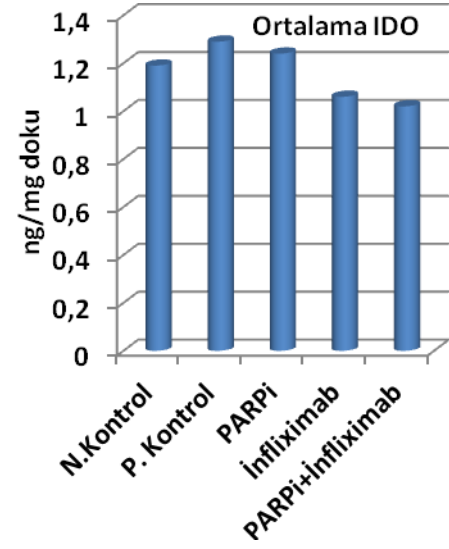
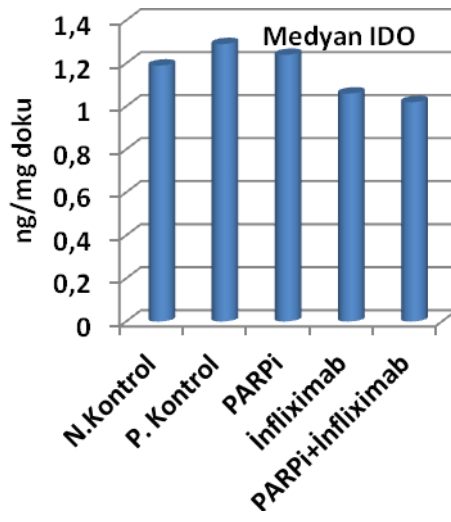


Grafik 10: Negatif Kontrol, Pozitif Kontrol ve Tedavi Gruplarında Kyn/Trp Oranının Ortalama ve Medyan Değerleri.

Çalışmamızda TNF- α düzeyleri bakımından grupları değerlendirdiğimizde; serum TNF- α düzeyleri ülseratif kolit oluşturulmuş gruplarda infliximab tedavisi uygulanan grup dışında negatif kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. İnfliximab tedavisi uygulanan grupta TNF- α düzeylerinin azaldığı, tedavi uygulanmayan negatif kontrol grubu ile kıyaslandığında TNF- α düzeyleri bakımından iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı gözlemlendi ($p>0.05$) (Tablo 7) (Grafik 11). Grupları doku IDO enzim düzeyleri bakımından da değerlendirdiğimizde; istatistiksel olarak gruplar arasında anlamlı farklılıklar gözlenmemiştir ($p>0.05$) (Grafik 12).



Grafik 11: Negatif Kontrol, Pozitif Kontrol ve Tedavi Gruplarında TNF- α Ortalama ve Medyan Değerleri.



Grafik 12: Negatif Kontrol, Pozitif Kontrol ve Tedavi Gruplarında Doku IDO Enzim Düzeylerinin Ortalama ve Medyan Değerleri.

5. TARTIŞMA

İnflamatuvar bağırsak hastalığı; ülseratif kolit ve Crohn hastalığını ifade eden, etiyolojisi ve patojenezi tam olarak anlaşılamamış, kronik ve gastrointestinal sistemin immün aracılı inflamatuvar bir hastalıdır. Hem ülseratif kolit hem de Crohn hastalığında, genetik olarak duyarlı kişilerde luminal antijenlere yönelmiş immün yanıtta disregülasyon söz konusu olup ülseratif kolit, mukozal T hücre disfonksiyonu ve anormal sitokin üretiminin yanı sıra kolonik mukozanın kısmen veya tamamen inflamasyonu ile karakterizedir.

Devamlı olarak çevreden, yiyeceklerden ve bakterilerden kaynaklanan potansiyel olarak zararlı antijenlere maruz kalan gastrointestinal mukozal yüzey, immünojenik yanıt ve tolerans arasındaki dengeyi sağlayan bir immün sisteme sahiptir. İnflamasyonun olmadığı koşullarda mukozal immün yanıt, doğal ve kazanılmış immün yanıt arasındaki işbirliğiyle kontrol edilmektedir. Bu işbirliği, tolerejenik yanıt olarak tanımlanan kontrollü inflamasyonla sonuçlanmakta, bu kontrollü inflamasyon patojenin ortadan kaldırılmasıyla hızla down-regüle olmaktadır. Ancak IBH'de bu denge kronik inflamasyon yönünde bozulmaktadır. Uygunsuz inflamatuvar yanıt, zararlı antijenlere karşı immün efektör T hücre alt gruplarının aşırı aktivasyonu ve farklılaşması ve/veya regülatuvar T hücrelerin cevabındaki defektin bir sonucu olarak meydana gelebilmektedir.

CH, Th1 immün yanıt aracılı bir hastalık olarak kabul edilirken, ÜK, atipik Th2 hücre aracılı bir hastalık olarak değerlendirilmekteydi. 2005 yılında⁶², CD4+ T hücrelerin Th1 ve Th2 dışında Th17 olarak adlandırılan, fibroblastlar, endotelial hücreler, makrofajlar ve epitelyal hücrelerin IL-1, IL-6, TNF- α ve metalloproteinaz

gibi inflamasyon mediatörlerini üretmesini stimüle eden, IL-17'i üreten T hücre alt tipine farklılaştığının gösterilmesiyle bu kompleks inflamatuvar barsak hastalıklarını basitçe Th1/Th2 hipoteziyle açıklamak güçleşmiştir.

Ülseratif kolitte Th2 ve Th17 gibi efektör T hücre alt tipleri etkin olmakla birlikte, yapılan çalışmalar, ülseratif kolitte hem Th1 hem de Th2 immün yanıtın rol oynadığını, aktif ülseratif kolitli hastalarda IL-1 β , IL-4, IL-5, IL-8, IL-12, IL-13, IFN- γ ve TNF- α düzeylerinin yüksek olduğunu ve ÜK'in patojenezinde hem humoral hem de hücre aracılı immünitenin rol oynadığını göstermektedir.^{27,63-65}

ÜK ve CH arasında immünolojik ve klinik farklılıklar olmakla birlikte her iki hastalık da kısmen ortak sitokin profili ve yüksek TNF- α düzeyleri göstermektedir⁸. Aktif ÜK'li hastaların kolon mukozasında ve gaita örneklerinde, TNF- α düzeylerinde kontrollere kıyasla artış gösterilmiştir^{66,67}. Önceleri ÜK'de sadece Th2 hücrelerin rolü olduğunun düşünülmesi, ÜK'in tedavisinde anti-TNF- α ajanlarının etkinliğine yönelik çalışmalarda gecikmeye yol açmış, IBH'da rol oynayan immün ve inflamatuvar mekanizmalara yönelik çalışmalar hızlandıkça TNF- α gibi proinflamatuvar molekülleri hedefleyen biyolojik çalışmalar da hız kazanmıştır.^{6,26}

Önemli proinflamatuvar ve immunomodülatör etkileri olan TNF- α 'ya karşı üretilen kimerik monoklonal bir antikor olan infliximab'ın etki mekanizması tam olarak aydınlatılmamış olmakla birlikte, önceleri çözünür TNF- α 'nın nötralizasyonu ile olabileceği düşünülmüş ancak benzer veya daha güçlü nötralize edici etkinliğe sahip bileşiklerle yapılan çalışmalarda aynı terapötik etki elde edilememiştir.^{68,69} Etki mekanizmasının, TNF- α eksprese eden inflamatuvar hücrelerin apoptozu

yoluyla olabileceği öne sürülmüş, infliximab'ın T hücreleri ve monositlerde apoptozu indüklediği gösterilmiştir.⁷⁰⁻⁷³

Infliximab'ın, hem fistülize olmuş hem de diğer tedavilere cevap vermeyen Crohn hastalarının tedavisinde etkili olduğu gösterilmiştir.^{75,75} Yapılan klinik çalışmalardan elde edilen veriler değişkenlik göstermekle birlikte infliximab'ın, özellikle diğer tedavi seçeneklerine dirençli ÜK hastalarının tedavisinde de etkili olduğu görülmüştür.^{13,76-82} Bununla birlikte anti-TNF- α tedavi yaklaşımının etkinliğinin hastalarda farklılık göstermesi, anti-TNF- α tedavisinin mekanizmalarının aydınlatılmasını ve alternatif tedavi yaklaşımlarının gerekliliğini ortaya çıkarmıştır.

IDO; immunoregülatuar etkilere sahip, triptofan-kinürenin yolağının regülatuar bir enzimidir. IDO enzimi, hem doğal hem de adaptif immün cevapta T hücreleri tarafından üretilen ve en güçlü indükleyicisi olan IFN- γ dışında, enfeksiyonlar esnasında üretilen TNF- α gibi sitokinlerle indüklenmektedir. Ekstrahepatik dokularda, özellikle gastrointestinal sistemde bazal düzeyde yüksek oranda eksprese edilen enzimin intestinal immünite ve patolojilerdeki rolü ve mekanizmaları hala araştırılmaktadır. Makrofajlar ve dendritik hücrelerde eksprese edilen IDO ortamdaki triptofanı tüketerek mikroçevredeki triptofan tüketimine duyarlı olan hücrelerin özellikle T hücrelerin, büyüme ve farklılaşmasında inhibitör etki oluşturmaktadır.^{83,84} Ayrıca triptofan-kinürenin yolağından açığa çıkan ve genel olarak kinüreninler olarak adlandırılan, kinürenin, kinolinik asit ve pikolinik asit gibi ürünlerin sitotoksik etkileri de IDO'nun antiproliferatif etkilerine aracılık etmektedir.¹¹ ÜK, CH ve çölyak hastalığı gibi çeşitli deneysel ve klinik çalışmalarda gastrointestinal sistemde IDO ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir.⁸⁵⁻⁸⁷

Gurtner ve arkadaşları, IDO'nun Th1 hücrelerinin regülasyonundaki rolünü araştırmak amacıyla TNBS ile oluşturdukları kolit modelinde IDO mRNA ve protein ekspresyonlarının arttığını, 1-metil triptofan ile IDO inhibe edildiğinde TNBS kolit grubunda plasebo gruba kıyasla intestinal inflamasyonun şiddetlendiğini ve %80 mortalitenin gözlemlendiğini bildirmişlerdir.⁵²

Bununla birlikte, Crohn ve Ülseratif kolit hastalarından kolonoskopi sırasında alınan biyopsi örneklerinde yapılan çalışmada, Crohn hastalarının lezyonlu biyopsi örneklerinde, IDO ekspresyonunun anlamlı derecede artarken, ÜK'li hastalardan alınan lezyonlu ve lezyonsuz biyopsi örneklerinde IDO ekspresyonunun sağlıklı örneklerle kıyasla anlamlı bir artış göstermediği bildirilmiştir.⁸⁵

Aktif T lenfositlerden sitokin salınması mukozaya fazla miktarda inflamatuvar hücrelerin göçüne neden olmaktadır. Bu hücrelerin aktivasyonu daha fazla sitokin üretimine, hücre göçüne ve inflamasyona neden olmaktadır. Sitokinlerin yanı sıra aktif mukozal hücrelerden lökotrienler, tromboksan ve reaktif oksijen türlerinin salınımı olmaktadır. Bu kontrolsüz immün sistem aktivasyonu, devamlı olarak reaktif oksijen ve nitrojen türevlerinin aşırı üretimiyle sonuçlanmaktadır. Devamlı oksidan oluşumunun, ÜK'te inflamasyonu ve mukozal hasarı artırabileceği öne sürülmüştür.^{88,89}

Çalışmamızda, ratlarda akut fazda yüksek TNF- α düzeyleri ve Th1 immün yanıt ile karakterize TNBS-kolit modeli kullanılarak, TNF- α inhibitörü infliximab ve PARP inhibitörü 3-aminobenzamid'in, immün regülasyonda rol oynayan triptofan-kinürenin yolağının, hız sınırlayıcı

enzimi olan IDO üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Grupların TNF- α düzeylerini değerlendirdiğimizde; literatürle uyumlu olarak, kolit oluşturulmuş kontrol grubunun TNF- α düzeylerinin kolit oluşturulmamış kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı derecede yüksek olduğu, tedavi uygulanmış kolitli gruplarda ise, sadece infliximab uygulanan grupta TNF- α düzeylerinin anlamlı derecede düştüğü gözlemlendi. Kyn/Trp oranı üzerinden IDO enzim aktivitesini, ve doku IDO protein düzeylerini değerlendirdiğimizde; kolit oluşturulmuş ve tedavi uygulanmış gruplarda, kolit oluşturulmamış kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir farklılık gözlenmedi.

TNF- α 'nın IDO indüksiyonundaki rolü tartışmalıdır^{90,91}. Ancak TNF- α 'nın tek başına primer insan makrofajlarında IDO ekspresyonunu indüklediği ve bu indüksiyonun ortama, IDO'nun en güçlü indüktörü ve T-hücre kaynaklı sitokin olan IFN- γ katıldığında arttığı gösterilmiştir⁹². IDO ekspresyonunun muhakkak aktivite anlamına gelmediği, konstitütif IDO ekspresyonunun birçok dendritik hücrede meydana geldiği ancak enzim aktivitesinin stimülatör sinyale ihtiyaç duyduğu, enzim aktivitesinin mekanizmaları tam olarak anlaşılamasa da posttranslasyonel protein modifikasyonunun olabileceği öne sürülmüştür.⁵¹

Trinitrobenzen sülfonik asit indüksiyonunun rat kolon dokusunda, doku hasarına ve mukozal disfonksiyona yol açtığı⁹³, nötrofil infiltrasyonunun inflamasyonlu dokudaki reaktif oksijen radikallerinin major kaynağı olduğu^{94,95} ve PARP inhibisyonunun kolon hasarını inhibe ettiği gösterilmiştir.⁹⁶ Serbest radikallerin, reaktif oksijen türlerinin ve peroksinitritin oluşumuna bağlı olarak artan PARP aktivasyonunun, NAD⁺ ve ATP'nin tüketimi ve hücre ölümüyle sonuçlanması nedeniyle, PARP inhibisyonun, NAD⁺ sentezinde regülatuar enzim olan IDO enzim

düzeyleri ve aktivitesi üzerindeki etkilerini değerlendirdiğimiz çalışmamızda; PARP inhibisyonunun IDO enzim protein düzeyleri ve aktivitesi üzerinde etkili olmadığı sonucuna varıldı.

6. ÖZET

Ülseratif kolit ve Crohn hastalığını kapsayan inflamatuvar bağırsak hastalığı, gastrointestinal sistemin kompleks, kronik, immün aracılı inflamatuvar bozukluğudur. Etiyolojisi tam olarak anlaşılamamakla birlikte çevresel faktörler, genetik yatkınlık ve immünolojik faktörlerin önemli rolü olduğu düşünülmektedir. İndolamin 2,3-dioksijana kinürenin yolağının immünoinflamatuvar etkileri olan hız sınırlayıcı enzimidir.

Bu çalışmada trinitrobenzen sülfonik asitle indüklenmiş rat kolit modelindeki, TNF- α inhibitörü infliximab ve poli(ADP-riboz) polimeraz inhibitörü olan 3-aminobenzamidin IDO enzim aktivitesine ve kolon dokusundaki enzimin protein düzeyine olan etkileri incelendi. Serum IDO aktivitesi olarak değerlendirilen kinürenin/triptofan oranı ve doku IDO protein düzeyleri bakımından tedavi grupları, tedavi uygulanmamış kolit grubu ve kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmedi. TNF- α düzeyleri, kolit grubunda, 3-aminobenzamid grubunda ve 3-aminobenzamid ile infliximabın birlikte uygulandığı grupta anlamlı derecede yüksek bulundu. Sadece infliximab uygulanan grupta kontrol grubuna kıyasla düşük TNF- α düzeyleri gözlemlendi. Sonuçlar infliximab ve 3-aminobenzamid uygulamasının ratlarda TNBS ile oluşturulan kolit modelinde IDO aktivitesini ve protein düzeyini etkilemediğini göstermiştir.

7. SUMMARY

Inflammatory bowel diseases, including both ulcerative colitis and Crohn's disease, are complex, chronic, immune-mediated inflammatory disorders of gastrointestinal tract. Their etiologies have not been completely understood however environmental factors, genetic predisposition and immunological factors are thought to have important contributions. Indoleamine 2,3-dioxygenase having immunoinflammatory effects is the rate limiting enzyme of the kynurenine pathway.

We evaluated the effects of TNF- α inhibitor, infliximab, and poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) inhibitor, 3-aminobenzamide on the serum IDO enzyme activity and enzyme protein levels of colon tissue in rat colitis induced by trinitrobenzene sulfonic acid. Kynurenine/tryptophan ratio as a serum IDO activity and IDO protein levels of colon tissues did not show statistically significant difference among treatment groups, non-treated colitis and control groups. TNF- α levels were significantly increased in colitis group, 3-aminobenzamide group and 3-aminobenzamide plus infliximab group. Only decreased TNF- α levels were observed only after infliximab treatment group compared to control group. These results showed that infliximab and/or 3-aminobenzamide treatment did not change IDO activity and levels in TNBS-induced colitis in rat.

8. KAYNAKLAR

1. Satsangi J, Jewell DP, Rosenberg WMC, Bell JL. Genetics of inflammatory bowel disease. *Gut* 1994; 35: 696-700.
2. Molodecky NA, Soon SI, Rabi DM, William A, Ferris M, Cernoff G et al. Increasing incidence and prevalence of the inflammatory bowel diseases with time, based on systematic review. *Gastroenterology* 2012; 142: 46-54.
3. Limbergen JV, Philpott D, Griffiths MA. Genetic profiling in inflammatory bowel disease: from association to bedside. *Gastroenterology* 2011; 141: 1566-71.
4. Lawrence J, Saubermann and Francis AF. Ulcerative colitis. In: *Therapy of digestive disorders*. Second edition. Elsevier Publishing; 2006. p.803-17.
5. Boriviant M, Cossu A. Inflammatory bowel disease. *Oral Dis* 2012; 18: 1-15.
6. Scott EP, Stephan RG. Future therapeutic approaches for inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2011; 140: 1838-46.
7. Abraham C, Cho JH. Inflammatory bowel disease. *N Engl J Med* 2009; 361: 2066-78.
8. Strober W, Fuss JL. Proinflammatory cytokines in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2011; 140: 1756-67.
9. Moffett JR, Nambodiri MA. Tryptophan and the immune response. *Immunol Cell Biol* 2003; 81: 247-65.
10. King NJC, Thomas SR. Molecules in focus: indoleamine 2,3-dioxygenase. *Int J Biochem Cell Biol* 2007; 39: 2167-72.
11. Bobby J, Cherayil MD. Indoleamine 2,3-dioxygenase in intestinal immunity and inflammation. *Inflamm Bowel Dis* 2009; 15: 1391-96.

12. Levin A, Shibolet O. Infliximab in ulcerative colitis. *Biologics*. 2008; 2: 379-88.
13. Di Sabatino A, Biancheri P, Rovedatti L, Thomas T, Corazza RG, et al. New pathogenic paradigms in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 2012; 18: 368-71.
14. Konduk BT, Hülügü S. İnflamatuvar bağırsak hastalıklarında tanı. *Türkiye Klinikleri J Int Med Sci* 2005; 1: 16-53.
15. Karlinger K, Györke T, Makö E, Mester A, Tarjan Z. The epidemiology and the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Eur J Radiol* 2000; 35: 154-67.
16. Tozun N, Atug O, Imeryuz N, Hamzaoglu HO, Tiftikci A, Parlak E, et al. Members of the Turkish IBD Study Group. Clinical characteristics of inflammatory bowel disease in Turkey. *J Clin Gastroenterol* 2009; 43: 51-7.
17. Ulker A, Parlak E, Tezel A, Alkım C, Şahin B. Epidemiology of inflammatory bowel disease. *Turk J Gastroenterol* 1999; 10: 55-9.
18. Tezel A, Dökmeci G, Eskiocak M, Umit H, Soylu AR. Epidemiological features of ulcerative colitis in Trakya, Turkey. *J Int Med Res* 2003; 31: 141-8.
19. Abraham C, Cho JH. Inflammatory bowel disease. *N Engl J Med* 2009; 361: 2066-78.
20. Osborne MJ, Stansby GP. Cigarette smoking and its relationship to inflammatory bowel disease: a review. *J Soc Roy Med* 1992; 85: 214-16.
21. Srivastava ED, Russell MA, Feyerabend C, Rhodes J. Effect of ulcerative colitis and smoking on rectal blood flow. *Gut* 1990; 31: 1021-24.
22. Cosnes J, Gower-Rousseau C, Seksik P, Cortot A. Epidemiology and natural history of inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology* 2011; 140: 1785-94.

23. Vessey M, Jewell D, Smith A, Yeates D. Chronic inflammatory bowel disease, cigarette smoking, and use of oral contraceptives: findings in a large cohort study of women of childbearing age. *Brit Med J* 1986; 292: 1101-03.
24. Chassaing B, Michaud A. The commensal microbiota and enteropathogens in the pathogenesis of inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology* 2011; 140: 1720-28.
25. Oscar C, Cgagoyan T, Maldonado J, Gil A. Aetiology of inflammatory bowel disease (IBD): Role of intestinal tissue immune response. *Clin Nutr* 2005; 24: 339-52.
26. Bruce ES, Gilaad G. The Role of TNF α in Ulcerative Colitis. *J Clin Pharmacol* 2007; 47: 930-41.
27. Di Sabatino A, Biancheri P, Rovedatti L, MacDonald TT, Corazza GR. New pathogenic paradigms in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 2012; 18: 368-71.
28. Carter MJ, Lobo AJ, Travis SP. Guidelines for the management of inflammatory bowel disease in adults. *Gut* 2004; 53: 1-16.
29. Vilablanca EJ, Cassani B, Andrian UH, Mora JR. Blocking lymphocyte localization to the gastrointestinal mucosa as a therapeutic strategy for inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology* 2011; 140: 1776-64.
30. Burger D, Travis S. Conventional medical management of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2011; 140: 1827-37.
31. Plevy SE, Targan SR. Future therapeutic approaches for inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology* 2011; 140: 1838-46.
32. Richard DM, Dawes MA, Mathias CW, Acheson A, Hill- Kapturczak N, Dougherty DM. L-Tryptophan: Basic metabolic functions, behavioral research and therapeutic indications. *Int J Tryptophan Res* 2009; 2: 45-60.

33. McMenamy RH, Oncley JL. The specific binding of L- tryptophan to serum albumin. *J Biol Chem* 1958; 233: 1436-47.
34. Schwarcz R, Pellicciari R. Manipulation of brain kynurenines: glial targets, neuronal effects, and clinical opportunities. *J Pharmacol Exp* 2002; 303:1-10.
35. Pucak ML, Carroll KAL, Kerr DA, Kaplin AL . The role of indoleamine 2,3- dioxygenase (IDO) in the pathophysiology of interferon-alpha-induced depression. *J Psychiatry Neurosci* 2003; 29: 11-7.
36. Takikawa O. Biochemical and medical aspects of indoleamine 2,3-dioxygenase-initiated L-tryptophan metabolism. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 338: 12-9.
37. Moffett JR, Namboodiri MA. Tryptophan and the immune response. *Immunol Cell Biol* 2003; 81: 247-65.
38. Taylor MW, Feng GS. Relationship between interferon-gamma, indoleamine 2,3-dioxygenase, and tryptophan catabolism. *FASEB J* 1991; 5: 2516-22.
39. Bender D.A. Biochemistry of tryptophan in health and disease. *Mol Aspects Med* 1983; 6: 101-97.
40. Schrocksnadel K, Wirleitner B, Winkler C, Fuchs D. Monitoring tryptophan metabolism in chronic immune activation. *Clin Chim Acta* 2006; 364: 82-90.
41. Fuchs D, Möller AA, Reibnegger G, Werner ER, Werner-Felmayer G, Dierich MP, et al. Increased endogenous interferon-gamma and neopterin correlate with increased degradation of tryptophan in human immunodeficiency virus type 1 infection. *Immunol Lett* 1991; 28: 207-12.
42. Schrocksnadel K, Kaser S, Ledochowski M, Neurauter G, Mur E, Herold M, et al. Increased degradation of tryptophan in blood of patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 2003; 30: 1935-9.
43. King NJ, Thomas SR. Molecules in focus: indoleamine 2,3-dioxygenase. *Int J Biochem Cell Biol* 2007; 39: 2167–72.

44. Alberati-Giani D, Malherbe P. Differential regulation of indoleamine 2,3-dioxygenase expression by nitric oxide and inflammatory mediators in IFN-gamma-activated murine macrophages and microglial cells. *J Immunol* 1997; 159: 419-26.
45. Murray MF. The human indoleamine 2,3-dioxygenase gene and related human gene. *Curr Drug Metab* 2007; 8: 197-200.
46. Ball HJ, Sanchez-Perez A, Weiser S, Austin CJD, Astelbauer F, Miu J, et al. Characterization of an indoleamine 2,3-dioxygenase-like protein found in humans and mice. *Gene* 2007; 396: 203–13.
47. Takikawa O, Littlejohn TK, Roger J, Truscott W. Indoleamine 2,3-dioxygenase in the human lens, the first enzyme in the synthesis of UV filters. *Exp Eye Res* 2001; 72: 271-7.
48. Korlimbinis A, Truscott RJ. Identification of 3-hydroxykynurenine bound to proteins in the human lens. A possible role in age-related nuclear cataract. *Biochemistry* 2006; 45:1950-60.
49. Mellor A. Indoleamine 2,3-dioxygenase and regulation of T-cell immunity. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 338: 20-4.
50. Mellor AL, Munn DH. Tryptophan catabolism and regulation of adaptive immunity. *J Immunol* 2003; 170: 5809-13.
51. Grohmann U, Fallarino F, Puccetti P. Tolerance, DCs and tryptophan: much ado about IDO. *Trends Immunol* 2003; 24: 242-48.
52. Gurtner GJ, Newberyy RD, Schloemann R, McDonald G, Stenson W. Inhibition of indoleamine 2,3-dioxygenase augments trinitrobenzene sulfonic acid colitis in mice. *Gastroenterology* 2003; 125: 1762-73.
53. Murch SH, Lamkin VA, Savage MO, Walker-Smith JA, MacDonald TT. Serum concentrations of tumour necrosis factor alpha in childhood chronic inflammatory bowel disease. *Gut* 1991; 32: 913-17.

54. Stevens C, Walz G, Singaram C, Lipman M, Zanker B, Muggia A, et al. Tumor necrosis factor- α interleukin-1 β , and interleukin-6 expression in inflammatory bowel disease. *Dig Dis Sci* 1992; 37: 818-26.
55. Powrie F, Leach MW, Mauze S, Menon S, Caddle LB, Coffman RL. Inhibition of Th1 responses prevents inflammatory bowel disease in scid mice reconstituted with CD45RBhi CD⁺ Tcells. *Immunity* 1994; 1: 553-62.
56. Neurath MF, Fuss I, Pasparakis M, Alexopolou L, Haralambous S, Strober W, et al. Predominant pathogenic role of tumor necrosis factor in experimental colitis in mice. *Eur J Immunol* 1997; 27: 1743-50.
57. Sands BE, Kaplan GG. The Role of TNF α in Ulcerative Colitis. *J Clin Pharmacol* 2007; 47: 930-41.
58. Atreya R, Mudter J, Finotto S, Müllberg J, Jostock T, Wirtz S, et al. Blockade of interleukin 6 trans signaling suppresses T-cell resistance against apoptosis in chronic intestinal inflammation: evidence in crohn disease and experimental colitis in vivo. *Nat Med* 2000; 6: 583-88.
59. De la Lastra, Villegas I, Sanchez-Fidalgo S. Poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors: New pharmacological functions and potential clinical implications. *Curr Pharm Des.* 2007; 13: 933-62.
60. Virag L, Szabo C. The Therapeutic Potential of Poly(ADP-Ribose) Polymerase Inhibitors. *Pharmacol Rev* 2002; 54: 375-429.
61. Zhang X, He Y, Ding M. Simultaneous determination of tryptophan and kynurenine in plasma samples of children patients with Kawasaki disease by high-performance liquid chromatography with programmed wavelength ultraviolet detection. *J Chromatogr B* 2009; 877: 1678-82.
62. Yoichiro I, Harumichi I. The IL-23/IL-17 axis in inflammation. *J Clin Invest* 2006; 5: 1218-22.

63. Sandborn WJ, Targan SR. Biologic therapy of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2002; 122: 1592-608.
64. Fuss IJ, Heller F, Boirivant M, Leon F, Yoshida M, Kitani A, et al. Nonclassical CD1 restricted NK T cells that produce IL-13 characterize an atypical Th2 response in ulcerative colitis. *J Clin Invest* 2004; 113: 1490-97.
65. Sawa Y, Oshitani N, Adachi K, Higuchi K, Matsumoto T, Arakawa T. Comprehensive analysis of intestinal cytokine Messenger RNA profile by real-time quantitative polymerase chain reaction in patients with inflammatory bowel disease. *Int J Mol Med* 2003; 11: 175-9.
66. Breese EJ, Michie CA, Nicholls SW, Williams CB, Domizio P, Macdonald TT, et al. Tumor necrosis factor alpha-producing cells in the intestinal mucosa of children with inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*. 1994; 106: 1455-66.
67. Braegger CP, Nicholls S, Murch SH, Stephens S, Macdonald TT. Tumor necrosis factor alpha in stool as a marker of intestinal inflammation. *Lancet* 1992; 339: 89-91.
68. Van Dulleman HM, Van Deventer SJ, Hommes DW, Bijl HA, Jansen J, Woody J, et al. Treatment of Crohn' s disease with anti-tumor necrosis factor chimeric monoclonal antibody (cA2). *Gastroenterology* 1995; 109: 129-35.
69. Hanauer SB, Cohen RD, Becker RV, Larson LR, Vreeland MG. Advances in the management of Crohn' s disease: economic and clinical potential of infliximab. *Clin Ther* 1998; 20: 1009-28.
70. Luger A, Schmidt M, Luger N, Pauels HG, Domschke W, Kucharzik T. Infliximab induces apoptosis in monocytes from patients with chronic active Crohn's disease by using a caspase-dependent pathway. *Gastroenterology* 2001; 121: 1145-57.
71. Van den Brande JM, Braat H, Van den Brink GR, Versteeg HH, Bauer CA, Hommes DW, et al. Infliximab but not etanercept

- induces apoptosis in lamina propria T-lymphocytes from patients with Crohn's disease. *Gastroenterology* 2003; 124: 1774-85.
72. Peppelenbosch MP, van Deventer SJ. T cell apoptosis and inflammatory bowel disease. *Gut* 2004; 53: 1556-58.
 73. Tilg H, Moschen A, Kaser A. Mode of function of biological anti-TNF agents in the treatment of inflammatory bowel disease. *Expert Opin Biol Ther* 2007; 7: 1051-59.
 74. Targan SR, Hanauer SB, van Deventer SJ, Mayer L, Present DH, Braakman T, et al. A short -term study of chimeric monoclonal antibody cA2 to tumor necrosis factor alpha for Crohn's disease. Crohn's Disease cA2 Study Group. *N Engl J Med* 1997; 337: 1029-35.
 75. Present DH, Rutgeerts P, Targan SR, Hanauer SB, Mayer L, van Hogezand RA, et al. Infliximab for the treatment of fistulas in patients with Crohn's disease. *N Engl J Med* 1999; 340: 1398-405.
 76. Probert C, Hearing D, Schreiber S, Kühbacher T, Ghosh S, Arnott D, et al. Infliximab in moderately severe glucocorticoid resistant ulcerative colitis: a randomised controlled trial. *Gut* 2003; 52: 998-1002.
 77. Bermejo F, Lopez A. Infliximab induces clinical, endoscopic and histological responses in refractory ulcerative colitis. *Rev Esp Enferm Dig* 2004; 96: 94-101.
 78. Sands BE, William JT, William JS, Rutgeerts PJ, Hanauer BS, Mayer L, et al. Infliximab in the treatment of severe, steroid-refractory ulcerative colitis: A pilot study. *Inflamm Bowel Dis* 2001; 7: 83-87.
 79. Rutgeerts P, Assche VG, Vermeire S: Review article: infliximab therapy for inflammatory bowel disease seven years on. *Aliment Pharmacol Ther* 2006; 23: 451-63.
 80. Rutgeerts P, William JS, Feagan BG, Reinisch W, Olson A, Johanns J, et al. Infliximab for induction and maintenance therapy for ulcerative colitis. *N Engl J Med* 2005; 353: 2462-76.

81. Guimbaud R, Bertrand V, Chauvelot-Moachon L, Guartier G, Vidon N, Gioud JP, et al. Network of inflammatory cytokines and correlation with disease activity in ulcerative colitis. *Am J Gastroenterol* 1998; 93: 2397-404.
82. Reimund JM, Wittersheim C, Dumont S, Muller CD, Baumann R, Duclos B, et al. Mucosal inflammatory cytokine production by intestinal biopsies in patients with ulcerative colitis and crohn's disease. *J Clin Immunol* 1996; 16: 144-50.
83. Mellor AL, Keskin DB, Johnson T, Chandler P, Munn DH. Cells expressing indoleamine 2,3-dioxygenase inhibit T cell responses. *J Immunol* 2002; 168: 3771-76.
84. Fallarino F, Grohmann C, Vacca R, Bianchi C, Spreca A, Fioretti MC, et al. T cell apoptosis by tryptophan catabolism. *Cell Death Differ* 2002; 9: 1069-77.
85. Wolf MA, Wolf D, Rumpold H, Alexander R, Kaser A, Obrist P, et al. Overexpression of indoleamine 2,3-dioxygenase in human inflammatory bowel disease. *Clin Immunol* 2004; 113: 45-55.
86. Dieckgraefe BK, Stenson WF, Korzenik JR; Swanson PE, Harrington PE. Analysis of mucosal gene expression in inflammatory bowel disease by parallel oligonucleotide arrays. *Physiol Genomics* 2000; 4: 1-11.
87. Torres MI, Lopez-Casado MA, Lorite P, Lorite P, Rios A. Tryptophan metabolism and indoleamine 2,3-dioxygenase in celiac disease. *Clin Exp Immunol* 2007; 148: 419-24.
88. Pavlick KP, Laroux FS, Fuseler J, Wolf RE, Gray L, Hoffman J, et al. Role of reactive metabolites of oxygen and nitrogen in inflammatory bowel disease. *Free Radic Biol Med* 2002; 33:311-22.
89. Kruidenier L, Verspaget HW. Review article: oxidative stress as a pathogenic factor in inflammatory bowel disease: radicals or ridiculous? *Aliment Pharmacol Ther* 2002; 16: 2997-15.

90. Carlin JM, Borden EC, Sondel PM, Byrne GI. Biologic-response-modifier induced indoleamine 2,3-dioxygenase activity in human peripheral blood mononuclear cell cultures. *J Immunol* 1987; 139: 2414–18.
91. Fujigaki S, Saito K, Sekikawa K, Tone S, Takikawa O, Fujii H, et al. Lipopolysaccharide induction of indoleamine 2,3-dioxygenase is mediated dominantly by an IFN-gamma independent mechanism. *Eur J Immunol*; 2001; 31: 2313-18.
92. Yasui H, Takai K, Yoshida R, Hayaishi O. Interferon enhances tryptophan metabolism by inducing pulmonary indoleamine 2,3-dioxygenase: its possible occurrence in cancer patients. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; 83: 6622-26.
93. Guo X, Wang JK, Cho CH. Involvement of neutrophils and free radicals in the potentiating effects of passive cigarette smoking on inflammatory bowel disease in rats. *Gastroenterology* 1999; 117: 884-92.
94. Cuzzocrea S, Mazzon E, Serraino I, Dugo L, Centorrino T, Ciccolo A, et al. Celecoxib, a selective cyclooxygenase-2 inhibitor reduces the severity of experimental colitis induced by dinitrobenzene sulfonic acid in rats. *Eur J Pharmacol* 2001a; 431: 91-102.
95. Cuzzocrea S, Mazzon E, Serraino I, Lepore V, Terranova ML, Ciccolo A, et al. Melatonin reduces dinitrobenzene sulfonic acid induced colitis. *J Pineal Res* 2011b; 30: 1-12.
96. Sanchez S, Villegas I, Martin A, Sanchez M, Lastra CA. PARP inhibition reduces acute colonic inflammation in rats. *Eur J Pharmacol* 2007; 563: 216-23.

9. ETİK KURUL KARARI

T.C.
Sağlık Bakanlığı
Ankara Eğitim ve Araştırma Hastanesi
"Eğitim, Planlama ve Koordinasyon Kurulu Karar Defteri"

Toplantı No: 0227 04.04.2007

BAŞKAN
Prof.Dr.Ali Pekcan Demiröz
Başhekim

EPKK ASIL ÜYELERİ	EPKK YEDEK ÜYELERİ
Doç.Dr.Yalçın Aral* - EPKK Başkan Vekili, YEK Başkanı Endokrinoloji ve Metabolizma Hastalıkları Klinik Şefi	Dr.Uğur Kocer**** I. Radyoloji Klinik Şefi ✓
Op.Dr.Erdal Samim*** I. K.B.B. Hastalıkları Klinik Şefi	Doç.Dr.Gül Gönçay**** III. İç Hastalıkları Klinik Şefi ✓
Op.Dr.Sunay Duman*** I. Göz Hastalıkları Klinik Şefi	Doç.Dr.Merih Korkmaz**** Nükleer Tıp Klinik Şefi
Doç.Dr.Yıldız Dallar*** Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Klinik Şefi	Doç.Dr.Bülent Gökmen**** Kadın Hastalıkları ve Doğum Klinik Şefi
Op.Dr.Ali Ulvi Öngören* II. Genel Cerrahi Klinik Şefi	

*Genel Etik Kurul (YEK) ve Eğitim Plan ve Koordinasyon Kurulu (EPKK) Üyeleri **YEK Üyeleri ***EPK Üyeleri ****EPK Yedek Üyeleri

KARAR:

1630. Kolit sonrası 3-aminobenzamid ve infliximab ın kolit üzerinde tedavide antiinflamatuvar potansiyelize edici etkilerinin incelenmesi T.C. Sağlık Bakanlığı Ankara Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi 2. Genel Cerrahi Klinik Şefliği (Op.Dr.Abdullah Eroğlu, Dr.Ebru Menekşe) çalışması. Prospektif (experimental) hayvan (Wistar Albino rat) çalışması. Çalışmanın protokol, usul, yaklaşım ve yöntem yönünden "ETİK" değerlendirmesinde "UYGUN" "OLDUĞUNA" / "DAVADIGINA" / "OYBİRLİĞİ" ile karar verilmiş. Hastanemiz hayvan laboratuvarı gerekliliklerinin ve araştırma için belirlenen uygulama, tetkik ve girişimlerin araştırma gurubunca karşılanması kaydı ile çalışmanın yapılmasına ve Hastanemiz hayvan laboratuvarının kullanılmasına "İZİN" "VERİLMİŞTİR" / "VERİLMİŞTİR".

Op.Dr.Yalçın Aral* Op.Dr.Erdal Samim*** Op.Dr.Sunay Duman***

Op.Dr.Yıldız Dallar*** Op.Dr.Ali Ulvi Öngören*

Prof.Dr.Ali Pekcan Demiröz (96096)
Başhekim

Dr. Uğur Kocer
Ulman

23/12/2009 10:04

10. ÖZGEÇMİŞ

Adı : Neslihan

Soyadı : Bostancı EKER

Doğum Yeri ve Tarihi : Ankara, 15.10.1984

Eğitimi :

Selçuk Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü - 2004

Halide Edip Süper Lisesi - 1999

120. Yıl İlköğretim Okulu – 1992

Yabancı Dili : İngilizce