



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



YÜKSEK LİSANS TEZİ

**FARELERDE DEKSTRAN SÜLFAT SODYUM İLE
OLUŞTURULAN KOLİT MODELİNDE GALEKTİN-1'İN
ROLÜ**

Güliz AYKOL
Biyoloji Anabilim Dalı
Zoojji Programı

Danışman
Yrd. Doç. Dr. Pelin ARDA-PİRİNÇÇİ

Şubat, 2014

İSTANBUL

Bu çalışma 20/03/2014 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoloji Anabilim Dalı Zooloji programında Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi:



Yrd. Doç. Dr. Pelin ARDA-PIRİNÇÇİ (Danışman)
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi



Prof. Dr. Şehnaz BOLKENT
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi



Prof. Dr. Refiye YANARDAĞ
İstanbul Üniversitesi
Mühendislik Fakültesi



Doç. Dr. N. Ömür BULAN
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi



Doç. Dr. Engin KAPTAN
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi

Bu alışma İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliđinin T-28091 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

ÖNSÖZ

Yüksek lisans eğitimim süresince bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan, her aşamada yol gösterici olan, yetişmemde emeği geçen, sabır ve anlayışını örnek aldığım değerli hocam *Yrd. Doç. Dr. Pelin ARDA PİRİNÇÇİ*'ye,

Tezimin yürütülmesi aşamasında, bilimsel desteğini esirgemeyen değerli hocam *Prof. Dr. Şehnaz BOLKENT*'e, biyokimyasal yöntemler ile ilgili çalışmalarına değerli fikirleri ile katkıda bulunan değerli hocam, *Prof. Dr. Refiye YANARDAĞ*'a, mikroskobik analizlerin yapılması sırasında laboratuvarında çalışma imkanı sağlayan değerli hocam *Doç. Dr. N. Ömür BULAN*'a, tez çalışmam sırasında yardımını gördüğüm sevgili hocam *Doç. Dr. Engin KAPTAN*'a,

Lisansa başladığım yıldan itibaren sevgisi, arkadaşlığı ve bilgi birikimiyle her zaman yanımda olan ve beni sürekli motive eden canım arkadaşım Biyolog *Eda OYAR YILMAZ*'a,

Bu tezin hazırlanması sırasında çeşitli aşamalarda yardımlarını gördüğüm ve her zaman desteğini hissettiğim laboratuvardaki değerli grup arkadaşlarım Biyolog *Cansu ÖZAL*, Uzman Biyolog *Sevinç NARİN*, Uzman Biyolog *Öznur YILMAZ*, Uzman Biyolog *Hale ÖVET*, Biyolog *Ecem GÖĞÜŞ* ve Uzman Biyolog *Özgecan KAYALAR*'a,

Destekleriyle her zaman yanımda olan sevgili arkadaşlarım, Uzman Biyolog *Ceylan TOPRAK*, *Elif YURTSEVER* ve *Aslı SERGİN*'e,

Her zaman olduğu gibi tezim süresince de bana destek olan ve hiçbir fedakarlıktan kaçınmayan sevgili *aileme*,

Eğitim hayatım boyunca desteklerini ve sevgilerini benden bir an olsun esirgemeyen, amaçlarım doğrultusunda beni yönlendiren canım annem *Mükerrem Leyla AYKOL* ve babam *Faik AYKOL*'a, teşekkür ederim...

Şubat, 2014

Güliz AYKOL

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖNSÖZ.....	i
İÇİNDEKİLER	ii
ŞEKİL LİSTESİ.....	v
TABLO LİSTESİ	ix
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ	x
ÖZET.....	xii
SUMMARY	xiv
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL KISIMLAR	4
2.1. LEKTİNLER	4
2.2. GALEKTİNLER.....	5
2.2.1. Galektin-1	6
2.2.1.1. Moleküler Yapısı	6
2.2.1.2. Subsellüler Dağılımı ve Taşınması.....	9
2.2.1.3. Galektin-1 Bağlayıcı Ligandlar	11
2.2.1.4. Hücre Sinyal Yolaklarındaki Rolü.....	12
2.2.1.5. İnflamasyon ve İmmunitedeki Rolü	14
2.3. ÜLSERATİF KOLİT	17
2.3.1. Epidemiyoloji.....	17
2.3.2. Etiyoloji ve Patogenez	18
2.4. DEKSTRAN SÜLFAT SODYUM İLE OLUŞTURULAN KOLİT MODELİ	20
2.5. SERBEST RADİKALLER VE REAKTİF OKSİJEN TÜREVLERİ	25
2.5.1. Serbest Radikallerin Kaynakları	27
2.6. OKSİDATİF STRES	28
2.6.1. Lipid Peroksidasyonu.....	30
2.7. ANTİOKSİDAN SAVUNMA SİSTEMLERİ	31
2.7.1. Glutatyon.....	32
2.7.2. Glutatyon Peroksidaz	34

2.7.3. Katalaz	35
2.7.4. Süperoksit Dismutaz	35
2.7.5. Miyeloperoksidaz.....	36
2.8. SİTOKİNLER.....	37
2.8.1. Tümör Nekroz Faktör- α	39
2.8.2. İnterlökin-10.....	40
3. MALZEME VE YÖNTEM	44
3.1. GALEKTİN-1 AKTİVİTE TESTİ	46
3.2. FARELERDEKİ % VÜCUT AĞIRLIK DEĞİŞİMİNİN TESPİTİ.....	48
3.3. FARELERİN KOLON UZUNLUKLARININ ÖLÇÜLMESİ.....	48
3.4. HASTALIK AKTİVİTE İNDEKSLERİNİN BELİRLENMESİ	49
3.5. HİSTOPATOLOJİK DEĞERLENDİRME	50
3.5.1. Kolin Mikroskopik Değerlendirilmesi.....	50
3.6. Kİ-67 İMMUNOHİSTOKİMYASI.....	51
3.7. BİYOKİMYASAL YÖNTEMLER.....	52
3.7.1. Total Protein Tayini	53
3.7.2. Lipid Peroksidasyon Tayini	55
3.7.3. Glutasyon Tayini	56
3.7.4. Glutasyon Peroksidaz Aktivite Tayini.....	58
3.7.5. Katalaz Aktivite Tayini	59
3.7.6. Süperoksit Dismutaz Aktivite Tayini.....	61
3.7.7. Miyeloperoksidaz Tayini	63
3.7.8. Tümör Nekroz Faktör- α Tayini.....	65
3.7.9. İnterlökin-10 Seviyelerinin Belirlenmesi.....	67
3.7.10. İstatistiksel Analizler.....	69
4. BULGULAR	70
4.1. FARELERDE AĞIRLIK DEĞİŞİMLERİNE AİT BULGULAR	70
4.2. FARELERDE KOLON UZUNLUĞUNUN ÖLÇÜMÜNE AİT BULGULAR ...	72
4.3. HASTALIK AKTİVİTE İNDEKSLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİNE AİT BULGULAR.....	74
4.4. HİSTOPATOLOJİK BULGULAR	76
4.4.1. Kontrol Grubuna Ait Bulgular	76
4.4.2. DSS Verilen Gruba Ait Bulgular	78
4.4.3. Galektin-1 Verilen Gruba Ait Bulgular	82
4.4.4. DSS+ galektin-1 Verilen Gruba Ait Bulgular.....	84

4.4.5. Histolojik Kolit Skorlamasına Ait Bulgular.....	86
4.5. Kİ-67 İMMUNOHİSTOKİMYASINA AİT BULGULAR.....	87
4.6. BİYOKİMYASAL BULGULAR.....	90
4.6.1. Lipid Peroksidasyon Seviyelerine Ait Bulgular.....	90
4.6.2. Glutasyon Seviyelerine Ait Bulgular.....	91
4.6.3. Glutasyon Peroksidaz Aktivitesine Ait Bulgular	92
4.6.4. Katalaz Aktivitesine Ait Bulgular.....	93
4.6.5. Süperoksit Dismutaz Aktivitesine Ait Bulgular.....	94
4.6.6. Miyeloperoksidaz Seviyelerine Ait Bulgular.....	95
4.6.7. Tümör Nekroz Faktör- α Seviyelerine Ait Bulgular	96
4.6.8. İnterlökin-10 Seviyelerine Ait Bulgular	97
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	99
KAYNAKLAR	112
ÖZGEÇMİŞ.....	130

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

- Şekil 2.1:** İnsan galektinlerinin farklı tipleri. İnsan galektinleri yapılarına göre 3 grupta sınıflandırılır: Proto-tip, Kimera-tip ,Tandem-repeat tip (Varki ve diğ., 2009).....5
- Şekil 2.2:** İnsan galektin-1 amino asit dizilimi. Yeşil amino asit sembolleri yüksek derecede korunmuş kalıntıları belirtir. Pembe ve turuncu amino asit sembolleri CRD'lerin anahtar kalıntılarındandır ve sırasıyla hidrojen bağları ve Van der Waals etkileşimleri ile karbohidratlara bağlanırlar (His44, Asn46, Arg48, Val59, Asn61, Trp68, Glu71 ve Arg73) (Cooper, 2002)..... 7
- Şekil 2.3:** Homodimerik insan galektin-1'in 3 boyutlu diyagramı. Her monomerin N ve C terminali dimerlerin arayüzünde konumlanmıştır. CRD'ler ise, monomerlerin uzak ucunda yer alır. Her bir CRD'de bir laktoz molekülü gösterilmiştir (Lopez-Lucendo ve diğ., 2004)..... 7
- Şekil 2.4:** Galektinlerin hücre yüzeyi ve ekstrasellüler glikokonjugatlar ile etkileşimi, hücre adhezyonu ve hücre sinyallerine neden olabilir. Galektinlerin hücre içi ligandlar ile etkileşimi hücre içi yolakların düzenlenmesine katkıda bulunur (Varki ve diğ., 2009)..... 9
- Şekil 2.5:** Galektinlerin hayvan hücrelerinde olası biyosentez mekanizması (Varki ve diğ., 2009)..... 10
- Şekil 2.6:** Galektin-1 ve hücre sinyalizasyonu (Campy ve diğ., 2006) 13
- Şekil 2.7:** DSS'nin moleküler yapısı (Ricketts, 1952)..... 21
- Şekil 2.8:** DSS ile oluşturulan kolite yatkınlığı, hastalığın başlangıcı ve şiddetini, ve hastalığa yanıtı etkileyebilecek çeşitli faktörlerin şematik gösterimi (Perse ve Cerar, 2012)..... 22
- Şekil 2.9:** Serbest oksijen radikallerinin potansiyel enzimatik kaynakları, hücredeki lokalizasyonları ve bazı önemli endojen anti-oksidanenzimler (Shihabi ve diğ., 2002) .. 31
- Şekil 2.10:** Glutatyon redoks sistemi (Arrick ve Nathan, 1984)..... 32
- Şekil 2.11:** İnflamatuvar bağırsak hastalıklarında IL-10 sinyal yolağı (Paul ve diğ., 2011) 42
- Şekil 2.12:** Galektin-1'in direkt (a) veya indirekt (b) mekanizmalar ile T hücrelerinde IL-10 sentezini uyarması (Cedeno-Laurent ve Dimitroff, 2012)..... 43
- Şekil 3.1:** Gruplara ait deneysel protokolü45
- Şekil 3.2:** Fizyolojik tuzlu su (% 0.9) ile negatif aglütinasyon. Orijinal büyütme x10047
- Şekil 3.3:** PBS ile negatif aglütinasyon. Orijinal büyütme x10047

Şekil 3.4: Galektin-1 pozitif aglütinasyon. Orijinal büyütme x100.....	48
Şekil 4.1: Gruplara göre farelerin % vücut ağırlık değişimleri	72
Şekil 4.2: DSS grubuna ait fare kolonu	73
Şekil 4.3: DSS+galektin-1 grubuna ait fare kolonu.....	73
Şekil 4.4 : Gruplara göre kolon uzunluğu ölçüm değerleri	73
Şekil 4.5: Gruplara göre günlük hastalık aktivite indeksleri	75
Şekil 4.6: Kontrol grubu rektum.....	75
Şekil 4.7: Kolit grubu rektum	75
Şekil 4.8: Galektin-1 grubu rektum	75
Şekil 4.9: DSS+gal-1 grubu rektum	75
Şekil 4.10 : Kontrol grubuna ait farenin distal kolon dokusunun genel histolojik görünümü. HE. Orijinal büyütme x100.....	76
Şekil 4.11: Kontrol grubuna ait farenin distal kolon dokusunun histolojik görünümü. Yüzey epitelinin bütünlüğü ve düzgün kriptler dikkat çekmektedir. HE. Orijinal büyütme x200	77
Şekil 4.12: Kontrol grubuna ait farenin distal kolonuna ait kesitlerdeki goblet hücrelerinde (►) gözlenen şiddetli ve yaygın PAS pozitif reaksiyon. PAS. Orijinal büyütme x200	77
Şekil 4.13: DSS verilen gruba ait farenin distal kolon dokusunun genel histolojik görünümü. Mukozada inflamatuvar hücre infiltrasyonu (→), submukozada ödem (►), fokal mukozal bozulma (►), mukoza ve submukozaya yayılan nekroz (★) , tamamen bozulmuş kript yapısı ve yaygın kript kaybı gözlenmektedir. HE. Orijinal büyütme x100	78
Şekil 4.14: DSS verilen gruba ait farenin distal kolon dokusunun genel histolojik görünümü. Mukozada yaygın inflamatuvar hücre infiltrasyonu (→), submukozada ödem (►), mukozal bozulma (►), mukoza ve submukozada nekrotik alan (★) ve yaygın kript kaybı görülmektedir. HE. Orijinal büyütme x100.....	79
Şekil 4.15: DSS verilen gruba ait farenin distal kolon dokusunun histolojik görünümü. Submukozal ödem (►), mukozal bütünlükte bozulma (►), bağırsak lümenine atılmış nekrotik hücreler (→), kript hücrelerinde vakuolar hidropik dejenerasyon (►) ve kript yapısında yaygın bozulmalar gözlenmektedir. HE. Orijinal büyütme x200	79
Şekil 4.16: DSS verilen gruba ait farenin distal kolon dokusunun histolojik görünümü. Submukozaya yayılan inflamatuvar hücre infiltrasyonu (→), kript hücrelerinde vakuolar hidropik dejenerasyon (►) ve kript kaybı (►) gözlenmektedir. HE. Orijinal büyütme x200.....	80

- Şekil 4.17:** DSS verilen gruba ait farenin distal kolon dokusunun histolojik görünümü. kript hücrelerinde vakuolar hidropik dejenerasyon (➤), bağırsak lümenine atılmış piknotik nukleuslu nekrotik hücreler (➔), mukozada nekrotik alan (★), tamamen bozulmuş kript yapısı ve yaygın kript kaybı (➞) görülmektedir. HE. Orijinal büyütme x20080
- Şekil 4.18:** DSS verilen gruba ait farenin distal kolonuna ait kesitlerdeki mukozada, yaygın kript hasarının görüldüğü ve goblet hücre kaybının olduğu bölgelerde negatif (★) ve diğer hasarlı bölgelerde oldukça zayıf (➤) PAS pozitif reaksiyon. PAS. Orijinal büyütme x20081
- Şekil 4.19:** DSS verilen gruba ait farenin distal kolonuna ait kesitlerdeki mukozada, yaygın kript hasarının görüldüğü ve goblet hücre kaybının olduğu bölgelerde negatif (★) ve daha az hasarlı bölgelerde az sayıda PAS pozitif reaksiyon (➤) veren goblet hücreleri. PAS. Orijinal büyütme x20081
- Şekil 4.20:** Galektin-1 verilen grubuna ait farenin distal kolon dokusunun genel histolojik görünümü. Genel histolojik görünüm kontrol bireylerinkinden mukozada gözlenen hafif derecede inflamatuvar hücre infiltrasyonu (➔) dışında farklı değildir. HE. Orijinal büyütme x100.....82
- Şekil 4.21:** Galektin-1 verilen gruba ait farenin distal kolon dokusunun histolojik görünümü. Yüzey epitelinin bütünlüğü ve düzgün kriptler gözlenmektedir. HE. Orijinal büyütme x200.....83
- Şekil 4.22:** Galektin-1 verilen gruba ait farenin distal kolonuna ait kesitlerdeki goblet hücrelerinde (➤) gözlenen PAS pozitif reaksiyon, kontrol bireylerdeki gibi yaygın ve şiddetlidir. PAS. Orijinal büyütme x200.....83
- Şekil 4.23:** DSS+galektin-1 verilen gruba ait farenin distal kolon dokusunun genel histolojik görünümü. Mukozada hafif yer yer inflamatuvar hücre infiltrasyonu (➔), submukozal alanda ödem (►), mukozal bütünlük ve kript yapısında yer yer bozulmalar (➞) dikkati çekmektedir. HE. Orijinal büyütme x100.....84
- Şekil 4.24:** DSS+galektin-1 verilen gruba ait farenin distal kolon dokusunun histolojik görünümü. Mukozal bütünlükte yer yer hafif bozulmalar (➤) haricinde kontrol bireylerdekine benzer düzgün kript yapısı (➞) ile histolojik hasarın belirgin olarak azaldığı ya da tamamen ortadan kalktığı görülmektedir. HE. Orijinal büyütme x20085
- Şekil 4.25:** DSS+galektin-1 verilen gruba ait farenin distal kolon dokusunda submukozada orta derecede ödem (►), yer yer hafif fokal mukozal bozulma (➤), bazı kript hücrelerinde vakuolar hidropik dejenerasyon (➤) ve birkaç bölgede kript bütünlüğünde hafif bozulma (➞) gözlenmektedir. HE. Orijinal büyütme x20085
- Şekil 4.26:** DSS+galektin-1 verilen gruba ait farenin distal kolonuna ait kesitlerdeki goblet hücrelerinde (➤) gözlenen PAS pozitif reaksiyon DSS grubundakilere göre belirgin bir artış göstermekte ve kontrol bireylerdekine yakın bir görünüm sergilemektedir. PAS. Orijinal büyütme x200.....86
- Şekil 4.27:** Gruplara göre histolojik kolit skoru87
- Şekil 4.28:** Kontrol grubuna ait farenin distal kolon mukozasında Ki-67 immünohistokimyası ile işaretlenen çoğalmakta olan kript hücreleri (➞). Orijinal büyütme x40088

Şekil 4.29: DSS verilen gruba ait farenin distal kolon mukozasında Ki-67 immünohistokimyası ile işaretlenen çoğalmakta olan hücrelerde (➔) sayıca azalma gözlenmektedir. Orijinal büyütme x400	88
Şekil 4.30: Galektin-1 verilen gruba ait farenin distal kolon mukozasında immünohistokimyasal olarak işaretlenen çoğalmakta olan kript hücrelerinde (➔) kontrol grubuna göre, sayıca artış görülmektedir. Orijinal büyütme x400	89
Şekil 4.31: DSS+galektin-1 verilen gruba ait farenin distal kolon mukozasında Ki-67 immünohistokimyası ile işaretlenen çoğalmakta olan hücrelerde (➔) DSS verilen kolit grubuna göre sayıca artış dikkati çekmektedir. Orijinal büyütme x400.	89
Şekil 4.32: Gruplara göre kolon mukozasında Ki-67 immünohistokimyası ile belirlenen hücre proliferasyon indeksi (%).....	90
Şekil 4.33: Gruplara göre kolon homojenatlarında ölçülen MDA seviyeleri	91
Şekil 4.34: Gruplara göre kolon homojenatlarında ölçülen GSH seviyeleri	92
Şekil 4.35: Gruplara göre kolon homojenatlarında ölçülen GSH-Px aktiviteleri	93
Şekil 4.36: Gruplara göre kolon homojenatlarında ölçülen CAT aktiviteleri	94
Şekil 4.37 : Gruplara göre kolon homojenatlarında ölçülen SOD aktiviteleri	95
Şekil 4.38: Gruplara göre kolon homojenatlarında ölçülen MPO seviyeleri.....	96
Şekil 4.39: Gruplara göre kolon homojenatlarında ölçülen TNF- α seviyeleri	97
Şekil 4.40: Gruplara göre kolon homojenatlarında ölçülen IL-10 seviyeleri	98

TABLO LİSTESİ

	Sayfa No
Tablo 3.1: Hastalık Aktivite İndeksi Skorlama Sistemi (Cooper ve diğ., 1993).....	49
Tablo 3.2: Histolojik Kolit Skorlama Sistemi (Dieleman ve diğ., 1998).....	51
Tablo 4.1: Gruplara göre deney süresince farelerin vücut ağırlıklarındaki % değişimler.....	71
Tablo 4.2: Gruplara göre kolit oluşturduktan sonraki günlerde hastalık aktivite indeksleri	74

SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

Kısaltmalar	Açıklama
CAT	: Katalaz
CRD	: Karbohidrat tanıma bölgesi
DETAE	: Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü
DSS	: Dekstran sülfat sodyum
DTNB	: 5-5'-dithio-bis(2-nitro)benzoik asit
ELISA	: Enzim bağlı immünosorbent testi
ERK	: Ekstrasellüler sinyal-düzenleyici kinaz
FTS	: Fizyolojik tuzlu su
Gal-1	: Galektin-1
GRx	: Glutasyon redüktaz
GSH	: İndirgenmiş glutasyon
GSH-Px	: Glutasyon peroksidaz
GSSG	: Yükseltgenmiş/okside glutasyon
GST	: Glutasyon-S-transferaz
HAİ	: Hastalık aktivite indeksi
HE	: Hematoksilen-Eozin
HO₂[·]	: Hidroperoksil radikali
HOCl⁻	: Hipoklorik asit
H₂O₂	: Hidrojen peroksit
IFN-γ	: İnterferon-γ
IL	: İnterlökin
LOO[·]	: Lipid peroksil radikali
LOOH	: Lipid hidroperoksit
MAPK	: Mitojen ile aktive edilen protein kinaz
MDA	: Malondialdehit
MEK	: Mitojen ekstrasellüler kinaz
MHC II	: Majör histokompatibilite kompleks II
MPO	: Miyeloperoksidaz
NADPH	: Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat
NBT	: Nitroblue tetrazolium
NF-κB	: Nuklear faktör-κB
O[·]	: Singlet oksijen
O₂^{-·}	: Süperoksit radikali
O₃	: Ozon
OH[·]	: Hidroksil radikali
ONOO^{-·}	: Peroksinitrit radikali
PAS	: Periyodik Asit Schiff
PBS	: Fosfat tamponu
PI3K	: Fosfotidilinositol-3 kinaz
PMN	: Polimorf nuklear lökosit
R[·]	: Karbon merkezli lipid radikali

Raf-1	: Proto-onkogen serin/threonin protein kinaz-1
RO[·]	: Alkoksil radikali
RO₂[·]	: Peroksil radikali
ROT	: Reaktif oksijen türleri
SOD	: Süperoksit dismutaz
STAT	: Sinyal iletilci transkripsiyon aktivatörü
TBA	: Tiyobarbiturik asit
Th	: Yardımcı T hücresi
TLR	: Toll-benzeri reseptör
TMB	: 3,3',5,5'-tetrametilbenzidin
TNBS	: Trinitrobenzen sülfonik asit
TNF-α	: Tümör nekroz faktör- α

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

FARELERDE DEKSTRAN SÜLFAT SODYUM İLE OLUŞTURULAN KOLİT MODELİNDE GALEKTİN-1'İN ROLÜ

Güliz AYKOL

İstanbul Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman : Yrd. Doç. Dr. Pelin ARDA-PIRİNÇÇİ

Ülseratif kolit, kolon mukoza ve submukozasında, periferik ve mukozal T hücre aktivasyonu, nötrofil ve makrofajlardan reaktif oksijen metabolitlerinin salınımı ve pro-inflamatuvar sitokinlerin üretiminde artışa bağlı olarak gelişen bir inflamatuvar bağırsak hastalığıdır. Galektin-1 (Gal-1) T hücre aracılı immün cevapları, hücre büyümesi, hücre çoğalması, hücre göçü ve yara iyileşmesi gibi çeşitli biyolojik olayları düzenleyen, β -galaktozid bağlayan protein ailesinin bir üyesidir.

Bu çalışmanın amacı, dekstran sülfat sodyum (DSS) ile farelerde oluşturulan deneysel akut kolit modelinde kolon morfolojisi, hücre proliferasyonu, oksidatif stres, anti-oksidan sistem, inflamatuvar ve anti-inflamatuvar araçlar üzerinde galektin-1'in rolünü ortaya çıkarabilmektir.

Bu çalışmada kullanılan toplam 32 adet ergin erkek C57BL/6 fareler dört gruba ayrıldı. I. grup PBS enjekte edilen ve steril musluk suyu verilen kontrol hayvanlardan, II. grup 5 gün boyunca oral olarak % 3 DSS verilerek akut kolit oluşturulan farelerden, III. grup 7 gün boyunca günde bir kez intraperitoneal yolla 1 mg/kg dozda rekombinant insan Gal-1 enjekte edilen hayvanlardan, IV. grup ise hem rekombinant insan Gal-1 enjeksiyonu yapılan hem de % 3 DSS verilen farelerden oluşturuldu. Deneyler sırasında farelerin vücut ağırlıklarındaki % değişim ve hastalık aktivite indeksleri (HAI) günlük olarak belirlendi. Gal-1'in DSS ile oluşturulan kolon hasarı üzerindeki etkileri makroskopik ve mikroskopik olarak incelenerek, kolit skorum sistemi ile belirlendi. Hücre

çoğalmasına etkileri Ki-67 immünohistokimyası ile gösterildi. Glutasyon (GSH), glutasyon peroksidaz (GSH-Px), katalaz (CAT) ve süperoksit dismutaz (SOD) gibi anti-oksidan sistem parametreleri ile oksidatif hasar göstergesi olan malondialdehit (MDA) düzeyi spektrofotometrik olarak tayin edildi. Kolon dokularında lökosit infiltrasyonunun göstergesi olan miyeloperoksidaz (MPO) seviyeleri ile tümör nekroz faktör- α (TNF- α) ve interlökin-10 (IL-10) düzeyleri ELISA yöntemi ile tespit edildi.

Farelere DSS uygulaması kolon dokusunda dejeneratif değişikliklere, HAİ, MDA, MPO ve TNF- α düzeylerinde artışa; vücut ağırlığında, kolon uzunluğunda, hücre çoğalma indeksinde, GSH-Px, CAT ve SOD aktivitelerinde, GSH ve IL-10 seviyelerinde azalmaya sebep olarak yaygın bir hasar ile sonuçlandı. Gal-1'in ön uygulaması, HAİ, MDA, MPO ve TNF- α düzeylerinde anlamlı bir azalmaya; vücut ağırlığında, kolon uzunluğunda, hücre çoğalma indeksinde, GSH-Px, CAT ve SOD aktivitelerinde, GSH ve IL-10 seviyelerinde ise artışa yol açarak kolit hasarını önledi. Sonuç olarak bu çalışma, farelerde DSS ile oluşturulan akut kolit hasarına karşı Gal-1'in hücre çoğalmasını uyarıcı, anti-oksidan, anti-inflamatuvar ve koruyucu etkilere sahip olduğunu göstermiştir. Bu çalışmadan elde edilen sonuçların, ülseratif kolit gibi inflamatuvar bağırsak hastalıklarının önlenmesinde ve tedavisinde Gal-1'in terapötik bir ajan olarak kullanılabilmesine katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

Şubat 2014, 145 Sayfa.

Anahtar kelimeler: Galektin-1, dekstran sülfat sodyum, ülseratif kolit, anti-oksidan sistem, fare.

SUMMARY

M.Sc. THESIS

ROLE OF GALECTIN-1 ON DEXTRAN SULPHATE SODIUM-INDUCED COLITIS MODEL IN MICE

Güliz AYKOL

İstanbul University

Graduate School of Science and Engineering

Department of Biology

Supervisor : Asst. Prof. Dr. Pelin ARDA-İRİNÇİ

Ulcerative colitis is an inflammatory bowel disease which is characterized by an effect on the mucosa and submucosal layer of the colon, peripheral and mucosal T-cell activation, the release of reactive oxygen metabolites from neutrophils and macrophages, and increase in the synthesis of pro-inflammatory cytokines. Galectin-1 (Gal-1) is a member of β -galactoside binding proteins which regulate T-cell mediated immune response and diverse biological processes such as cell growth, cell proliferation, cell migration, and wound healing.

The aim of this study was to reveal the role of Gal-1 on colon morphology, cell proliferation, oxidative stress, anti-oxidant system, inflammatory and anti-inflammatory mediators in the model of experimental acute colitis induced by dextran sulfate sodium (DSS) in mice.

A total of 32 adult male C57BL/6 mice used in this study were divided into four groups. I. group, control animals injected with PBS and given sterile tap water; II. group, mice administered orally 3 % DSS for 5 days to induce acute colitis; III. group, animals injected intraperitoneally with 1 mg/kg recombinant human Gal-1 once a day for 7 consecutive days; IV. group, mice both injected recombinant human Gal-1 and given 3 % DSS. During the experiment, change % in body weight of the mice and disease activity index (HAI) was determined in a daily manner. The effects of Gal-1 on DSS-induced colonic injury were determined using colitis scoring system by examining macroscopically and microscopically. Its role on cell proliferation was shown by Ki-67 immunohistochemistry. Parameters of anti-oxidant system such as glutathione (GSH),

glutathione peroxidase (GSH-Px), catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD), and malondialdehyde (MDA) level which is a marker of oxidative injury, were examined by spectrophotometry. Myeloperoxidase (MPO) levels as an indicator of leukocyte infiltration, tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin-10 (IL-10) levels in colon tissues determined by ELISA.

Administration of DSS resulted in a common injury in colon by causing degenerative changes, an increase in HAI, MDA, MPO and TNF- α levels; a decrease in bodily weight, colon length, cell proliferation index, GSH-Px, CAT and SOD activities, GSH and IL-10 levels. Gal-1 pretreatment prevented colonic injury by a significant reduction in HAI, MDA, MPO and TNF- α levels; an increase in body weight, colon length, cell proliferation, GSH-Px, CAT and SOD activities, GSH and IL-10 levels. As a result, this study showed that Gal-1 has proliferative, anti-oxidant, anti-inflammatory, and protective effects against DSS-induced acute colonic injury in mice. The results obtained from this study suggest that Gal-1 can be used as a therapeutic agent expected to contribute in preventing and treating of inflammatory bowel disease such as ulcerative colitis.

February 2014, 145 Pages.

Keywords: Galectin-1, dextran sulphate sodium, ulcerative colitis, anti-oxidant system, mouse.

1. GİRİŞ

Ülseratif kolit, etiyolojik olarak genetik yatkınlık ve bir takım enfeksiyöz ajanlardan kaynaklanan; rafine yiyeceklerin tüketimi, stres, alkol ve sigara kullanımı gibi çevresel bazı faktörlerle tetiklenebilen ve spesifik tedavisi bulunmayan bir inflamatuvar bağırsak hastalığıdır. Kolon mukoza ve submukozasını tutan, tekrarlayan inflamasyon ve ülserler ile karakterize bir hastalık olan ülseratif kolit, dünyada sıkça görülen hastalıklar arasında yer almaktadır (Lindberg ve diğ., 1988). Bu hastalığın patogenezi tam olarak bilinmemekle birlikte, periferal ve mukozal T hücre aktivasyonu, inflamatuvar hücre göçü, oksidatif stres ve çeşitli pro-inflamatuvar sitokinlerin üretimindeki artışın ülseratif kolitte potansiyel veya tetikleyici temel faktörler olduğu düşünülmektedir (Thompson-Chagoyan ve diğ., 2005, Yao ve diğ., 2010).

Ülseratif kolitin, dünyada ve ülkemizde yaygın olarak görülen ve ölüm ile sonuçlanabilen kolon kanseri riskini arttırması nedeniyle, erken teşhis ve tedavisi önem taşımaktadır. Günümüzde kolit tedavisinde kullanılan ilaçlar kolite sebep olan etkenleri ortadan kaldırmaya yönelik olmayıp, inflamasyonun geriletmesini sağlayan anti-inflamatuvar tipte ilaçlar ve immün sistemi baskılayıcı ajanlardır (Lewis ve diğ., 1999; Pohl ve diğ., 2000; Ozkan, 2003). Kolit etiyolojisi henüz tam olarak bilinmediğinden, halen mevcut tedavi yöntemleri hastalığın iyileşmesi ya da önlenmesinde tam etkili olamamaktadır. Bunun yanı sıra, mevcut tedavi yöntemleri enfeksiyon riski, hipertansiyon, diyabet, pankreatit, hepatit, böbrek hasarı, sinir hücrelerinde iletim bozukluğu gibi ciddi yan etkilere de sahiptir (Duvnjak ve diğ., 2013). Bu nedenle günümüzde, ülseratif kolit hastalığı için yeni ve etkin tedavi yöntemleri geliştirilmeye çalışılmaktadır. Dekstran sülfat sodyum (DSS), trinitrobenzen sülfonik asit (TNBS), indometazin, asetik asit, iodoasetamid ve oksazolun gibi bazı kimyasal ajanların kullanılması ile deneysel olarak oluşturulan *in vivo* hayvan modelleri inflamatuvar bağırsak hastalıklarının patogenez mekanizmalarının araştırılmasına yardımcı olmakla beraber, etkin tedavi yöntemlerinin geliştirilmesine de katkı sağlamaktadır (Gautam ve Goel, 2012).

Sentetik sülfatlanmış bir polisakkarit olan dekstran sülfat sodyumun oral olarak içme suyuna katılması ile fare ve sıçan gibi kemirgenlerde oluşturulan kolit; ağırlık kaybı, diyare, kanlı dışkı, mukoza ve submukozada erozyon ve ülserasyon, lamina proprea ve submukozaya inflamatuvar hücre infiltrasyonu, epitel tabakanın dejenerasyonu, kript apseleri ve kript kaybı gibi birçok klinik ve histopatolojik özelliği yansıması açısından insanlarda gözlenen ülseratif kolite oldukça benzerdir (Huang ve diğ., 2010, Whitem ve diğ., 2010). DSS, kolon dokusundaki epitel hücrelerinin proliferasyonunu inhibe edip, lamina propreadaki immün sistem hücrelerini aktif hale getirerek ve TNF- α gibi pro-inflamatuvar sitokinlerin salınımını artırarak, kolon epitelinin bariyer fonksiyonlarını bozar. Fagositik hücreler tarafından üretilen reaktif oksijen türleri (ROT) kolon dokusundaki yıkımı hızlandırıp, arttırabilir. ROT'lar tarafından oluşturulan bu mukozal hasar, bağırsak mukozasına fazla sayıda lökositin infiltrasyonuna neden olur, lökositlerin infiltrasyonu ise mukozada oksidatif hasarı artırır ve pro-inflamatuvar sitokinlerin salınımı ile birlikte, lökosit göçündeki artış bir kısır döngü halinde devam eder (Podolsky, 2002). İnflamatuvar bağırsak hastalıklarında ve DSS ile oluşturulan kolit modellerinde, oksidatif stres göstergelerindeki artış ile birlikte, anti-oksidan sistem parametrelerinin seviyelerinin azaldığı da saptanmıştır (Loftus ve Sanborn, 2002).

Galektin-1 (Gal-1), β -galaktozid bağlayan galektin protein ailesinden olan, homodimerik yapıda bir lektindir (Camby ve diğ., 2006). Yapılan araştırmalar sonucu, Gal-1'in hücre büyümesi, çoğalması ve farklılaşmasında, hücre adhezyonu ve hücre göçünde, T hücre apoptozunda ve immünmodülasyonda rol aldığı bilinmektedir. Ayrıca, yara iyileşmesi, anjiyogenez ve anti-inflamatuvar yanıt oluşumu gibi önemli biyolojik süreçlerde de regülatör görevlere sahiptir (He ve Baum, 2006). Literatürde, Gal-1'in eksojen olarak deney hayvanlarına uygulanmasının inflamasyon ile ilişkili hepatit, pankreatit, artrit ve peritonit gibi bazı hastalıkların *in vivo* modellerinde kronik ve akut inflamasyon gelişimini önlediğine dair bulgular mevcuttur (Rabinovich ve diğ., 1999; Santucci ve diğ., 2000; Gil ve diğ., 2010). Galektin-1, T hücre aracılı çeşitli immün hastalıkların deneysel modellerinde timustaki olgun olmayan timositlerin ve aktif T hücrelerinin apoptozunu uyararak hastalığı baskılayıcı etkiler göstermektedir (Rabinovich ve diğ., 1999; Santucci ve diğ., 2000). Bu modellerde eksojen olarak Gal-1 uygulaması, antijen ile uyarılan T hücrelerini ortadan kaldırarak ve sitokin dengesini Tip 2 yardımcı T hücresi (Th2) yönüne kaydırarak, inflamatuvar yanıtı inhibe

etmektedir. İlaveten, eksojen galektin-1'in uygulanan doza ve süreye bağlı olarak hücre proliferasyonu üzerinde bifazik etkilere sahip olduğu da rapor edilmiştir (Adams ve diğ., 1996). Bununla birlikte, Gal-1'in *in vivo* deneysel modellerde kullanımı oldukça sınırlıdır ve etki mekanizmaları henüz tam olarak aydınlatılamamıştır.

Bu bilgiler ışığında, galektin-1 biyolojik sistemlerde sahip olduğu anti-inflamatuvar ve immünmodülatör etkileri nedeniyle, ülseratif kolitin de dahil olduğu çeşitli inflamatuvar hastalıklar için yeni terapötik stratejilerin geliştirilmesinde potansiyel bir hedef olarak düşünülebilir. Yapılan literatür taramaları sonucunda, deney hayvanlarında DSS ile oluşturulan ülseratif kolitte Gal-1'in etkilerini inceleyen herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu nedenle, çalışmamızda farelerde DSS ile oluşturulan deneysel kolit modelinde eksojen olarak uygulanan Gal-1'in olası etkilerini tespit ederek, etki mekanizmaları hakkında fikir sahibi olabilmeyi hedefledik.

Çalışmamızın esas amacı, DSS ile C57BL/6 farelerde oluşturulan akut kolit modelinde farelerin vücut ağırlıkları, kolon uzunlukları, hastalık aktivite indeksi, kolon morfolojisi, hücre proliferasyonu, inflamatuvar ve anti-inflamatuvar araçlar, oksidatif stres ve anti-oksidan sistem üzerinde Gal-1'in rolünü ortaya çıkarmaktır. Yapılan literatür taramaları sonucunda, DSS ile oluşturulan ülseratif kolitte Gal-1'in etkilerini inceleyen herhangi bir çalışmanın mevcut olmaması, çalışmamızın özgünlüğünü ortaya koymaktadır. Ayrıca, Gal-1'in kolon dokusunda anti-oksidan sistem üzerindeki etkilerinin bilinmemesi bu tezin özgün olan diğer yönünü oluşturmaktadır. Tüm bu yönleriyle bu çalışmanın, DSS ile oluşturulan kolit hasarı üzerindeki etkileri ve fonksiyonları bilinmeyen Gal-1'in rolünün anlaşılmasına katkıda bulunmanın yanı sıra, bu proteinin ülseratif kolit gibi inflamatuvar bağırsak hastalıklarında tedavi edici amaçla kullanımına dair bir fikir verebileceği de düşünülmektedir.

2. GENEL KISIMLAR

2.1. LEKTİNLER

Hücre büyümesi, hücre bölünmesi ve hücre farklılaşması gibi çeşitli biyolojik olaylar için hücreler arasında ve hücreler ile eksojen makromoleküller arasında farklı tiplerdeki hücrel etkileşimler gereklidir. Bu biyolojik olaylarda tanınma sürecine aracılık eden molekül gruplarından biri hücre yüzeyi glikokonjugatlarıdır. Bunlar, çoğunlukla membranlarda bulunan ve büyüme faktörleri, enzimler ve hormonlar için reseptör görevi yapan, hücre büyümesi, farklılaşması ve bazı patolojik olaylarda rol oynayan antijenik determinantlar olarak tanımlanırlar (Paulson, 1989, Sharon ve Lis, 1989).

Lektinler, spesifik oligosakkarit yapıları tanıyan ve en önemlisi “lektin aktivitesi” olarak adlandırılan eritrosit ve lökositlerin aglütinasyonuna ve/veya lizisine neden olan karbohidrat bağlayıcı proteinlerdir (Barondes, 1988). Lektinler ilk olarak yaklaşık 50 yıl önce bitki ekstraktlarında, uygun sakkarit yapılarla bağlanarak hücreleri aglütine edebilme yeteneklerinden dolayı multivalent, non-enzimatik, non-immün karbohidrat bağlayıcı proteinler olarak tanımlanmıştır (Sharon ve Lis, 1972). Lektin benzeri proteinlerin omurgalı karaciğerinde varlığı 40 yıl önce Ashwell ve Morell (1974), tarafından gösterilmiştir. Diğer bir lektin, elektrikli yılan balığının elektrik organında keşfedilmiştir (Teichberg ve diğ., 1975). Günümüze kadar, keşfedilen farklı lektinler bitkilerden insanlara kadar farklı türler arasında geniş çapta dağılım gösteren bir protein ailesini oluşturmaktadır.

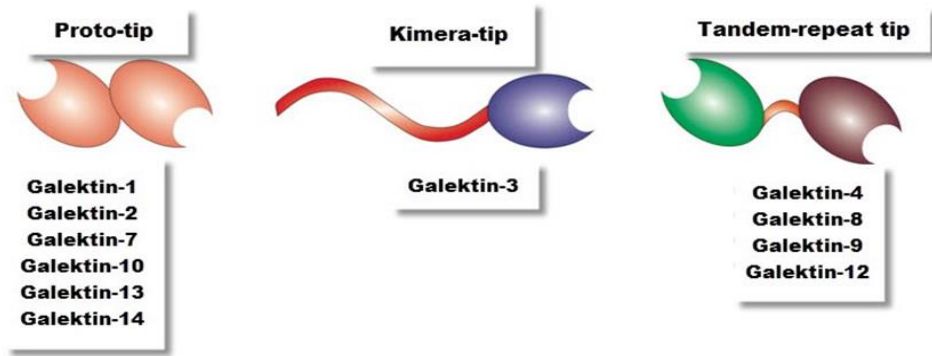
Hayvan lektinleri; sakkarit ligandlarının tipine, katıldıkları biyolojik olaylara, hücre içindeki lokalizasyonlarına, suda çözünürlük gibi fiziksel özelliklerine, metal kofaktörlere bağımlılıkları gibi özelliklerine göre sınıflandırılabilirler. Lektinlerin bütünsel yapısı değişiklik gösterebilirken, karbohidrat bağlama aktivitesi lektinin sadece belirli bir kısmı ile sınırlandırılmıştır. Bu segment, karbohidrat-tanım bölgesi (CRD) olarak tanımlanmıştır (Drickamer, 1988). Lektinler, CRD dizilerinin karşılaştırılması yapılarak 3 grup halinde sınıflandırılmıştır. Bunlar: P, C ve S tipi lektinlerdir. Pentraksinler olarak da adlandırılan P-tipi lektinler primer ligandları olan mannoz-6-

fosfata bağlanırlar. C-tipi lektinler, karbohidrat bağlamak için kalsiyuma gereksinim duyarken; galektinler olarak bilinen S-tipi lektinler, kalsiyumdan bağımsız olarak karbohidrat bağlarlar (Barondes ve diğ., 1994). S-tipi lektinlerin β -galaktozidleri bağlama yeteneği vardır. S-Lac lektinler olarak da isimlendirilirler. Deterjan kullanmaksızın hücre ve dokulardan izole edilebildiği için çözünebilir proteinlerdir.

2.2. GALEKTİNLER

β -galaktozidleri bağlama yeteneğine sahip olan galektinler endojen lektin ailelerinden biridir (Barondes ve diğ., 1994). Galektinler ve galektin benzeri proteinler tüm hayvanlarda bulunmaktadır ve evrimsel olarak oldukça iyi korunmuşlardır (Cooper ve Barondes, 1999). Tüm galektinlerin CRD'leri yaklaşık 130 amino asit uzunluğundadır ve benzer bir dizi homolojisi gösterirler. β -galaktoz içeren oligosakkaritlere bağlanma afiniteleri de birbirine benzerdir (Leffler ve diğ., 2004).

Günümüzde bilinen, 15 memeli galektini vardır. Bu lektinlerden 11 tanesinin (galektin -1, -2, -3, -4, -7, -8, -9, -10, -12, -13, -14) insanlarda bulunabildiği gösterilmiştir (Liu ve Rabinovich, 2005).



Şekil 2.1: İnsan galektinlerinin farklı tipleri. İnsan galektinleri yapılarına göre 3 grupta sınıflandırılır: Proto-tip, Kimera-tip, Tandem-repeat tip (Varki ve diğ., 2009).

Galektinler yapısal organizasyonlarına göre üç gruba ayrılırlar. Sadece bir adet CRD içeren galektinler proto-tip olarak isimlendirilir. Bu grupta yer alanlar, galektin -1, -2,

-5, -7, -10, -11, -13, -14 ve -15'tir. Farklı uzunluktaki bağlayıcı bir peptitle bağlanan iki adet CRD içeren galektinler tandem repeat-tip olarak isimlendirilir ve galektin -4, -6, -8, -9, -12 bu gruba dahildir. Bir adet CRD'si olan ve prolin ve glisince zengin lektin olmayan bir domaine sahip olan galektin kimera-tip'tir. Bu grubun tek temsilcisi ise galektin-3'tür (Şekil 2.1).

Galektinlerin endojen ligandları glikolipid ve glikoproteinler gibi glikokonjugatların sakkarit zincirleridir. Tüm galektinler pekçok N- veya O- bağlı glikanda bulunan yaygın bir disakkarit olan N-asetillaktozamine bağlanır (Gal β 1-3GlcNAc veya Gal β 1-4GlcNAc) (Hirabayashi ve diğ., 2002, Patnaik ve diğ., 2006). Bireysel laktozamin birimlerine bağlanma göreceli olarak daha düşük afinitededir. Polilaktozaminler ise bağlanma afinitesini yüz kat artırırlar (Cho ve Cummings, 1995).

Galektin ailesinin farklı üyelerinin dokularda dağılımı da farklıdır. Galektin-1, -3 ve -8 birçok dokuda eksprese edilir. Diğer galektinlerin lokalizasyonu ise daha sınırlıdır (Chiariotti ve diğ., 2004, Huflejt ve Leffler, 2004).

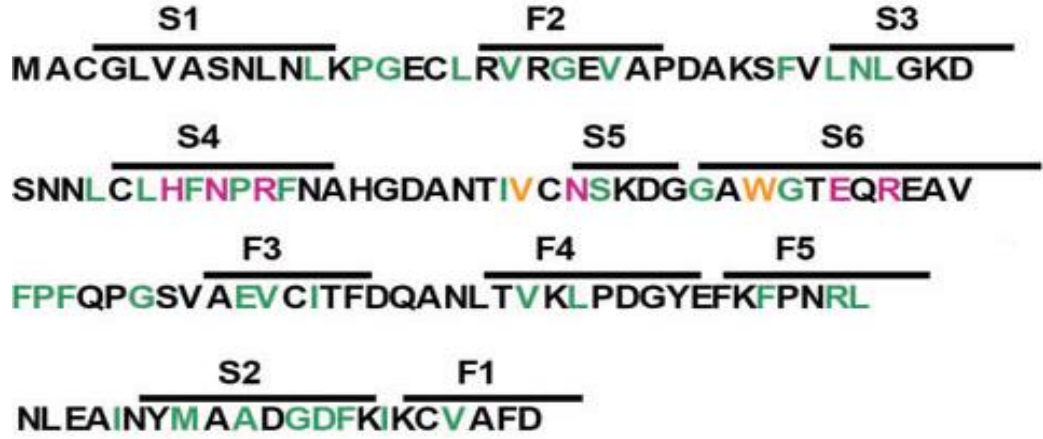
Galektinler, aktif makrofajlar, monositler, dendritik hücreler ve aktif T hücreleri gibi farklı immün hücreler tarafından eksprese edilir (Blaser ve diğ., 1998; Rabinovich ve diğ., 1998; Zuniga ve diğ., 2001; Rabinovich ve diğ., 2002).

Son 10 yılda galektinlerle ilgili literatürlerin sayısı belirgin olarak artmaktadır. Bu artan ilginin temel nedeni galektin ailesinin farklı üyelerinin farklı hücrel fonksiyonlarda rol oynaması ve birçok fizyolojik ve patolojik sürecin anahtar düzenleyicisi olmasıdır.

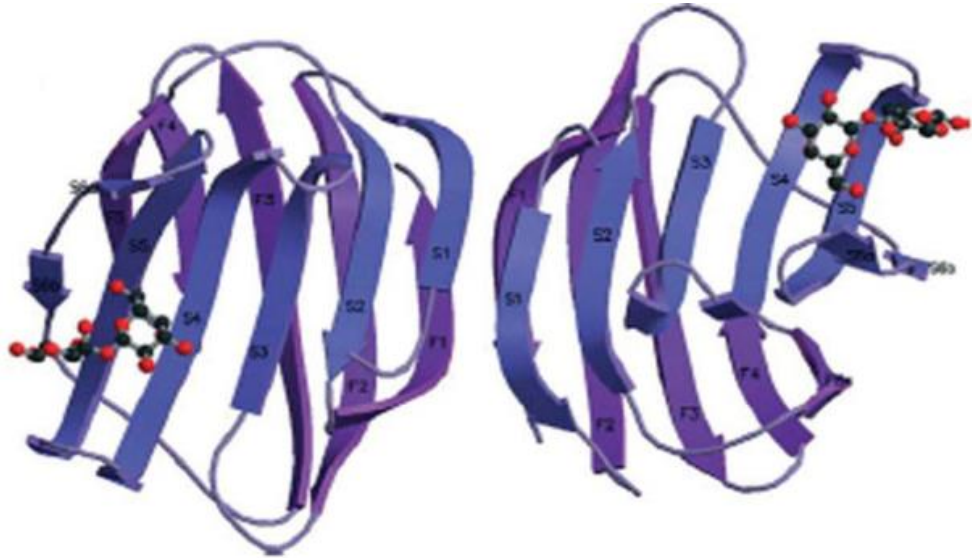
2.2.1. Galektin-1

2.2.1.1. Moleküler Yapısı

Galektin-1 14.5 kDa ağırlığında, β -galaktozid bağlayan protein ailesinin ilk keşfedilen üyesidir. *Electrophorus electricus*'un elektrik organından izole edildiği için başlangıçta "elektrolektin" olarak isimlendirilmiştir (Teichberg ve diğ., 1975). Gal-1 22q12 kromozomunda yer alan LSGALS1 geni tarafından kodlanan, 135 amino asitlik bir proteindir (GenPept: NP_002296, SwissProt: P09382) (Şekil 2.2). Gal-1, sırasıyla 5 (F1-F5) ve 6 (S1-S6a/b) ipliğin meydana getirdiği iki antiparalel β -pilili tabakadan oluşan bir β -sandviç yapısına sahiptir (Lopez-Lucendo ve diğ., 2004) (Şekil 2.3).



Şekil 2.2: İnsan galektin-1 amino asit dizilimi. Yeşil amino asit sembolleri yüksek derecede korunmuş kalıntıları belirtir. Pembe ve turuncu amino asit sembolleri CRD'lerin anahtar kalıntılarıdır ve sırasıyla hidrojen bağları ve Van der Waals etkileşimleri ile karbohidratlara bağlanırlar (His44, Asn46, Arg48, Val59, Asn61, Trp68, Glu71 ve Arg73) (Cooper, 2002).

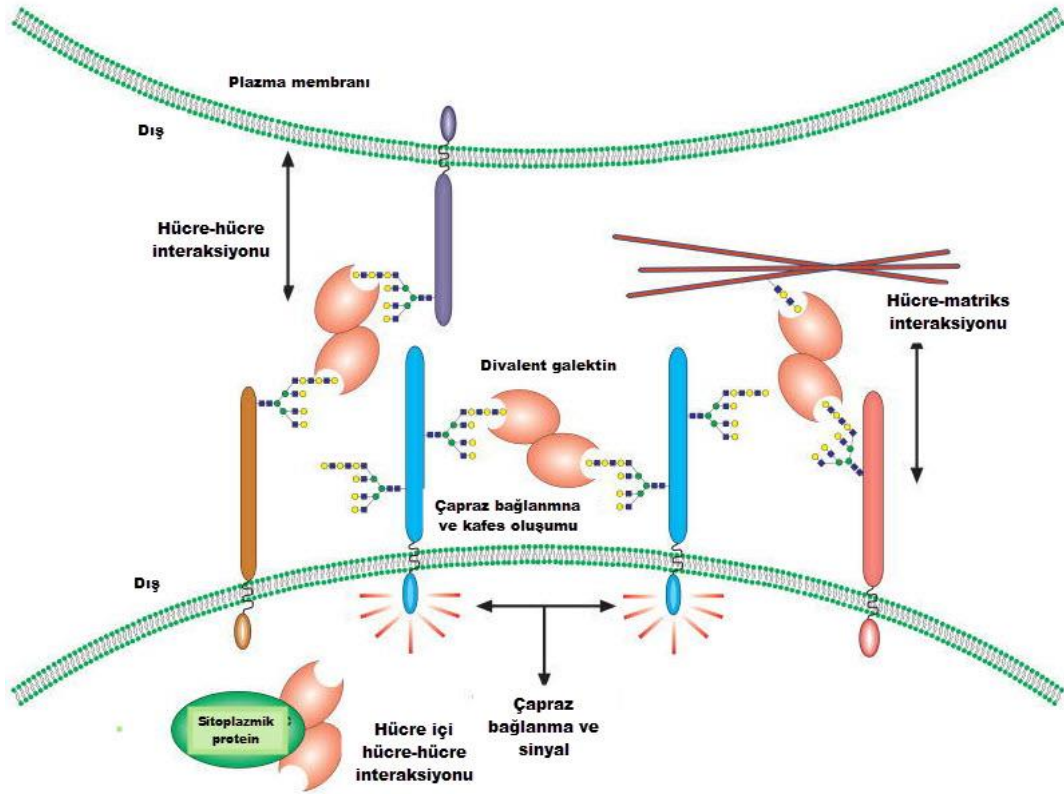


Şekil 2.3: Homodimerik insan galektin-1'in 3 boyutlu diyagramı. Her monomerin N ve C terminali dimerlerin arayüzünde konumlanmıştır. CRD'ler ise, monomerlerin uzak ucunda yer alır. Her bir CRD'de bir laktöz molekülü gösterilmiştir (Lopez-Lucendo ve diğ., 2004).

Bir adet CRD bulunması ile karakterize proto-tip galektinler grubuna dahil olan Gal-1 monomer veya dimer (her alt birim bir CRD'ye sahiptir) halinde bulunabilir (Barondes ve diğ., 1994, Cho ve Cummings, 1995). Dimerleri oluşturan Gal-1 alt birimleri birbirlerine kovalent olarak bağlı değildir ve monomerler dimerik form ile dinamik bir denge halindedir. Monomerlerin birbirlerine olan afinitelerinin güçlü olmaması nedeniyle, düşük konsantrasyonlarda denge, proteinin monomerik formuna doğru kayar. Bu problemin üstesinden gelebilmek için Gal-1'in kristal yapısı üzerinde kovalent olarak bağlı olan dimer formu oluşturulmuştur. Stabil olan dimerik form, normal Gal-1'den 10 kat daha düşük konsantrasyonlarda bile fare timosit ve olgun T hücrelerinin apoptozunu uyarır (Böttig ve diğ., 2004). Proteinin stabilitesini artırmak ve monomer-dimer denge problemlerini önlemek için yapılan bir çalışmada, Cedeno-Laurent ve diğ. (2010), fare Gal-1 proteinini insan immünoglobulin G1'in Fc bölgesiyle birleştirerek kimerik bir füzyon protein elde etmişlerdir. Bu kimerik protein ile aktif T hücrelerinin ko-kültürü yapılmış ve süpernatantlarda interlökin (IL)-4, IL-10, IL-13 gibi anti-inflamatuvar sitokin seviyelerinde artış bulunmuştur.

Galektin-1'in monomerik ve dimerik formları farklı biyolojik aktivitelere sahiptir. İnsan Gal-1 genellikle non-kovalent homodimer halinde bulunur. Bu dimerin hücre içine girişi, monomerleri arasındaki etkileşimler ve dimerin esas stabilitesini sağlayan korunmuş hidrofobik öz bölgesiyle olur (Lopez-Lucendo ve diğ., 2004). Düşük konsantrasyonlarda spontan olarak monomerik forma dönüşen Gal-1, karbohidrat bağlama özelliğini koruyarak, ligandlarına daha düşük bir afiniteyle de olsa bağlanabilir (Cho ve Cummings, 1995). Bununla birlikte, Gal-1'in monovalent, divalent veya multivalent ligandlara yüksek afiniteye bağlanması için dimerik form gerekli değildir, tek bir monomerik CRD ile yapılan etkileşimler de yeterli düzeyde bağlanmayı sağlar (Salomonsson ve diğ., 2010). Fakat, monomerik form hücrelere bağlanmasına rağmen, hücre içi sinyalleri aktifleştiremez. Bu nedenle oligomerlerin oluşumu biyolojik aktivite için gereklidir (Dias-Baruffi ve diğ., 2003). Hem monomerik hem de dimerik formdaki Gal-1'in, multivalent ligandlarına bağlanması ile kafes yapısı oluşur. Bu yapı hem plazma membranının organizasyonunu sağlar hem de reseptörlerin endositozunu engelleyerek uyarılara karşı hücrenin yanıtını düzenler (Rabinovich ve diğ., 2007). Bu

nedenle birçok büyüme faktörü (epidermal büyüme faktörü, fibroblast büyüme faktörü ve insülin benzeri büyüme faktörü) reseptörü, N-glikanlarca zengindir ve galektinlerin bağlanması için hedeftirler (Lau ve diğ., 2007) (Şekil 2.4). Gal-1 hücrede okside formda da bulunabilir fakat bu durumda lektin aktivitesine sahip değildir (Outenreath ve Jones, 1992).



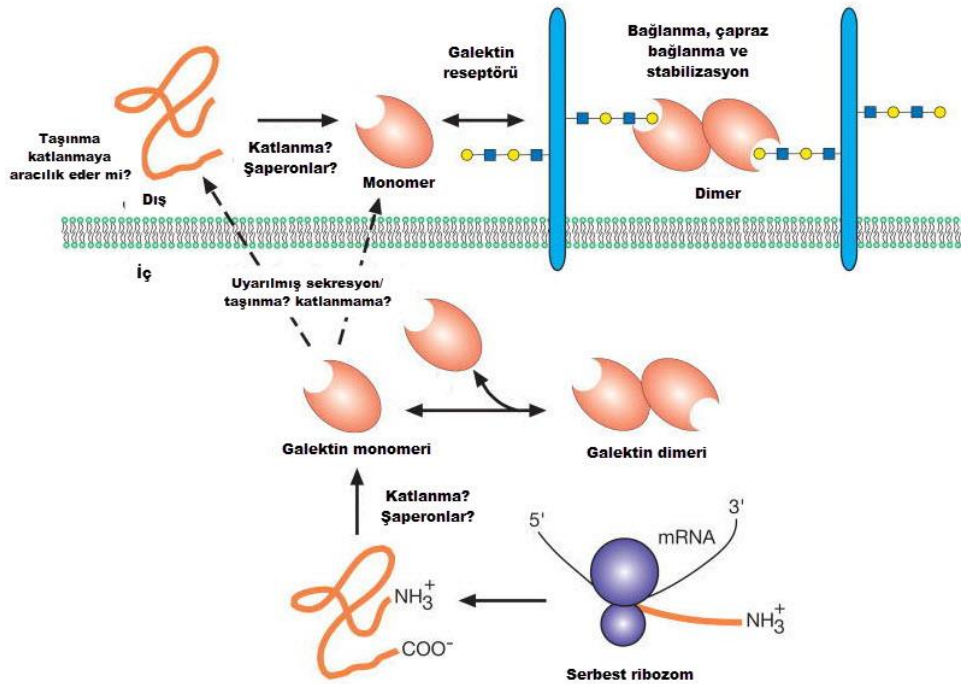
Şekil 2.4: Galektinlerin hücre yüzeyi ve ekstrasellüler glikokonjugatlar ile etkileşimi, hücre adhezyonu ve hücre sinyallerine neden olabilir. Galektinlerin hücre içi ligandlar ile etkileşimi hücre içi yolların düzenlenmesine katkıda bulunur (Varki ve diğ., 2009).

2.2.1.2. Subsellüler Dağılımı ve Taşınması

Çeşitli normal ve patolojik dokularda eksprese edilen Gal-1, hem hücre içinde hem de hücre dışında bulunabilir ve bu alanlarda farklı biyolojik fonksiyonlara sahiptir.

Dimerik Gal-1'in hücre dışı aktivitesi karbohidrat bağlamasını gerektirirken (lektin aktivitesine bağımlı); hücre içi aktivitesi diğer proteinler ile karbohidrat bağlama özelliğinden bağımsız etkileşimleri gerektirir (lektin aktivitesinden bağımsız). Gal-1 en fazla hücrenin sitoplazmasında eksprese edilir. Bunun dışında nükleusta, hücre yüzeyinde ve ekstrasellüler matrikste de bulunmaktadır (Camby ve diğ., 2006).

Galektin-1 sitoplazmada serbest ribozomlarda sentezlenir. Yeni sentezlenmiş protein stabil değildir ve karbohidrat ligandlarına bağlanarak stabil hale gelebilir veya hücredeki diğer proteinler ile etkileşime girebilir. Stabil monomerik Gal-1 hücre içinde homodimerleri oluşturabilir. Aynı zamanda Gal-1, hücrelerden sekresyona uğrayarak hücre dışı alanlara da taşınabilir. Fakat, galektinlerde klasik endoplazmik retikulum – golgi aygıtı sekresyon yolağı için gerekli olan sinyal peptit dizileri bulunmaz (Hughes, 1999). Bu nedenle Gal-1'in sekresyon ve taşınma mekanizması açık değildir. Gal-1'in muhtemel taşınma mekanizması, henüz tanımlanmamış membran proteinleri ve sitozolik faktörlerin aracılığıyla, memeli hücrelerinin plazma membranları boyunca proteinin direkt olarak translokasyonunun gerçekleştiği yönündedir (Seelenmeyer ve diğ., 2003).



Şekil 2.5: Galektinlerin hayvan hücrelerinde olası biyosentez mekanizması (Varki ve diğ., 2009).

Galektin-1, CRD bölgesi ile β -galaktozid içeren glikolipidler gibi hücre yüzeyindeki moleküllere bağlanır. Bağlanmış olan Gal-1, glikolipidlerin plazma membranının iç ve dış yaprağı arasında transloke olmasına neden olur. Sadece doğru katlanmış olan Gal-1

hücre yüzeyindeki bu reseptör moleküller tarafından tanınabildiği için Gal-1 için dolaylı olarak bir kontrol mekanizması da sağlanmış olur (Nickel, 2005). Proteinin hücre dışına sekresyon mekanizmasında doğru olarak katlanmış monomerik yapının gerekliliği ya da proteinin zardan taşınmasının katlanmaya aracılık edip etmediği hala bilinmemektedir. Hücre dışına salınan Gal-1, burada hücre yüzeyi reseptörlerine çapraz bağlanır. Böylece proliferasyon, farklılaşma, apoptoz ve sitokin sekresyonu gibi çok sayıda hücreyel olayın düzenlenmesi için sinyal yollarını aktifleştirir (Liu ve Rabinovich, 2005). Gal-1 hücre yüzeyindeki ligandlara bağlanmanın yanı sıra, ekstrasellüler matriksteki ligandlarla veya diğer hücrelerdeki ligandlarla da doğrudan etkileşime girebilir (Şekil 2.5).

2.2.1.3. Galektin-1 Bağlayıcı Ligandlar

Galektin-1, β -galaktozidlere bağlanan bir lektin olmasının yanı sıra, hücre içinde protein-protein etkileşimlerine de girer.

Karbohidratlarla etkileşimi: Gal-1, karbohidratlara CRD bölgesi aracılığıyla hidrojen bağları ve Van der Waals etkileşimleri ile bağlanır. Dimerik Gal-1 tercihen N-asetillaktozamin içeren glikokonjugatlara bağlanmasına rağmen, serbest laktozamin birimlerine de nispeten daha düşük bir afiniteyle bağlanabilir (Schwarz ve diğ., 1998, Ahmed ve diğ., 2004). Polisakkaritlerde ise terminal N-asetillaktozamin içermeyen glikanlara bağlanmaz (Stowell ve diğ., 2004). Terminal galaktoz kalıntıları dimerik Gal-1'in tanınması için oldukça önemli olmasına rağmen, α 3-siyalillenmiş ve α 2-fruktozillenmiş terminal N-asetillaktozaminlere de bağlanabilir (Leppanen ve diğ., 2005).

Ekstrasellüler matriksteki ligandlar: Gal-1 doza ve lektin aktivitesine bağlı olarak birçok ekstrasellüler matriks bileşenine bağlanabilir. Bağlanma afinitesi yüksek olandan düşük olana doğru ekstrasellüler matriksteki ligandları şu şekilde sıralanabilir: Laminin, hücreyel fibronektin, trombospondin, plazma fibronektin, vitronektin, osteopontin. Laminin ve hücreyel fibronektin iki veya dört dallı poli-N-asetillaktozaminlere sahip olduğu için Gal-1'in bu glikoproteinlere afinitesi diğerlerine oranla daha fazladır (Moiseeva ve diğ., 2003).

Hücre yüzeyindeki ligandlar: Gal-1, T hücrelerinin yüzeyinde bulunan CD2, CD3, CD4, CD7, CD43 ve CD45 gibi glikoprotein tabiatlı hücre yüzeyi reseptörlerine lektin aktivitesine bağımlı olarak bağlanır. Bu glikoproteinlerin glikozilasyonu Gal-1'in T hücrelerine verdiği yanıtta kritik bir öneme sahiptir (Pace ve diğ., 1999; Walzel ve diğ., 1999; Symons ve diğ., 2000).

İntegrinler de Gal-1'in bağlanması için önemli hücre yüzeyi reseptörlerindedir. İntegrin adhezyon reseptörlerinin aktivitesi, hücre fonksiyonlarının devamı ve hücrenin yaşaması için önemlidir. Dimerik Gal-1'in $\beta 1$ integrinlere direkt olarak bağlanması kısmen aktifleşmiş olan integrinlerin miktarını artırır ve hücrenin laminine adhezyonunu düzenleyerek hücre iskeletinin yeniden organizasyonunu sağlar (Moiseeva ve diğ., 2003). İnsan nöroblastoma hücrelerinin yüzeyinde bulunan GM1 gangliyozitlerin karbohidrat kısımları da Gal-1 için önemli bir reseptördür ve Gal-1 tarafından büyümenin düzenlenmesinde rol oynar.

Proteinlerle etkileşimi: Proteinler Gal-1 ile yapısal olarak ilişkili olmamasına ve ortak bir domain paylaşmamalarına rağmen lektin aktivitesinden bağımsız bir şekilde Gal-1 ile etkileşime girerler. Örneğin, Gal-1 lektin aktivitesinden bağımsız bir şekilde H-Ras-GTP'ye bağlanarak H-Ras'ın membrana bağlanmasını güçlendirir (Paz ve diğ., 2001).

2.2.1.4. Hücre Sinyal Yolaklarındaki Rolü

Hücre büyümesinin düzenlenmesi

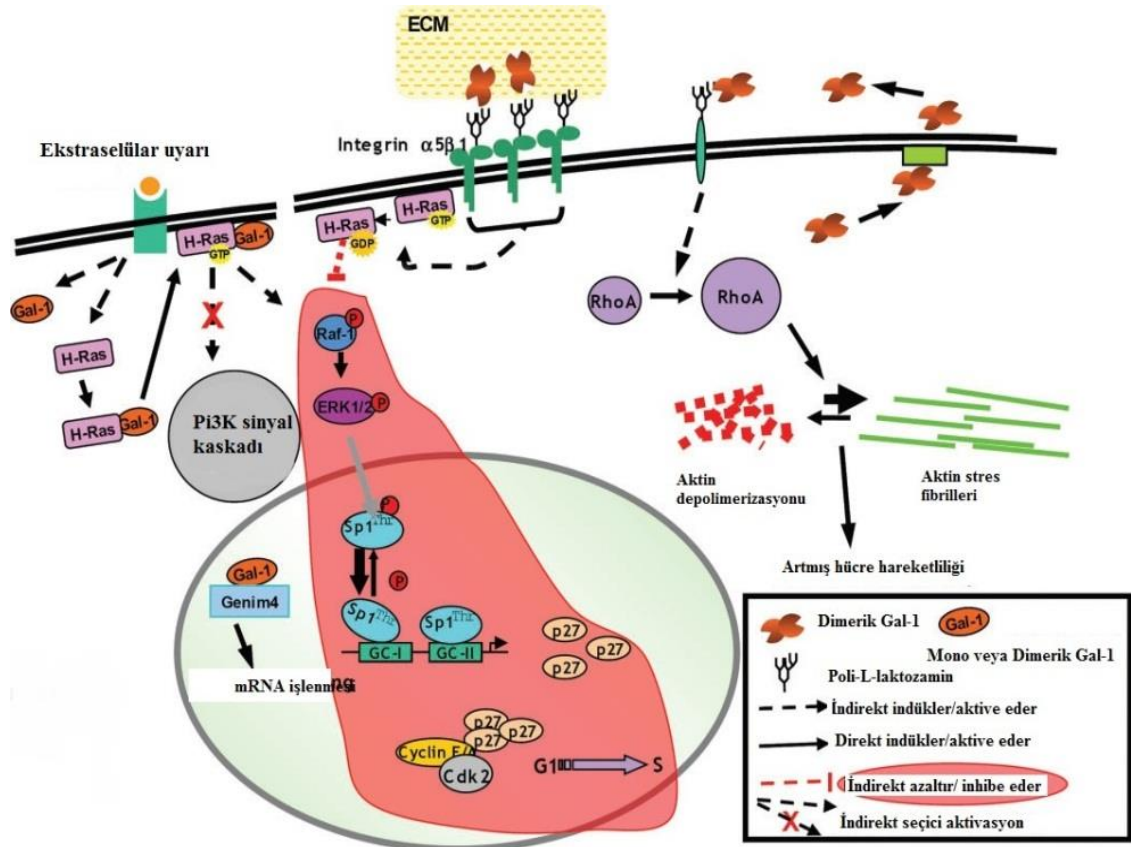
Galektin-1 doza bağılı olarak hücre büyümesi üzerinde bifazik bir etkiye neden olur. Yüksek dozda (1 μ M) uygulanan Gal-1 nöroblastoma ve stromal kemik iliği hücrelerinde lektin aktivitesinden bağımsız olarak hücre proliferasyonunu inhibe ederken, düşük dozda (1 nM) uygulandığında lenf düğümü hücreleri, memeli vasküler hücreleri ve karaciğer satellit hücrelerinde mitojenik etkiye sahiptir ve laktoz ile inhibisyona duyarlıdır (Adams ve diğ., 1996, Vas ve diğ., 2005).

Eksojen dimerik Gal-1, hücre yüzeyindeki $\alpha 5\beta 1$ integrinlere bağlanarak hücre büyümesini inhibe eder (Şekil 2.6). Bu anti-proliferatif etki Ras-mitojen ekstrasellüler kinaz (MEK) - ekstrasellüler sinyal-düzenleyici kinaz (ERK) yolağının inhibisyonu ve p27'nin transkripsiyonunun uyarılmasıyla gerçekleşir. Aynı zamanda Gal-1, p21 transkripsiyonunu da uyarır. Gal-1 aracılığıyla p27 ve p21'in birikmesi siklin bağımlı

kinaz-2 aktivitesini engeller ve hücre G1 fazından S fazına geçemediğinden hücre bölünmesi durur (Fischer ve diğ., 2005).

Zıt olarak, monomerik Gal-1 ise, sitozolden hücre membranına taşınarak H-Ras-GTP ile birleşir, karbohidrat bağlama aktivitesinden bağımsız olarak proto-onkogen serin/threonin-protein kinaz-1 (Raf-1)'e bağlanarak ERK sinyal yolağını aktifleştirir ve hücre büyümesini uyarır (Şekil 2.6). Ras genleri insan tümör hücrelerinde çoğunlukla mutasyona uğramıştır ve malignant transformasyona neden olur. Ras'ın transformasyona neden olabilmesi için membrana sıkı olarak bağlanması gerekir. Gal-1'in aşırı ekspresyonu Ras, Ras-GTP'nin membrana stabilizasyonunu artırarak ERK yolağını aktifleştirir ve hücre proliferasyonunu artırır (Elad-Sfadia ve diğ., 2002).

Galektin-1'in hücre büyümesi üzerindeki bu paradoksal etkisi, hücre tipine, hücrenin aktivasyon durumuna, proteinin monomerik ve dimerik formunun dağılımına veya hücre içi ve hücre dışı formlarına göre değişebilir.



Şekil 2.6: Galektin-1 ve hücre sinyalizasyonu (Camby ve diğ., 2006).

Hücre göçünün düzenlenmesi

Hücre göçü; adhezyon, hareketlilik ve invazyon proseslerinin bir sonucudur ve Gal-1 bu üç prosesin de düzenlenmesinde rol oynar. Gal-1 çeşitli normal ve kanser hücrelerinin yüzeyindeki integrinlerin, laminin ve fibronektin gibi ekstrasellüler matriks bileşenlerinin karbohidrat kısımları ile çapraz bağlanarak hücre adhezyonunu artırır (Van den Brule ve diğ., 2003). Ayrıca homotipik ve heterotipik hücre etkileşimlerine de aracılık eder. Aktin polimerizasyonunu ve depolimerizasyonunu düzenleyen bir protein olan RhoA, aktin hücre iskeletinin polimerizasyonunu değiştirerek hücre hareketliliğini sağlar. Gal-1 ise RhoA ekspresyonunu uyararak hücrenin hareketliliğini artırır (Camby ve diğ., 2002) (Şekil 2.6). Glioma hücrelerinde Gal-1 ekspresyonunun baskılanması hücrelerin hareketliliğinin ve adhezyon özelliğinin azalmasıyla sonuçlanmıştır (Camby ve diğ., 2005). Ayrıca Hittelet ve diğ. (2003), Gal-1'in karsinoma hücrelerinin hareketliliğini azalttığını göstermişlerdir.

2.2.1.5. İnflamasyon ve İmmunitedeki Rolü

Galektin-1, inflamatuvar cevabın başlaması, çoğalması ve sonlandırılmasının kontrolü açısından önemli bir moleküldür. Gal-1'in immün ve inflamatuvar hücreler üzerindeki etkileri bu hücrelerin yüzeyindeki glikoproteinlere çapraz bağlanmasının sonucudur.

Lökositlerin toplanması ve göçü ile ilgili olarak Gal-1, periferik kandan ve ekstrasellüler matriksten çeşitli inflamatuvar hücrelerin göç etmesini engeller. Vasküler endotel hücreler, tümör nekroz faktör- α (TNF- α) gibi inflamatuvar bir uyarıya cevaben Gal-1 eksprese eder (Baum ve diğ., 1995). Lökositlerin toplanmasında Gal-1'in inhibitör etkisi hem fosfolipaz A2 ile oluşturulan hem de karregean ile oluşturulan pençe ödemi (Iqbal ve diğ., 2011) ve akut peritonit (La ve diğ., 2003) gibi çeşitli *in vivo* inflamasyon modellerinde gösterilmiştir. Fosfolipaz A2 ile oluşturulan pençe ödeminde, Gal-1 ön uygulaması, polimorf nuklear lökosit (PMN) infiltrasyonunu, mast hücre degranülasyonunu ve doku hasarını azaltarak inflamasyona bağlı ödemi iyileştirmiştir. Çalışmanın lipopolisakkaritle aktive edilen makrofajlarla yapılan *in vitro* kısmında ise, Gal-1 doza bağımlı ve karbohidrat bağlama özelliğinden bağımsız olarak, araşidonik asit ve prostaglandin E2 salınımını engelleyerek inflamasyonu azaltmıştır (Rabinovich ve diğ., 2000). Yapılan *in vitro* çalışmalar aktif endotel hücrelere uygulanan insan rekombinant Gal-1'in lökosit kümelenmesini önemli ölçüde azalttığını göstermiştir.

Gal-1'in lökosit toplanmasını inhibe ederek, immünsupresif ve anti-inflamatuvar bir aracı olarak rol oynadığı yönünde kuvvetli deliller bulunmaktadır.

Makrofajlar inflamasyonun erken basamaklarında patojenlerin uzaklaştırılması ve doku homeostazının sağlanmasında önemli rol oynayan hücrelerdir. Gal-1 doğal immün sistem hücrelerinden makrofajları da aktiveleştirir. Makrofajların aktivasyonunda lokal sitokinler etkilidir ve aktivasyonları iki bağımsız mekanizma ile sağlanır. İnterferon- γ (IFN- γ) ile uyarılan klasik aktivasyon yolağında, denge Tip 1 yardımcı T hücresi (Th1) cevabına doğru kayarken; IL-4 ve IL-13 ile uyarılan alternatif aktivasyon yolağında Th2 cevabı uyarılır. Gal-1 nitrik oksit sentezini inhibe ederek, arjinaz aktivitesini artırarak ve prostoglandin E₂ üretimini artırarak makrofajların alternatif yol ile aktivasyonunu uyarır (Barrionuevo ve diğ., 2007). Ayrıca Gal-1 makrofajların T hücrelerine antijen sunmasını sağlayan majör histokompatibilite kompleks (MHC) II moleküllerinin ekspresyonunu inhibe eder (Barrionuevo ve diğ., 2007). Zimosan ile oluşturulan bir akut inflamasyon modeli olan peritonitte, Gal-1 24. saatte mononuklear fagositlerin göçünü artırmıştır. Esasen Gal-1, inflamasyonun erken aşamalarında mononuklear fagositlerin göçünü artırarak inflamasyonu inhibe etmiştir (Gil ve diğ., 2010).

Galektin-1, nötrofillerin makrofajlar tarafından fagositozunu kolaylaştırarak nötrofil döngüsünün düzenlenmesinde kritik bir rol oynar. Bu süreçte, Gal-1 aktif nötrofillerin yüzeylerinin fosfotidilserine maruz kalmasını uyararak; fagositozla ortadan kaldırmaya hazırlamaktadır, ancak bu durum aktif nötrofillerin apoptozuyla sonuçlanmamaktadır (Dias-Baruffi ve diğ., 2003). Yine Gil ve diğ. (2010), yaptıkları bir çalışmada oluşturdukları akut inflamasyon modelinde, eksojen Gal-1'in 4. saatte β 2 adhezyon molekülünün seviyesinin azaltarak PMN'lerin göçünün engellediği ve peritoneal hücrelerden TNF- α , IL-1 β pro-inflamatuvar sitokinlerinin salınımını inhibe ettiği gösterilmiştir. İnterferonun başlangıç fazında Gal-1, PMN'lerin göçünü düzenleyerek inflamasyonu inhibe etmiştir. Benzer şekilde Gal-1, nötrofil kemotaksisini ve transendotelial göçü inhibe eder (La ve diğ., 2003). Gal-1 nikotinamid adenin dinükleotit fosfat (NADPH) oksidaz aktivasyonunu uyarıp, süperoksit (O₂⁻) radikali üretimini artırarak, inflamasyonlu dokuya göç eden nötrofiller üzerinde pro-inflamatuvar bir etki göstermektedir (Almkvist ve diğ., 2002).

Galektin-1'in T hücreleri üzerinde de önemli görevleri vardır. Yapılan *in vitro* çalışmalarda, Gal-1'in fare ve insan T hücrelerinin timusta olgunlaşması ve periferdeki aktivasyonları boyunca gelişimini düzenlediği veya bu hücrelerin apoptotik sürece girmesini sağladığı gösterilmiştir (Perillo ve diğ., 1995; Perillo ve diğ., 1997). Gal-1 aktif haldeki T hücrelerinin (dinlenme halindeki T hücreleri hariç) apoptozunu uyararak immün cevabı sonlandırabilir (Perillo ve diğ., 1997). Gal-1 aynı zamanda birçok farklı T hücre tipinin proliferasyonunu inhibe etmektedir (Rabinovich ve diğ., 1997; Blaser, 1998; Novelli ve diğ., 1999). T hücrelerine spesifik glikoproteinler olan CD45, CD43, CD7; insan MOLT4 ve Jurkat T hücrelerinde Gal-1'in bağlandığı spesifik reseptörlerdir. Gal-1'in bu reseptörlere bağlanması hücrede ölüm reseptörleri aracılığı ile, mitokondriyal yolak gibi sinyal akış yollarını başlatarak, Gal-1 aracılı T hücre apoptozuna neden olur (Symons ve diğ., 2000). Örneğin, kutanöz T hücre lenfomalarındaki malignant T hücreleri CD7 ekspres etmediği için Gal-1 gibi T hücre apoptozunu uyaran ajanlara karşı dirençlidir. Gal-1, bazı özel transkripsiyon faktörlerinin ekspresyonlarını uyararak, mitojen ile aktive edilen protein kinaz (MAPK) sinyal yolağını aktive ederek, Bcl-2 protein üretimini düzenleyerek, mitokondriyal membranların depolarizasyonunu ve sitokrom c salınımını sağlayarak ve kaspazları aktive ederek aktif T hücrelerini apoptoza götürür. Gal-1 Th1 hücrelerinin apoptozunu uyarırken, Th2 hücrelerinin apoptozunu indüklemeyiz çünkü bu hücrelerin yüzey moleküllerinin glikozilasyonu farklıdır (Toscano ve diğ., 2007). Bu nedenle, yüksek dozda (μM) T hücrelerine uygulanan Gal-1, pro-inflamatuvar bir sitokin olan IL-2 sekresyonunu baskılayıp; anti-inflamatuvar bir sitokin olan IL-10 sekresyonunu uyararak inflamasyonu baskılar (Van der Leij ve diğ., 2004).

Galektin-1'in otoimmün hastalıklar ve kronik inflamasyon modelleri gibi *in vivo* deneysel çalışmalarda, T hücre fonksiyonlarını inhibe etme yeteneği ile güçlü immün düzenleyici etkileri vardır. Bu deneysel modellerde Gal-1, dengeyi Th2 sitokin cevabına (TNF- α , IFN- γ , IL-2 ve IL-12 seviyelerinde azalma, IL-5 seviyesinde artma) kaydırarak inflamasyonu baskılar (Santucci ve diğ., 2000). *In vivo* Gal-1 tedavisi kronik inflamasyon gelişimini engelleyerek, otoimmün encephalomyelit (Offner ve diğ., 1990), artrit (Rabinovich ve diğ., 1999), hepatit (Santucci ve diğ., 2000) ve pankreatit (Wang ve diğ., 2000) gibi hastalıkların deneysel modelleri üzerinde iyileştirici bir etki göstermiştir. Romatoid artrit hastalığının deneysel bir modeli olan kollagen ile

oluşturulan artritte, hastalığın başlangıcında Gal-1 eksprese eden DBA/1 fibroblastlar, artritli farelere enjekte edilerek gen terapisi, rekombinant insan Gal-1; ise farelere günlük olarak verilerek protein terapisi yapılmıştır. Sonuçta her iki uygulamada da Gal-1, T hücrelerinin apoptozuna yol açarak artrit klinik ve histopatolojik etkilerini baskılamıştır. Ayrıca, farelerin serumlarında IFN- γ seviyesinin azalması, IL-5 seviyesinin artmasıyla sitokin dengesinin Th2 yönüne doğru kaydığı gösterilmiştir (Rabinovich ve diğ., 1999). T hücre bağımlı karaciğer hasar modeli olan konkanavalin A ile oluşturulan hepatitte ise, konkanavalin A'dan 30 dakika önce uygulanan Gal-1, aktif T hücrelerini seçici olarak elimine ederek, karaciğere infiltre olan T hücrelerinin sayısını azaltmış ve Th1 kökenli pro-inflamatuvar sitokinlerin (TNF- α ve IFN- γ) sentezlenmesini/salınımını inhibe ederek fareleri karaciğer hasarına karşı korumuştur (Santucci ve diğ., 2000).

Galektin-1'in B hücrelerinin gelişimi ve farklılaşması üzerinde de önemli rolü vardır. Periferde Gal-1 ekspresyonu, aktif B hücrelerinin sentezini artırır ve onların antikor üreten plazma hücrelerine farklılaşmasını sağlar (Tsai ve diğ., 2008).

2.3. ÜLSERATİF KOLİT

Ülseratif kolit, rektumdan başlayıp proksimale doğru tüm kolon mukoza ve submukozasına yayılan, akut ve kronik inflamatuvar değişikliklerle karakterize, kişilerde genetik ve çevresel faktörlerin etkisiyle, kolon mukozasında bakteriler ve antijenler ile immün yanıtın uyarılması sonucu meydana gelen bir inflamatuvar bağırsak hastalığıdır. Aslında ülseratif kolit sadece sindirim kanalına özgü değil, bağırsak dışı tutulumları da olan sistemik bir hastalıktır (Okten ve diğ., 2001).

2.3.1. Epidemiyoloji

Ülseratif kolit, tüm dünyada görülen, görülme sıklığı coğrafik bölge ve topluluklara göre büyük değişiklikler gösteren bir hastalıktır. İnsidansı, 2-10/100.000, prevalansı 35-100/100.000 olarak bildirilmiştir. Türkiye'de ise prevalansı 0.079 olarak bulunmuştur (Daglı, 2006). Hastalık coğrafik bölge olarak Amerika Birleşik Devletleri ve Kuzey Avrupa ülkelerinde, ırk olarak beyaz ırkta ve etnik köken olarak Yahudilerde daha fazla görülmektedir (Gilat ve diğ., 1986). Yaş grupları incelendiğinde, ülseratif kolit olgularının 15-30 ve 60-80 yaşları arasında yığılım yapacak şekilde dağıldığı

saptanmıştır. Genç hastalarda genetik yatkınlık nedeniyle immün yanıtta bir artış söz konusuyken; daha yaşlılarda çevresel etkenlere maruz kalma sonucu immün yanıt artmaktadır (Pietro ve Lawrance, 1999). Bu bulgu patogeneizde çevresel faktörlerin önemli olduğunun göstergesidir. Türkiye’de ise yaş gruplarına göre dağılımlar incelendiğinde, prevalans 20-29 yaş arasında 1.95/100.000, 40-49 yaş arasında 4.77/100.000, 50-59 yaş arasında ise pik yaparak 6.55/100.000 olarak bulunmuştur (Daglı, 2006). Bu hastalığa, kadın ve erkekler arasında benzer sıklıkta rastlanmaktadır (Peterson ve Graham, 2002). Ülseratif kolit insidansındaki artış kentlerde kırsal alanlara göre daha fazladır (Pietro ve Lawrance, 1999). Ayrıca, eğitim seviyesi ve sosyoekonomik düzeyi yüksek kişilerde, düşük sosyoekonomik düzeyli kesime göre, ülseratif kolit daha sık görülmektedir.

2.3.2. Etiyoloji ve Patogenez

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

Yapılan klinik araştırmalarda, ülseratif kolit gelişiminde genetik yatkınlığın rol oynadığı görülmüştür. Birinci derece akrabaları arasında ülseratif kolit hastalığı bulunan birinin, hastalığa yakalanma ihtimali 30-100 kat artar. Kolit hastalarının % 10 kadarında otozomal dominant geçiş vardır. Genetik çalışmalar, hastalık lokuslarının 12. ve 16. kromozomlarda tanımlanmış olduğunu, ayrıca 1., 3., 6., 7., 14. ve 19. kromozomlardaki değişikliklerin de hastalıktan sorumlu olduğunu göstermektedir (Farrell ve Peppercorn, 2002). Hastalıkta, 6. kromozom üzerinde bulunan insan lökosit antijen sınıf II lokusundaki insan lökosit antijen-DR2, insan lökosit antijen-DRB1*0103, insan lökosit antijen-DR9 ve insan lökosit antijen-DRB1*1502 allellerinin etkili olduğu kabul edilmektedir. Ayrıca “nükleotid bağlayıcı oligomerizasyon bölgesi-2” geni hastalık ile ilişkili bulunmuştur (Cho, 2003). Çoklu ilaç direnç geni-1 varyantlarının da hastalık ile ilgili olduğu bulunmuştur. Çoklu ilaç direnç geni-1, hücrelerden ksenobiyotiklerin ve ilaçların uzaklaşmasını sağlayan bir taşıyıcı olan P-glikoprotein 170’i kodlar. P-glikoprotein 170 bir flippaz gibi görev yaparak amfipatik maddeleri membranın sitoplazmik kısmından dış yaprağına taşır. Çoklu ilaç direnç geni-1, ülseratif kolit

tedavisinde direnç göstermektedir ve bu geni eksik olan farelerde kolit geliştiği görülmüştür (Ho ve diğ., 2005). Peroksizom proliferasyonunu aktive edici reseptör gama geni de nuklear faktör- κ B (NF- κ B) aktivitesini engelleyen önemli bir nuklear reseptördür ve ekspresyonu ülseratif kolitli hastalarda azalmaktadır (Dubuquoy ve diğ., 2003). Ülseratif kolit patogeneziyle ilgili tüm bu genler doğal immün cevabı, mukozal bariyer fonksiyonlarını ve bakteriyel ölümü düzenleyerek etkilerini göstermektedir.

Çevresel faktörler arasında ise sigara içimi, diyet, non-steroidal anti-inflamatuvar ilaçlar, stres ve enfeksiyöz ajanlar sayılabilir. Yapılan çalışmalarda, sigara içiminin kolon mukozasındaki musinin yapısını bozması sonucunda ülseratif koliti tetiklediği düşünülmektedir (Blumberg ve Strober, 2001). Karbohidrat, rafine şeker ve protein tüketiminin yüksek olması ve yüksek miktarda yağ asidi içeren besinlerin tüketilmesi ülseratif kolite yatkınlığı arttırmaktadır. Non-steroidal anti-inflamatuvar ilaçlar, non-spesifik olarak inflamasyonu başlatır ve mukozal bariyeri yıkarak doğal immün cevabı aktifleştirir. Genetik olarak hastalığa yatkın bireylerde kommensal bakteri ve diğer antijenlerin enterositlere fazla girişi sonucu uzun süreli T hücre aracılı inflamasyon uyarılır. Örneğin 2 hafta boyunca non-steroidal anti-inflamatuvar ilaçlardan proksikam'a maruz kalan IL10^{-/-} farelerde kronik kolit gelişmiştir (Berg ve diğ., 2002). Stres de mukozal bariyer geçirgenliğini, immün yanıtı ve lüminal mikroçevreyi değiştirerek inflamasyona duyarlılığı arttırmaktadır. Ülseratif kolitin alevlenme dönemlerinde enfeksiyöz barsak hastalıklarından ayırt edilmesi güçtür ve ülseratif kolit ile *Campylobacter*, *Shigella*, *Escherichia coli* ve *Cytomegalovirus* enfeksiyonları benzerlik göstermektedir (Sartor, 1995).

Ülseratif kolit, mikrobiyal ajanlara maruz kalan kolon mukozasındaki immün düzenleyici mekanizmaların defektiyle karakterizedir. Sağlıklı bağırsakta, kommensal bakteriler konak ile simbiyotik bir yaşam sürer ve bu bakterilerin inflamatuvar genleri inhibe etmesiyle, immün cevap baskılanır. İmmunolojik dengeyi sağlayan mukozal immün sistem sayesinde, bağırsakta her gün çok miktarda bakteriyel ve diyetsetel antijenik uyarı olmasına rağmen, herhangi bir immün yanıt gelişmemektedir. Ülseratif kolit hastalığında ise bu tolerans kaybolur. Mukozadaki immün hücreler tarafından lüminal mikrofloraya karşı immün yanıt başlatılır. Kontrolsüz immün yanıt epitelin bariyer fonksiyonunu bozarak, permeabilityyi artırır (Kitajima ve diğ., 1999a). Kolon

epitel hücrelerinin permeabilitesinin artması mikroorganizmaların mukozal bariyeri daha kolay geçmesine neden olur ve antijenler immün hücrelerle direkt olarak temas eder. Permeabilite defektleri daha da şiddetlenir. Böylece mukozada kendi kendini uyaran bir inflamasyon siklusu başlatılır (Podolsky, 2002). Bu durum kalıcı inflamasyonu başlatır ve inflamatuvar yanıtı baskılayamayan genetik olarak yatkın kişilerde kronik kolit oluşur.

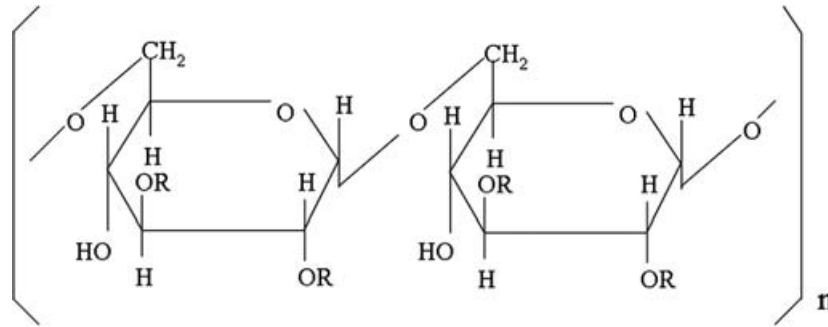
Yukarıda sözü edilen tüm bu genetik ve çevresel faktörler kişiyi ülseratif kolite eğilimli kılar. Duyarlı hale gelen bireylerde sindirim kanalı mukozasında inflamasyonu başlatacak çeşitli tetikleyicilere ihtiyaç vardır. Bu tetikleyiciler başlıca, lüminal bakteriler veya ürünleri, diyet antijenleri ve bağırsak epitel hücreleri olarak üç grupta toplanabilir (otoimmün teori). Duyarlı hale gelmiş kişilerde tetikleyicilerden herhangi biri bağırsak duvarında inflamasyonu başlatabilir. Bağırsak duvarındaki inflamasyona immün (mukozal B ve T hücreler, monositler, makrofajlar, nötrofiller, eozinofiller, bazofiller ve mast hücreleri) ve nonimmün hücreler (epitel hücreleri, mezenkimal hücreler, sinir hücreleri, endotel hücreleri) katılır. İnflamasyon, bağırsakta permeabilite artışı nedeniyle lümeden kolayca bağırsak duvarına nüfuz eden tetikleyici ajanın, burada antijen sunan hücreler aracılığıyla hemen alttaki lenfoid folliküllerde bulunan T hücrelerine sunulması ile başlar. Makrofajların ve Th'lerin aktivasyonu birçok sitokin salgınmasına yol açar. Ülseratif kolitin kronik fazında IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 gibi Th2 tipi sitokinler daha fazla salgılanarak inflamasyonu alevlendirir. Th2 tipi sitokinler B hücrelerini uyarak aşırı miktarlarda immünoglobulin G salgınmasına yol açarlar. Normalde bağırsak mukozasında yer alan B hücreleri immünoglobulin A salgılar. İmmunoglobulin A komplemanı uyarmazken, immünoglobulin G komplemanın ve fagositlerin aktivasyonuna yol açarak inflamasyonu daha da alevlendirir. Aktifleşmiş makrofajlardan salınan IL-8 de nötrofilleri aktive eder. Aktifleşen nötrofillerden açığa çıkan reaktif oksijen metabolitleri ile ortamda bulunan inflamatuvar sitokinler bağırsak epitel hücrelerini hasara uğratarak kolit gelişimine katkıda bulunur (Okten ve diğ., 2001, Hanauer, 2006).

2.4. DEKSTRAN SÜLFAT SODYUM İLE OLUŞTURULAN KOLİT MODELİ

Dekstran sülfat, dekstranın klorosülfonik asit ile esterleşmesi yoluyla oluşan polianyonik bir dekstran türevidir. Heparin benzeri sülfatlanmış olan bu polisakkarit,

anhidro-D-glikoz (α -1,6-glikozidik bağ) ve sülfattan oluşmaktadır. Bu sülfatlanmış polisakkarit yaklaşık olarak % 17 oranında sülfür içerir ki, bu dekstran molekülündeki her bir glikoz kalıntısının ortalama 1.9 sülfat grubuna sahip olduğunu gösterir. Her bir glikoz molekülü 3 sülfat grubu taşıyabilir (Ricketts, 1952) (Şekil 2.7).

Dekstran sülfat sodyum, LDL ve VLDL lipoproteinlerini çöktürme özelliğine sahiptir ve solüsyonda nükleik asitlerin hibridizasyon oranının artırılması amacıyla kullanılır (Wahl ve diğ., 1979). Bunun yanı sıra, hümmoral immünitenin artması veya azalması, B lenfositlerinin aktivasyonu, timositlerin lektinlere reaktivitesinin değiştirilmesi (Blitstein-Willinger ve diğ., 1976), kan koagülasyonunun inhibisyonu, platelet agregasyonu (Nakajima, 1979) ve hümmesel immün cevabın artması veya baskılanması (Bradfield ve diğ., 1974) gibi pek çok immünolojik etkilere sahiptir.

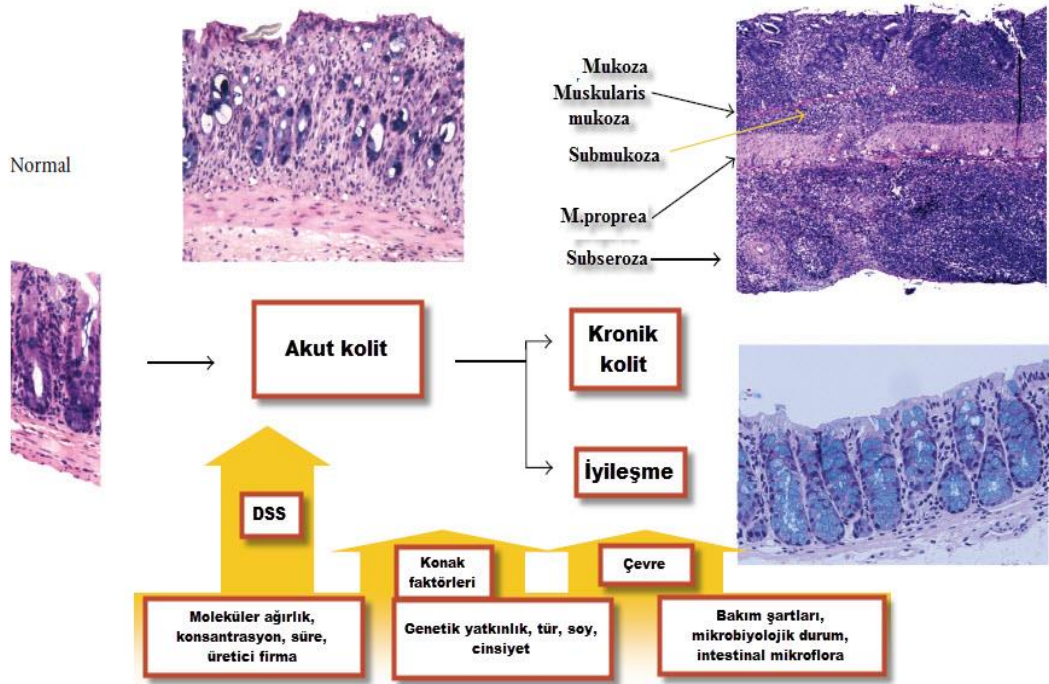


R: SO₃Na or H

Şekil 2.7: DSS'nin moleküler yapısı (Ricketts, 1952).

Son on yılda, ülseratif kolitin birçok farklı hayvan modelleri geliştirilmiştir. Bunlar; spontan kolit modelleri, genetik olarak modifiye modeller, adoptif hücre transferi ve kimyasallar yoluyla oluşturulan modelleridir (Wirtz ve diğ., 2007, Wirtz ve Neurath, 2007). Bu modeller, insan hastalıklarının kompleksliğini tam olarak yansıtmamasına karşın, ülseratif kolit patogenezinin neden olan faktörleri ve farklı terapötik ajanların etkilerini araştırmak açısından önemlidir. İnflamatuvar bağırsak hastalıklarının kimyasallar yoluyla oluşturulan fare modelleri, hastalığı kolay olarak uyarması, inflamasyonun başlangıç, ilerleme ve şiddetinin kontrol edilebilir olması bakımından en çok kullanılan modeller arasındadır. DSS ile oluşturulan kolit modelinin diğer modeller ile karşılaştırıldığında avantajları vardır. Akut, kronik veya nüksedici modeller,

uygulanan DSS'nin konsantrasyonunun değiştirilmesi yoluyla kolaylıkla oluşturulabilir. Son yıllarda, DSS ile oluşturulan kolit modeli, kolit ile ilişkili karsinogenezin araştırılmasında da kullanılmaktadır (Kanneganti ve diğ., 2011). Ayrıca DSS kolit modeli, insan ülseratif kolitin tedavisinde kullanılmak üzere farklı terapötik ajanların deney hayvanları üzerinde test edilebilmesi açısından da oldukça elverişlidir (Melgar ve diğ., 2008).



Şekil 2.8: DSS ile oluşturulan kolite yatkınlığı, hastalığın başlangıcı ve şiddetini ve hastalığa yanıtı etkileyebilecek çeşitli faktörlerin şematik gösterimi (Perse ve Cerar, 2012).

DSS, ilk defa 1985 yılında Ohkusa ve diğerleri tarafından hamsterlerde kolit oluşturmak amacıyla kullanılmıştır. Daha sonra farelerde denenmeye başlamıştır ve günümüzde kolitin patogenezi ve etkileyen faktörleri araştırabilmek için DSS ile oluşturulan kolit modelinin kullanıldığı pek çok çalışma vardır. DSS'nin konsantrasyonuna, süresine ve uygulama sıklığına bağlı olarak akut veya kronik kolit hatta kanser lezyonları oluşturulabilir. DSS uygulamasına verilen bu farklı yanıtlar, sadece DSS'nin konsantrasyonuna, moleküler ağırlığına, maruz kalma süresine bağlı değildir; aynı

zamanda genetik ve mikrobiyal faktörler de direkt etkilidir (Perse ve Cerar, 2012) (Şekil 2.8).

Sülfatlanmış bir polisakkarit olan DSS 5 kDa'dan 1400 kDa'a kadar farklı moleküler ağırlıklarda bulunabilmektedir. DSS'nin moleküler ağırlığı kolitin uyarılması açısından önemli bir faktördür (Kitajima ve diğ., 2000). BALB/c farelerde en şiddetli kolit 40 kDa'luk DSS uygulandığında gözlemlenmiştir; 5 kDa'luk DSS verilmesi ise, daha hafif bir kolit gelişimi ile sonuçlanmıştır. 40 kDa'luk DSS'nin hücrelerce alınımı ve dokulardaki dağılımının histokimyasal analizleri, DSS'nin bağırsak epitel hücre membranlarından nüfuz ettiği gösterilmiştir. DSS, bağırsaktaki mikroflora tarafından yıkıma, farklı pH derecelerinin (4.0-7.5) etkisine ve anaerobik inkübasyona dirençlidir (Kitajima ve diğ., 2002). DSS idrar ve feçes yoluyla atılmaktadır. (Kitajima ve diğ., 1999b).

Akut kolit genellikle % 2-5'lik DSS'nin sürekli olarak kısa periyotta (4-9 gün) uygulanmasıyla oluşturulur. Akut fazda DSS kolitin klinik belirtileri; ağırlık kaybı, diyare, dışkıda gizli kan, piloereksiyon ve anemidir. Tipik histolojik değişiklikler ise, musin artışı, epitel dejenerasyonu, nekroz, lamina proprea ve submukozada nötrofil infiltrasyonu, kriptitis, kript apsesi ile mukozal ve submukozal inflamasyondur. Nötrofillerin mukozal epitelle transepiteliyal göçü kriptitis olarak adlandırılır. Çok sayıdaki nötrofilin mukozal epitelden kriptlerin lümenine geçişi ise, kript apselerinin oluşumuna neden olur. Kriptitis ve kript apsesi insanlardaki hastalığın yaygın görülen bir histolojik özelliği olmasına karşın, DSS ile oluşturulan akut kolitte nadiren gözlenmektedir (Melgar ve diğ., 2005).

Farelerde DSS kolit patogeneğinde bağırsak florasının da etkili olduğunu gösteren bazı çalışmalar vardır. Okayasu ve diğ. (1990), bu kolit modelinde kolondaki bakteriler ve onların ürünlerinin kolitin gelişimine katkısının olup olmadığını incelemişler ve DSS uygulanan farelerin kolon dokularında *Enterobacteriaceae*, *Bacteroidaceae* ve *Clostridium spp.* sayılarının arttığını tespit etmişlerdir. Bağırsak inflamasyonunun gelişiminde doğal immüitenin ve kommensal bakterilerin rolünün araştırıldığı bir çalışmada, immünokompetan (bağışıklık sistemi sağlam olan) BALB/c fareler ile, T ve B hücreleri olmayan immün yetersiz SCID fareler normal şartlarda yetiştirilmiş ve DSS uygulaması ile kolit uyarılmıştır. DSS verilmesinden sonra iki soyun da kolon

mukozalarında şiddetli infiltrasyon ve epitelde kayıplar tespit edilmiştir. Aynı fareler bağırsak mikroflorasının bulunmadığı germ-free şartlarda yetiştirildiğinde ise, DSS uygulamasından sonra iki soyda da az miktarda mukozal inflamasyon görülmüştür (Hudcovic ve diğ., 2001). Bu bulgular, DSS ile oluşturulan kolitte mikrofloranın varlığının inflamasyonu kolaylaştırdığını kanıtlamaktadır.

İnsanlarda görülen ülseratif kolitte olduğu gibi DSS kolitte de genetik faktörler önemli bir rol oynamaktadır. Örneğin C3H/HeJ, NOD/Ltj ve NOD-scid inbred soylar DSS ile oluşturulan lezyonlara daha çok yatkın iken; 129/SvPas ve DBA/2J inbred soyların yatkınlığı daha azdır. BALB/c fareler DSS ile oluşturulan kolite, C57BL/6 farelerden daha az duyarlıdır. Duyarlılıktaki bu farklılıklar, mukozanın inflamatuvar hasara dayanma gücündeki genetik farklılıklar veya inflamatuvar cevabın oluşturulmasındaki farklılıklardan kaynaklanabilir. DSS bir siklus uygulandıktan sonra, BALB/c farelerde kolit iyileşirken; C57BL/6 farelerdeki kolit kronik faza ilerlemektedir (Melgar ve diğ., 2005, Perse ve Cerar, 2012).

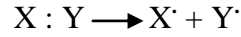
DSS kolon epitel hücreleri üzerinde toksik etkiye sahiptir ve epitel bariyerin geçirgenliğinde bozulmalara yol açar. Böylece kolon mukozasının permeabilitesi artarak, DSS gibi büyük moleküllerin geçişine imkan verir. DSS'nin mukozal epitel hücrelerden geçiş mekanizması hala tam olarak bilinmemektedir. Bununla birlikte, DSS kolitin akut fazında sıkı bağlantılarda bulunan proteinlerden olan okludin, sıkı bağlantı proteini-1, kladin-1, -3, -4 ve -5'in kaybı ve yeniden dağılımı sonucu epitelde bariyer fonksiyonlarının bozulduğu bildirilmektedir (Mennigen ve diğ., 2009). Sıkı bağlantı proteinlerinin ekspresyonundaki değişimler ve epitel hücrelerde apoptozun artışı insan hastalığında da izlenmektedir. Apoptoz ve proliferasyon arasındaki dengenin bozulması epitel bariyerden sızıntılara neden olmaktadır. Bu bulgular, akut DSS kolit modelinde epitelin artmış apoptozu ve azalmış proliferasyonu ile desteklenmektedir (Araki ve diğ., 2010). DSS ile oluşturulan kolitte, çeşitli sitokinlerin, kemokinlerin ve nitrik oksitin üretimi artmaktadır. DSS uygulamasının ilk gününde TNF- α , IL-1 β , IFN- γ , IL-10 ve IL-12 ekspresyonlarının arttığı gözlenmiştir (Yan ve diğ., 2009). DSS kolitin kronik fazında TNF- α ve IL-17 seviyeleri düşük, IL-4, IL-6, IL-10 ve IFN- γ seviyeleri ise yüksek olarak tespit edilmektedir (Alex ve diğ., 2009). DSS kolitte sitokin profili, klinik ve histolojik parametreler ve epiteliyal bariyer özellikleri ile yakından ilişkilidir.

2.5. SERBEST RADİKALLER VE REAKTİF OKSİJEN TÜREVLERİ

Serbest radikaller, dış yörüngelerinde bir ya da daha fazla eşlenmemiş elektron içeren, elektrik yüklü veya yüksüz, kimyasal reaktiviteleri yüksek olan atom veya moleküllerdir. Biyolojik sistemlerdeki en önemli serbest radikaller, oksijenden oluşan radikallerdir. Oksijen molekülü reaktif olmamasına rağmen diğer radikallerle reaksiyona girme özelliğine sahiptir. Reaktif oksijen türleri (ROT) ise, diğer moleküller ile çok kolay elektron alışverişine giren moleküllerdir. ROT'lar, süperoksit radikali ($O_2^{\cdot-}$), hidroksil radikali (OH^{\cdot}), peroksil radikali (RO_2^{\cdot}), alkoksil radikali (RO^{\cdot}), hidroperoksil radikali (HO_2^{\cdot}), hidrojen peroksit (H_2O_2), hipoklorik asit ($HOCl^{\cdot}$), ozon (O_3) ve singlet oksijen (O^{\cdot}) gibi reaktif ürünlerdir (Cavdar ve diğ., 1997, Halliwell ve Gutteridge, 2007).

Serbest radikaller başlıca 3 yolla oluşabilmektedir.

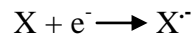
1. Kovalent bağlı bir molekülün homolitik bölünmesi. Bu bölünme sonucunda oluşan atomlar ortak elektronlardan birini alır.



2. Molekülden tek bir elektronun kaybı ya da bir molekülün heterolitik olarak bölünmesi. Heterolitik bölünmede kovalent bağı oluşturan her iki elektron, atomlardan birisinde kalır.



3. Bir moleküle tek bir elektronun eklenmesi



Oksijen kaynaklı serbest radikaller vücutta normal veya patolojik durumlarda endojen olarak sentezlenen metabolik yan ürünlerdir. Bu ürünler hemen sentez edildikleri yerde detoksifiye edilmezler ise zararlı etkilerini oluştururlar. Serbest radikallerin yol açtığı hücre hasarının derecesi hücre içindeki koruyucu sistemlerin etkinlik derecelerine bağlıdır (Halliwell ve Gutteridge, 2007).

$O_2^{\cdot -}$ radikali, hemen tüm aerobik hücrelerde, oksijenin bir e^- olarak indirgenmesi ve indirgenmiş geçiş metallere (demir ve bakır, v.b.) otooksidasyonu sonucunda oluşur. Düşük pH derecelerinde, reaktivitesi artarak, HO_2^{\cdot} oluşturmak üzere protonlanır. $O_2^{\cdot -}$ ve HO_2^{\cdot} reaksiyona girerek, H_2O_2 oluşumuna neden olur. Ayrıca, $O_2^{\cdot -}$ in bir serbest radikal olan nitrik oksit ile birleşmesi sonucu, OH^{\cdot} radikali gibi diğer toksik ürünlere dönüşebilme kapasitesine sahip bir reaktif oksijen türevidir olan peroksinitrit ($ONOO^-$) meydana gelir. Böylece dokularda nitrik oksitin vazodilatasyon gibi etkileri inhibe edilir. $O_2^{\cdot -}$ bir serbest radikal olmakla birlikte, asıl oksidan etkisi direkt zararlı etkiden çok, H_2O_2 kaynağı olması ve geçiş metallere iyonlarının indirgeyicisi olmasından kaynaklanır (Halliwell, 1994).

Membranlardan kolayca geçebilen, uzun ömürlü bir oksidan olan H_2O_2 , moleküler oksijenin çevresindeki moleküllerden iki e^- alması veya $O_2^{\cdot -}$ in bir e^- almasıyla oluşur. Fakat, biyolojik sistemlerde asıl üretimi $O_2^{\cdot -}$ in dismutasyonu (süperoksit dismutaz enzimi etkisiyle veya spontan olarak) meydana gelir. H_2O_2 bir serbest radikal olmamakla birlikte, $O_2^{\cdot -}$ radikali ile reaksiyona girerek, en reaktif ve zarar verici serbest oksijen radikali olan OH^{\cdot} radikalini oluşturmak üzere yıkılabilir (Cheeseman ve Slater, 1993).

OH^{\cdot} radikali, ROT'ların en güçlüsüdür. H_2O_2 'nin, $O_2^{\cdot -}$ ile reaksiyonu sonucu geçiş metallere varlığında indirgenmesi (Fenton reaksiyonu) veya suyun yüksek enerjili radyasyona maruz kalması sonucu oluşan, son derece reaktif, zarar verici ve yarılanma ömrü çok kısa olan bir oksidan radikaldir. Tiyoller ve yağ asitleri gibi moleküllerden bir proton koparıp, yeni radikallerin oluşumuna neden olarak serbest radikal zincir reaksiyonlarını başlatır (Cheeseman ve Slater, 1993).

H_2O_2 'nin fagositlerdeki en fazla bulunan proteinlerden biri olan miyeloperoksidaz (MPO) enzimi tarafından metabolize edilmesi ile okside edici bir radikal olan $HOCl^{\cdot}$ oluşur. Bu reaksiyon özellikle inflamatuvar süreçlerde çok önemlidir. $HOCl^{\cdot}$, $O_2^{\cdot -}$ ve H_2O_2 'den 100-1000 kat daha fazla toksiktir ve farklı biyokimyasal hedefleri vardır. Örneğin bazı temel enzimleri inaktive eder (Schraufstatter ve diğ., 1990), plazma membranındaki tiyol gruplarını okside eder (Carr ve Winterbourn, 1997), bazı proteinleri ve plazma membran fonksiyonlarını bozar (Zavodnik ve diğ., 2001).

Serbest radikaller hücrelerde proteaz, fosfolipaz, elastaz, siklooksijenaz, lipoksijenaz, ksantin oksidaz gibi litik enzimleri aktifleştiririp, alfa-1-antitripsin gibi savunma sistemlerini inhibe ederek, plazma membranı ve organellerde doymamış yağ asitlerinin peroksidasyonuna neden olarak lipidler, sülfidril içeren enzimlerin oksidasyonu ve enzimlerin inaktivasyonuna neden olarak proteinler, polisakkaritlerin depolimerizasyonuna sebep olarak karbohidratlar ve DNA sarmallarının ayrılmasını sağlayarak ve nükleotid yapılı koenzimleri yıkarak DNA üzerinde zararlı etkiler gösterir. Ayrıca, serbest radikallerin mitokondrideki aerobik solunumu ve kapiller permeabiliteyi bozup, hücrenin potasyum kaybını ve trombosit agregasyonunu artırma etkileri vardır. Dolayısıyla bu özellikleri ile serbest radikallerin, diyabet, kanser, ateroskleroz ve kronik inflamasyon gibi pek çok hastalığın patogeneğinde önemli rol oynadığı düşünülmektedir (Halliwell, 1994).

2.5.1. Serbest radikallerin kaynakları

Biyolojik sistemlerde serbest radikal oluşturan kaynaklar endojen ve eksojen olmak üzere iki gruba ayrılabilir. Eksojen kaynaklar şöyle sıralanabilir (Delibas ve Ozcankaya, 1995, Simsek, 1999).

- Çevresel faktörler: Hiperoksi, hava kirliliği, sigara, alkol, uyuşturucu, böcek ilaçları, metaller.
- Toksik kimyasallar: Kloroform gibi halojenlenmiş hidrokarbonlar, redoks potansiyelli maddeler, karbontetraklorür
- Stres
- Radyasyon
- Çeşitli antineoplastik ajanlar, antibiyotikler ve anestezipler.

Endojen kaynaklar altı ana başlık altında toplanabilir (Kavas, 1989, Delibas ve Ozcankaya, 1995).

- Mitokondriyal elektron taşıma sistemi: Aerobik hücrelerdeki en önemli serbest radikal kaynağı, mitokondriyal elektron taşıma zincirinde oluşan sızıntıdır. Mitokondri iç zarında yerleşmiş oksidatif fosforilasyon zinciri bileşenleri büyük oranda indirgendiğinde mitokondriyal $O_2^{\cdot -}$ üretimi artmaktadır.
- Endoplazmik retikulum ve nuklear membran elektron taşıma sistemleri: Endoplazmik retikulum ve nuklear membrandaki serbest radikal üretimi,

membrana bağlı sitokromların oksidasyonundan kaynaklanır. Nuklear membranda oluşan serbest radikaller özellikle DNA'da hasar oluştururlar.

- Peroksizom: Peroksizomlar H_2O_2 'in hücredeki en önemli kaynağıdır. Peroksizomlardaki D-amino asit oksidaz, ürat oksidaz, yağ açıl-KoA oksidaz ve L- α -hidroksi asit oksidaz gibi oksidazlar, O_2^- radikali üretilmeden bol miktarda H_2O_2 üretimine neden olurlar. Ancak peroksizomlarda, H_2O_2 'in suya ayrışmasını katalizleyen CAT enziminin aktivitesi çok yüksek olduğundan peroksizomlardan sitozole ne kadar H_2O_2 geçtiği bilinmemektedir
- Oksidan enzimler: Oksidan enzimlerin katalitik etkinliği serbest radikal oluşumuna yol açmaktadır. Ksantin oksidaz, indolamin dioksijenaz, triptofan dioksijenaz, galaktoz oksidaz, siklooksijenaz, lipoksijenaz ve monoamin oksidaz belli başlı oksidan enzimler olarak sıralanabilir.
- Araşidonik asit metabolizması: Plazma membranına bağlı enzimlerden siklooksijenaz ve lipoksijenaz, prostaglandin ve lökotrien biyosentezi için araşidonik asidin oksidasyonunu katalizledikleri sırada karbon ve oksijen merkezli serbest radikaller açığa çıkmaktadır.
- Fagositik hücreler: Fagositik hücreler herhangi bir etken ile uyarıldıklarında ROT'un oluşumuyla birlikte, mitokondri dışında oksijen tüketimi de artar. Solunumsal patlama sırasında elektron vericisi olarak NADPH kullanımı sonucu O_2 'nin $O_2^{\cdot-}$ 'e indirgenmesi ile NADP⁺ üretimi artar. Fagositik hücrelerin lizozomal granüllerinde bulunan MPO enzimi, uyarıcıların etkisiyle ekstrasellüler alandaki fagositik vakuol içine boşaltılır. Fagosit edilmiş bakteri, solunumsal patlama ürünlerinin etkisiyle öldürölür, ancak bu esnada ROT üretimi de gerçekteşmiş olur.

2.6. OKSİDATİF STRES

Serbest radikaller, organizmalarda normal veya patolojik durumlarda endojen olarak sürekli sentezlenen ve anti-oksidan savunma sistemi tarafından düzenli olarak ortadan kaldırılan moleküllerdir. Serbest radikallerin oluşumu ile bunların anti-oksidan sistem tarafından ortadan kaldırılması arasında bir denge vardır. Bu denge "oksidatif denge" olarak adlandırılır. Oksidatif denge durumunda, organizma serbest radikallerin olumsuz etkilerinden zarar görmez. Anti-oksidan savunma mekanizmasının yetersiz kalması

veya serbest radikal oluşumunun artması nedeniyle, oksidatif denge serbest radikaller yönüne kayarak oksidatif stres meydana gelir (Serafini ve Del Rio, 2004). Bakterilerin, nötrofiller tarafından oksijen radikalleri aracılığı ile yok edilmesi gibi bazı durumlarda, serbest radikal oluşumu, organizmaya faydalı olabilir. Fakat fazla miktarda serbest radikal üretimi sonucu meydana gelen oksidatif stres hücrede DNA, proteinler, lipidler, karbohidratlar ve enzimlerin zarar görmesine yol açabilir (Song, 2004). ROT'lar çok yüksek reaktivitede olmalarına rağmen, oldukça kısa bir yarılanma ömrüne sahip oldukları için genellikle üretildikleri bölgelere yakın yerlerde oksidatif doku hasarlarına neden olurlar.

İmmün sistem hastalıkları, ürolojik rahatsızlıklar, kas, göz, deri, akciğer ve karaciğer hastalıkları, ateroskleroz, iskemik hasar, karsinogenez, nörolojik hastalıklar gibi birçok hastalıkta olduğu gibi, inflamatuvar bağırsak hastalıklarının patogenezinde de inflamatuvar hücreler tarafından oluşan mukozal oksidatif stres ve redoks dengesinin bozulması kritik rol oynayabilir. ROT'ların üretimi, nötrofil infiltrasyonu ve kolitin aktivasyonuna eşlik eder (Keshavarzian ve diğ., 1999). *In vivo* yapılan deneylerde oksidanların inflamasyona aracılık ettiği bilinmektedir. İnflamasyonun gelişiminde bağırsak mukozasına göç eden inflamatuvar hücreler, burada oksidanları ve birtakım proteazları salarak mukozal hasara neden olurlar. Bağırsakta kronik inflamasyonun başlaması veya gelişimine katkı sağlayan oksidatif stresin yayılmasını neyin sağladığı hala bilinmemektedir. *In vivo* deneysel modeller ve insan inflamatuvar bağırsak hastalıklarında, oksidatif olarak modifiye olmuş markır moleküllerin değerlendirildiği bilinmektedir. Örneğin, inflamatuvar bağırsak hastalığı olan kişilerin kolon biyopsilerinde malondialdehit (MDA) ve 4-hidroksi-nonenal seviyelerinin yükselmesi, etan solunumu ve pentan boşaltımının artması, yüksek lipid peroksidasyonunun bir kanıtıdır. ROT'lar ile oluşan protein hasarı ile ilgili olarak, hücre ve dokuların karbonil içeriği, oksidatif protein hasar markırı olarak kullanılmaktadır. Proteinlerdeki tirozin kalıntılarının nitrasyonu sonucu oluşan, 3-nitrotirozin ise peroksinitrit ile modifiye olmuş proteinlerin belirteci olarak kullanılır. Ülseratif kolitli hastaların kolon biyopsilerinde proteinlerin karbonil içeriğinin arttığı ve esas olarak lamina propreadaki mononuklear hücrelerde 3-nitrotirozin ekspresyonunun artış gösterdiği immünohistokimyasal olarak gösterilmiştir (Kruidenier ve Verspaget., 2002).

2.6.1. Lipid peroksidasyonu

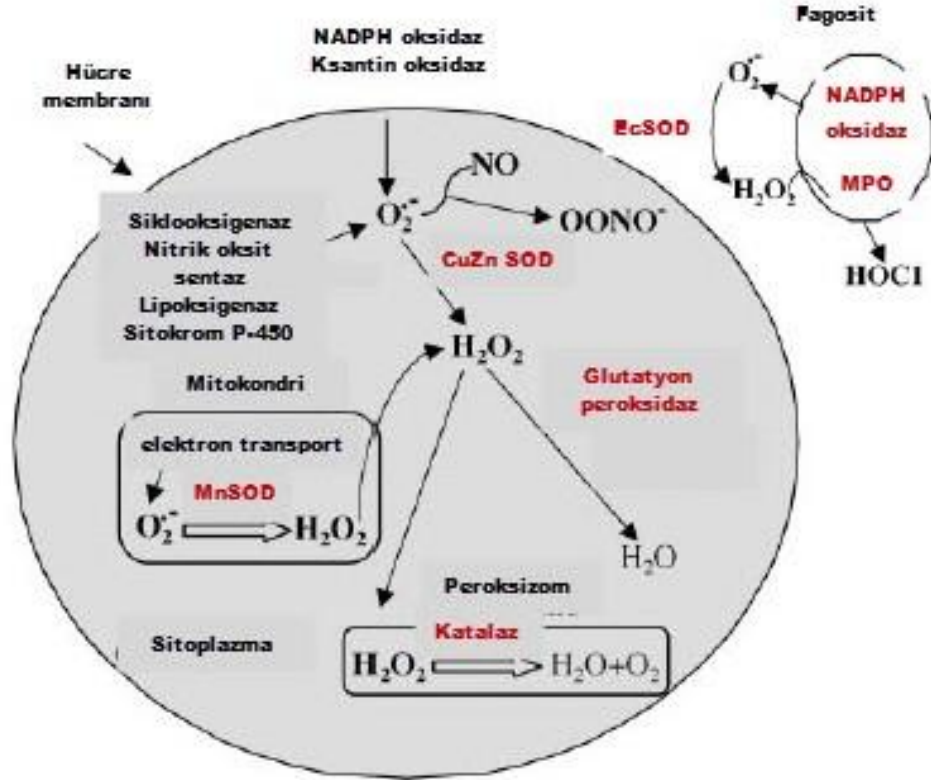
Serbest radikallerin biyolojik sistemlerdeki en önemli etkileri lipidler üzerinedir. “Lipid peroksidasyonu” olarak bilinen bu etki hücrelerdeki membran fosfolipidlerinin yükseltgenerek peroksit türevlerine dönüşmesi olarak tanımlanır. Biyolojik sistemlerde lipid peroksidasyonunu başlatan radikaller şunlardır: $O_2^{\cdot-}$, OH^{\cdot} , RO_2^{\cdot} , RO^{\cdot} . Peroksidasyon, kuvvetli yükseltgen bir serbest radikalın, membran fosfolipidlerinin yapısında bulunan α -metilen gruplarından bir hidrojen atomu kopararak doymamış yağ asidi zincirinin radikal özelliği kazanması ile başlar. Hidrojen atomunun koparılması ile oluşan karbon merkezli lipid radikali, oldukça dayanıksız bir bileşik olup, molekül içi çift bağların aktarılması ile dien konjugatlarına dönüşür. Daha sonra dien konjugatları, moleküler oksijen ile reaksiyona girerek, lipid peroksil radikali (LOO^{\cdot}) meydana gelir. Oluşan LOO^{\cdot} membranda bulunan diğer doymamış yağ asitlerini etkileyerek, yeni lipid radikallerinin oluşmasını sağlamakta ve bu arada açığa çıkan hidrojen atomlarını ise kendisi alarak lipid hidroperoksitlere ($LOOH$) dönüşmektedir. Bu aşamada tepkimeler otokatalitik olarak sürekli şekilde devam eder. Doymamış yağ asitlerinin miktarına bağlı olarak, hidroperoksit oluşumu da devamlıdır. Bu tepkimeler, peroksit gruplarının bir araya gelerek tepkimeye girmesi ve etkisiz ürünler oluşturmasına kadar sürer. Meydana gelen gruplar ise ya birbirleriyle reaksiyona girerek etkisiz ürünlere dönüşür ya da anti-oksidanlar ile reaksiyonları sonucu tepkimeyi sonlandırırlar (Yarsan, 1998).

Lipid peroksidasyon olayının zincir aşamasında ortaya çıkan lipid hidroperoksitler son derece dayanıksız ürünlerdir; özellikle zincirde açılmalar şeklinde yapısal bozulmalara uğrayarak, aldehidler, ketonlar, alkanlar, alkenler ve karboksilik asitler gibi çeşitli metabolik formlara dönüşürler. Bu olaylar sonucunda ortaya çıkan malondialdehit (MDA) gibi ürünler peroksidasyonun şiddetini belirler. Üç veya daha fazla çift bağlı yağ asitlerinin yıkılması sonucu oluşan MDA ve 4-hidroksi-nonenal peroksidasyon sonucunda oluşan en önemli ürünlerdir (Yarsan, 1998). Bu aldehitler hücre membranlarından kolayca geçebildikleri ve yarılanma ömürleri uzun olduğu için doku hasarından sorumludurlar. MDA proteinlerin amino grubuna, nükleik asitlerin bazlarına ve membran bileşenlerine çapraz bağlanıp polimerizasyona neden olarak, etkisini gösterir. Sonuç olarak membran akışkanlığı, iyon taşınması, enzimlerin inaktivasyonu

gibi membran özellikleri değişir. MDA, ayrıca DNA bazları ile reaksiyona girebildiğinden, kuvvetli mutajenik, genotoksik ve karsinojeniktir (Isık, 2009).

2.7. ANTIOKSİDAN SAVUNMA SİSTEMLERİ

Organizmada gerçekleşen pek çok biyokimyasal reaksiyon sonucunda oluşan serbest radikallerin zararlı etkilerine karşı organizmayı koruyan anti-oksidan sistemler bulunmaktadır. Hücreler, böylece serbest radikallerin etkilerinden ve lipid peroksidasyonundan korunurlar (Halliwell, 1994).



Şekil 2.9: Serbest oksijen radikallerinin potansiyel enzimatik kaynakları, hücredeki lokalizasyonları ve bazı önemli endojen anti-oksidan enzimler (Shihabi ve diğ., 2002).

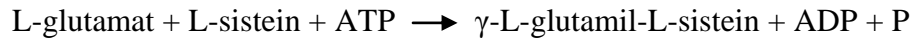
Anti-oksidanlar genel olarak, endojen ve eksojen kaynaklı olarak iki grupta incelenirler. Endojen anti-oksidanlar ise, kendi aralarında enzim olanlar ve enzim olmayanlar şeklinde sınıflandırılırlar. Anti-oksidan enzimler başlıca, süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT) ve glutasyon peroksidaz (GSH-Px)'dir (Şekil 2.9). Bunlardan başka,

dolaylı olarak anti-oksidan sistem içerisinde yer alan ikincil anti-oksidan enzimler, glutatyon redüktaz (GRx) ve glutatyon-S-transferaz (GST)'dir. Enzim olmayan endojen anti-oksidanlar; α -tokoferol (E vitamini), β -karoten, glutatyon (GSH), askorbik asit, melatonin, ürat, seruloplazmin, transferrin, ferritin, albumin ve bilirubindir. Başlıca eksojen kaynaklı anti-oksidan sistem elemanları ise, ksantin oksidaz ve NADPH oksidaz inhibitörleri, çeşitli sitokinler, demir şelatörleri ve gıda anti-oksidanlarıdır (Akkus, 1995, Shihabi ve diğ., 2002).

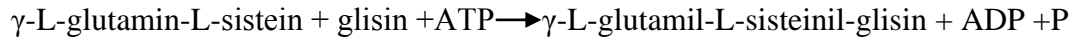
2.7.1. Glutatyon

Glutatyon (γ -L-glutamil-L-sisteinil-glisin) tüm memeli hücrelerinde mM konsantrasyonlarda bulunan, glutamik asit, sistein ve glisin amino asitlerinden oluşmuş protein olmayan bir tripeptittir ve hücre içindeki en önemli anti-oksidan moleküllerden biridir (Penninckx, 2000).

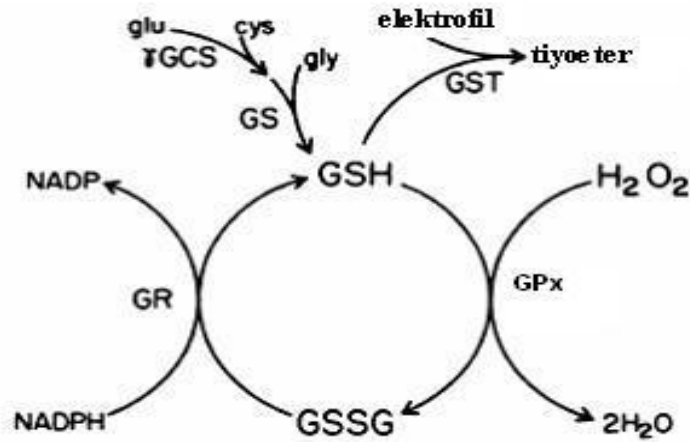
γ -Glutamil sistein sentetaz



Glutatyon sentetaz



Glutatyonun tiyol grubu anti-oksidan savunma, ksenobiyotik ve eikozanoid metabolizması, hücre siklusu ve gen ekspresyonunun düzenlenmesinde önemlidir.



Şekil 2.10: Glutatyon redoks sistemi (Arrick ve Nathan, 1984).

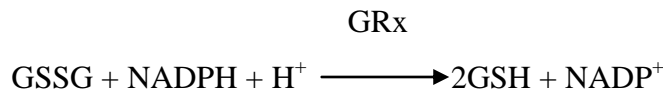
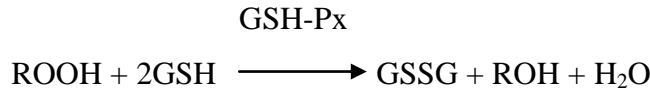
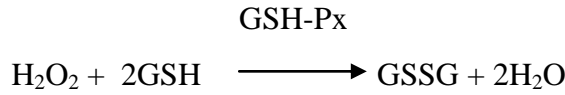
Glutasyon, ROT'lar ile direkt olarak reaksiyona girerek veya GRx ve GSH-Px gibi enzimlerin aktivasyonu ile dolaylı olarak anti-oksidan savunmada görev alabilir. Örneğin, GSH hidroperoksitlerle direkt olarak reaksiyona girmez ancak, GSH-Px için substrat olarak kullanıldığında H_2O_2 ve diğer hidroperoksitlerin indirgenmesi için temel bir unsurdur. Glutasyon disülfit (GSSG) diğer adıyla okside glutasyon, NADPH varlığında GRx ile reaksiyona girerek GSH'ye indirgenir (Şekil 2.10).

Okside glutasyon total glutasyonun % 1'inden daha az oranda bulunurken, glutasyon hücrelerde çoğunlukla indirgenmiş tiyol (GSH) formunda bulunur ve asıl anti-oksidan etki bu form tarafından gerçekleştirilir. Oksidatif strese maruz kalma GSSG üretiminde artışa neden olur. Artan GSSG, proteinlerin sülfidril grupları ile yer değiştirerek protein-glutasyon karışımı disülfitler oluşur. Bu protein-glutasyon karışımlarının yarılanma ömürleri daha uzundur. Yani, GSH/GSSG oranı ne kadar büyükse oksidatif hasara karşı savunma o kadar güçlüdür. Bunun dışında, glutasyon proteinlerin sülfidril gruplarını indirgenmiş halde tutar ve bu grupları oksidasyona karşı koruyarak proteinlerin ve enzimlerin inaktivasyonunu engeller. Glutasyon, hücre membranında γ -glutamil siklusu ile amino asitlerin taşınmasını sağlar. Ayrıca, glutasyon gliksilaz ve insülin transhidrojenaz gibi enzimlerin kofaktörüdür. GSH formları ayrıca, nonenzimatik olarak elektrofil bileşenlerle de konjuge olarak hem ksenobiyotik mekanizması için hem de normal fizyolojik metabolizma için gereklidir. Glutasyon, hücrelerden atılan küçük moleküller ile de konjuge olur ve bu konjugasyonun detoksifikasyon mekanizmasının bir parçası olduğu düşünülür. GSH'nın anti-oksidan savunmadaki diğer bir rolü ise karbon merkezli radikaller ile reaksiyona girme yeteneğidir. GSH oksidatif hasarı engellemek için SOD ile birlikte hareket edebilir. Ağır metallerin varlığı, yüksek glikoz konsantrasyonu ve ısı şoku gibi durumlarda hücre içi GSH seviyesi değişebilir. H_2O_2 gibi ROT'lara maruz kalma ya da ROT'ları oluşturabilen bileşiklere maruz kalma gibi durumlar GSH sentez oranını artırabilir. GSH'nın hücre içindeki konsantrasyonu, kullanımı ve sentezi arasındaki dengeyle sağlanır. Hücre içinde GSH içeriği, glutasyon-S-transferaz ile konjugasyon yaparak, H_2O_2 varlığında GSH-Px aktivitesi ile azalabilir (Dickinson ve Forman, 2002).

2.7.2. Glutatyon peroksidaz

Glutatyon peroksidaz (GSH-Px) (EC:1.11.1.9), GSH'yı kullanarak H_2O_2 ve diğer hidroperoksitlerin indirgenmesinden sorumlu olan bir enzimdir. Bu enzimin memelilerde bilinen en az 5 izoformu vardır ve bunların bazıları bağırsaktaki absorlayıcı epitel hücrelerde lokalizedir (Kruidenier ve Verspaget, 2002). Fakat bu enzimin iki ana tipi çok daha önem kazanmaktadır.

İlk izoenzim; aktif bölgesinde kovalent olarak bağlı selenyum atomu içeren, selenyuma bağımlı GSH-Px (Se-GSH-Px)'tir. Bu enzim, organik hidroperoksitler ve H_2O_2 'ye karşı katalitik aktivite gösterir. Se-GSH-Px, dört protein alt biriminden oluşur ve her ünite aktif bölgesinde selenosistein formunda selenyum atomu içerir. Molekül ağırlığı yaklaşık 85 kDa'dur. Baskın olarak sitoplazmada bulunmakla birlikte, mitokondri ve peroksizomlarda da mevcuttur. Se-GSH-Px, GSH'ın oksidasyonunu katalizleyerek, H_2O_2 ve diğer organik hidroperoksitlerin yıkımını sağlar. GSSG ise GRx aracılığı ile tekrar GSH'ya indirgenir (Aydın ve diğ., 2001).



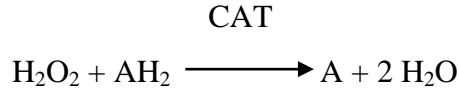
İkinci izoenzim ise glutatyon-S-transferaz olarak adlandırılan, selenyuma bağımlı olmayan, H_2O_2 'den daha çok organik hidroperoksitlerin indirgenmesinden sorumlu olan enzimdir. Selenyuma bağımlı olmayan GSH-Px'ler glutatyon ile konjugasyon reaksiyonlarında glutatyon transferaz olarak aktivite gösterirler (Lawrence ve Burk, 1976).

2.7.3. Katalaz

Katalaz (CAT) (E.C: 1.11.1.6), yaklaşık 240 kDa'luk bir moleküler ağırlığa sahip olan, aktif kısmında 4 tane Fe³⁺-protoporfirin bulunduran bir hemoproteindir. Katalaz, H₂O₂'yi suya ve moleküler oksijene parçalayarak, H₂O₂'nin yıkıcı etkilerine karşı hücreleri korur.



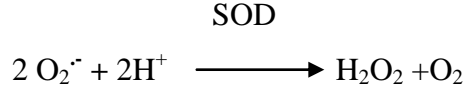
Ayrıca, enzim H₂O₂ varlığında, peroksidaz etkisi de göstererek, etil ve metil alkol gibi alkoller, formaldehit ve asetaldehite oksitler.



Katalaz aktivitesinin % 98'den fazlasını oluşturan eritrositler, fazla miktarda katalaz içerir. Enzim aktivitesinin en yüksek olduğu dokular ise karaciğer ve böbrektir. Katalaz başlıca peroksizomlarda bulunmakla birlikte, mitokondri, endoplazmik retikulum ve sitoplazmada da aktivite göstermektedir. CAT ve GSH-Px enzimlerinin ikisi de substrat olarak H₂O₂'yi kullanmalarına rağmen, düşük konsantrasyonlarda ve devamlı olarak H₂O₂'ye maruz kalma durumunda GSH-Px aktivite gösterirken; akut ve şiddetli oksidatif stres durumlarında H₂O₂ seviyesi yükseltilere ulaştığında CAT katalitik olarak aktiftir. GSH-Px, ekstrasellüler alanda CAT'ın görevini üstlenir. GSH-Px'in H₂O₂'ye afinitesi CAT'dan daha fazladır ve sadece GSH-Px lipid hidroperoksitler ile de etkili bir şekilde reaksiyona girerken, CAT'ın lipid hidroperoksitleri katalizleme özelliği bulunmamaktadır (Kruidenier ve Verspaget, 2002).

2.7.4. Süperoksit dismutaz

Süperoksit dismutaz (SOD), (E.C: 1.15.1.1), O₂⁻ radikalinin, H₂O₂'ye dismutasyonunu katalizleyen, hücreleri O₂⁻ radikalinin zararlı etkilerinden koruyan ve serbest radikal saldırısına karşı ilk savunmayı gerçekleştiren bir metalloenzimdir.



Bu reaksiyon, sulu ortamda spontan olarak da gerçekleşebilmesine rağmen, ortamda SOD bulunduğu zaman 4000 kat daha hızlı gerçekleşir (Akkus, 1995).

Ökaryotik hücrelerde SOD enziminin, metal içerikleri ve lokalizasyonlarına göre 3 izoenzimi bulunmaktadır (Kruidenier ve Verspaget, 2002). Bunlar;

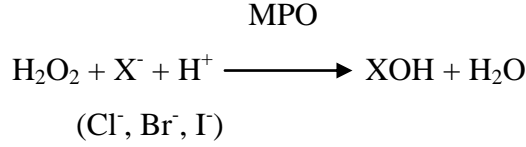
1. **Cu/Zn-SOD:** 32 kDa ağırlığında, homodimerik ve her bir alt biriminde bir Cu ve bir Zn atomu içerir. Hücrelerde en bol bulunan izoenzimdir. En çok sitoplazmada bulunmakla birlikte; nukleusta, lizozom, iç ve dış mitokondriyal membran boşluklarında da bulunan ve total SOD aktivitesinin % 70'inden sorumlu olan formdur.
2. **Mn-SOD:** 80 kDa ağırlığında, kovalent bağ oluşturmeyen, tetramerik yapıda, aktif bölgesinde Mn atomu içeren, mitokondriyal matrikste bulunan izoenzimdir.
3. **EC-SOD:** 135 kDa ağırlığında, tetramerik yapıda, Cu ve Zn içeren glikoprotein yapısında, en çok ekstrasellüler sıvı ve kan plazmasında bulunan, heparin gibi glikozaminoglikanlara yüksek afinite gösteren, total SOD aktivitesinin % 0.5-17'sinden sorumlu olan izoenzimdir.

2.7.5. Miyeloperoksidaz

Akut inflamasyon durumunda PMN'ler ekstraselülasyon ile dokulara göç ederler. Bu hücrelerin lizozomlarının primer azurofilik granüllerinde bulunan oksidan ve hidrolitik enzimler ile fagosite edilmiş olan mikroorganizmalar parçalanırken, bazı enzimler de ekstrasellüler alana salınır (Matheson ve diğ., 1981). İnflamatuvar uyarılar sonucu nötrofillerin aktivasyonu ile ekstrasellüler alana salınan enzimlerden biri de miyeloperoksidazdır. Miyeloperoksidaz, (MPO), (E.C.:1.11.1.7), inflamasyonun baskılanmasında önemli görevleri olan, lökositlerden salgılanan, iki ağır ve iki hafif zincirden oluşan, tetramerik, hem prostetik grubuna sahip glikoprotein yapıda, bir lizozomal enzimdir (Andersen ve diğ., 1982). Başlıca, nötrofillerde bulunmakla birlikte

monosit ve makrofajlarda da az miktarda mevcuttur. MPO, nötrofillerin azurofilik granüllerinde yüksek oranda bulunması nedeniyle, nötrofil infiltrasyonunun kantitatif belirlenmesinde kullanılan önemli bir biyomarkırdır.

MPO, H₂O₂ ve klor iyonlarının çok kuvvetli oksidan bir bileşik olan HOCl dönüşümünü katalizler.



HOCl bilinen en kuvvetli oksidan bileşiktir ve kuvvetli antimikrobiyal aktivite gösterir. Çok sayıda biyolojik molekül ile reaksiyona girebilme kapasitesine sahiptir. HOCl, glikozamin ve taurin gibi aminler ile reaksiyona girerek, yine kuvvetli bir oksidan olan klorlanmış aminleri oluştururlar. Amonyum ile reaksiyonları sonucunda oluşan amonyum klorür ise oksitleyici özelliği ile tiyol gruplarını sülfoksitlere dönüştürerek, sülfidril gruplarının redoks reaksiyonlarına girmelerini engeller (Akkus, 1995). Bundan başka, çeşitli enzimleri inaktive ederek ve hücre membranlarındaki doymamış yağ asitlerinin de yapısını bozarak, sitotoksik etkiler gösterir. Ayrıca MPO, florür dışındaki diğer halojenlerin H₂O₂ varlığında oksidasyonunu katalizler, fakat hücre içinde klor derişimi fizyolojik olarak yüksek konsantrasyonda olduğundan, genellikle reaksiyonlara klor iyonu da eşlik eder (Kettle ve Winterbourn, 1994). MPO, anilinleri ve fenolik bileşikleri oksitleyerek serbest radikal oluşumuna da neden olur. MPO'dan başka, nötrofillerden salınan proteazlar da (elastaz, kollajenaz) hasara katkıda bulunurlar. Bu bilgiler ışığında, MPO inflamatuvar hastalıklarda nötrofiller tarafından oluşturulan doku hasarının esas sorumlusu olarak kabul edilmektedir.

2.8. SİTOKİNLER

Sitokinler, immün sistemin haberleşmesinde esas görevi olan, protein veya glikoprotein yapısındaki moleküllerdir. İmmün yanıtın regülasyonu, hücre büyümesi ve farklılaşması, doku tamiri gibi proseslerde hücreler arasındaki kimyasal haberleşmeyi sağlarlar (Oberholzer ve diğ., 2000). Pek çok inflamatuvar hastalık sitokin üretimi ile ilişkilendirilmiştir. Septik şok, iskemi/reperfüzyon hasarı ve yara oluşumu ve

rejenerasyonu gibi inflamatuvar durumlarda sitokinlerin rolü büyük önem taşımaktadır (Thijs ve Hack, 1995, Oberholzer ve diğ., 2000).

Sitokinler, makrofaj, granülosit, endotel hücre, dendritik hücre, T ve B hücreleri, mast hücreleri ve tümör hücreleri gibi farklı hücre tipleri tarafından salgılanırlar (Munoz ve diğ., 1991, Casey, 2000). Sitokinler genel olarak geçici etki gösterirler ve fizyolojik şartlar altında düşük konsantrasyonlarda bulunurlar. Sitokinlerin biyolojik aktiviteleri membrandaki reseptörler aracılığı ile düzenlenir. Sitokin reseptörleri iki ya da daha fazla transmembran polipeptit zincirlerinden oluşur. Bunun yanı sıra, çözünebilir sitokin reseptörleri de vardır. Bu reseptörler, membran bağımlı reseptörlerle rekabete girerek, sitokin sinyallerini düzenlerler. Çözünebilir sitokin reseptörleri, sepsis gibi enfeksiyon durumlarında veya romatizmal hastalıklar gibi inflamatuvar hastalıklarda artar (Munoz ve diğ., 1991, Casey, 2000). Çözünebilir sitokin reseptörleri düşük konsantrasyonlarda buldukları zaman sitokin taşıyıcısı olarak görev yaparak, sitokinlerin etkinliğini uzatır ve aktivitesini dengede tutar. Bakteriyal enfeksiyon durumlarında olduğu gibi yüksek konsantrasyonda olan çözünebilir sitokin reseptörleri sitokinlerin aktivitesini engeller.

Sitokinler, değişik hücre tiplerinde farklı etkiler göstermektedir. Sitokinler diğer sitokinlerin sentez veya salınmasını artırarak veya azaltarak, immün veya inflamatuvar yanıtı baskılayabilir veya arttırabilirler. Sitokinler, hedef hücrelerindeki hücre yüzeyi reseptörlerine bağlanarak, aynı hücreden sitokin sekresyonu (otokrin), komşu hücrelerde (parakrin) veya uzaktaki hücrelerde (endokrin) aktivasyona neden olabilirler (Thijs ve Hack, 1995).

Etki mekanizmalarına göre sitokinler, pro-inflamatuvar ve anti-inflamatuvar olarak iki grupta toplanabilirler. İnflamasyonun başlangıç fazında salınan pro-inflamatuvar sitokinler, immün yanıtın başlatılması ve sürdürülmesi için gereklidir. İnflamatuvar süreçlerde rol oynayan temel pro-inflamatuvar sitokinler, TNF- α ve IL-1'dir. Ayrıca IL-6 ve IL-8 de sekonder yardımcı pro-inflamatuvar sitokinlerdendir. Anti-inflamatuvar sitokinler ise inflamasyonun ileri aşamalarında salgılanırlar ve inflamatuvar yanıtın kontrolünü sağlarlar. Bunlar, IL-4, IL-10, IL-11 ve IL-13'tür (Alkharfy ve diğ., 2000, Casey, 2000). Doğal immün yanıtta, mononükleer fagositler ve doğal öldürücü hücreler tarafından üretilen sitokinler, adaptif immün yanıtta T hücreleri tarafından üretilirler. Doğal immünitede görev alan en önemli sitokinlerden olan TNF- α , IL-1 ve IL-6, immün

yanıtın düzenlenmesinde tek başlarına rol oynamazlar, ancak Th yanıtına neden olarak adaptif immüitenin gelişimine katkı sağlarlar (Thijs ve Hack, 1995, Oberholzer ve diğ., 2000).

2.8.1. Tümör Nekroz Faktör- α

Tümör nekroz faktör- α (TNF- α), makrofaj ve monositler gibi doğal immün yanıtta rol oynayan hücreler, ile farklılaşmış T hücreleri tarafından salgılanan, 17 kDa'luk pleiotropik bir pro-inflamatuvar sitokindir. TNF- α pro-inflamatuvar etkileri, IL-1 β ve IL-6 üretimini, adhezyon moleküllerinin ekspresyonlarını, fibroblast proliferasyonunu artırarak, akut faz yanıtını başlatarak ve apoptozu inhibe ederek gerçekleştirir (Sanchez-Muñoz ve diğ., 2008). Akut travmaya yanıt olarak gerçekleşen TNF- α salınımı, hızlı ve kısa sürelidir. Fakat ortamda kısa süreli bulunması bile önemli metabolik değişikliklerin gelişimine ve siklusun daha ileri basamaklarındaki sitokinlerin aktifleşmesine neden olur. TNF- α ; IL-1, IL-6, IL-8 salınımını uyarır. Aynı zamanda T hücreleri tarafından IFN- γ ve IL-2 üretimini stimüle eden bir mediyatördür (Sands, 2000).

TNF- α 'nın iki farklı spesifik transmembran reseptörü vardır. Tip I reseptör, apoptoz ve sitotoksiteyi indükler ve pro-inflamatuvar sitokinlerin salınımını uyarır. Tip II reseptör ise, anti-apoptotik etki ile T hücrelerinin, doğal öldürücü hücrelerin ve fibroblastların yaşamasını, proliferasyonunu sağlar (Mizoguchi ve diğ., 2002). Ayrıca, TNF- α 'nın proteolitik olarak parçalanmış membran reseptörleri olarak bilinen spesifik çözünebilir reseptörlere bağlandığı da bilinmektedir. Bu çözünebilir reseptörler bir doğal TNF inhibitörü gibi etki göstererek, yarışmalı olarak dolaşımda bulunan fazla TNF- α 'yı bağlayıp nötralize ederek koruyucu rol oynamaktadır (Sayım, 2010).

TNF- α inflamatuvar bağırsak hastalıklarının patogeneğinde mukozal immün yanıtta rol oynayan ve inflamasyonun sürecinde ilk suçlanan sitokindir. Doku hasarı veya enfeksiyonlar sonucu oluşan immün yanıtta pro-inflamatuvar sitokin siklusunun başlamasını sağlar ve immün yanıtın oluşmasındaki en etkin araçlardan biridir (Sayım, 2010). TNF- α ayrıca bağırsak permeabilitesinde artışa neden olan bir moleküldür. Ülseratif kolitli hastaların kolon dokularının incelendiği bir çalışmada, mukozada TNF- α seviyesinin arttığı ve buradaki aktif makrofajların TNF- α sekresyonu yaptığı gösterilmiştir (Stucchi ve diğ., 2006). Başka bir çalışmada, serumdaki TNF- α düzeylerinin, inflamatuvar bağırsak hastalık aktivitesinin klinik ve laboratuvar

göstergeleri ile korele olduğu görülmüştür (Reimund ve diğ., 1996). İnfliximab, adalimumab ve certolizumab pegol gibi ajanlar ile anti-TNF- α terapisi, Crohn hastalığını belirgin derecede iyileştirmiştir (Yamamoto-Furusho, 2007).

2.8.2. İnterlökin-10

İnterlökin-10 (IL-10) immün yanıtı baskılayan 18 kDA ağırlığında önemli bir anti-inflamatuvar pleiotropik sitokindir. CD4 Th2 hücreler tarafından salınan IL-10 antijen sunan hücrelerden sitokin üretimini inhibe ederek, hem doğal hem adaptif immün yanıtı kontrol eden önemli bir sitokindir. Antijen sunumunu ve pro-inflamatuvar sitokin salınımını baskılayarak mukozal inflamasyonu iyileştirir. Bu nedenle IL-10 bağırsak homeostazını düzenleyici önemli bir faktördür (Sanchez-Muñoz ve diğ., 2008). IL-10 geni olmayan farelerde kronik kolitin geliştiği görülmektedir ve mukozal immün sistem üzerinde IL-10'un önemli terapötik etkileri vardır (Wirtz ve Neurath, 2007). IL-10 inaktive olan farelerde IL-12 ve IFN- γ üretimi artar.

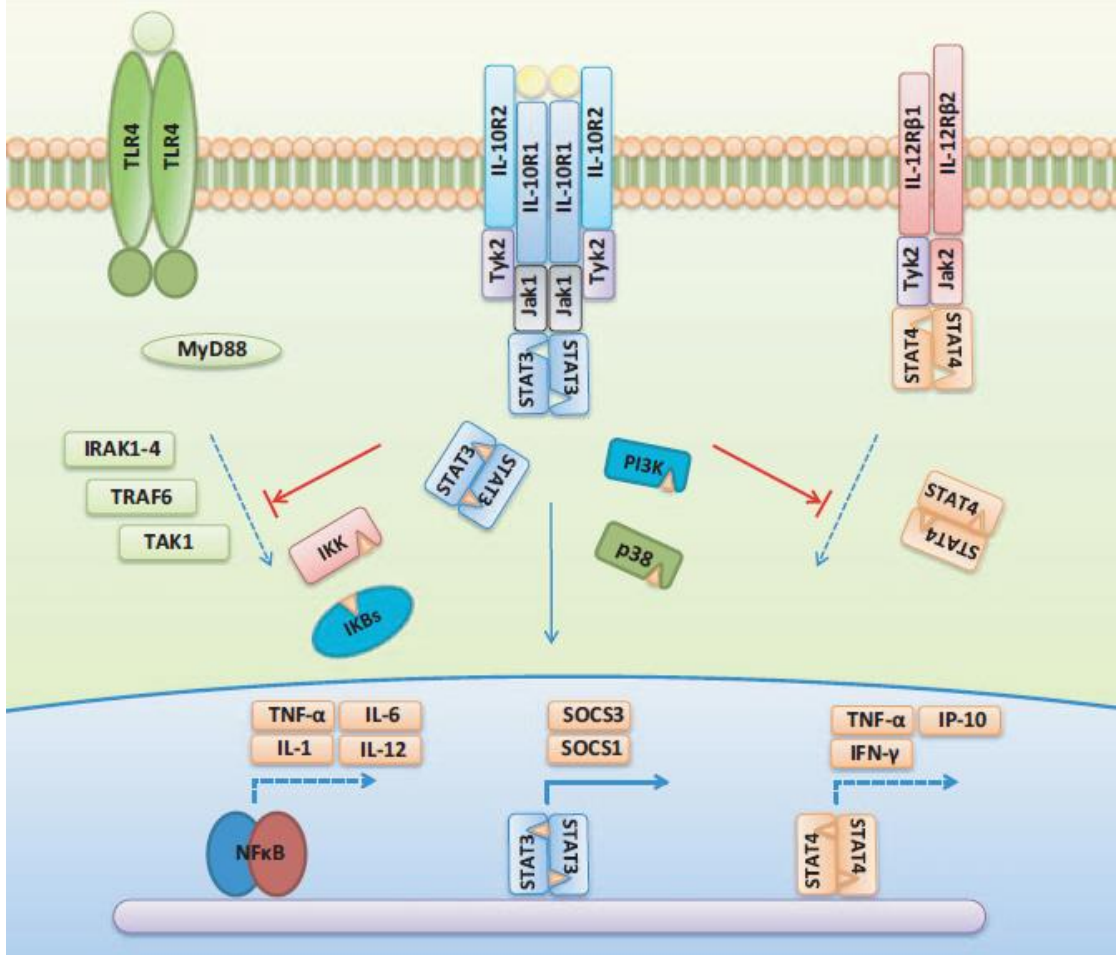
IL-10, IL-10 reseptör I ve II olarak adlandırılan iki zincirli bir reseptöre sahiptir ve IL-10 homodimer olarak bu reseptörlere bağlanır (Paul ve diğ., 2011).

Doğal immünyetede, IL-10 ekspresyonu Toll-benzeri reseptör (TLR) bağımlı veya bağımsız yollar ile tetiklenebilir. TLR'ler patojenlerdeki bazı molekülleri tanırlar. Patojenlerin TLR'ye bağlanması ERK, P38-MAPK, fosfotidilinositol-3 kinaz (PI3K) ve NF- κ B yolaklarını aktiveştirerek inflamasyonu başlatır. P38-MAPK ve PI3K'in aktivasyonu IL-10 üretimini baskılar (Günzl ve diğ., 2010).

IL-10, dentritik hücrelerdeki MHC II moleküllerinin ekspresyonlarını azaltarak, bu hücrelerin antijen sunumunu engeller. Böylece T hücrelerinin aktivasyonunu inhibe eder. IL-10 ayrıca, IL-1, IL-6, TNF- α ve IL-12 salınımını da inhibe eder. Ayrıca otokrin olarak kendi ekspresyonunu artırır (Paul ve diğ., 2011). IL-10, sinyal iletici transkripsiyon aktivatörü-3 (STAT-3) yolu ile aktif makrofajların proliferasyonunu inhibe eder (O'Farrell ve diğ., 1998). IL-10 cevabına bağlı olarak makrofajlardan pro-inflamatuvar sitokinlerin üretimi ve MHC II moleküllerinin üretimi de azalır.

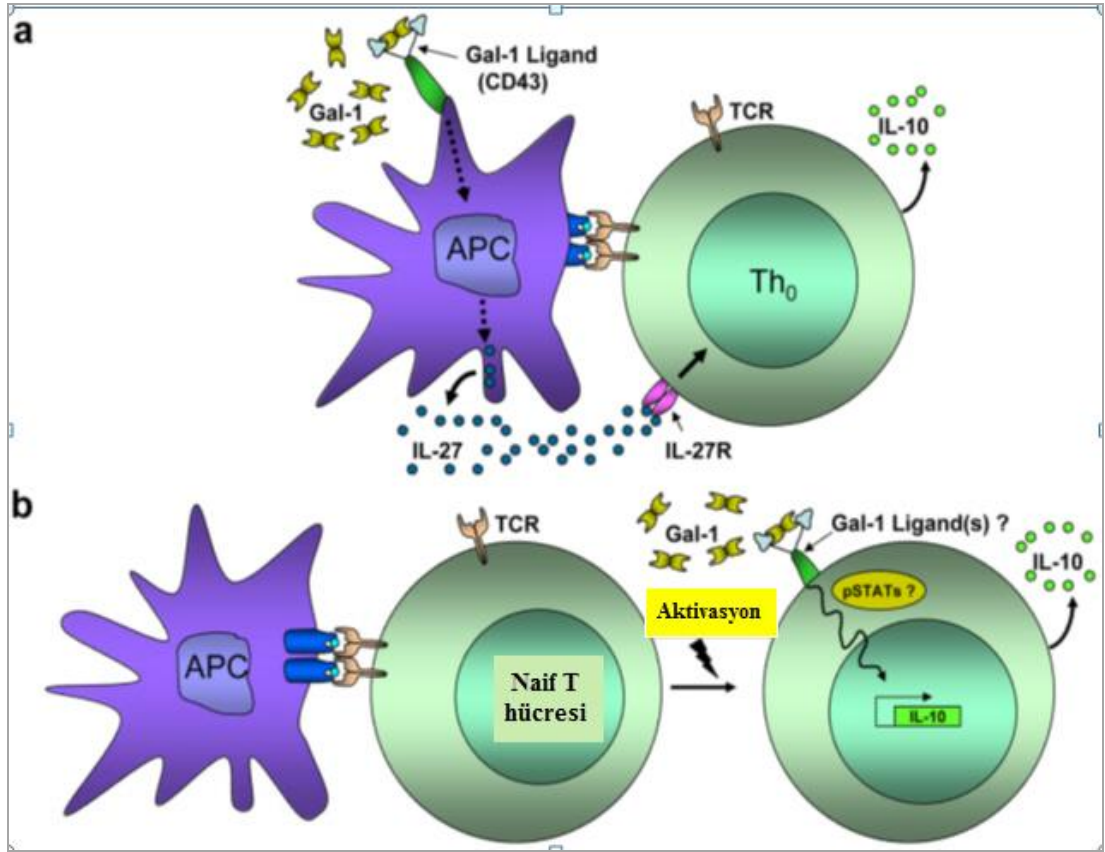
Adaptif immünyetede ise IL-10'un T hücreleri üzerindeki etkileri indirekttir. IL-10, dentritik hücrelerin antijen sunmasını engelleyerek ve IL-12 ile IFN- γ sekresyonunu inhibe ederek, naif T hücrelerinin Th1 hücrelere farklılaşmasını engeller. Th2 hücreleri tarafından üretilen IL-10, Th1 hücrelerin oluşumunu da kontrol eder (Paul ve diğ., 2011). İnflamatuvar bağırsak hastalıklarında regülatör T hücreleri tarafından IL-10 üretimi önemlidir. Regülatör T hücreleri tarafından IL-10 ve transforme edici büyüme faktörü- β sekresyonunun uyarılması bu hücrelerin baskılayıcı fonksiyonları için gereklidir (Mills, 2004). Ayrıca regülatör B hücreleri de IL-10 üretiminde rol oynar (Fillatreau ve diğ., 2008).

IL-10, IL-10 reseptör I ve II'ye bağlandığında, Janus kinazlar (Jak1 ve Tyk2)'ın aktivitesi artar. Bu reseptör alt birimlerinin ve diğere kinazların fosforilasyonu STAT3 moleküllerinin dimerizasyonuna ve fosforilasyonuna neden olur. Dimerik STAT3 nükleusa transloke olur ve DNA üzerindeki STAT bağlayıcı elementlere bağlanarak, IL-10 cevap genlerini aktiveştirir. Diğere sitoplazmik moleküller de aktif reseptör komplekslerine bağlanabilir. Bu PI3K ve MAPK yollarının aktivasyonu ile sonuçlanır. STAT3'ün fosforilasyonu IL-10'un anti-inflamatuvar özelliklerini artırır. IL-10, TLR sinyallerini, bazı gerekli sinyal moleküllerinin proteozomal degradesyona uğratarak inhibe eder. Bu yolla IL-10, NF- κ B'nin ve TNF- α , IL-6, IL-1 gibi inflamatuvar sitokinlerin ekspresyonlarını engeller. İnflamatuvar bağırsak hastalıklarında IL-12'nin hastalığı artırıcı aktivitesi IL-10 tarafından da antagonize edilir. IL-12 heterodimerik reseptörüne bağlandığında Jak2 ve Tyk2 aracılığı ile STAT-4 aktiveştir. IL-12 böylece Th1 ve doğal öldürücü hücreleri aktiveştirerek IFN- γ ve TNF- α salınımına neden olur. IL-10, NF- κ B'yi düzenleyerek IL-12 üretimini baskılar (Paul ve diğ., 2011) (Şekil 2.11).



Şekil 2.11: İnflamatuvar bağırsak hastalıklarında IL-10 sinyal yolağı (Paul ve diğ., 2011).

Galektin-1 antijen sunan hücrelerin yüzeyindeki glikanlara bağlandığında bu hücrelerden IL-27 salınımı tetiklenir. IL-27, T hücrelerinin yüzeyindeki IL-27 spesifik reseptöre bağlanarak, IL-10 sentezini uyarır. Alternatif olarak, dimerik Gal-1'in aktif T hücrelerine direkt olarak bağlanması, IL-10 salınımına neden olarak regülatör tip I hücreye farklılaşması ile sonuçlanır (Cedeno-Laurent ve Dimitroff, 2012) (Şekil 2.12).



Şekil 2.12: Galektin-1'in direkt (a) veya indirekt (b) mekanizmalar ile T hücrelerinde IL-10 sentezini uyarması (Cedeno-Laurent ve Dimitroff, 2012).

3. MALZEME VE YÖNTEM

Bu deneysel çalışma, İstanbul Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü (DETAE) Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun 27.06.2012 tarihli ve 95 sayılı karar yazısı ile Etik Kurul ilkelerine uygun bulunmuştur. Çalışmamızda, İstanbul Üniversitesi DETAE'de yetiştirilen 8-10 haftalık C57BL/6 soyu 32 adet erkek fare kullanıldı. Hayvanların deney öncesindeki bakımları, İstanbul Üniversitesi DETAE Deney Hayvanları Laboratuvarı standart koşullarında yapıldı. Bu sürede farelere pellet yem ve musluk suyu verildi. Çalışma boyunca her gün aynı saatte, ağırlık değişimlerinin belirlenmesi amacıyla, farelerin ağırlıkları tartıldı ve içtikleri su/DSS'li su miktarları kaydedildi. Farelerde kolit oluşumunun sağlanması amacıyla kullanılan % 3 DSS (w/v) (MP Biomedicals, moleküler ağırlığı: 36.000-50.000 Da) solüsyonu her gün taze olarak otoklavlanmış steril musluk suyu ile hazırlandı.

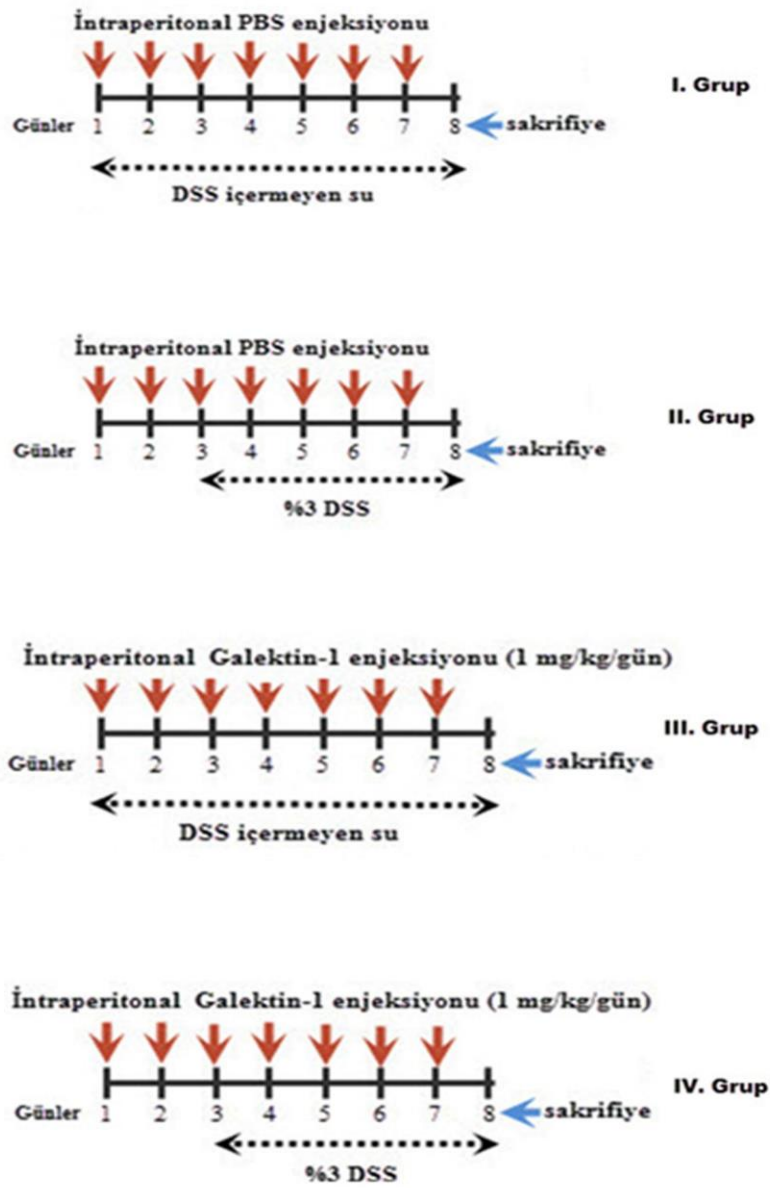
Rastgele seçilen fareler 4 gruba ayrıldı:

Grup I (Kontrol Grubu) (n=8): 7 gün boyunca günde 1 kez, galektin-1 çözücüsü olarak 0.1 ml fosfat tamponu (PBS, pH 7.4) intraperitoneal yolla enjekte edilen ve deney süresince steril musluk suyu verilen, 8. günde sakrifiye edilen hayvanlar.

Grup II (DSS Verilen Kolit Grubu) (n=8): Deneyin ilk 2 günü steril musluk suyu verilip, 3. günden itibaren 5 gün boyunca steril musluk suyu içinde çözündürülen % 3 DSS verilen ve diğer deney grubundaki hayvanlarla eşit şartları sağlayabilmek amacıyla, 7 gün boyunca günde 1 kez galektin-1 çözücüsü olarak intraperitoneal yolla 0.1 ml PBS (pH 7.4) enjekte edilerek, 8. günde sakrifiye edilen hayvanlar.

Grup III (Galektin-1 Verilen Grup) (n=8): 7 gün boyunca günde 1 kez, PBS (pH 7.4)'te çözündürülen rekombinant insan galektin-1 (Novoprotein Scientific Inc.), 1 mg/kg dozda ve 0.1 ml olacak şekilde intraperitoneal olarak enjekte edilen ve steril musluk suyu verilen, son enjeksiyondan 24 saat sonra 8. günde sakrifiye edilen hayvanlar.

Grup IV (Galektin-1 ve DSS Verilen Grup) (n=8): Deneyin ilk 2 günü steril musluk suyu verilir, 3. günden itibaren 5 gün boyunca steril musluk suyu içinde çözündürülen % 3 DSS verilen; 7 gün boyunca günde 1 kez PBS (pH 7.4)'te çözündürülen rekombinant insan galektin-1, 1 mg/kg dozda ve 0.1 ml olacak şekilde intraperitoneal olarak enjekte edilen ve son enjeksiyondan 24 saat sonra 8. günde kurban edilmiş hayvanlar.



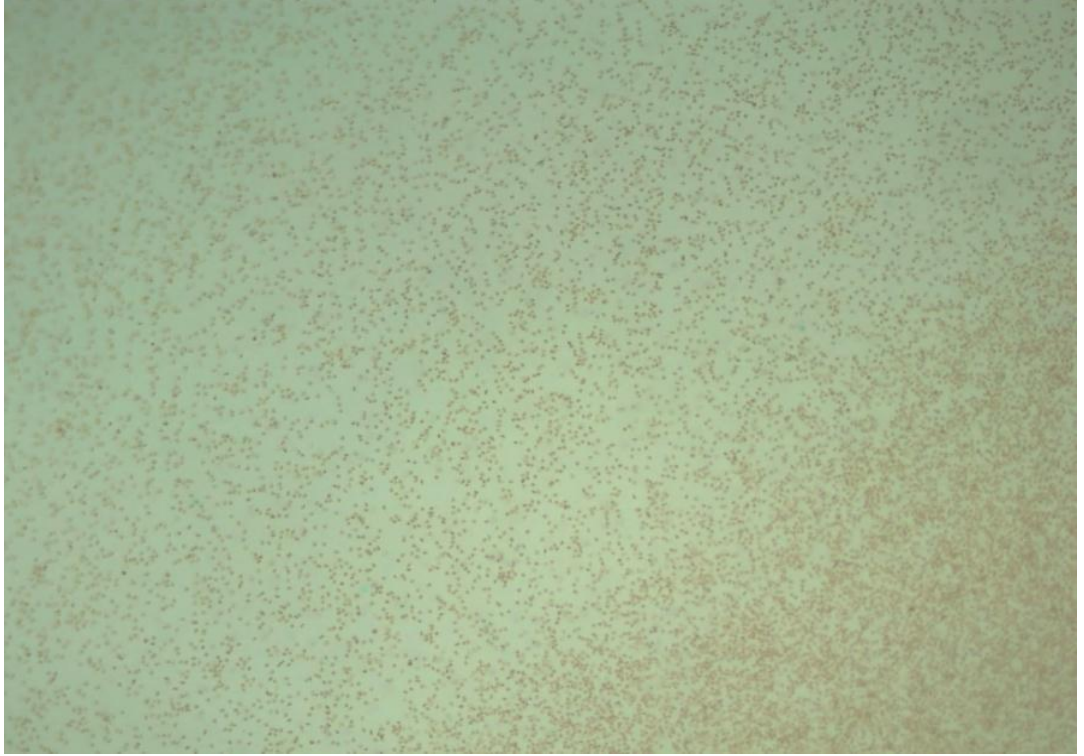
Şekil 3.1: Gruplara ait deney protokolü.

Farelere yapılan tüm enjeksiyonlar her gün aynı saatte (9.00'da) gerçekleştirildi. Deneyden bir gece önce (12 saat) aç bırakılan fareler, yapılan son enjeksiyonlardan 24 saat sonra 8. gün saat 9.00'da intraperitoneal ketamin (40 mg/kg, Ketalar, Pfizer) enjeksiyonu ile anestezi edildiler.

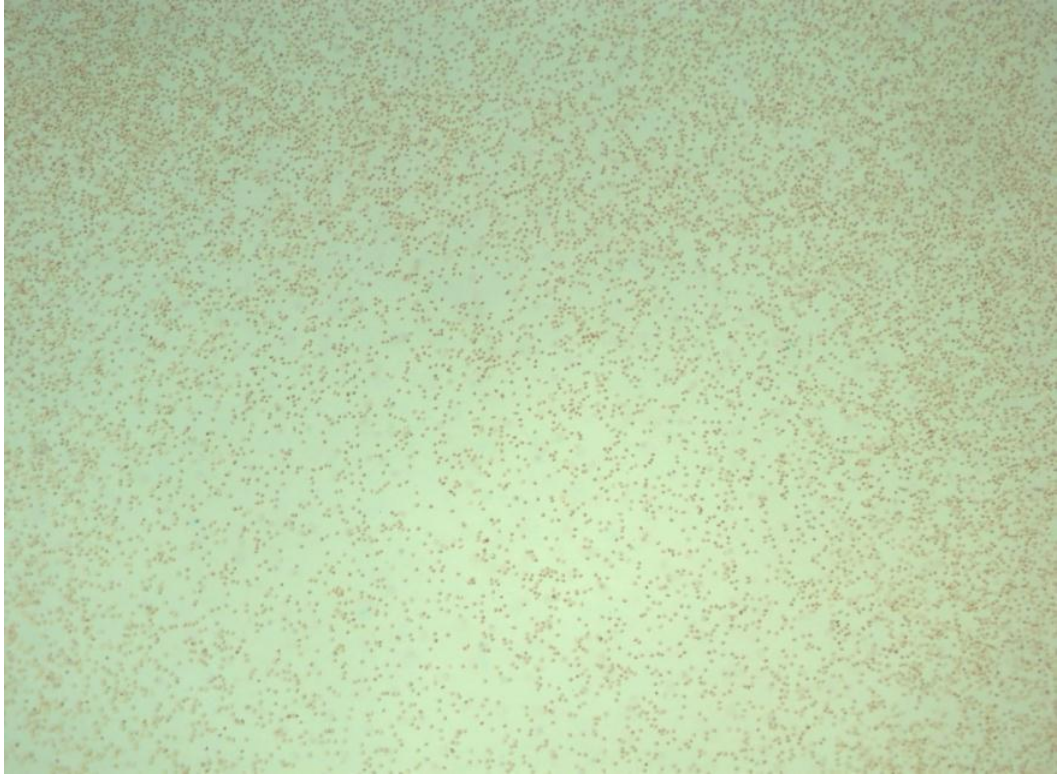
Anestezi altındaki farelerin ağırlıkları ölçüldü. Farelerin tümüyle çıkarılan kolon dokularında, distal kolonda anüsün proksimalindeki 1 cm'lik segment ikiye ayrılarak histolojik ve immünohistokimyasal yöntemlerde kullanılmak üzere fiksatifler içine alındı. Biyokimyasal incelemeler için ise geriye kalan kolon dokusu 3 eşit parçaya bölünerek, proksimalden itibaren ilk iki parça ELISA yöntemlerinde kullanılmak üzere buz soğukluğunda PBS (pH 7.2) içinde, son doku parçası ise spektrofotometrik tayinleri gerçekleştirmek amacıyla için buz soğukluğunda % 0.9'luk fizyolojik tuzlu su (FTS) içinde deneyin yapılacağı güne kadar -86°C 'deki derin dondurucuda saklandı.

3.1. GALEKTİN-1 AKTİVİTE TESTİ

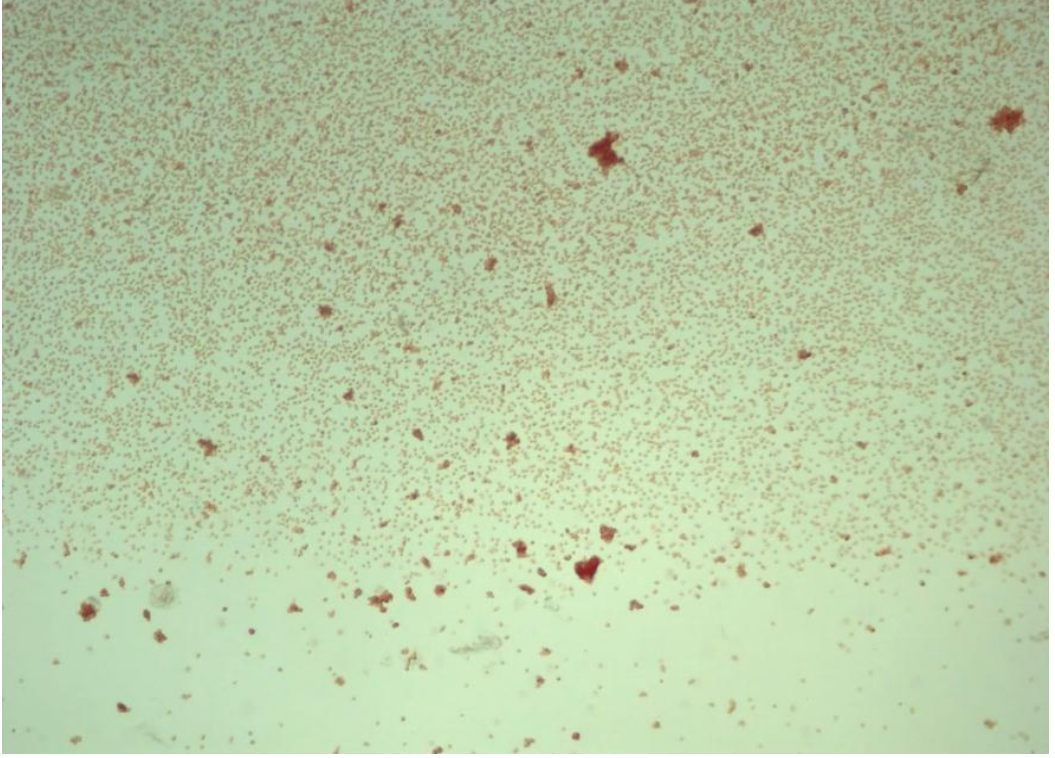
Farelere terapötik amaçla enjekte edilen rekombinant galektin-1'in, deney öncesi aktivitesinin kontrol edilmesi amacıyla hemagglütinasyon testi yapıldı. 5 ml taze kan EDTA'lı tüpe alındı ve oda sıcaklığında 800 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası üstte kalan plazma kısmı pipet yardımıyla ortamdan uzaklaştırıldı. Eritrositlerin bulunduğu peletin üzerine % 0.9'luk FTS eklendikten sonra oda sıcaklığında 800 rpm'de 5 dakika santrifüj yapılarak eritrositlerin yıkanması sağlandı. Üstte kalan süpernatant uzaklaştırılarak, altta kalan hücre solüsyonu 1:1 oranında FTS ile sulandırıldı ve hazırlanan bu seyreltik eritrosit solüsyonu ile hemagglütinasyon testi yapıldı. Üç adet lam alınarak, birinci lama sadece 20 µl seyreltik eritrosit süspansiyonu; ikinci lama 20 µl seyreltik eritrosit süspansiyonu ve 20 µl Gal-1 çözücüsü olan PBS; üçüncü lama ise 20 µl seyreltik eritrosit süspansiyonu, 20 µl PBS ve 20 µl PBS'te çözülmüş Gal-1 konuldu. Tüm lamlar Olympus CX41 model ışık mikroskobu ile incelendi ve Olympus DP71 model dijital kamera ile fotoğrafları çekildi. Negatif kontrol olarak kullanılan birinci ve ikinci lamlarda hiçbir agglütinasyon gözlenmezken (Şekil 3.2, Şekil 3.3), Gal-1'in bulunduğu üçüncü lamda bu lektinin eritrositleri çöktürdüğü tespit edildi (Şekil 3.4). Yalnızca üçüncü lamda agglütinasyonun olması, rekombinant insan Gal-1'in aktif durumda olduğunu gösterdi.



Şekil 3.2: Fiziyojik tuzlu su (% 0.9) ile negatif aglütinasyon. Orijinal büyütme x100.



Şekil 3.3: PBS ile negatif aglütinasyon. Orijinal büyütme x100.



Şekil 3.4: Galektin-1 ile pozitif aglütinasyon. Orijinal büyütme x100.

3.2. FARELERDEKİ % VÜCUT AĞIRLIK DEĞİŞİMİNİN TESPİTİ

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

3.3. FARELERİN KOLON UZUNLUKLARININ ÖLÇÜLMESİ

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

3.4. HASTALIK AKTİVİTE İNDEKSLERİNİN BELİRLENMESİ

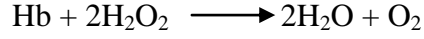
Kolitin klinik değerlendirmesi, Cooper ve diğ. (1993) tarafından geliştirilen bir yöntem olan *Hastalık Aktivite İndeksi* (HAİ)'nin tespiti ile yapıldı. HAİ, kolondaki inflamasyonun yayılımı ve şiddetinin değerlendirilmesi amacıyla; *vücut ağırlığı*, *dışkı kıvamı* ve *rektal kanama* düzeylerinin belirlenmesiyle hesaplanır. DSS ile oluşturulan kolit modelinde HAİ günlük olarak hesaplanır ve hastalığa yönelik tedavilerde HAİ skorlarında azalma saptanması tedavi edici ajanın terapötik etkinliği hakkında önemli bilgi verir. HAİ için kullanılan her bir parametre 0 (hasarsız) - 4 (şiddetli hasar) arasında skorlandırıldı ve 3 parametreye ait skorlar toplanarak, aritmetik ortalaması alındı. Maksimum skor, bir birey için 4 kabul edildi. Çalışmamızda farelerin HAİ'leri günlük olarak hesaplandı ve deney sonunda DSS verilen kolit grubunda HAİ skoru ≥ 3 olan fareler kullanıldı. HAİ skorlandırılması Tablo 3.1'de gösterilmiştir.

Tablo 3.1: Hastalık Aktivite İndeksi Skorlama Sistemi (Cooper ve diğ., 1993).

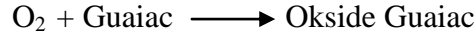
Skor	Ağırlık kaybı (%)	Dışkı kıvamı	Gizli/görünür rektal kanama
0	Yok	Normal	Yok
1	1-5		
2	5-10	Yumuşak	Gizli kan
3	10-20		
4	>20	Diyare	Görünür kanama

Hayvanların dışkılarında gizli kanın varlığı, Hemocult Gizli Kan Testi Kiti (Hema-Screen Occult Blood Test, Stanbio Laboratory) kullanılarak saptandı. Gizli kan içeren dışkı, guaiac (guaiakonik asit gibi fenolik bileşenler içerir)'lı test kağıdına uygulandığında hemoglobin ile guaiac temas eder ve reaksiyonu geliştirici solüsyonun eklenmesiyle gelişen peroksidaz reaksiyonu sonucu oluşan oksijen guaiac'ı okside ederek mavi renk oluşturur. Renk oluşumu hemoglobin konsantrasyonu ile doğru orantılıdır ve dışkıda kan bulunduğunun kanıtıdır.

Hemoglobin + Reaksiyon geliştirici solüsyon (H₂O₂) ;



Guaiac'ın oksidasyonu;



(renksiz) (mavi)

3.5. HİSTOPATOLOJİK DEĞERLENDİRME

Histopatolojik yöntemler için tüm gruplardaki farelerin distal kolon dokuları kullanıldı. Distal kolonun anüsün proksimalinde bulunan kısmından ilk 0.5 cm'lik segmentler halinde alınan dokular genel histolojik incelemede kullanılmak üzere, Bouin solüsyonunda oda sıcaklığında 24 saat fikse edildi. Fiksasyonu takiben, yükselen alkol serilerinden geçirilip, ksilolde şeffaflaştırıldıktan sonra parafine gömülen kolon doku parçalarından 5 µm kalınlığında kesitler alındı. Kesitler albumin mayer kaplı lamlara yapıştırıldı. Hematoksilen-Eozin (HE) ve Periyodik Asit Schiff (PAS) ile boyanarak, Olympus CX 41 model ışık mikroskobu ile incelendi ve Olympus DP71 model dijital kamera ile fotoğrafları çekildi.

3.5.1. Kolitın Mikroskopik Değerlendirilmesi

Hematoksilen-Eozin ile boyanan kolon kesitlerindeki histolojik kolit hasar skorunun mikroskopik olarak belirlenmesi için, Dieleman ve diğ. (1998) tarafından geliştirilen kolit skorlama sistemi kullanıldı. Buna göre, *inflamasyonun şiddeti*, *inflamasyonun yayılımı* ve *kript hasarı* gibi ölçütlere göre her bir fareye ait kesitler ışık mikroskopik olarak değerlendirildi. İnflamasyonun şiddeti ve yayılımı 0-3 arasında, kript hasarı ise 0-4 arasındaki bir skalaya göre derecelendirildi. Daha sonra, her bir ölçüt skoru, o ölçütün kesit üzerindeki yüzde tutulum skoru ile çarpılarak, üç ölçütün skorları toplandı. Bir birey için maksimum kolit hasar skoru 40 olarak kabul edildi. Bireysel hasar skoru istatistiksel olarak değerlendirildi. Histolojik kolit skorlaması sistemi Tablo 3.2'de gösterilmiştir.

Tablo 3.2: Histolojik Kolit Skorlama Sistemi (Dieleman ve diğ., 1998).

Skorlama ölçütleri	Skor	Tanımlama
İnflamasyon şiddeti	0	Yok
	1	Hafif
	2	Orta
	3	Şiddetli
İnflamasyon yayılımı	0	Yok
	1	Mukoza
	2	Submukoza
	3	Transmural
Kript hasarı	0	Yok
	1	Bazal 1/3 hasarlı
	2	Bazal 2/3 hasarlı
	3	Kript kaybı, sadece yüzey epiteli var
	4	Kript ve yüzey epitelinde kayıp
Yüzde tutulum	0	% 0
	1	% 1-25
	2	% 26-50
	3	% 51-75
	4	% 76-100

3.6. KI-67 İMMUNOHİSTOKİMYASI

Bu çalışmada ışık mikroskobu düzeyinde kolon kesitlerinde hücre proliferasyonunu tespit edebilmek amacıyla “Streptavidin-Biyotin-Peroksidaz” yöntemi kullanılarak, anti Ki-67 (çoğalan hücre belirteci) antikoruna ile immün işaretleme yapıldı. Ki-67 immünohistokimyası için, alınan distal kolon dokusu parçaları % 10 tamponlanmış formalin fiksatifinde, +4°C’de 24 saat fikse edildi. Fiksasyonu takiben yükselen alkol serilerinden geçirilip, ksilolde şeffaflaştırıldıktan sonra parafine gömülen kolon dokularından 4 µm kalınlığında kesitler alındı. Kesitler poli-L-lizin kaplı lamlara yapıştırıldı. Deparafinizasyon ve rehidratasyon işlemlerinden sonra distile suda çalkalanıp, antijen iyileştirmesi için sitrat tamponunda (pH 6.0), mikrodalgada (700 W) 15 dakika kaynatıldı ve 20 dakika oda sıcaklığında soğumaya bırakıldı. Daha sonra kesitler, PBS (pH 7.4) ile yıkanarak, hücre membranlarının geçirgenliğinin artırılması amacıyla 10 dakika süreyle % 0.3 Triton X-100’de bekletildi. Dokudaki endojen peroksidaz aktivitesinin inhibe edilmesi için kesitler metanolde hazırlanan % 3’lük

H₂O₂ solüsyonunda 10 dakika süresince tutuldu. Daha sonra Histostatin-Plus kiti (Invitrogen) için verilen yönteme uygun şekilde, kesitler dokuda spesifik olmayan bağlanmaların engellenmesi için 7 dakika bloklayıcı solüsyonda bekletildi. Kesitlere, Ki-67 için spesifik olan primer antikor (Abcam-ab16667), % 3'lük Triton X-100 içeren PBS (pH 7.4) solüsyonunda 1/100 dilüsyonda hazırlanarak uygulandı ve gece boyunca (16 saat) +4°C'de inkübe edildi. Bu aşamada, negatif kontrol kesitlere antikor yerine % 3'lük Triton X-100 içeren PBS (pH 7.4) solüsyonu uygulandı. Daha sonra kesitler, biyotinlenmiş sekonder antikor ve streptavidin peroksidaz enzim konjugatında 25'er dakika oda ısısında nemli bir kap içerisinde bekletildi. Kesitlere renk reaksiyonunu gerçekleştirmek amacıyla AEC (3-Amino-9-Etilkarbazol) 15 dakika uygulanarak, mikroskop altında renk oluşumu gözlemlendi. Reaksiyonun durdurulması için kesitler distile suya alındıktan sonra, 10 saniye zıt boya olarak Mayer Hematoksilin uygulandı. Zıt boya sonrasında boyayı sabitlemek için kesitler distile suya alındı. GVA kapatma solüsyonu kullanılarak, lamel ile kapatılıp +4°C'de saklandı. Bloklayıcı solüsyon uygulanmasından sonraki aşama hariç, diğer tüm aşamalar arasında yıkamalar 10 dakika süreyle % 0.05'lik PBS-Tween20 ile yapıldı.

Ki-67 immünohistokimyası ile kolon mukozasında işaretlenen çoğalan hücreler, Olympus CX41 model ışık mikroskopunda X40 objektif kullanılarak incelendi ve Olympus DP71 dijital kamera ile fotoğrafları çekildi. Hücre proliferasyon indeksi, kolon kesitlerinde rastgele seçilen kolon mukozasının farklı alanlarındaki Ki-67 pozitif çoğalan hücre sayısının, alandaki tüm hücre sayısına oranının 100 ile çarpılması ile hesaplandı. Her bir bireye ait kesitlerde, farklı alanlardaki toplam 1000 hücre sayıldı.

$$\text{Hücre proliferasyon indeksi (\%)} = \frac{\text{Ki-67 pozitif çoğalan hücre sayısı}}{\text{Toplam hücre sayısı}} \times 100$$

3.7. BİYOKİMYASAL YÖNTEMLER

Lipid peroksidasyonunun ve anti-oksidan sistem parametrelerinin incelenmesi için farelerden alınan kolon doku örnekleri, analizlerin yapılacağı güne kadar -86°C'deki dondurucuda % 0.9'lük FTS içinde saklandı. Analizlere başlamadan önce -86°C'den alınan örneklerin önce -20°C'de, daha sonra da +4°C'de bir gün bekletilerek

çözünmeleri sağlandı. Çözünen dokular % 0.9'luk FTS ile yıkandıktan ve kurulandıktan sonra ağırlıkları tartıldı. Kolon örnekleri, 1 g doku için 10 ml FTS ile sulandırılarak, cam homojenizatörde ve buz dolu bir kabın içinde homojenize edildi. Homojenize edilen dokular 10.000 g'de 20 dakika (+4°C'de) santrifüj edilerek, berrak süpernatantlar elde edildi. Her gün analiz yapılacak sayıdaki doku homojenize edilerek, biyokimyasal parametrelerin ölçülmesinde taze süpernatantlar kullanıldı.

Homojenatlarda total protein seviyeleri Lowry yöntemine göre (Lowry ve diğ., 1951), malondialdehit seviyeleri Ledwozyw yöntemine göre (Ledwozyw ve diğ., 1986), glutatyon seviyeleri Beutler yöntemine göre (Beutler, 1963), glutatyon peroksidaz aktiviteleri Paglia-Valentine yöntemine göre (Paglia ve Valentine, 1967), katalaz aktivitesi Aebi yöntemine göre (Aebi, 1984), süperoksid dismutaz aktiviteleri Sun yöntemine göre (Sun ve diğ., 1988) spektrofotometrik (Schimadzu UV 1700) olarak belirlendi. Tüm örnekler çift tekrarlı çalışıldı.

3.7.1. Total Protein Tayini

Prensip

Total protein seviyeleri Lowry (Lowry ve diğ., 1951) yöntemine göre, spektrofotometrik olarak belirlendi. Bu yöntemin esası, folin reaktifinde bulunan fosfomolibdik/ fosfotungustik asit çözeltisinin alkali koşullarda proteinlerdeki tirozin ve triptofan gibi aromatik halka içeren amino asitler ile verdiği reaksiyona dayanır. Alkali ortamda bakır iyonu (Cu^{+2}) proteinlerdeki peptid bağları ile kompleks oluşturur ve Cu^{+1} 'e indirgenir. İndirgenmiş bakır ve proteinlerde bulunan tirozin ve triptofan amino asitleri folin reaktifini indirgeyerek mavi renkli bir kompleks oluşumuna neden olur. Oluşan rengin, spektrofotometrede 500 nm dalga boyunda verdiği absorbans şiddeti protein konsantrasyonu ile doğru orantılıdır.

Kullanılan çözeltiler:

- **A reaktifi:** % 2 Na_2CO_3 , 0.1 N NaOH çözeltisi içerisinde hazırlanarak, kahverengi şişede ve oda sıcaklığında saklandı.
- **B reaktifi:** % 0.5 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, % 1 dipotasyum tartarat çözeltisi içerisinde her çalışmada taze olarak hazırlandı.

- **C reaktifi:** 50 ml A reaktifi ile 1 ml B reaktifinin karışımıyla her çalışmada taze olarak hazırlandı.
- **Folin reaktifi (E reaktifi):** 100 g Na-tungustat, 25 g Na-molibdat, 50 ml %85'lik fosfat asidi, 100 ml derişik HCl ve 700 ml ultra saf su karıştırıldı ve 10 saat kaynatıldı. 150 g Li₂SO₄, 50 ml ultra saf su ve birkaç damla brom eklenerek 15 dakika kaynatılıp, soğutuldu ve ultra saf su ile 1 litreye tamamlandı. Stok olan bu reaktif, deneyde kullanılırken 1:2 oranında ultra saf su ile seyreltildi.
- **Standart çözelti:** % 100 mg sığır serum albumin (BSA) içeren stok çözelti % 0.9'luk FTS ile hazırlandı. Bu stok çözeltden FTS ile seyreltmeler yapılarak % 5'lik, % 10'luk, % 15'lik ve % 20'lik standart çözeltiler hazırlandı.

Yöntem

Kör, örnek ve standart tüpler aşağıdaki gibi hazırlandı ve iki tekrarlı çalışıldı.

Reaktifler	Kör	Örnek	Standart
Seyreltik doku süpernatantı	-	0.5 ml	-
Standart çözelti	-	-	0.5 ml
FTS	0.5 ml	-	-
C reaktifi	2.5 ml	2.5 ml	2.5 ml
Tüpler vorteksle karıştırıldı ve oda sıcaklığında 10 dakika bekletildi.			
E reaktifi	0.25 ml	0.25 ml	0.25 ml

Tüpler vorteksle karıştırıldı ve oda sıcaklığında 30 dakika bekletildikten sonra absorbanslar spektrofotometrede 500 nm dalga boyunda köre karşı okundu.

Hesaplama

Her bir standart çözeltden en az 20 tekrar çalışıldı ve elde edilen absorbans değerlerinin aritmetik ortalamasına göre, standart grafik çizilerek, % mg olarak total protein seviyeleri hesaplandı. Grafikten okunan değerler seyreltme faktörü ile çarpıldı.

3.7.2. Lipid Peroksidasyon Tayini

Prensip

Lipid peroksidasyon seviyeleri Ledwozyw (Ledwozyw ve diğ., 1986) yöntemine göre spektrofotometrik olarak belirlendi. Bu yöntem, çoklu doymamış yağ asitlerinin peroksidasyonu sonucunda oluşan MDA'nın sıcak ortamda tiyobarbiturik asit (TBA) ile reaksiyonu sonucunda oluşan kırmızı-pembe rengin 532 nm dalga boyunda verdiği absorbansın spektrofotometrik olarak ölçülmesine esasına dayanır.

Kullanılan çözeltiler:

- **0.6 M HCl**
- **1.22 M Trikloroasetik asit (TCA) çözeltisi:** 0.6 M HCl ile hazırlandı.
- **1 M NaOH**
- **Tiyobarbiturik asit (TBA) çözeltisi:** 500 mg TBA, 6 ml 1M NaOH ve 69 ml ultra saf su ile çözüldü.
- **Standart çözelti:** 4.4 nmol/ml 1.1.3.3-tetra etoksi propan

Yöntem

Kör, örnek ve standart tüpler aşağıdaki gibi hazırlandı.

Reaktifler	Kör	Örnek	Standart
Doku süpernatantı	-	0.5 ml	-
Standart çözelti	-	-	0.5 ml
Ultra saf su	0.5 ml	-	-
TCA	2.5 ml	2.5 ml	2.5 ml
Tüpler vorteksle karıştırıldı ve oda sıcaklığında 15 dakika bekletildi.			
TBA	0.75 ml	0.75 ml	0.75 ml
Tüpler vorteksle karıştırıldı ve kaynar su banyosunda ağızları kapalı olarak 30 dakika bekletildi. 30 dakika sonra tüpler soğutuldu.			
n-bütanol	2 ml	2 ml	2 ml

Daha sonra tüpler 1 dakika boyunca kuvvetlice çalkalandıktan sonra, 4000 g'de 10 dakika santrifüj edildi. Süpernatantlar alınarak 532 nm'de köre karşı absorbanslar kaydedildi. Sonuçlar aşağıdaki formüle göre hesaplandı.

Hesaplama

$$\text{MDA (nmol/mg protein)} = \frac{\text{Ö}_{\text{abs}} \times 4.4}{\text{S}_{\text{abs}} \times \text{P}}$$

Ö_{abs}: Örneğin absorbansı

S_{abs}: Standartın absorbansı

4.4 : Standart çözeltinin konsantrasyonu (nmol/ml)

P : Doku protein miktarı (mg/ml)

3.7.3. Glutasyon Tayini

Prensip

İndirgenmiş glutasyon miktarı Beutler (Beutler, 1963) yöntemine göre, spektrofotometrik olarak belirlendi. Bu yöntemin esası, Ellman reaktifi olarak da bilinen 5-5'-dithio-bis(2-nitro)benzoik asit'in (DTNB), indirgenmiş glutasyonun sülfidril grupları ile indirgenerek sarı renkli bir ürün olan 2-nitro-5-merkaptobenzoik asite dönüşmesine ve bu bileşiğin 412 nm'de verdiği absorbansın ölçülmesine dayanır.

Kullanılan çözeltiler:

- **Proteinsizleştirme (Çöktürme) çözeltisi:** 1.67 g glasiyel metafosforik asit, 0.2 g EDTA-Na ve 30 g NaCl ultra saf suda çözüldü ve son hacim 100 ml'ye tamamlandı. Çözelti +4°C'de 3 hafta dayanıklıdır.
- **% 1'lik Sodyum Sitrat çözeltisi**
- **Ellman (DTNB) reaktifi:** % 40 mg DTNB % 1'lik sodyum sitrat çözeltisi kullanılarak hazırlandı. Bu çözelti +4 °C'de 13 hafta dayanıklıdır.
- **Sekonder Sodyum Fosfat (Na₂HPO₄) çözeltisi:** 0.3 M Na₂HPO₄ çözeltisi hazırlandı. Bu çözelti +4°C'de saklandı.

- **Standart çözelti:** % 100 mg stok GSH çözeltisi hazırlandı. Bu stok çözeltiden ultra saf su ile seyreltmeler yapılarak % 1'lik, % 2.5'lik ve % 5'lik standart çözeltiler her çalışmada taze olarak hazırlandı.

Yöntem

Deney tüpüne 0.5 ml doku homojenatı ile 0.75 ml çöktürme çözeltisi konarak vorteksle karıştırıldı ve 4000 g'de 5 dakika santrifüj edilerek protein içermeyen süpernatant elde edildi.

Kör, örnek ve standart tüpler aşağıdaki gibi hazırlandı.

Reaktifler	Kör	Örnek	Standart
Doku süpernatantı	-	0.5 ml	-
Standart çözelti	-	-	0.5 ml
Ultra saf su	0.5 ml	-	-
Na₂HPO₄ çözeltisi	2 ml	2 ml	2 ml
DTNB reaktifi	0.25 ml	0.25 ml	0.25 ml

Tüpler vorteks ile karıştırıldıktan sonra oda sıcaklığında 5 dakika bekletildi. Absorbanslar köre karşı 412 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçüldü. Sonuçlar aşağıdaki formüle göre hesaplandı.

Hesaplama

$$\text{GSH (nmol/mg protein)} = \frac{\text{Ö}_{\text{abs}} \times A \times 2.5 \times 10^6}{S_{\text{abs}} \times 307.3 \times P}$$

Ö_{abs} : Örneğin absorbansı

S_{abs} : Standartın absorbansı

A : Çalışmada kullanılan standartın konsantrasyonu (% mg)

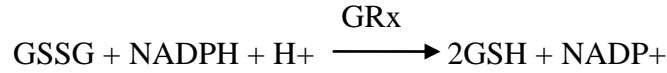
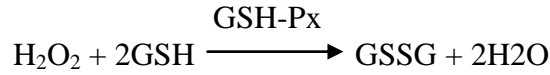
307.3 : GSH'nın molekül ağırlığı

P : Doku protein miktarı (% mg)

3.7.4. Glutasyon Peroksidaz Aktivite Tayini

Prensip

Kolon örneklerinde GSH-Px aktivitesi Paglia-Valentine (Paglia ve Valentine, 1967) yöntemine göre spektrofotometrik olarak belirlendi. Reaksiyon ortamına eklenen H₂O₂ varlığında, örnekteki GSH-Px aktivitesi ile GSH yükseltgenir. GSSG'nin, GRx aktivitesi ile tekrar indirgenmesi NADPH'nın yükseltgenmesine neden olur. NADPH'nın NADP⁺'ya yükseltgenmesi, GSSG'nin oluşum hızı oranındadır ve 366 nm dalga boyunda absorbanstaki azalma ile tespit edilir. GSH-Px aktivitesi, 366 nm dalga boyunda absorbanstaki azalmanın spektrofotometrik olarak okunmasıyla belirlendi.



Kullanılan çözeltiler:

- **PBS (0.25 M, pH 7):** KH₂PO₄ ve Na₂HPO₄·7H₂O kullanılarak ve 100 ml tampon çözeltide 2.5 mM EDTA ile 2.5 mM sodyum azid içerecek şekilde hazırlandı.
- **GSH:** 10 mM GSH ultra saf su ile her çalışmada taze olarak hazırlandı.
- **NADPH:** 2.5 mM NADPH ultra saf su ile her çalışmada taze olarak hazırlandı.
- **GRx:** 6 U/ml olacak şekilde PBS (0.25 M, pH 7) ile her çalışmada taze olarak hazırlandı.
- **H₂O₂:** 12 mM H₂O₂ ultra saf su ile her çalışmada taze olarak hazırlandı.

Yöntem

Kör ve örnekler 1 ml'lik kuvartz küvetlerin içinde sırasıyla aşağıdaki gibi hazırlandı.

Reaktifler	Kör	Örnek
PBS	400 µl	400 µl
GSH	100 µl	100 µl
NADPH	100 µl	100 µl
GRx	100 µl	100 µl
Ultra saf su	200 µl	-
Doku süpernatantı	-	200 µl
H₂O₂	100 µl	100 µl

Tüm reaktifler eklendikten sonra, kuvartz küvete en son H₂O₂ eklenerek reaksiyon başlatıldı. Örneklerin ve körün absorbansları 366 nm dalga boyunda ultra saf su körüne karşı 3 dakika boyunca birer dakika aralıklarla okundu. 1. ve 3. dakikalarda ölçülen absorbans değerleri kullanılarak, sonuçlar aşağıdaki formüle göre hesaplandı.

Hesaplama

$$\text{GSH-Px (U/dak/ml)} = \frac{\Delta_{\text{abs}} \text{ Ö} - \Delta_{\text{abs}} \text{ K}}{6.22} \times \frac{\text{Toplam hacim}}{\text{Doku süpernatantının hacmi}}$$

$$\text{Spesifik Aktivite (U/dak/g protein)} = \frac{\text{GSH-Px (U/dak/ml)}}{\text{Doku proteini (g/ml)}}$$

Δ_{abs} : 1 dakikadaki absorbans değişimi
 $6.22 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$: NADPH için molar ekstinksiyon katsayısı

3.7.5. Katalaz Aktivite Tayini

Prensip

Kolon dokusuna ait süpernatantlarda CAT aktivitesi Aebi (Aebi, 1984) yöntemine göre, spektrofotometrik olarak belirlendi. Bu yöntem, doku homojenatında bulunan CAT

enziminin, reaksiyon ortamına eklenen H₂O₂'yi parçalaması ile 240 nm dalga boyunda H₂O₂'nin absorbansının zamana bağlı olarak azalmasının ölçülmesi esasına dayanır.

Kullanılan çözeltiler:

- **PBS (50 mM, pH 7):** KH₂PO₄ ve Na₂HPO₄·2H₂O kullanılarak ultra saf suda hazırlandı.
- **H₂O₂:** 30 mM H₂O₂, PBS (50 mM, pH 7) ile her çalışmada taze olarak hazırlandı.

Yöntem

Kör ve örnekler kuvarz küvetlerin içinde aşağıdaki gibi hazırlandı.

Reaktif	Kör	Örnek
H ₂ O ₂	2 ml	2 ml
FTS	0.5 ml	-
Doku süpernatantı	-	0.5 ml

Örneklerin absorbansı 240 nm dalga boyunda köre karşı okundu. Enzim aktivitesi, 0. ve 1. dakikadaki absorbans değerlerinin farkı alınarak aşağıdaki formüle göre hesaplandı.

Hesaplama

$$\text{CAT (U/dak/ml)} = \frac{\Delta_{\text{abs}}}{0.0436} \times \frac{\text{Toplam hacim}}{\text{Doku süpernatantının hacmi}} \times \text{S.F}$$

$$\text{Spesifik Aktivite (U/dak/mg protein)} = \frac{\text{CAT (U/dak/ml)}}{\text{Doku proteini (mg/ml)}}$$

- Δ_{abs} : 1 dakikadaki absorbans değişimi
 $43.6 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$: H₂O₂ için molar ekstinksiyon katsayısı
 S.F : Seyreltme faktörü

3.7.6. Süperoksid Dismutaz Aktivite Tayini

Prensip

Kolon dokularındaki SOD aktivitesi Sun (Sun ve diğ., 1988) yöntemine göre, spektrofotometrik olarak belirlendi. Bu yöntem, reaksiyon ortamında enzimatik bir reaksiyon sonucu oluşan $O_2^{\cdot-}$ radikallerinin, ortamda bulunan nitroblue tetrazolium'u (NBT) indirgemesinin örnekteki süperoksid dismutaz enzimi tarafından engellenmesi esasına dayanır. Yöntemde $O_2^{\cdot-}$ radikali üretimi ksantin-ksantin oksidaz enzimatik reaksiyonu ile gerçekleşir. Bu şekilde oluşan $O_2^{\cdot-}$ radikalleri NBT ile reaksiyona girerek 560 nm dalga boyunda maksimum absorbanı veren mor renkli bir formazon oluşturur. Ortama ilave edilen enzimin, üretilen radikalleri dismutasyona uğratması sonucunda NBT indirgenme reaksiyonu yavaşlar ve sonuçta spektrofotometrede okunan absorbanı değeri düşer. Yani, formazon oluşumunun inhibisyonunun tespiti ile, örnekteki SOD aktivitesi indirekt olarak belirlenir.

Kullanılan çözeltiler:

- **Stok ksantin çözeltisi:** 3 mM stok ksantin çözeltisi 1 ml 0.1 N NaOH ile çözülerek, ultra saf su ile hacimce 10 ml'ye tamamlandı. Çözelti +4°C'de 1 hafta dayanıklıdır.
- **Ksantin çözeltisi:** 0.3 mM ksantin çözeltisi, stok ksantin çözeltisinden ultra saf su ile seyreltilerek her çalışmada taze olarak hazırlandı.
- **NaOH çözeltisi:** 0.1 N NaOH çözeltisi ultra saf su ile hazırlandı.
- **EDTA-Na₂ çözeltisi:** 0.6 mM EDTA-Na₂ çözeltisi ultra saf su ile çözülerek hazırlandı.
- **NBT çözeltisi:** 150 µM NBT çözeltisi ultra saf su ile her çalışmada taze olarak hazırlandı.
- **Na₂CO₃ çözeltisi:** 400 mM Na₂CO₃ çözeltisi ultra saf su ile hazırlandı.
- **BSA çözeltisi:** 1 g/l BSA çözeltisi ultra saf su ile hazırlandı.
- **Ksantin oksidaz çözeltisi:** 167 U/l olacak şekilde buz soğukluğunda (NH₄)₂SO₄ çözeltisi içinde her çalışmada taze olarak hazırlandı.
- **(NH₄)₂SO₄ çözeltisi:** 2 M (NH₄)₂SO₄, ultra saf su ile hazırlandı.

SOD çalışma solüsyonu: Her çalışmada taze olarak hazırlandı.

20 ml 0.3 mM Ksantin
 10 ml 0.6 mM EDTA-Na₂
 10 ml 150 µM NBT
 6 ml 400 mM Na₂CO₃
 3 ml 1 g/l BSA

Yöntem

500 µl doku homojenatı, 300 µl kloroform ve 500 µl %96 etanol ile karıştırılıp, 1 dakika vortekslendikten sonra 10.000 g'de +4°C'de 20 dakika santrifüj edildi ve yöntemde bu süpernatantlar kullanıldı.

Kör ve örnek tüpleri aşağıdaki gibi hazırlandı.

Reaktifler	Kör	Örnek
SOD çalışma solüsyonu	2.45 ml	2.45 ml
Doku süpernatantı	-	0.100 ml
Ultra saf su	0.100 ml	-
Ksantin oksidaz	0.050 ml	0.050 ml

Tüpler vortekslendikten sonra 25°C'lik su banyosunda 20 dakika inkübe edildi. Örnek ve kör tüpünde oluşan renkli bileşiğin absorbanı, 560 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ultra saf su körüne karşı okundu.

Hesaplama

$$\% \text{ inhibisyon} = \frac{K_{\text{abs}} - \ddot{O}_{\text{abs}}}{K_{\text{abs}}} \times 100$$

$$\text{SOD (U/ml)} = \frac{\% \text{ inhibisyon}}{50 \times \text{Doku süpernatantının hacmi}}$$

$$\text{Spesifik aktivite (U/mg protein)} = \frac{\text{SOD (U/ml)}}{\text{Doku proteini (mg/ml)}}$$

K_{abs} : Kör absorbansı
 Ö_{abs} : Örnek absorbansı
 50 : İnhibisyon katsayısı

3.7.7. Miyeloperoksidaz Tayini

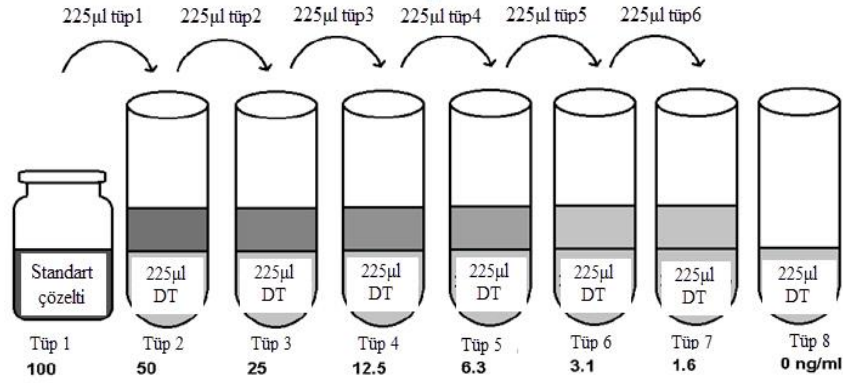
Prensip

Kolon dokularında MPO seviyelerinin belirlenmesi fareye spesifik MPO Sandwich ELISA Kiti (Hycult biotech-HK210) kullanılarak yapıldı. Yöntemin esası, fare MPO'suna spesifik antikor ile kaplı kuyucuklara eklenen örneklerdeki MPO'nun antikorlar tarafından yakalanmasına dayanır. Antikorlar ile kompleks oluşturan MPO, biyotinlenmiş sekonder antikor ile birleşir. Daha sonra ilave edilen streptavidin-peroksidaz konjugatı biyotinlenmiş sekonder antikora bağlanır. Peroksidaz, substratı olan 3,3',5,5'-tetrametilbenzidin (TMB) ile reaksiyona girerek mavi renkli ürün oluşumuna neden olur. Enzim reaksiyonu eklenen okzalik asit tarafından durdurulur. Okzalik asitin eklenmesiyle mavi renkli ürünün rengi sarıya dönüşür. Örnekte bulunan MPO konsantrasyonu, oluşan sarı renk ile doğru orantılıdır. Oluşan sarı renkli sıvının absorbansı 450 nm dalga boyunda ELISA okuyucu (Biotek Mikroquant-Mqx200) ile köre karşı okunur.

Kullanılan çözeltiler:

- **Yıkama tamponu:** 20x yıkama tamponundan, 1:20 oranında distile su ile sulandırılarak hazırlandı.
- **Dilüsyon tamponu:** 10x dilüsyon tamponu A ve 10x dilüsyon tamponu B, 1:5 oranında distile su ile sulandırıldı. Daha sonra, iki solüsyondan da eşit hacimlerde alınarak iyice karıştırıldı.
- **Standart çözelti:** Standart, analiz sertifikasında belirtildiği gibi, elde edilen çözeltinin konsantrasyonu 100 ng/ml olacak şekilde, dilüsyon tamponu ile çözüldü. Bu stok standart çözeltiden ependorf tüplerde dilüsyon tamponu ile seri

dilüsyonlar yapılarak 50, 25, 12.5, 6.3, 3.1, 1.6 ng/ml konsantrasyonlarda standart çalışma çözeltileri hazırlandı. Standart çözelti çözüldükten sonra 15 dakika içinde kullanıldı.



- **Biyotinli çözelti:** 1 ml distile suyla çözülerek stok biyotinli çözelti hazırlandı. Her deney öncesinde bu stok çözülden 1:12 oranında dilüsyon tamponu ile seyreltme yapılarak çalışma çözeltisi hazırlandı. Bu çözelti, +4°C'de 1 ay stabildir.
- **Streptavidin-peroksidaz solüsyonu:** 100x konsantre solüsyon kullanılmadan önce kısa süre spin atıldı. Her deney öncesinde stok solüsyondan 1:100 oranında seyreltme yapılarak çalışma solüsyonu hazırlandı.
- **TMB substrat:** Solüsyon renksiz olmalı ve ışıktan korunmalıdır.
- **Stop solüsyon**

Yöntem

Dokuların hazırlanması: 10 mg doku için 200 µl lizis tamponu (200 mM NaCl, 5 mM EDTA, 10 mM tris, % 10 gliserin, 1 mM PMSF, 1 µg/ml leupeptin ve 28 µg/ml aprotinin [pH:7,4]) eklenerek cam homojenizatör içinde kolon dokuları homojenize edildi. Daha sonra, örnekler 2 kere 1500 g'de 15 dakika +4°C'de santrifüj edildikten sonra süpernatantları kullanıldı. Ön denemelerle dilüsyon oranları tespit edildi.

Deneyden önce tüm çözeltiler ve örnekler oda sıcaklığına getirildi. Kör, standart ve örneklerden 100 µl, antikor ile kaplı olan kuyucuklara konuldu. Kör, standart ve örnekler çift tekrarlı çalışıldı. Kuyucukların üzeri kapatılarak 1 saat oda sıcaklığında

inkübe edildikten sonra tüm kuyucuklar yıkama tamponu ile yıkandı. Her bir kuyucuğa, 100 µl biyotinli çözeltiden eklenerek, kuyucukların üzeri kapatılıp, 1 saat oda sıcaklığında inkübe edildi. Tüm kuyucuklar yıkama tamponu ile yıkandıktan sonra 100 µl streptavidin peroksidaz solüsyonu uygulandı. Her bir kuyucuk kaplanarak 1 saat oda sıcaklığında inkübe edildi. İnkübasyondan sonra kuyucuklar yıkama tamponu ile yıkandıktan sonra TMB substrat solüsyonu eklendi. Bu aşamada kuyucuklar, güneş ışığına maruz kalmaması için alüminyum folyo ile kapatılarak karanlık bir ortamda ve oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edildi. Reaksiyon gelişip mavi renkli ürün oluştuğundan sonra aynı sıra ile kuyucuklara 100 µl stop solüsyon eklenerek reaksiyon durduruldu. ELISA okuyucuda 450 nm dalga boyunda absorbanlar köre karşı okundu.

Hesaplama

Tüm gruplara ait örneklerdeki MPO seviyeleri, fare MPO standart çalışma çözeltileri kullanılarak hazırlanan standart eğri üzerinden hesaplandı. Elde edilen sonuçlar, sulandırma faktörü ile çarpıldı. Her örnek için mg protein başına düşen MPO miktarı hesaplandı.

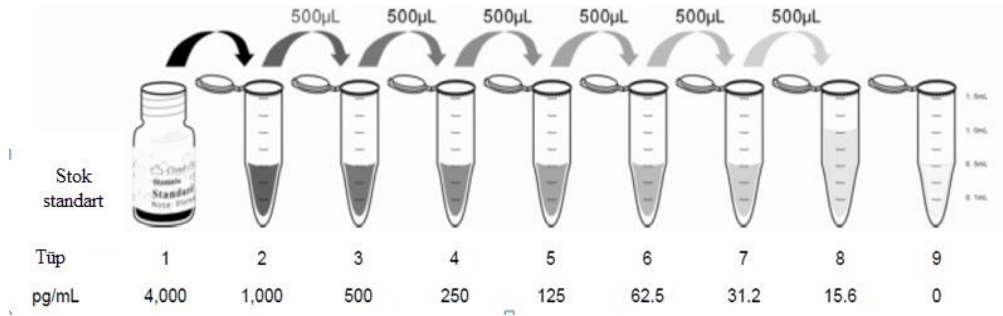
3.7.8. Tümör Nekroz Faktör- α Tayini

Prensip

Kolon dokularında TNF- α seviyelerinin belirlenmesi, fareye spesifik TNF- α Sandwich ELISA Kiti (USCN, *Cloud-Clone Corp.*-SEA133Mu) kullanılarak, ELISA yöntemi ile yapıldı. Yöntem, fare TNF- α 'sına spesifik antikor ile kaplı kuyucuklara eklenen örneklerdeki TNF- α 'nın antikorlar tarafından yakalanması esasına dayanır. Kuyucuklara uygulanan örneklerde mevcut olan TNF- α , biyotinle konjuge spesifik antikora bağlanır. Bu aşamadan sonra avidin ile konjuge Horseradish Peroxidase reaksiyon ortamına eklenir ve TMB substrat solüsyonu ilavesinden sonra, sadece TNF- α 'ya bağlı biyotinle konjuge antikor - enzime konjuge avidin kompleksi içeren kuyucuklarda reaksiyon gelişerek, renk değişimi olur. Enzim-substrat reaksiyonu sülfürik asit solüsyonunun eklenmesi ile sonlandırılır ve renk değişikliği ELISA okuyucuda 450 nm dalga boyunda ölçülür.

Kullanılan çözeltiler:

- **Yıkama tamponu:** 30x yıkama tamponundan, 1:30 oranında distile su ile sulandırılarak hazırlandı.
- **Belirtme Reaktifi A ve Belirtme Reaktifi B:** İki solüsyon da kullanılmadan önce spin atıldı ve sırasıyla sulandırma solüsyonu A ve B ile 1:100 oranında seyreltilerek hazırlandı.
- **Standart çözelti:** Standart, 1 ml standart sulandırma solüsyonu ile çözüldü ve 10 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Elde edilen stok çözeltinin konsantrasyonu 4000 pg/ml'dir. Bu stok çözeltilerden ependorf tüplerde standart sulandırma solüsyonu ile seri dilüsyonlar yapılarak 1000, 500, 250, 125, 62.5, 31.2 ve 15.6 pg/ml'lik konsantrasyonlarda standart çalışma çözeltileri hazırlandı. Standart çözelti çözüldükten sonra 15 dakika içinde kullanıldı.



- **TMB substrat:** Solüsyon renksiz olmalı ve ışıktan korunmalıdır. Steril pipet uçları ile gerekli miktardaki solüsyon kullanıldı.
- **Stop solüsyon**

Yöntem

Dokuların hazırlanması: Kolon dokuları buz soğukluğunda PBS (0.01 M, pH: 7.2) ile % 10 oranında sulandırılarak, cam homojenizatör içinde homojenize edildi. Elde edilen homojenatlara hücre membranlarının lizisi için 6 kere 10 saniyelik sürelerle ultrasonikasyon yapıldı ve homojenatlar, 5000 g'de +4°C'de 5 dakika santrifüj edildikten sonra süpernatantlar örnek olarak kullanıldı.

Deneyden önce tüm çözeltiler ve örnekler oda sıcaklığına getirildi. Kuyucuklara kör, standart ve örneklerden 100'er µl eklenerek üstleri kaplandı. 37°C'lik etüvde 2 saat inkübe edildi. Kuyucuklardaki sıvılar uzaklaştırıldı ve yıkama yapılmaksızın tüm kuyucuklara 100 µl Belirtme Reaktifi A konuldu. Tüm kuyucukların üstleri kaplanarak, 37°C'lik etüvde 1 saat inkübe edildi. İnkübasyon süresinin sonunda, tüm kuyucuklar yıkama tamponu ile yıkanarak, 100 µl Belirtme Reaktifi B uygulandı. 37°C'lik etüvde 30 dakikalık bir inkübasyondan sonra yıkama tamponu ile yıkama yapıldı. Daha sonra, her kuyucuğa 90 µl TMB substrat solüsyonu eklendi ve kuyucuklar ışıktan etkilenmeyecek şekilde alüminyum folyo ile kaplanarak, 37°C'lik etüvde 25 dakika inkübe edildi. TMB substrat eklendikten sonra, mavi renkli ürünün oluşumu her 10 dakikada bir kontrol edildi. Renk oluşum reaksiyonu gerçekleştikten sonra, her bir kuyucuğa aynı sıra ile 50 µl stop solüsyon eklenerek, oluşan mavi rengin sarıya dönüşmesiyle reaksiyon durduruldu. Absorbanslar 450 nm dalga boyunda ELISA okuyucuda okundu.

Hesaplama

TNF- α standart çalışma çözeltilerine göre çizilen standart grafik yardımıyla, örneklerdeki TNF- α seviyeleri hesaplandı. Her örnek için, mg protein başına düşen TNF- α miktarı belirlendi.

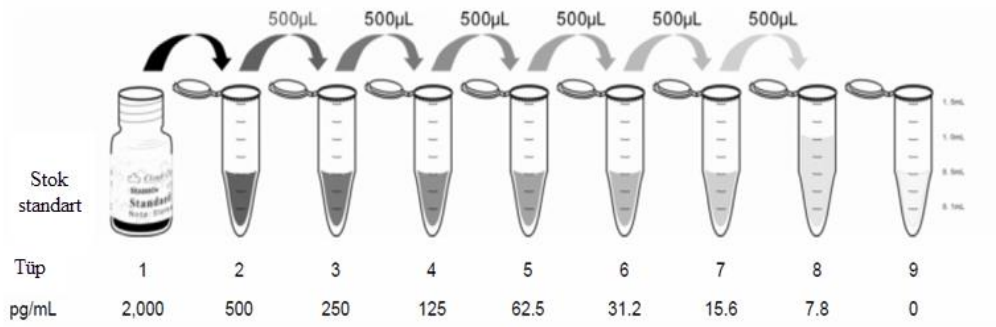
3.7.9. İnterlökin-10 Seviyelerinin Belirlenmesi

Prensip

Kolon dokularında IL-10 seviyelerinin belirlenmesi fareye spesifik IL-10 Sandwich ELISA Kiti (USCN, *Cloud-Clone Corp.*-SEA056Mu) kullanılarak ELISA yöntemiyle yapıldı. Yöntem, fare IL-10'a spesifik antikor ile kaplı kuyucuklara eklenen örneklerdeki IL-10'un antikorlar tarafından yakalanması esasına dayanır. Kuyucuklara uygulanan örneklerde mevcut olan IL-10 biyotinle konjuge spesifik antikora bağlanır. Avidin ile konjuge Horseradish Peroxidase reaksiyon ortamına eklenir ve TMB substrat solüsyonu ilavesinden sonra, sadece IL-10'a bağlı biyotinle konjuge antikor - enzime konjuge avidin kompleksi içeren kuyucuklarda reaksiyon gelişerek, renk değişimi olur. Enzim-substrat reaksiyonu sülfürik asit solüsyonunun eklenmesi ile sonlandırılır ve renk değişikliği, ELISA okuyucuda 450 nm dalga boyunda ölçülür.

Kullanılan çözeltiler:

- **Yıkama tamponu:** 30x yıkama tamponundan, 1:30 oranında distile su ile sulandırılarak hazırlandı.
- **Belirleme Reaktifi A ve Belirleme Reaktifi B:** İki solüsyona da kullanılmadan önce spin atıldı ve sırasıyla sulandırma solüsyonu A ve B ile 1:100 oranında seyreltilerek hazırlandı.
- **Standart çözelti:** Standart, 1 ml standart sulandırma solüsyonu ile çözüldü ve 10 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Elde edilen stok çözeltinin konsantrasyonu 2000 pg/ml'dir. Bu stok çözeltiden ependorf tüplerde standart sulandırma solüsyonu ile seri dilüsyonlar yapılarak 500, 250, 125, 62.5, 31.2, 15.6 ve 7.8 pg/ml'lik konsantrasyonlarda standart çalışma çözeltileri hazırlandı. Standart çözelti çözüldükten sonra 15 dakika içinde kullanıldı.



- **TMB substrat:** Solüsyon renksiz olmalı ve ışıktan korunmalıdır. Steril pipet uçları ile gerekli miktardaki solüsyon kullanıldı.
- **Stop solüsyon**

Yöntem

Dokuların hazırlanması: Dokular buz soğukluğunda PBS (0.01 M, pH: 7.2) ile % 10 oranında sulandırılarak, cam homojenizatör içinde homojenize edildi. Elde edilen homojenatlara hücre membranlarının lizisi için 6 kere 10 saniyelik sürelerle

ultrasonikasyon yapıldı ve homojenatlar, 5000 g'de +4°C'de 5 dakika santrifüj edildikten sonra süpernatantlar örnek olarak kullanıldı.

Deneyden önce tüm çözeltiler ve örnekler oda sıcaklığına getirildi. Kuyucuklara kör, standart ve örneklerden 100 µl eklenerek üstleri kaplandı. 37°C'lik etüvde 2 saat inkübe edildi. Kuyucuklardaki sıvılar uzaklaştırıldı ve yıkama yapılmaksızın tüm kuyucuklara 100 µl Belirtme Reaktifi A konuldu. Tüm kuyucukların üstleri kaplanarak, 37°C'lik etüvde 1 saat inkübe edildi. İnkübasyon süresinin sonunda, tüm kuyucuklar yıkama tamponu ile yıkanarak, 100 µl Belirtme Reaktifi B uygulandı. 37°C'lik etüvde 30 dakikalık bir inkübasyondan sonra yıkama tamponu ile yıkama yapıldı. Daha sonra, her kuyucuğa 90 µl TMB substrat solüsyonu eklendi ve kuyucuklar ışıktan etkilenmeyecek şekilde alüminyum folyo ile kaplanarak 37°C'lik etüvde 25 dakika inkübe edildi. TMB substrat eklendikten sonra mavi renkli ürünün oluşumu her 10 dakikada bir kontrol edildi. Renk oluşum reaksiyonu gerçekleştikten sonra, her bir kuyucuğa aynı sıra ile 50 µl stop solüsyon eklenerek, oluşan mavi rengin sarıya dönüşmesiyle reaksiyon durduruldu. Absorbanslar 450 nm dalga boyunda ELISA pleyt okuyucuda okundu.

Hesaplama

IL-10 standart çalışma çözeltilerine göre çizilen standart grafik yardımıyla örneklerdeki IL-10 seviyeleri hesaplandı. Her örnek için mg protein başına düşen IL-10 miktarları belirlendi.

3.7.10. İstatistiksel Analizler

Veriler, SPSS 15.0 istatistik programı kullanılarak değerlendirildi. Tüm parametreler için öncelikle normalite testi ve varyansların homojenliği testi uygulandı. HAİ, histolojik hasar skoru ile Ki-67 immünohistokimyasına ait veriler normal dağılıma uymadıkları için, tüm grupları karşılaştırmak amacıyla yapılan nonparametrik Kruskal-Wallis testini takiben, ikili gruplar arasında Mann-Whitney U testi kullanıldı. Diğer tayinlere ait veriler için, tek yönlü ANOVA ve Post Hoc-Tukey testini takiben, ikili gruplar arasında bağımsız t-testi kullanıldı. Sonuçlar "ortalama ± standart hata" olarak verildi ve $p < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

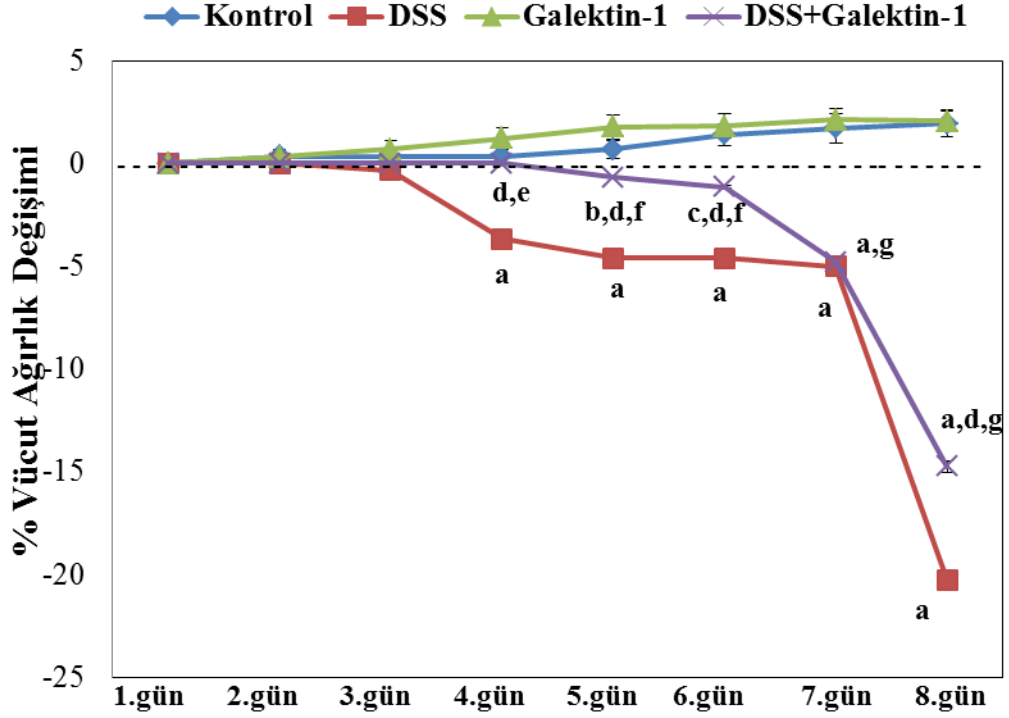
4. BULGULAR

4.1. FARELERDE AĞIRLIK DEĞİŞİMLERİNE AİT BULGULAR

Deney süresince gruplara göre farelerin vücut ağırlıklarındaki % değişimler Tablo 4.1 ve Şekil 4.1'de gösterilmiştir. Ölçümler sonucunda, deneyin ilk üç günü vücut ağırlıklarının % değişiminde gruplar arasında anlamlı bir farklılık saptanmamıştır. 7 günlük enjeksiyon sonunda % ağırlık değişimlerinde kontrol grubu ve galektin-1 enjekte edilen grupta, istatistiksel olarak anlamlı olmayan hafif bir artış gözlenmiştir. Galektin-1 verilen grupta 4. ve 5. günlerde kontrol grubuna göre hafif bir artış olmasına rağmen, bu artış istatistiksel olarak anlamlı olmamıştır ve deney boyunca galektin-1 verilen farelerin % vücut ağırlıklarında, kontrol grubuna göre önemli bir artma kaydedilmemiştir. Kolit belirtilerinin gözleendiği deneyin 4. gününden itibaren tüm deney süresince, DSS verilen gruptaki farelerin vücut ağırlıklarında, kontrol grubuna göre istatistiksel olarak önemli bir azalma gözlenmiştir ($p < 0.001$). Bunun yanı sıra, DSS grubunda hayvan ağırlıklarındaki en belirgin azalma ise son DSS uygulamasından sonraki 24 saat içerisinde meydana gelmiştir (-% 20.25). Deneyin 5. ve 8. günleri arasında DSS+galektin-1 grubunun % vücut ağırlıklarında, kontrol grubuna göre anlamlı bir düşüş tespit edilmiştir (5. gün $p < 0.05$, 6. gün $p < 0.01$, 7. ve 8. gün $p < 0.001$). DSS+galektin-1 grubundaki farelerin deneyin 4. ve 8. günleri arasındaki % vücut ağırlıklarında, sadece galektin-1 enjeksiyonu yapılan gruba göre de anlamlı bir azalma saptanmıştır (4. gün $p < 0.05$, 5. ve 6. gün $p < 0.01$, 7. ve 8. gün $p < 0.001$). Ancak, DSS grubuna galektin-1'in ön enjeksiyonu farelerin vücut ağırlıklarını, yalnızca DSS verilen kolit grubuna göre deneyin 4. gününden itibaren deney süresince (7. gün hariç) istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde arttırmıştır ($p < 0.001$). Bununla birlikte, bu gruptaki hayvan ağırlıkları kontrol grubundaki bireylerin % değerlerine ulaşamamıştır.

Tablo 4.1: Gruplara göre deney süresince farelerin vücut ağırlıklarındaki yüzde değişimler
(Ortalama \pm Standart hata).

Gruplar	1.gün	2.gün	3.gün	4.gün	5.gün	6.gün	7.gün	8.gün
Kontrol	0.00 \pm 0.00	0.35 \pm 0.35	0.35 \pm 0.35	0.35 \pm 0.35	0.69 \pm 0.45	1.41 \pm 0.53	1.71 \pm 0.7	1.94 \pm 0.63
DSS	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	-0.34 \pm 0.03	-3.67 \pm 0.11	-4.60 \pm 0.19	-4.60 \pm 0.23	-5.00 \pm 0.15	-20.25 \pm 0.25
Galektin-1	0.00 \pm 0.00	0.33 \pm 0.33	0.69 \pm 0.45	1.24 \pm 0.47	1.80 \pm 0.59	1.82 \pm 0.59	2.14 \pm 0.54	2.07 \pm 0.52
DSS+ galektin-1	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	-0.68 \pm 0.01	-1.13 \pm 0.08	-4.78 \pm 0.28	-14.75 \pm 0.29

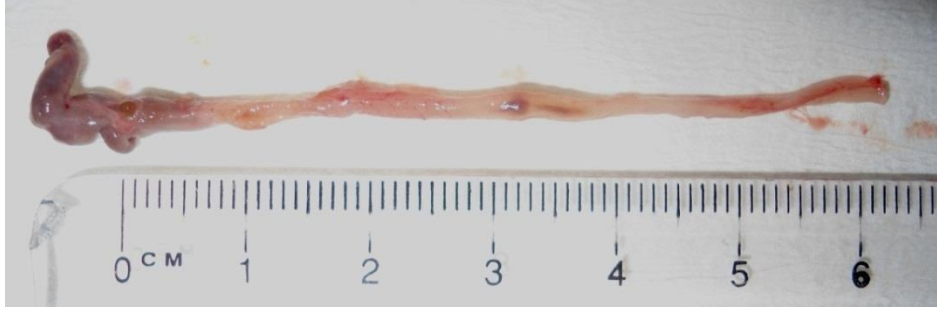


Şekil 4.1: Gruplara göre farelerin % vücut ağırlık değişimleri.

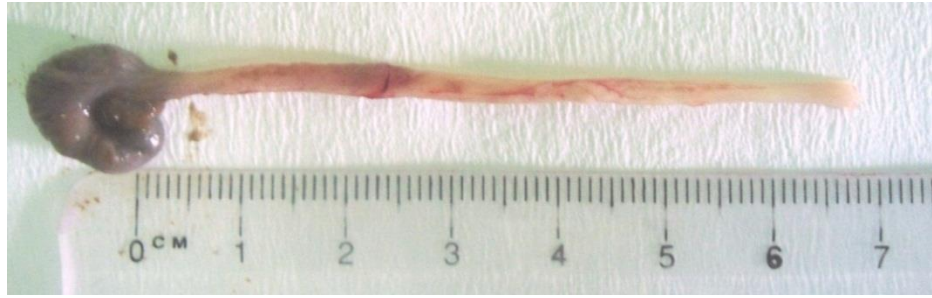
- ^aKontrol grubuna göre (p<0.001). ^bKontrol grubuna göre (p<0.05).
^cKontrol grubuna göre (p<0.01). ^dDSS grubuna göre (p<0.001).
^eGalektin-1 grubuna göre (p<0.05). ^fGalektin-1 grubuna göre (p<0.01).
^gGalektin-1 grubuna göre (p<0.001).

4.2. FARELERDE KOLON UZUNLUĞUNUN ÖLÇÜMÜNE AİT BULGULAR

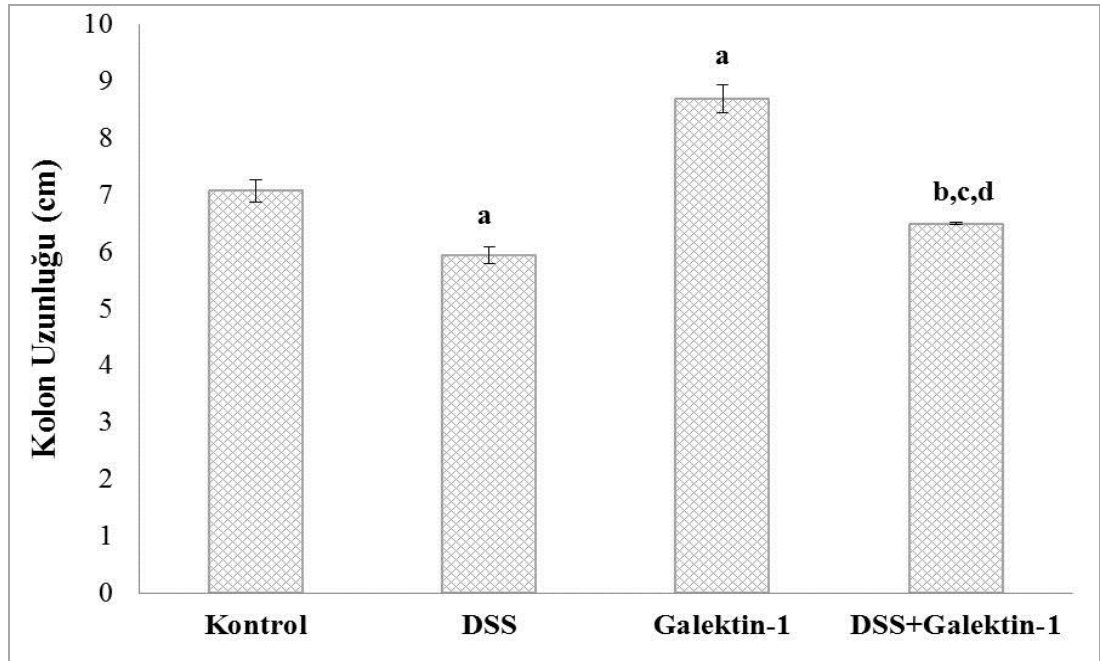
Farelerin kolon uzunluklarında oluşan değişiklikler Şekil 4.2, Şekil 4.3 ve Şekil 4.4'te gösterilmiştir. Kolon dokularının uzunluğunun ölçümünde, DSS verilen grupta, kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir azalma (p<0.001); galektin-1 enjekte edilen grupta ise kontrol grubuna göre önemli bir artış (p<0.001) saptanmıştır. DSS verilen gruba galektin-1 ön uygulaması, kolon uzunluğunda kontrol grubuna göre (p<0.05) ve galektin-1 uygulanan gruba göre (p<0.001) bir azalma göstermekle birlikte; DSS verilen gruba göre istatistiksel olarak anlamlı bir artış göstermiştir (p<0.01).



Şekil 4.2: DSS grubuna ait fare kolonu.



Şekil 4.3: DSS+galektin-1 grubuna ait fare kolonu.



Şekil 4.4 : Gruplara göre kolon uzunluğu ölçüm değerleri (Ortalama ± Standart hata).

Kontrol: 7.08 ± 0.20 , **DSS:** 5.95 ± 0.15 , **Galektin-1:** 8.70 ± 0.25 ,

DSS+galektin-1: 6.50 ± 0.02 .

^aKontrol grubundan farklı ($p < 0.001$).

^cDSS grubundan farklı ($p < 0.01$).

^bKontrol grubundan farklı ($p < 0.05$).

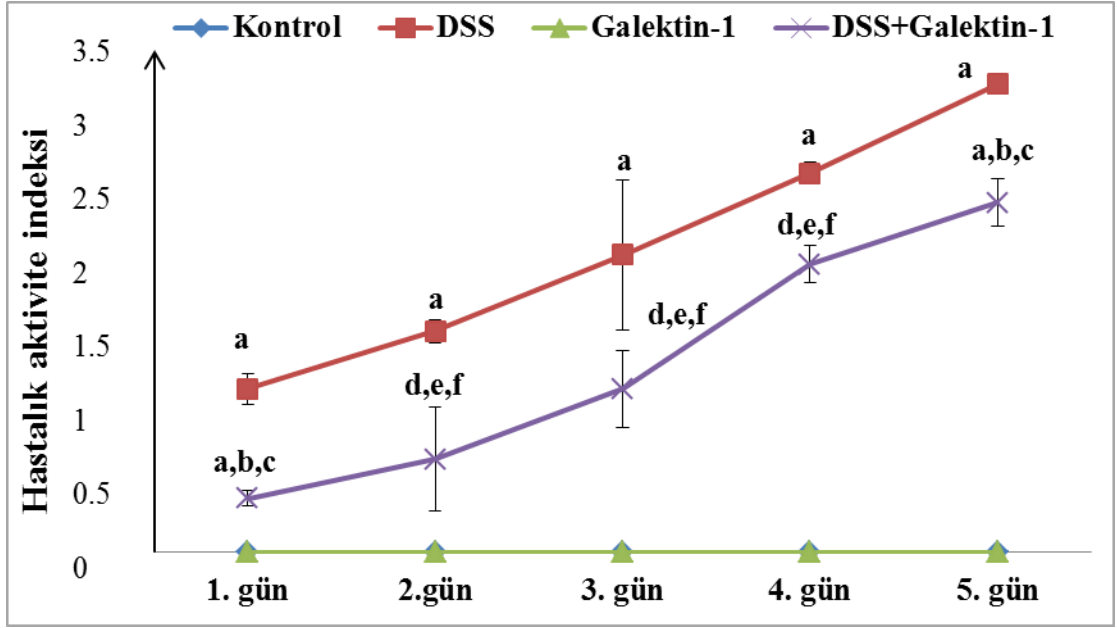
^dGalektin-1 grubundan farklı ($p < 0.001$).

4.3. HASTALIK AKTİVİTE İNDEKSLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİNE AİT BULGULAR

Gruplara göre hayvanlara DSS uygulamasını takiben 5 gün boyunca tespit edilen hastalık aktivite indeksleri (HAİ) Tablo 4.2 ve Şekil 4.5'te özetlenmiştir. Deney boyunca tüm farelere ait HAİ, her bir birey için günlük olarak hesaplanmıştır. Gözlemler sonucunda, HAİ'nin kolit oluşumu ile birlikte belirgin olarak yükseldiği tespit edilmiştir. Deneyin DSS uygulanmaya başlandıktan sonraki tüm günlerinde HAİ'nin, kolit grubunda kontrol grubuna göre, istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde yüksek olduğu belirlenmiştir ($p<0.001$). Aynı şekilde, DSS+galektin-1 grubundaki farelerde de, DSS uygulamasının ardından hem kontrol grubundaki farelere göre hem de sadece galektin-1 verilen farelere göre HAİ'de günlük olarak anlamlı artışlar görülmüştür (1. ve 5. gün $p<0.001$; 2., 3. ve 4. gün $p<0.01$). Bununla birlikte yalnızca DSS uygulanan kolit grubunda HAİ, DSS verilmesini takiben tüm günler, DSS+galektin-1 grubundan istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (1. ve 5. gün $p<0.001$; 2., 3. ve 4. gün $p<0.01$). Hem DSS verilen kolit grubunda hem de DSS+galektin-1 uygulanan grupta en yüksek HAİ değerlerine, DSS uygulamasının 5. gününde ulaşılmıştır. Ancak HAİ, DSS+galektin-1 grubunda, DSS uygulamasının yapıldığı tüm günlerde DSS verilen farelerdekenden düşük seviyelerde seyretmektedir. Bu durumda galektin-1 ön uygulamasının DSS'nin etkisini hafiflettiği söylenebilir. Ayrıca, HAİ'nin değerlendirilmesindeki parametrelerden biri olan rektumda görünür kan bulunması, DSS uygulamasının son gününde DSS kolit grubundaki tüm farelerde gözlenmiştir. Bununla birlikte, iyileştirme grubundaki birkaç farede hafif derecede kanlı rektum görülmüştür. Tüm gruplara ait farelerin rektum görüntüleri Şekil 4.6, Şekil 4.7, Şekil 4.8 ve Şekil 4.9'da gösterilmiştir.

Tablo 4.2: Gruplara göre kolit oluşturduktan sonraki günlerde hastalık aktivite indeksleri (Ortalama \pm Standart hata).

Gruplar	1.gün	2.gün	3.gün	4.gün	5.gün
Kontrol	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00
DSS	1.16 \pm 0.30	1.57 \pm 0.23	2.12 \pm 0.53	2.70 \pm 0.21	3.33 \pm 0.00
Galektin-1	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00
DSS+galektin-1	0.38 \pm 0.13	0.66 \pm 0.36	1.16 \pm 0.27	2.05 \pm 0.32	2.49 \pm 0.40



Şekil 4.5: Gruplara göre günlük hastalık aktivite indeksleri.

^aKontrol grubuna göre ($p < 0.001$).

^bKontrol grubuna göre ($p < 0.01$).

^cDSS grubuna göre ($p < 0.001$).

^dDSS grubuna göre ($p < 0.01$).

^eGalektin-1 grubuna göre ($p < 0.001$).

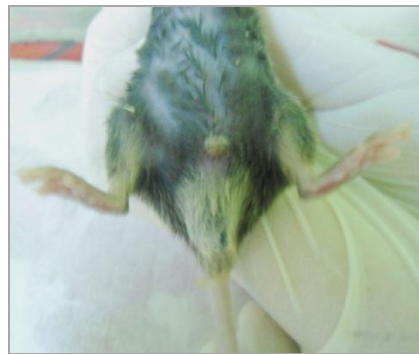
^fGalektin-1 grubuna göre ($p < 0.01$).



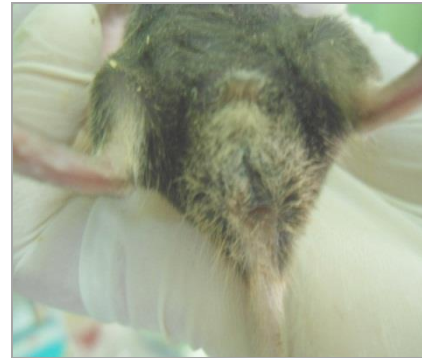
Şekil 4.6: Kontrol grubu rektum



Şekil 4.7: Kolit grubu rektum



Şekil 4.8: Galektin-1 grubu rektum.



Şekil 4.9: DSS+gal-1 grubu rektum

4.4. HİSTOPATOLOJİK BULGULAR

4.4.1. Kontrol Grubuna Ait Bulgular

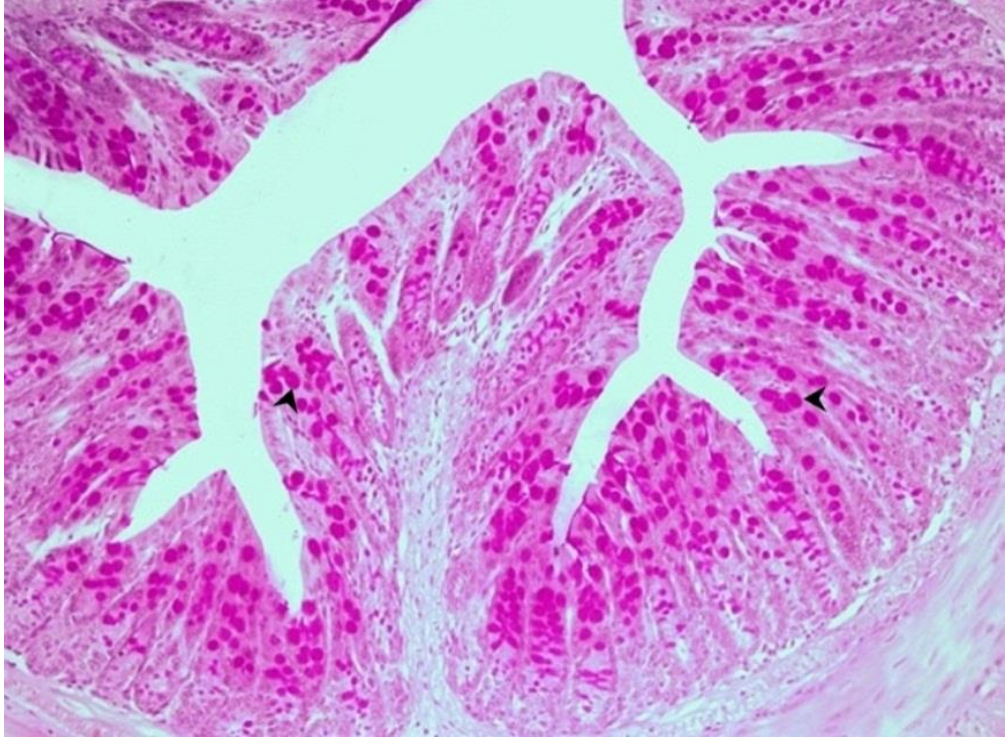
Kolonun distal bölgesine ait mukoza tek tabakalı silindirik epitel ile çevrili olup, Lieberkühn kriptaları (bezleri) olarak adlandırılan lamina propreanın içeriye doğru uzanarak oluşturduğu basit tübüler bez yapılarına sahiptir. Yüzey epiteli ve kriptaları başlıca 4 adet farklı hücre tipi oluşturmaktadır. Epitelde ağırlıklı olarak mukus salgılayan goblet hücreleri bulunmaktadır. Apikal yüzeyinde mikrovilluslar içeren, besinlerin, elektrolitlerin ve sıvıların emiliminden sorumlu olan emici hücreler (enterositler), goblet hücrelerine oranla epitelde daha az bulunmakla birlikte, kriptaların taban kısımlarında bulunan ve emici hücrelerle goblet hücrelerine kaynak veren kök hücreler ve parakrin hormonlar salgılayan enteroendokrin hücreler de epitelde daha seyrek olarak yer almaktadır. Kontrol grubuna ait histolojik kesitlerde, sağlıklı ve normal bir görünüm hakimdir (Şekil 4.10, Şekil 4.11). Bu grupta goblet hücrelerinde görülen PAS pozitif reaksiyon yaygın ve şiddetlidir (Şekil 4.12).



Şekil 4.10 : Kontrol grubuna ait farenin distal kolon dokusunun genel histolojik görünümü. HE. Orijinal büyütme x100.



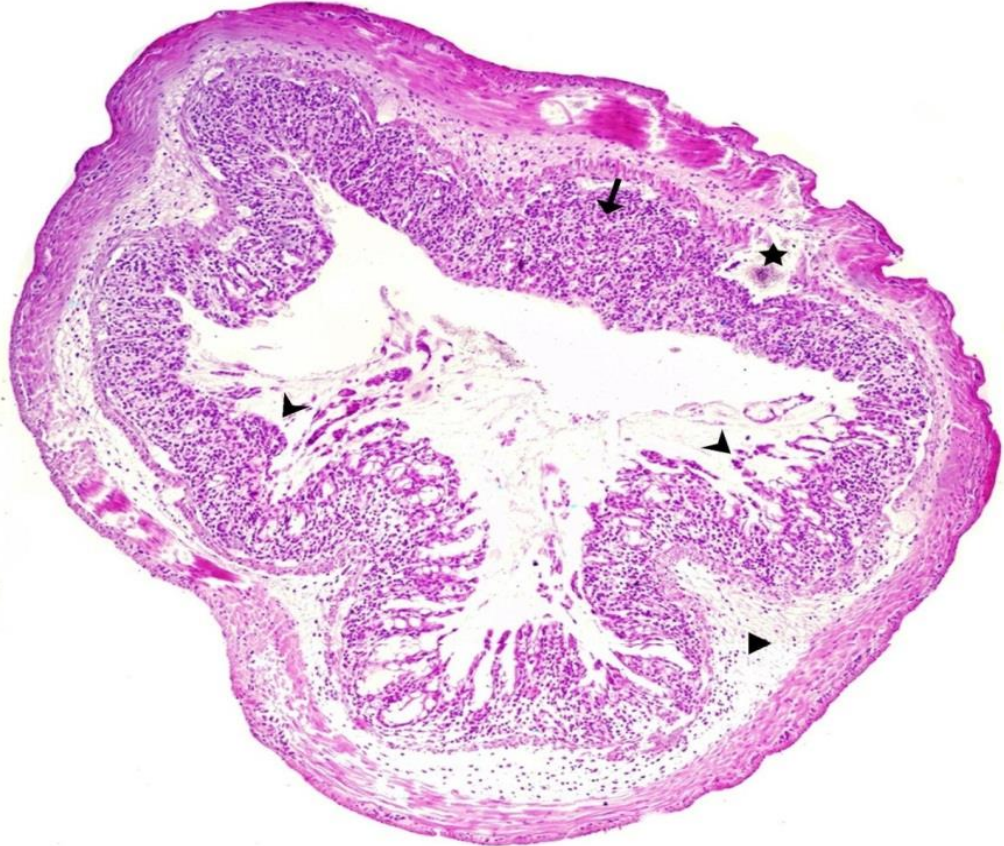
Şekil 4.11: Kontrol grubuna ait farenin distal kolon dokusunun histolojik görünümü. Yüzey epitelinin bütünlüğü ve düzgün kripler dikkat çekmektedir. HE. Orijinal büyütme x200.



Şekil 4.12: Kontrol grubuna ait farenin distal kolonuna ait kesitlerdeki goblet hücrelerinde (➤) gözlenen şiddetli ve yaygın PAS pozitif reaksiyon. PAS. Orijinal büyütme x200.

4.4.2. DSS Verilen Gruba Ait Bulgular

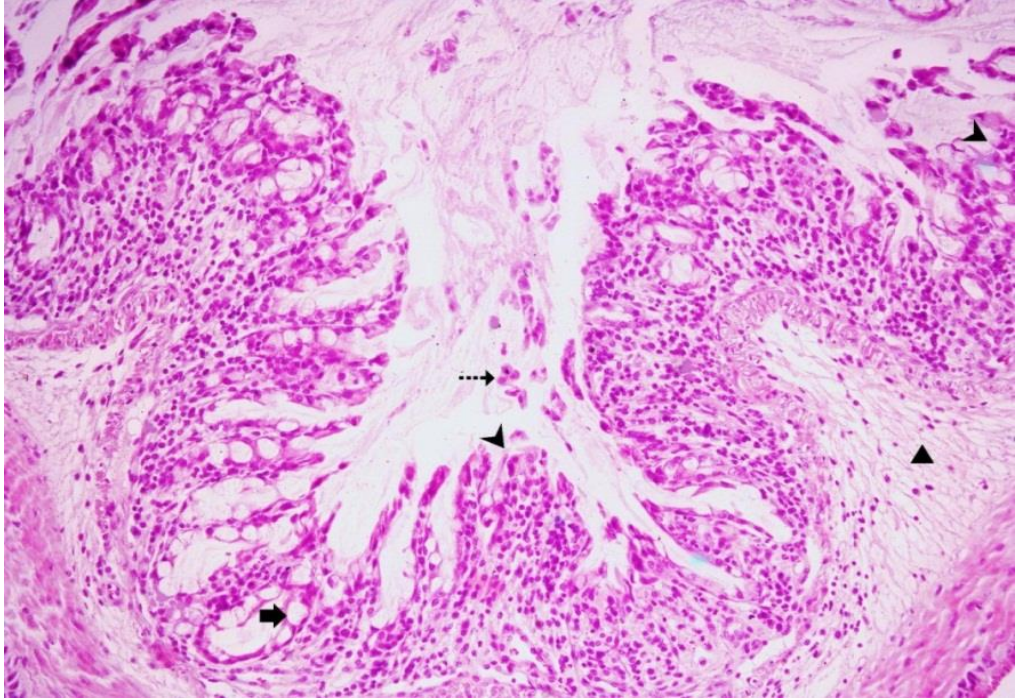
DSS verilen gruba ait farelerin distal kolonlarında, kontrol grubundaki bireylerle karşılaştırıldığında histolojik olarak belirgin bir hasar saptanmıştır. Bu grupta belirgin olarak gözlenen bulgular mukozada ve bazı bireylerin submukozalarında yaygın inflamatuvar hücre infiltrasyonu ve yaygın submukozal ödem ile ileri derecede akut inflamasyon, fokal mukozal bozulma, yüzey epitelinin yer yer hasarı ile yüzeysel erozyon, kript bütünlüğünde bozulma ile epitel ve kriptlerin yaygın kaybı, mukoza ve/veya submukozada yer yer nekrotik alanlar ve yaygın goblet hücre kaybıdır. Bunlara ek olarak, mukozal epiteldeki lezyonlar sonucunda bezlerden koparak bağırsak lümenine dökülen piknotik nükleuslu nekrotik hücrelerin ve özellikle kript hücrelerinde vakuolar hidropik dejenerasyon bu gruba ait bireylerin histolojik incelemeleri sırasında dikkati çekmiştir (Şekil 4.13-17).



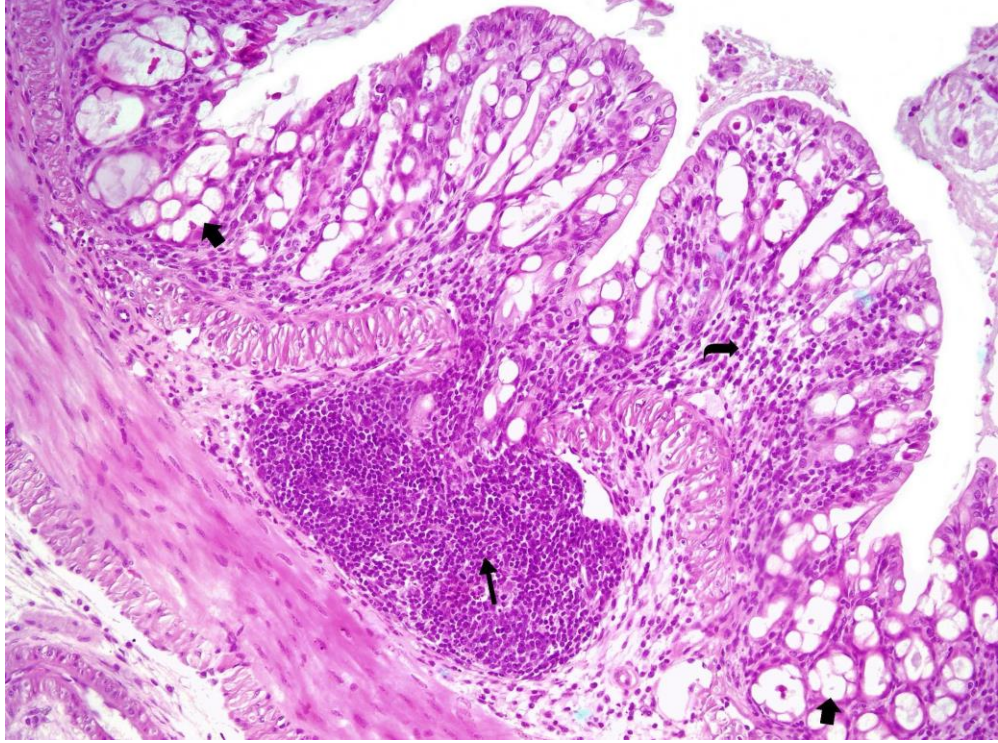
Şekil 4.13: DSS verilen gruba ait farenin distal kolon dokusunun genel histolojik görünümü. Mukozada inflamatuvar hücre infiltrasyonu (→), submukozada ödem (►), fokal mukozal bozulma (▶), mukoza ve submukozaya yayılan nekroz (★), tamamen bozulmuş kript yapısı ve yaygın kript kaybı gözlenmektedir. HE. Orijinal büyütme x100.



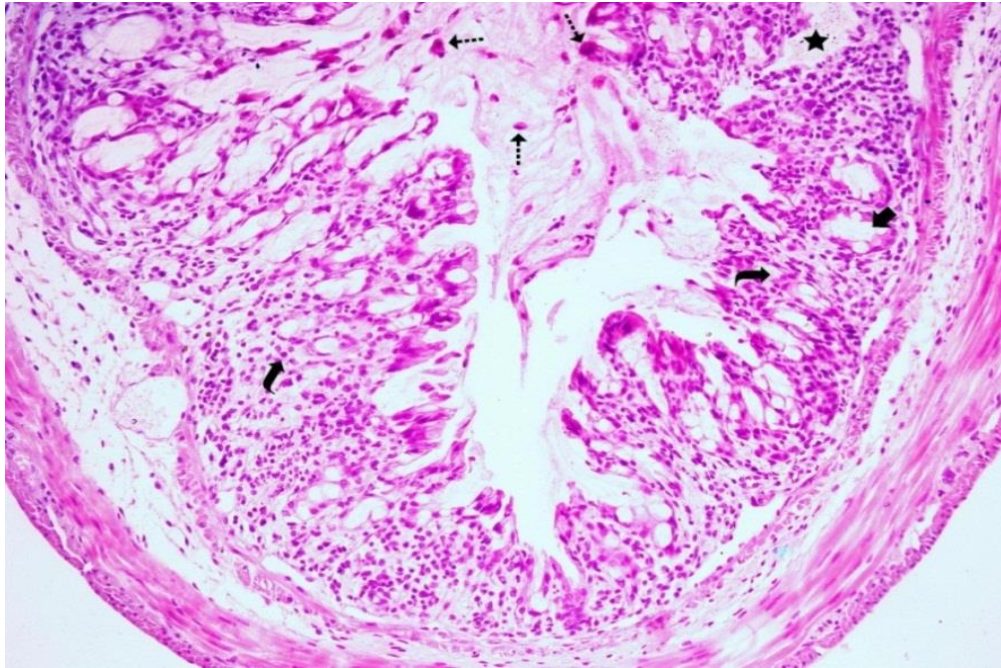
Şekil 4.14: DSS verilen gruba ait farenin distal kolon dokusunun genel histolojik görünümü. Mukozada yaygın inflamatuvar hücre infiltrasyonu (→), submukozada ödem (►), mukozal bozulma (▷), mukozal ve submukozada nekrotik alan (★) ve yaygın kript kaybı görülmektedir. HE. Orijinal büyütme x100.



Şekil 4.15: DSS verilen gruba ait farenin distal kolon dokusunun histolojik görünümü. Submukozal ödem (►), mukozal bütünlükte bozulma (▷), bağırsak lümenine atılmış nekrotik hücreler (⇢), kript hücrelerinde vakuolar hidropik dejenerasyon (◆) ve kript yapısında yaygın bozulmalar gözlenmektedir. HE. Orijinal büyütme x200.

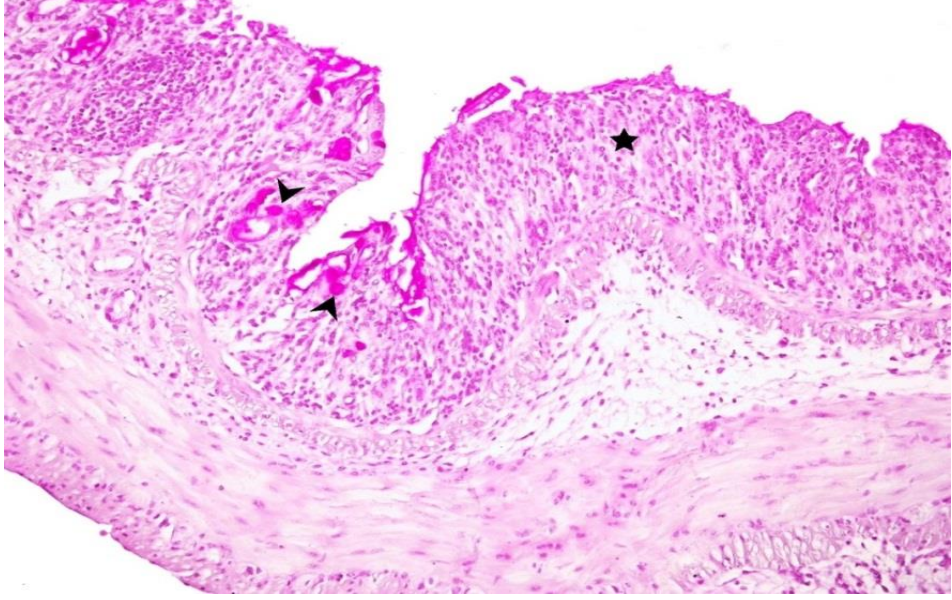


Şekil 4.16: DSS verilen gruba ait farenin distal kolon dokusunun histolojik görünümü. Submukozaya yayılan inflamatuvar hücre infiltrasyonu (→), kript hücrelerinde vakuolar hidropik dejenerasyon (➡) ve kript kaybı (↔) gözlenmektedir. HE. Orijinal büyütme x200.

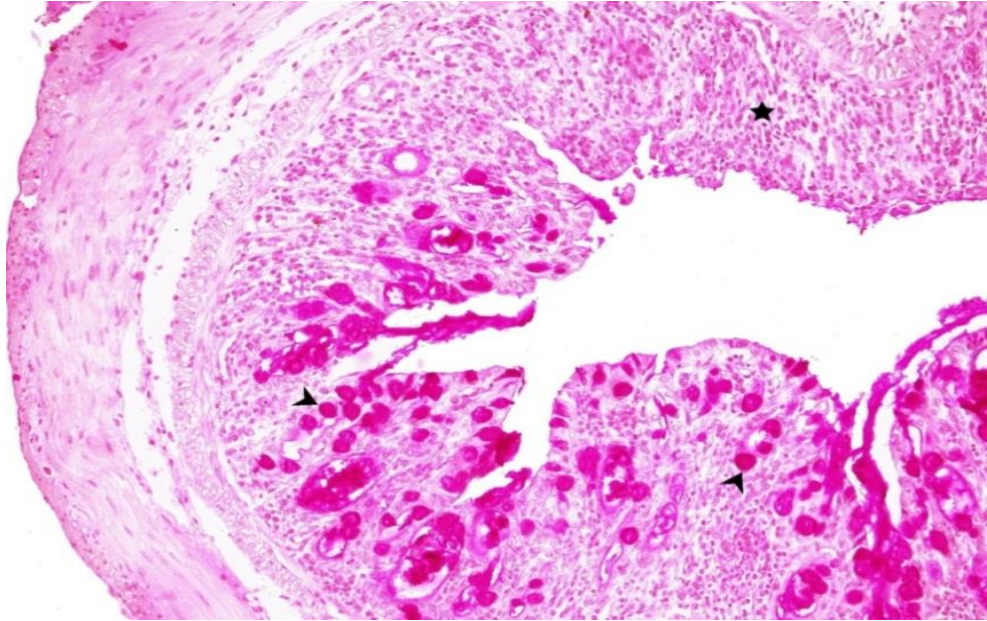


Şekil 4.17: DSS verilen gruba ait farenin distal kolon dokusunun histolojik görünümü. Kript hücrelerinde vakuolar hidropik dejenerasyon (➡), bağırsak lümenine atılmış piknotik nukleuslu nekrotik hücreler (↔), mukozada nekrotik alan (★), tamamen bozulmuş kript yapısı ve yaygın kript kaybı (↔) görülmektedir. HE. Orijinal büyütme x200.

Bu grupta goblet hücrelerinde gözlenen PAS pozitif reaksiyonunun şiddeti ve yaygınlığı kontrol grubundakine oranla belirgin olarak azalmakla birlikte, yaygın kript hasarının görüldüğü ve yoğun goblet hücre kaybının olduğu kesitlerde PAS ile negatif reaksiyon veren mukozal bölgeler de bulunmaktadır (Şekil 4.18, Şekil 4.19).



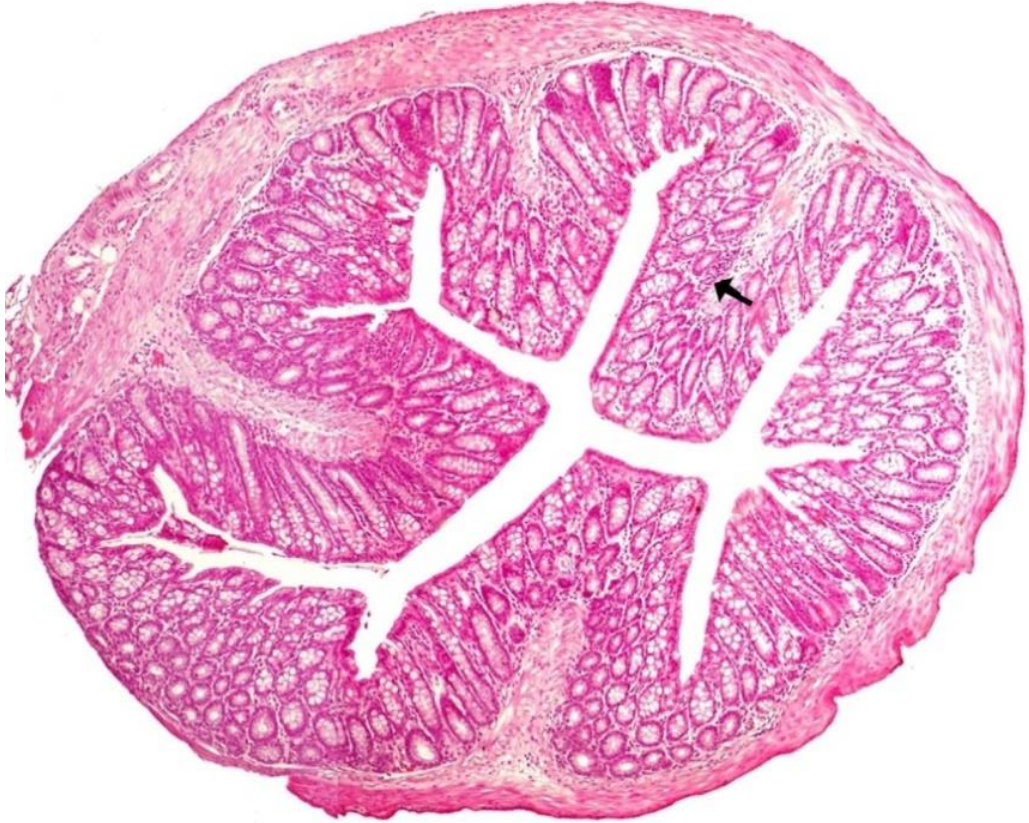
Şekil 4.18: DSS verilen gruba ait farenin distal kolonuna ait kesitlerdeki mukozada, yaygın kript hasarının görüldüğü ve goblet hücre kaybının olduğu bölgelerde negatif (★) ve diğer hasarlı bölgelerde oldukça zayıf (➤) PAS pozitif reaksiyon. PAS. Orijinal büyütme 200.



Şekil 4.19: DSS verilen gruba ait farenin distal kolonuna ait kesitlerdeki mukozada, yaygın kript hasarının görüldüğü ve goblet hücre kaybının olduğu bölgelerde negatif (★) ve daha az hasarlı bölgelerde az sayıda PAS pozitif reaksiyon (➤) veren goblet hücreleri. PAS. Orijinal büyütme x200.

4.4.3. Galektin-1 Verilen Gruba Ait Bulgular

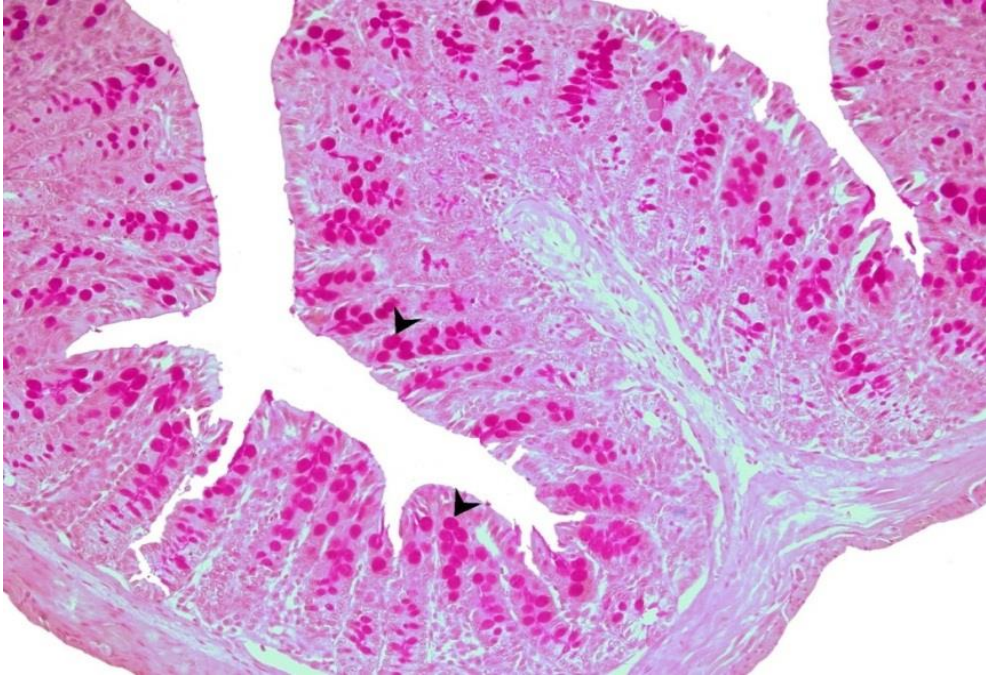
Galektin-1 verilen gruba ait hayvanların distal kolon dokularından alınan kesitlerde, birkaç bireyde gözlenen lamina propreadaki az sayıda alanda hafif şiddetteki inflamatuvar hücre infiltrasyonu dışında, kontrol grubundaki bireylerinkine benzer normal bir histolojik görünüm hakimdir (Şekil 4.20, Şekil 4.21). Bu grupta, genel mukozal yapının ve kript bütünlüğünün korunduğu gözlenmiştir. Galektin-1 verilen gruba ait bireylerin distal kolon kesitlerinde mukozal alanda bulunan goblet hücrelerinde gözlenen PAS pozitif reaksiyon, kontrol grubundaki bireylerde gözlenenlere benzer şekilde yaygın ve şiddetlidir (Şekil 4.22).



Şekil 4.20: Galektin-1 verilen grubuna ait farenin distal kolon dokusunun genel histolojik görünümü. Genel histolojik görünüm kontrol bireylerinkinden mukozada gözlenen hafif derecede inflamatuvar hücre infiltrasyonu (→) dışında farklı değildir. HE. Orijinal büyütme x100.



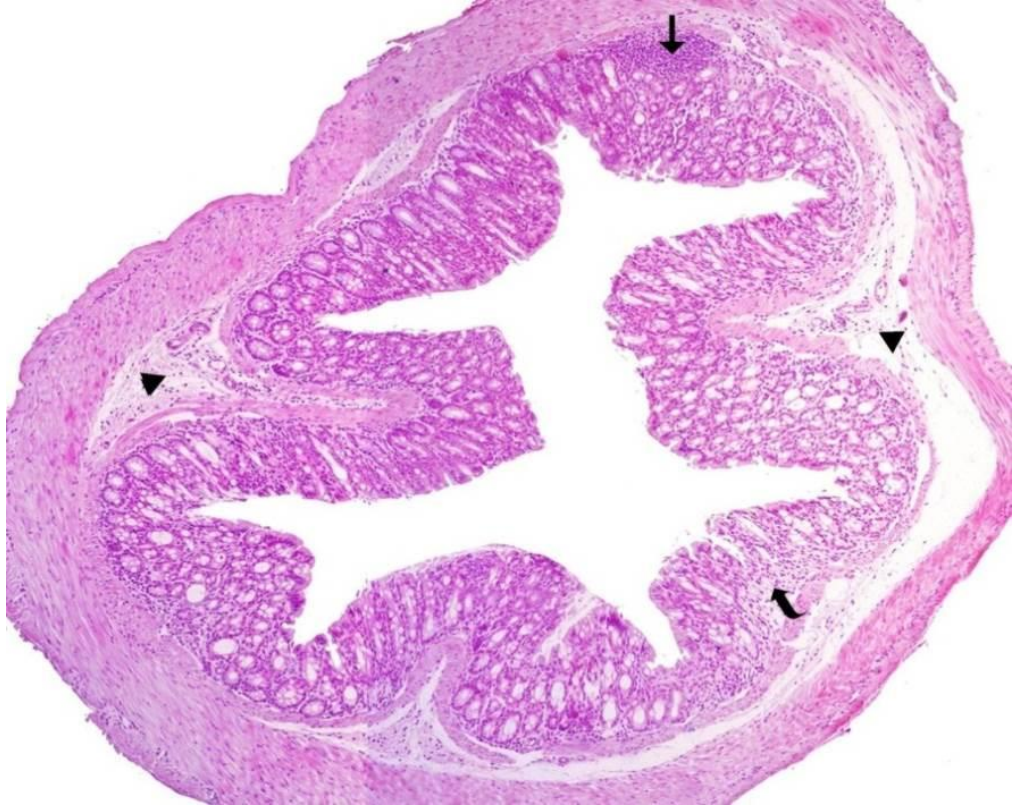
Şekil 4.21: Galektin-1 verilen gruba ait farenin distal kolon dokusunun histolojik görünümü. Yüzey epitelinin bütünlüğü ve düzgün kripler gözlenmektedir. HE. Orijinal büyütme x200.



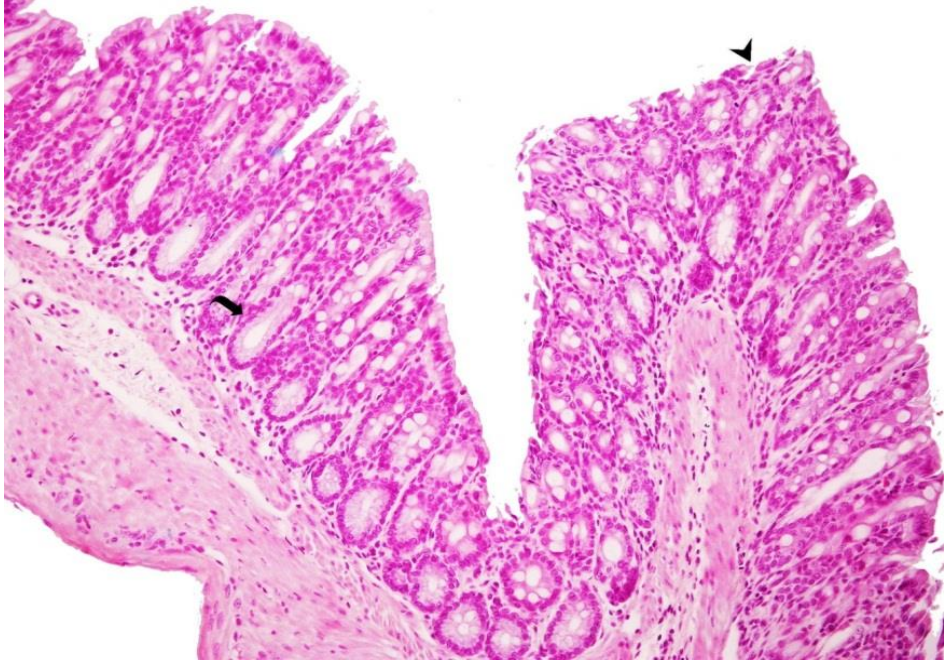
Şekil 4.22: Galektin-1 verilen gruba ait farenin distal kolonuna ait kesitlerdeki goblet hücrelerinde (►) gözlenen PAS pozitif reaksiyon, kontrol bireylerdeki gibi yaygın ve şiddetlidir. PAS. Orijinal büyütme x200.

4.4.4. DSS+ galektin-1 Verilen Gruba Ait Bulgular

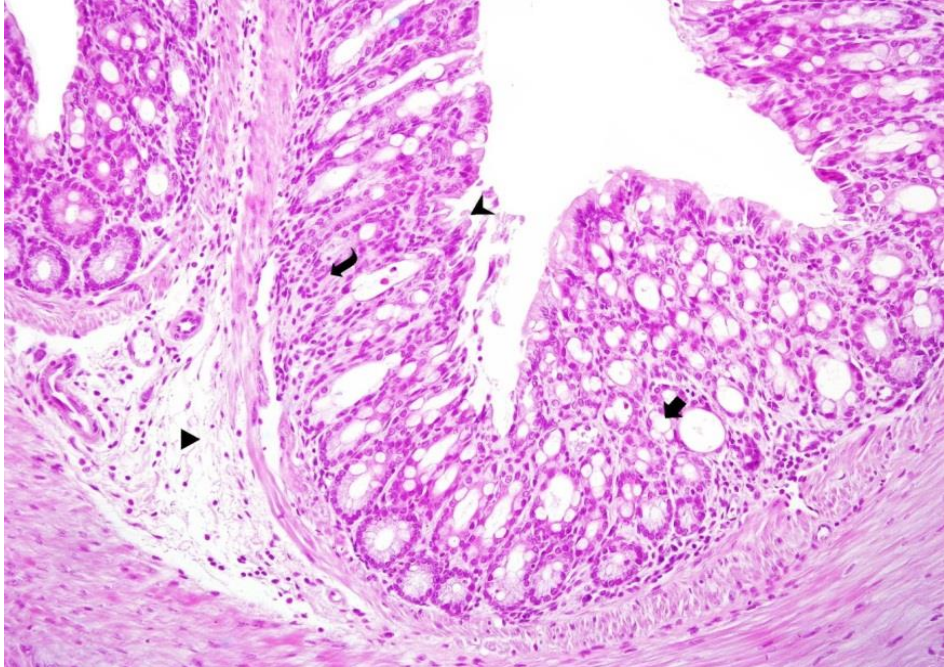
DSS ve galektin-1 verilen gruba ait farelerin distal kolon kesitlerinde, DSS grubundaki bireylerle karşılaştırıldığında, histolojik hasarın belirgin olarak azaldığı ve hatta birkaç bireyde kontrol grubundakilere benzer bir görünüm sergilediği tespit edilmiştir (Şekil 4.23-25). Bu grupta, submukozal bazı alanlarda hafif ve orta derecede ödem, birkaç bireyin lamina propreasında hafif inflamatuvar hücre infiltrasyonu, mukozal bütünlükte ve kript yapısında hafif bozulmalar ve bazı kript hücrelerinde vakuolar hidropik dejenerasyon yer yer gözlenmektedir. Bu gruba ait kesitlerde, yaygın şekilde inflamatuvar hücre infiltrasyonu, yaygın mukozal ülserasyonlar ve nekrotik alanlar, geniş alanlarda goblet hücrelerinde kayıp, lümene atılmış nekrotik hücreler ve ciddi kript lezyonları hiç gözlenmemiştir. DSS uygulanan farelere galektin-1'in ön enjeksiyonu, distal kolonda mukozal yapıyı genel olarak koruyarak ve nekrotik hasar oluşumunu engelleyerek, DSS'nin kolonda oluşturduğu hasarı belirgin olarak önlemiştir.



Şekil 4.23: DSS+galektin-1 verilen gruba ait farenin distal kolon dokusunun genel histolojik görünümü. Mukozada hafif yer yer inflamatuvar hücre infiltrasyonu (→), submukozal alanda ödem (▶), mukozal bütünlük ve kript yapısında yer yer bozulmalar (↔) dikkati çekmektedir. HE. Orijinal büyütme x100.

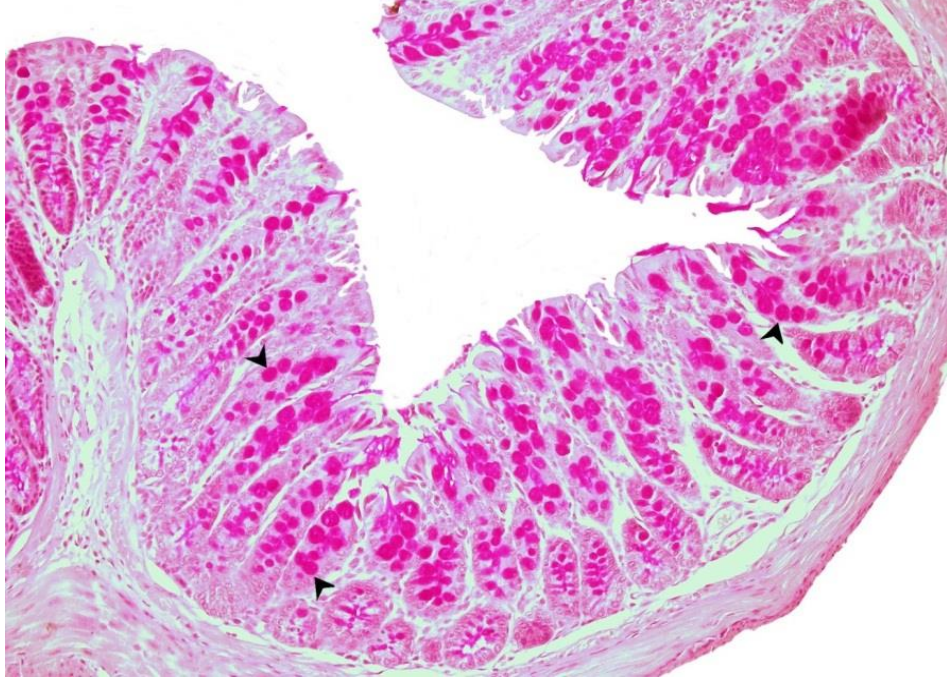


Şekil 4.24: DSS+galektin-1 verilen gruba ait farenin distal kolon dokusunun histolojik görünümü. Mukozal bütünlükte yer yer hafif bozulmalar (➤) haricinde kontrol bireylerdekine benzer düzgün kript yapısı (➡) ile histolojik hasarın belirgin olarak azaldığı ya da tamamen ortadan kalktığı görülmektedir. HE. Orijinal büyütme x200.



Şekil 4.25: DSS+galektin-1 verilen gruba ait farenin distal kolon dokusunda submukozada orta derecede ödem (➤), yer yer hafif fokal mukozal bozulma (➤), bazı kript hücrelerinde vakuolar hidropik dejenerasyon (➤) ve birkaç bölgede kript bütünlüğünde hafif bozulma (➡) gözlenmektedir. HE. Orijinal büyütme x200.

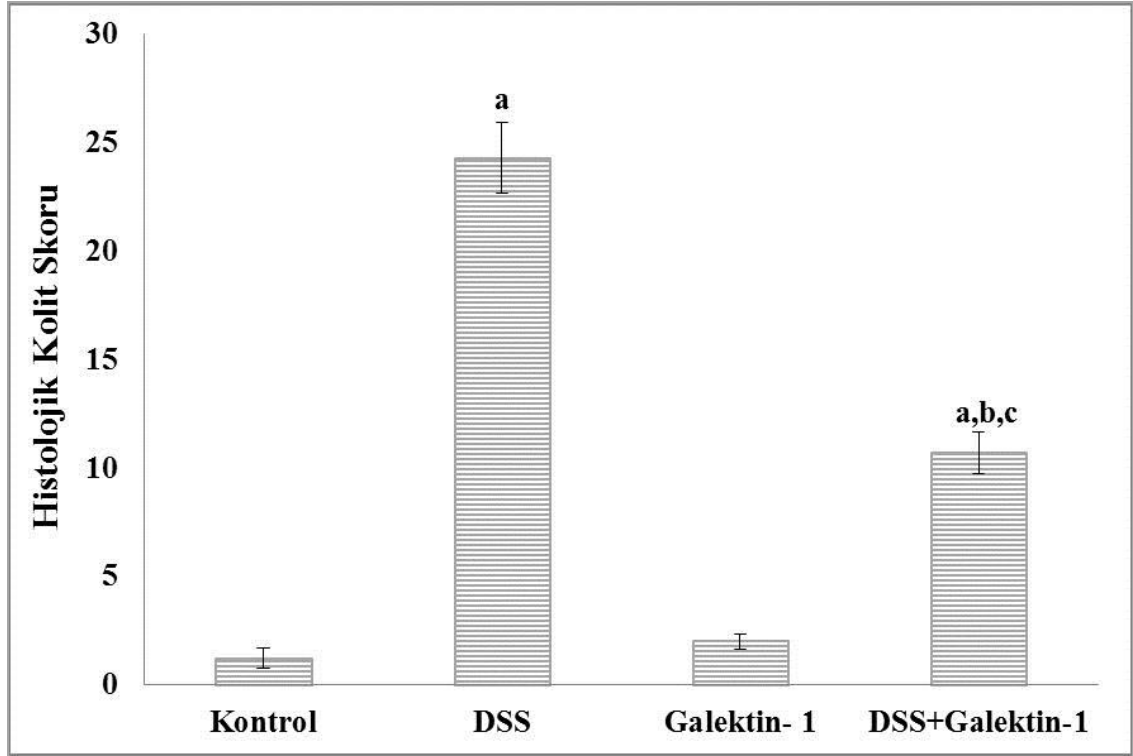
DSS+galektin-1 grubunda, goblet hücrelerinde görülen PAS pozitif reaksiyon, sadece DSS verilen kolit grubuna göre, belirgin olarak artmış, pek çok bireyde kontrol grubunda görülene yakın bir görünüm sergilemiştir (Şekil 4.26).



Şekil 4.26: DSS+galektin-1 verilen gruba ait farenin distal kolonuna ait kesitlerdeki goblet hücrelerinde (►) gözlenen PAS pozitif reaksiyon DSS grubundakilere göre belirgin bir artış göstermekte ve kontrol bireylerdekine yakın bir görünüm sergilemektedir. PAS. Orijinal büyütme x200.

4.4.5. Histolojik Kolit Skorlamasına Ait Bulgular

Dieleman ve diğerlerinin geliştirdiği kolit skorlama sistemine göre semi-kantitatif olarak değerlendirilen kolon dokularına ait histolojik skorlama bulguları Şekil 4.27’de gösterilmiştir. Histolojik kolit skoru, DSS uygulanan gruptaki farelerin kolon dokularında en yüksek oranda tespit edilmiştir. DSS verilen grupta, hasar skoru kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde bir artış göstermiştir ($p<0.001$). Sadece galektin-1 enjeksiyonu yapılan farelerle, kontrol grubundaki fareler arasındaki histolojik skorlamada anlamlı bir farklılık saptanmamıştır. Histolojik hasar skoru, DSS+galektin-1 grubunda, hem kontrol hem de galektin-1 grubuna göre anlamlı olarak artmıştır ($p<0.001$). Bununla birlikte DSS grubuna galektin-1 ön uygulaması, DSS kolit grubuna göre, histolojik hasarı belirgin ölçüde azaltmıştır ($p<0.001$).



Şekil 4.27: Gruplara göre histolojik kolit skoru (Ortalama ± Standart hata). **Kontrol:** 1.22 ± 0.46, **DSS:** 24.30 ± 1.62, **Galektin-1:** 2.00 ± 0.37, **DSS+galektin-1:** 10.71 ± 0.94.

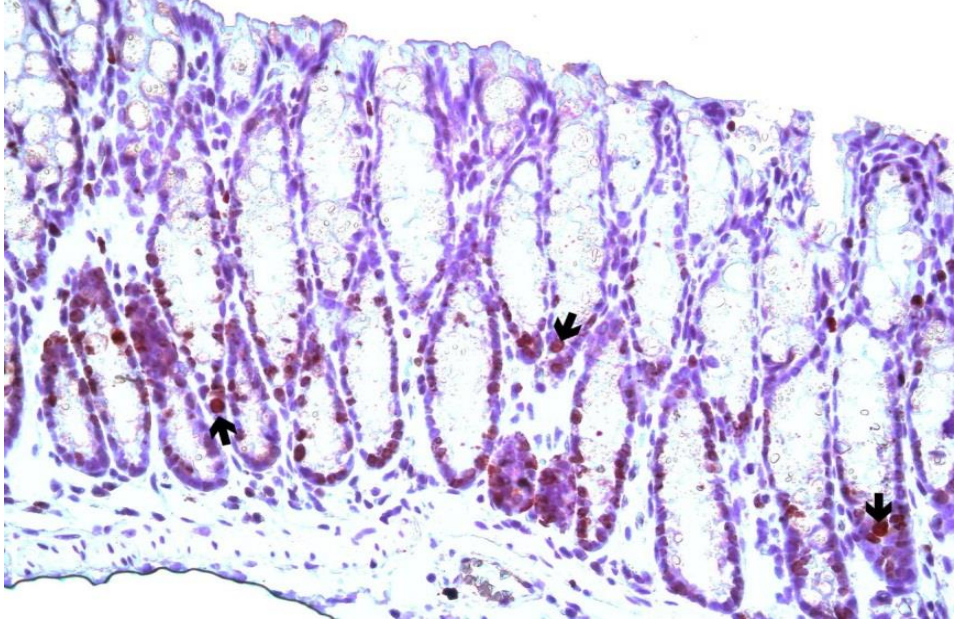
^aKontrol grubundan farklı (p<0.001).

^bDSS grubundan farklı (p<0.001).

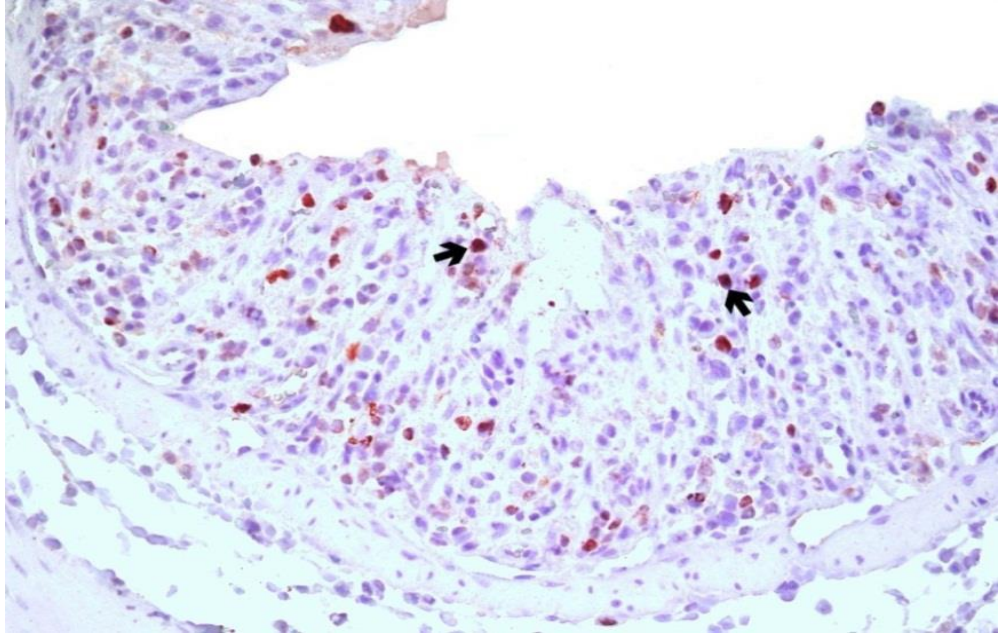
^cGalektin-1 grubundan farklı (p<0.001).

4.5. KI-67 İMMUNOHİSTOKİMYASINA AİT BULGULAR

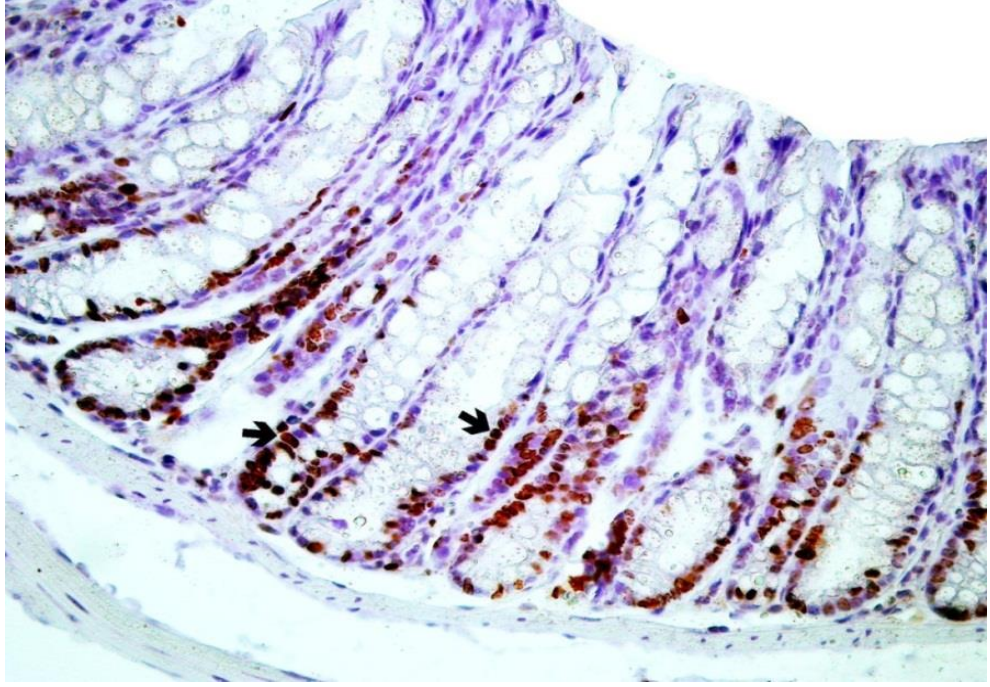
Distal kolon mukozasında Ki-67 immuohistokimyasına ait ışık mikrografları Şekil 4.28, Şekil 4.29, Şekil 4.30 ve Şekil 4.31’de verilmiştir. Hücre proliferasyon indeksi (%)’nin gruplara göre dağılımları ise Şekil 4.32’de gösterilmiştir. DSS grubunda kontrol grubuna göre, hücre proliferasyon indeksi istatistiksel olarak anlamlı bir azalma göstermiştir (p<0.01). Yalnızca galektin-1 enjekte edilen gruptaki hücre proliferasyon indeksinde, kontrol grubuna göre, istatistiksel olarak anlamlı olmayan bir artış olduğu saptanmıştır. DSS+galektin-1 grubundaki % Ki-67 pozitif hücre sayısında, kontrol grubu ve sadece galektin-1 verilen gruba oranla bir azalma (p<0.05, p<0.01) olmasına karşın, DSS verilen kolit grubuna göre hücre proliferasyonunda anlamlı bir artış tespit edilmiştir (p<0.05).



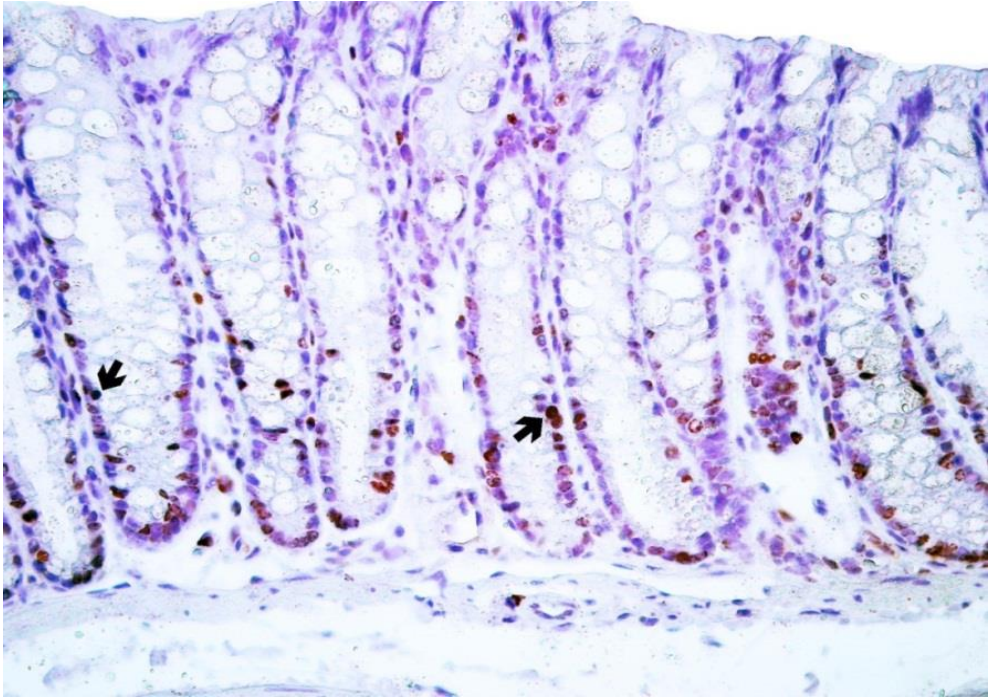
Şekil 4.28: Kontrol grubuna ait farenin distal kolon mukozasında Ki-67 immünohistokimyası ile işaretlenen çoğalmakta olan kript hücreleri (→). Orijinal büyütme x400.



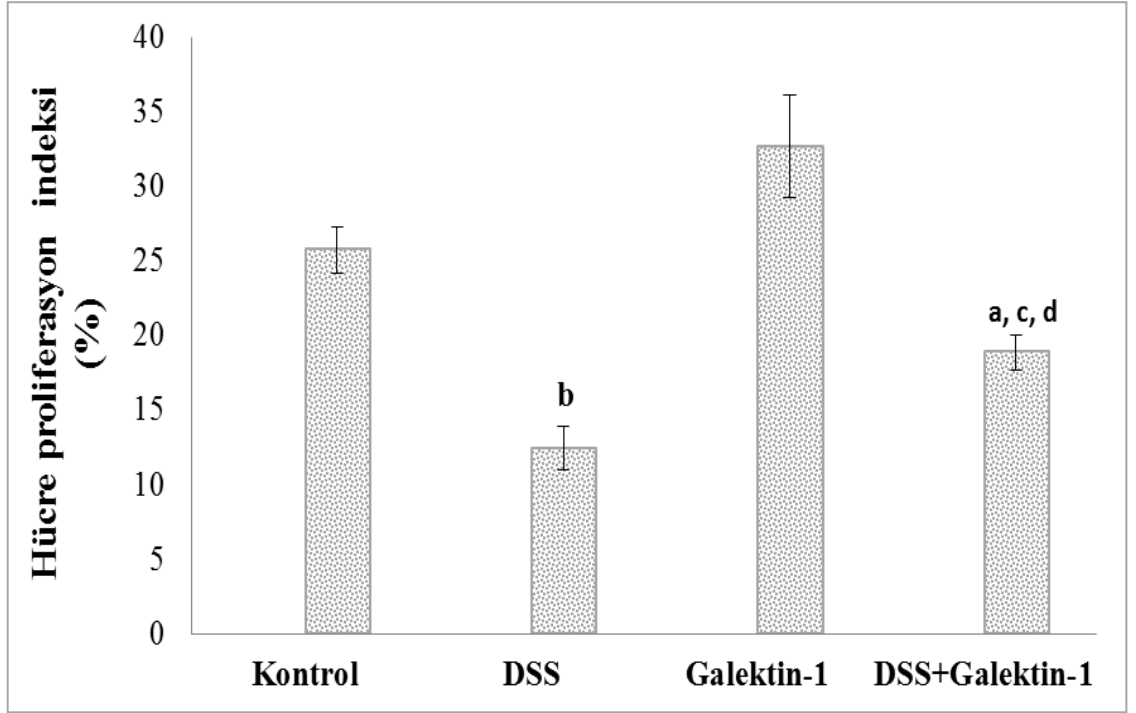
Şekil 4.29: DSS verilen gruba ait farenin distal kolon mukozasında Ki-67 immünohistokimyası ile işaretlenen çoğalmakta olan hücrelerde (→) sayıca azalma gözlenmektedir. Orijinal büyütme x400.



Şekil 4.30: Galektin-1 verilen gruba ait farenin distal kolon mukozasında immünohistokimyasal olarak işaretlenen çoğalmakta olan kript hücrelerinde (→) kontrol grubuna göre, sayıca artış görülmektedir. Orijinal büyütme x400.



Şekil 4.31: DSS+galektin-1 verilen gruba ait farenin distal kolon mukozasında Ki-67 immünohistokimyası ile işaretlenen çoğalmakta olan hücrelerde (→) DSS verilen kolit grubuna göre sayıca artış dikkati çekmektedir. Orijinal büyütme x400.



Şekil 4.32: Gruplara göre kolon mukozasında Ki-67 immuohistokimyası ile belirlenen hücre proliferasyon indeksi (%) (Ortalama ± Standart hata). **Kontrol:** 25.75 ± 1.56, **DSS:** 12.46 ± 1.46, **Galektin-1:** 32.69 ± 3.41, **DSS+galektin-1:** 18.87 ± 1.19.

^aKontrol grubundan farklı (p<0.05).

^bKontrol grubundan farklı (p<0.01).

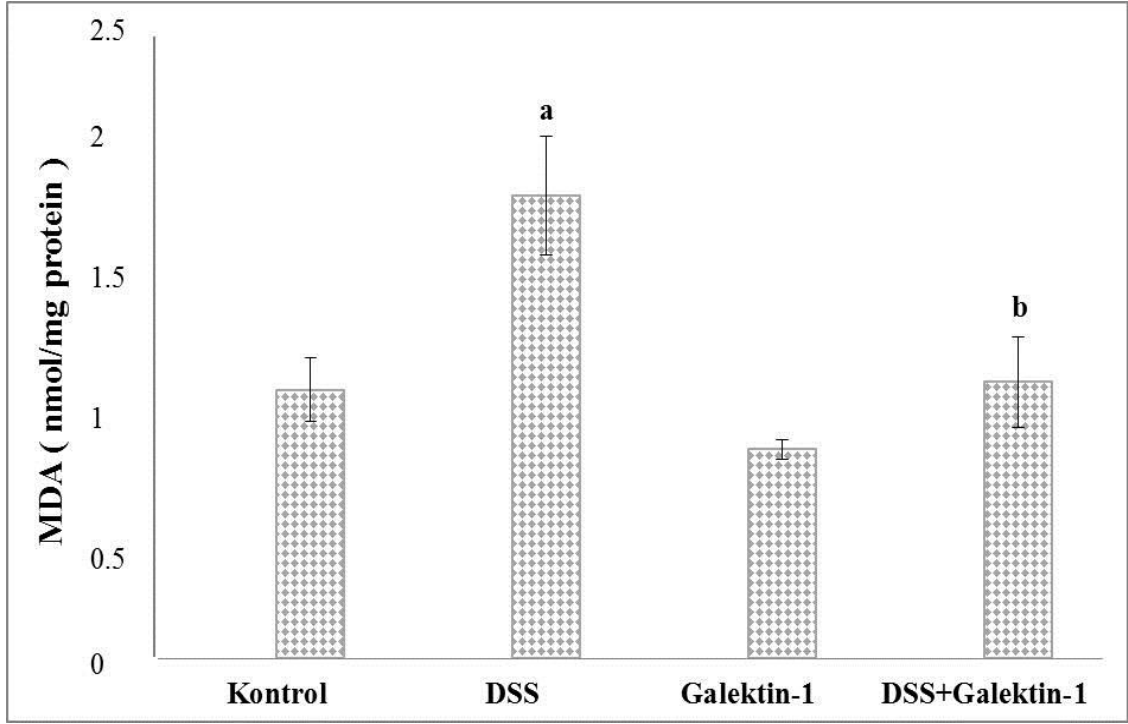
^cDSS grubundan farklı (p<0.05).

^dGalektin-1 grubundan farklı (p<0.01).

4.6. BİYOKİMYASAL BULGULAR

4.6.1. Lipid Peroksidasyon Seviyelerine Ait Bulgular

Kolon doku homojenatlarından elde edilen MDA seviyelerinin gruplara göre dağılımı Şekil 4.33'te gösterilmiştir. Kolit grubundaki MDA değerleri kontrol grubuna oranla önemli bir artış göstermiştir (p<0.05). Sadece galektin-1 enjeksiyonu yapılan grupta, kontrol bireylerle karşılaştırıldığında, anlamlı olmayan bir azalma kaydedilmiştir. Galektin-1 ön uygulaması yapılan DSS grubuna ait dokuların MDA düzeyinde ise, DSS kolit grubuna oranla, anlamlı bir azalma olduğu tespit edilmiştir (p<0.05).



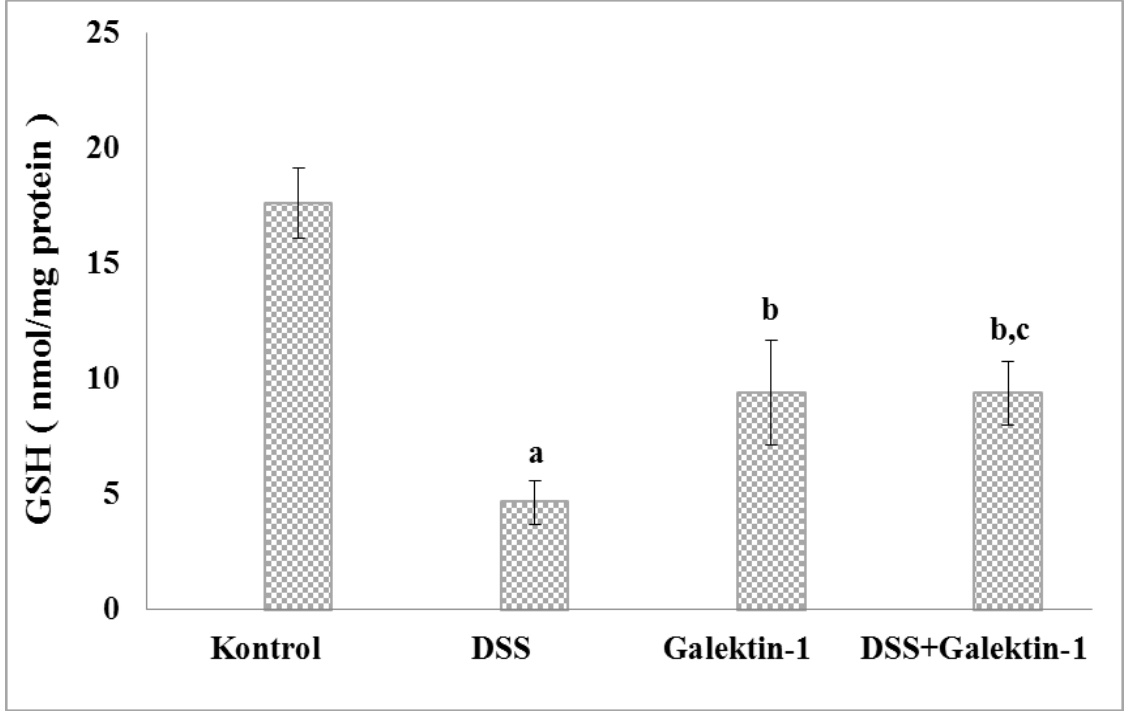
Şekil 4.33: Gruplara göre göre kolon homojenatlarında ölçülen MDA seviyeleri (Ortalama ± Standart hata). **Kontrol:** 1.08 ± 0.13 , **DSS:** 1.86 ± 0.24 , **Galektin-1:** 0.84 ± 0.04 , **DSS+galektin-1:** 1.11 ± 0.18 .

^aKontrol grubundan farklı ($p < 0.05$).

^bDSS grubundan farklı ($p < 0.05$).

4.6.2. Glutasyon Seviyelerine Ait Bulgular

Kolon doku homojenatlarından elde edilen GSH seviyelerinin gruplara göre dağılımı Şekil 4.34'te gösterilmiştir. Tüm deney gruplarında GSH düzeyleri, kontrol bireylerle karşılaştırıldığında, istatistiksel olarak anlamlı bir azalma göstermiştir. Gruplardaki anlamlılık dereceleri şu şekildedir: DSS ($p < 0.001$), Galektin-1 ($p < 0.01$), DSS+galektin-1 ($p < 0.01$). GSH seviyelerindeki en belirgin azalma DSS uygulanan kolit grubunda gerçekleşmiştir. Bununla birlikte, DSS grubuna galektin-1 enjeksiyonu, GSH değerlerini DSS kolit grubuna oranla anlamlı derecede arttırmıştır ($p < 0.05$).



Şekil 4.34: Gruplara göre göre kolon homojenatlarında ölçülen GSH seviyeleri (Ortalama ± Standart hata). **Kontrol:** 17.62 ± 1.54 , **DSS:** 4.65 ± 0.94 , **Galektin-1:** 9.40 ± 2.26 , **DSS+galektin-1:** 9.36 ± 1.37 .

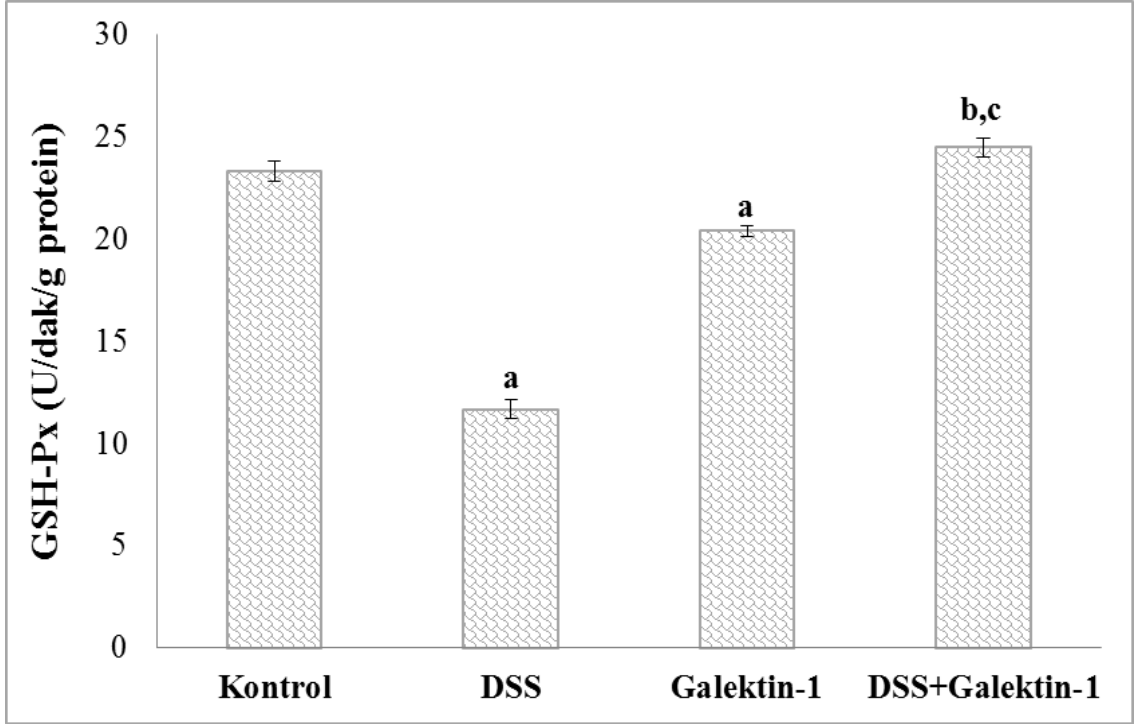
^aKontrol grubundan farklı ($p < 0.001$).

^bKontrol grubundan farklı ($p < 0.01$).

^cDSS grubundan farklı ($p < 0.05$).

4.6.3. Glutasyon Peroksidaz Aktivitesine Ait Bulgular

Kolon doku homojenatlarından elde edilen GSH-Px aktivitelerinin gruplara göre dağılımı Şekil 4.35'te verilmiştir. Kontrol grubundaki farelerle karşılaştırıldığında GSH-Px aktivitelerinde, hem DSS kolit grubunda hem de galektin-1 verilen kontrol grupta anlamlı bir azalma kaydedilirken ($p < 0.001$); DSS+galektin-1 grubunda ise anlamlı bir değişiklik saptanmamıştır. Ancak DSS uygulaması, galektin-1 grubundan farklı olarak GSH-Px aktivitelerini kontrole göre yarı yarıya azaltarak, belirgin bir düşüş meydana getirmiştir. DSS+galektin-1 uygulanan grupta, hem kolit grubuna hem de sadece galektin-1 enjeksiyonu yapılan gruba göre GSH-Px aktivitesi istatistiksel olarak anlamlı derecede artarak, kontrol bireylerdeki seviyelere yaklaşmıştır ($p < 0.001$).



Şekil 4.35: Gruplara göre göre kolon homojenatlarında ölçülen GSH-Px aktiviteleri (Ortalama ± Standart hata). **Kontrol:** 23.30 ± 0.50, **DSS:** 11.65 ± 0.46, **Galektin-1:** 20.36 ± 0.27, **DSS+galektin-1:** 24.48 ± 0.46.

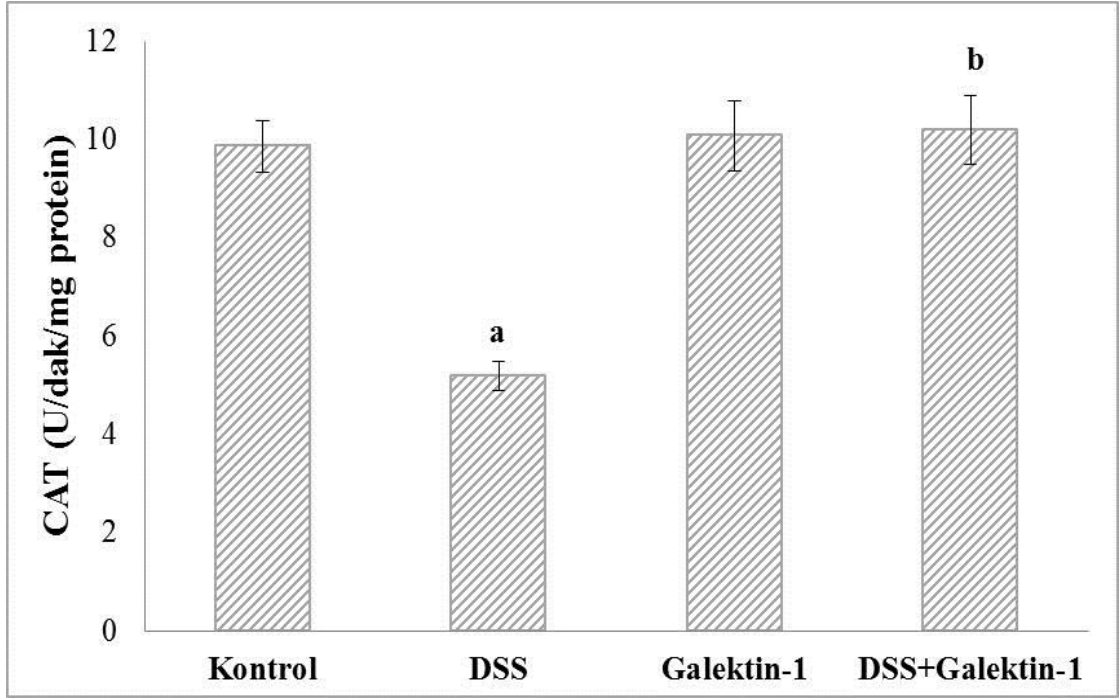
^aKontrol grubundan farklı (p<0.001).

^bDSS grubundan farklı (p<0.001).

^cGalektin-1 grubundan farklı (p<0.001).

4.6.4. Katalaz Aktivitesine Ait Bulgular

Kolon doku homojenatlarından elde edilen CAT aktivitelerinin gruplara göre dağılımı Şekil 4.36'da gösterilmiştir. DSS ile kolit oluşturulan gruptaki farelerin CAT aktivitelerinde, kontrol grubundaki farelere göre önemli bir azalma saptanmıştır (p<0.001). DSS+galektin-1 grubunda, kontrol ve galektin-1 gruplarına göre CAT aktivitelerinde anlamlı bir farklılık gözlenmezken; galektin-1'in tek başına enjeksiyonu da CAT aktivitesi üzerinde kontrol grubuna oranla anlamlı bir değişikliğe neden olmamıştır. DSS grubuna galektin-1 ön uygulaması, CAT aktivitesinde DSS kolit grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir artış meydana getirmiştir (p<0.001).



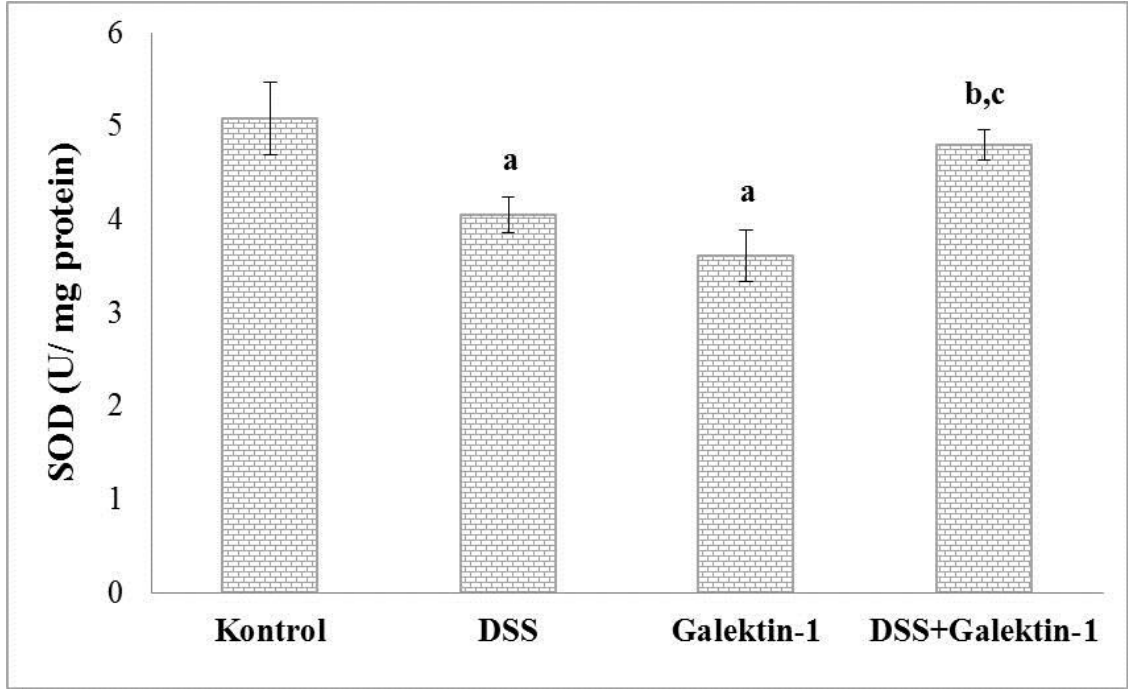
Şekil 4.36: Gruplara göre göre kolon homojenatlarında ölçülen CAT aktiviteleri (Ortalama \pm Standart hata). **Kontrol:** 9.86 ± 0.52 , **DSS:** 5.19 ± 0.30 , **Galektin-1:** 10.08 ± 0.71 , **DSS+galektin-1:** 10.19 ± 0.69 .

^aKontrol grubundan farklı ($p < 0.001$).

^bDSS grubundan farklı ($p < 0.001$).

4.6.5. Süperoksit Dismutaz Aktivitesine Ait Bulgular

Kolon doku homojenatlarından elde edilen SOD aktivitelerinin gruplara göre dağılımı Şekil 4.37'de verilmiştir. DSS grubunda ve galektin-1 grubunda SOD aktivitelerinde, kontrol gruba göre anlamlı bir azalma tespit edilirken ($p < 0.05$); DSS grubunda gözlenen düşük SOD aktivitesi, galektin-1 ön uygulaması ile istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artış göstermiştir ($p < 0.05$). Buna ilaveten DSS+galektin-1 grubunda gözlenen SOD aktivitesindeki artış, sadece galektin-1 verilen kontrol grubundaki bireylere göre de istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0.01$).



Şekil 4.37 : Gruplara göre göre kolon homojenatlarında ölçülen SOD aktiviteleri (Ortalama ± Standart hata). **Kontrol:** 5.08 ± 0.39 , **DSS:** 4.05 ± 0.56 , **Galektin-1:** 3.61 ± 0.28 , **DSS+galektin-1:** 4.80 ± 0.16 .

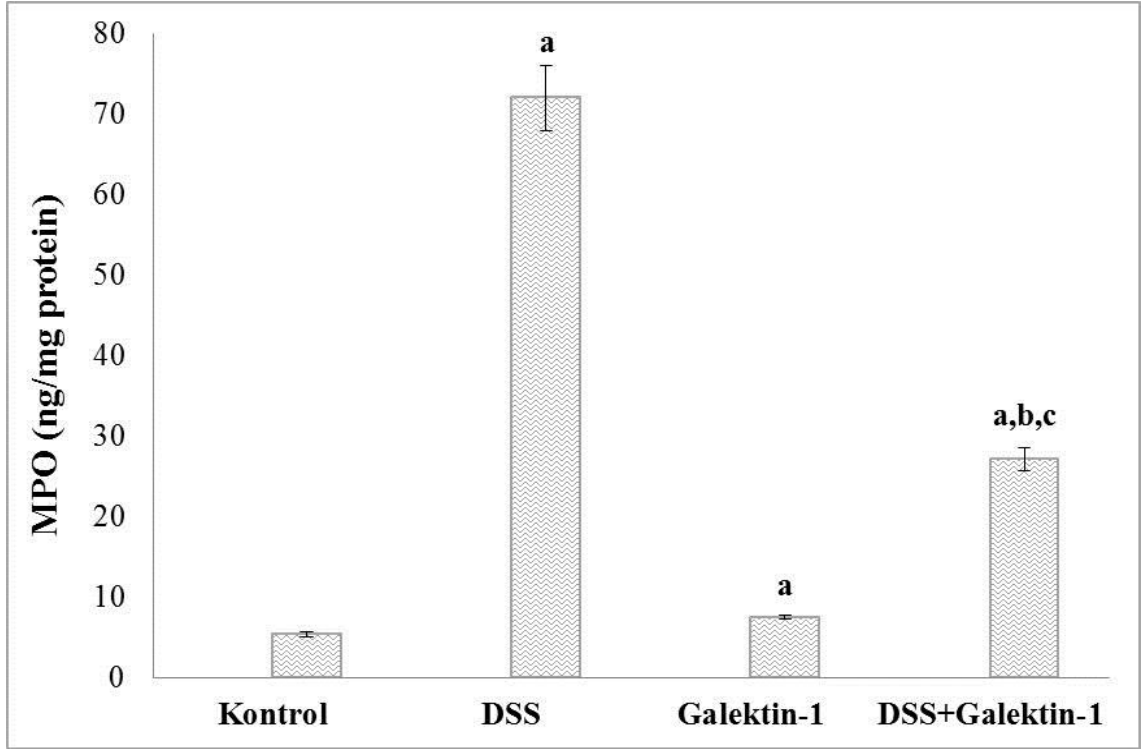
^aKontrol grubundan farklı ($p < 0.05$).

^bDSS grubundan farklı ($p < 0.05$).

^cGalektin-1 grubundan farklı ($p < 0.01$).

4.6.6. Miyeloperoksidaz Seviyelerine Ait Bulgular

Kolon doku homojenatlarından elde edilen MPO seviyelerinin deney gruplarına göre dağılımı Şekil 4.38'de özetlenmiştir. Tüm deney grupları gözönüne alındığında, kontrol grubuna kıyasla MPO seviyesindeki en belirgin artış (yaklaşık 13 kat) DSS kolit grubunda gözlenmiştir ($p < 0.001$). Bunun yanı sıra, hem galektin-1 verilen kontrol grupta hem de DSS+galektin-1 grubunda da kontrol bireylere göre, MPO seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış bulunmaktadır ($p < 0.001$). DSS ve galektin-1 verilen iyileştirme grubunda, sadece galektin-1 enjekte edilen farelere göre MPO seviyesinde anlamlı bir artış gözlenirken ($p < 0.001$); DSS grubuna göre belirgin bir azalma ($p < 0.001$) tespit edilmiştir.



Şekil 4.38: Gruplara göre göre kolon homojenatlarında ölçülen MPO seviyeleri (Ortalama ± Standart hata). **Kontrol:** 5.40 ± 0.32, **DSS:** 71.99 ± 4.03, **Galektin-1:** 7.53 ± 0.23, **DSS+galektin-1:** 27.11 ± 1.46.

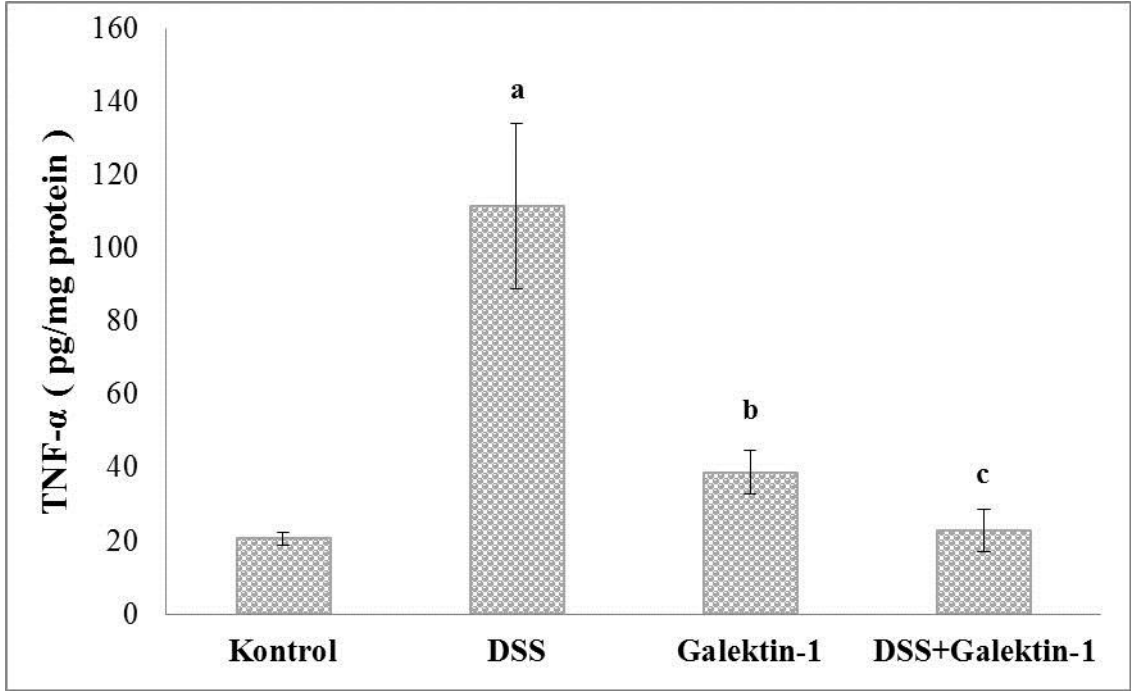
^aKontrol grubundan farklı (p<0.001).

^bDSS grubundan farklı (p<0.001).

^cGalektin-1 grubundan farklı (p<0.001).

4.6.7. Tümör Nekroz Faktör- α Seviyelerine Ait Bulgular

Kolon doku homojenatlarından elde edilen TNF- α seviyelerinin gruplara göre dağılımı Şekil 4.39'da gösterilmiştir. Buna göre, DSS grubunun TNF- α seviyelerinde, kontrol grubuna göre istatistiksel olarak belirgin bir artış gözlenmiştir (p<0.01). Yalnızca galektin-1 enjeksiyonu yapılan grupta da, kontrol grubundaki bireylerle kıyaslandığında, TNF- α düzeylerinde artış saptanmıştır (p<0.05). DSS verilen farelere galektin-1'in ön enjeksiyonu, DSS grubundaki artmış TNF- α düzeylerini, bu gruba kıyasla istatistiksel olarak önemli derecede azaltarak (p<0.01), kontrol grubundaki bireylerin sahip olduğu seviyelere yaklaştırmıştır.



Şekil 4.39: Gruplara göre göre kolon homojenatlarında ölçülen TNF- α seviyeleri (Ortalama \pm Standart hata). **Kontrol:** 20.71 \pm 1.73, **DSS:** 111.52 \pm 22.54, **Galektin-1:** 38.71 \pm 6.07, **DSS+galektin-1:** 22.72 \pm 5.73.

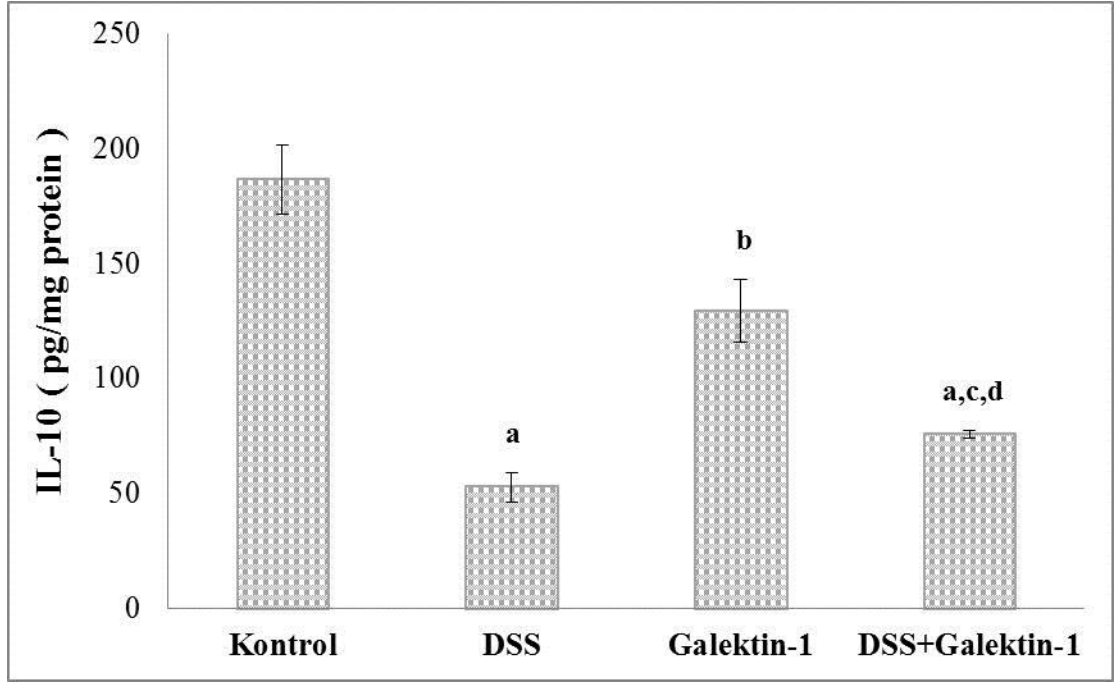
^aKontrol grubundan farklı (p<0.01).

^bKontrol grubundan farklı (p<0.05).

^cDSS grubundan farklı (p<0.01).

4.6.8. İnterlökin-10 Seviyelerine Ait Bulgular

Kolon doku homojenatlarından elde edilen IL-10 seviyelerinin gruplara göre dağılımı Şekil 4.40'ta belirtilmiştir. IL-10 seviyelerinde kontrol grubuna oranla DSS grubunda istatistiksel olarak belirgin bir azalma (p<0.001) gözlenmekle birlikte; galektin-1 enjekte edilen grupta da bir anlamlı düşüş saptanmıştır (p<0.05). DSS grubuna galektin-1'in ön enjeksiyonu ise, kolon homojenatlarındaki IL-10 düzeylerini sadece galektin-1 verilen (p<0.01) veya kontrol grubundaki (p<0.001) bireylerin seviyelerine kadar arttırmasa da, DSS kolit grubuna oranla istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde yükseltmiştir (p<0.05).



Şekil 4.40: Gruplara göre göre kolon homojenatlarında ölçülen IL-10 seviyeleri (Ortalama ± Standart hata). **Kontrol:** 186.44 ± 15.18 , **DSS:** 52.80 ± 6.41 , **Galektin-1:** 129.38 ± 13.56 , **DSS+galektin-1:** 75.58 ± 1.67 .

^aKontrol grubundan farklı ($p < 0.001$).

^bKontrol grubundan farklı ($p < 0.05$).

^cDSS grubundan farklı ($p < 0.05$).

^dGalektin-1 grubundan farklı ($p < 0.01$).

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

İnflamatuvar bağırsak hastalıklarının patogenezinin incelenmesi ve bu hastalıklar için yeni ve etkin tedavi yöntemlerinin geliştirilebilmesi amacıyla TNBS, asetik asit, DSS ve karregean gibi kimyasallarla uyarılabilir modeller, transgenik ve knock out kolit modelleri gibi çeşitli hayvan modelleri kullanılmaktadır (Kim ve Berstad, 1992, Blumberg ve diğ., 1999). Deneysel olarak ilk kez kullanılmaya başlandığı 1990'lı yılların başlarından bu yana, DSS'nin içme suyunda çözündürülerek uygulandığı DSS ile oluşturulan deneysel kolit modeli, insanlarda görülen ülseratif kolit hastalığının pek çok klinik ve histopatolojik bulgusunu yansıtması nedeniyle sıklıkla tercih edilmektedir (Cooper ve diğ. 1993).

İntrarektal yoldan TNBS uygulanması ile oluşturulan kolit modeli, insanlardaki Crohn hastalığı ile daha çok benzerlik göstermekte ve Th hücre aracılı mukozal adaptif immün yanıtın araştırılmasında kullanılmaktadır. DSS'nin oral yoldan uygulanması ile oluşturulan ülseratif kolit modeli ise daha çok doğal immün mekanizmalar ile ilişkilendirilmektedir (Wirtz ve diğ., 2007). Kolondaki epitel hücreler tarafından DSS'nin fagosite edilmesi ile epitel hücre bariyer fonksiyonları bozulur (Rogler ve Andus, 1998) ve doğal immünitinin oluşumuna katkı sağlayan lüminal antijenler lamina propreaya daha kolay ulaşarak buradaki hücreleri uyarır. Bu hücrelerce pro-inflamatuvar sitokinlerin salınması ile inflamasyon gelişir (Okayasu ve diğ., 1990). DSS ile oluşturulan kolit modeli özellikle kilo kaybı, dışkı kıvamında yumuşama, diyare ve rektal kanama gibi klinik bulgular (Kawada ve diğ., 2007) ile fokal kript hasarı ile birlikte seyreden epiteliyal hasar, ülserasyon, mukozada yaygın inflamatuvar hücre infiltrasyonu gibi sahip olduğu pek çok histopatolojik özellik (Okayasu ve diğ., 1990; Cooper ve diğ., 1993; Dieleman ve diğ., 1998) bakımından insanlarda görülen ülseratif kolitle büyük benzerlikler taşımaktadır ve ülseratif kolit hastalığının hayvan modeli olarak kullanılmaktadır. Ülseratif kolitin patogenezi henüz tam olarak bilinmediğinden günümüzde ülseratif kolit tedavisinde kullanılan ilaçlar kolite sebep olan etkenleri ortadan kaldırmaya yönelik olmayıp, inflamasyonun geriletmesini sağlayan anti-inflamatuvar ve immün baskılayıcı özelliğe sahip ilaçlardır. Bu nedenle, ülseratif kolitin

deneysel modelleri kullanılarak yapılan çalışmalarla etkin ve yeni tedavi yöntemleri geliştirilmeye çalışılmaktadır.

Galektin-1, insan ve farelerdeki gastrointestinal kanalın farklı tipteki hücreleri tarafından eksprese edilen, yara iyileşmesi ve anti-inflamatuvar yanıt oluşumu gibi pek çok biyolojik olayda rol oynayan bir moleküldür. İnsan ince bağırsaklarında en fazla epitelde ve lamina propreda eksprese edilen Gal-1, 129/SvJ soyuna ait farelerin bağırsaklarında lamina propreda yaygın olmakla birlikte muskulariste de eksprese edilmektedir (Muglia ve diğ., 2011). Mathieu ve diğ. (2008), normal C57BL/6 soyu farelerin kolon kesitlerinde anti-Gal-1 antikoları ile yaptıkları immün işaretlemeler sonucunda, kolon yüzey epiteli ve kript epitel hücrelerinde Gal-1 ekspresyonunun olmadığını, lamina propreda ise BALB/c ve 129 Sv/Ev farelere kıyasla daha az sayıda Gal-1 eksprese eden hücrenin olduğunu göstermişlerdir. Oysa ki, normal BALB/c farelerin ve kronik enterokolitin spontan geliştiği IL10^{-/-} farelerin kolon yüzey epitelindeki Gal-1 ekspresyonunun % 70 gibi yüksek seviyelerde olduğu gösterilmiştir (Mathieu ve diğ., 2008). Ayrıca, aynı grubun C57BL/6 farelere % 4 DSS'nin 7 gün uygulanması ile oluşturdukları akut kolit deneyinde, kolon dokusunda yüzey ve kript epitelindeki Gal-1 ekspresyon seviyelerinde kontrol grubuna göre önemli bir değişiklik saptanmamış ve DSS ile akut kolit oluşturulmasından sonra da C57BL/6 farelerin kolon dokularında endojen Gal-1 düzeyi oldukça düşük bulunmuştur (Mathieu ve diğ., 2008). İnce bağırsak hücre soylarında yapılan analizler sonucu, 129/SvJ soyu duodenal fare hücrelerinde Gal-1'in mRNA ve protein ekspresyonlarının yüksek olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca 129/SvJ soyuna ait farelerin ince bağırsak (duodenum) epitel hücrelerinde eksojen Gal-1'in bağlanacağı glikoepitoplarm ekspresyon seviyeleri de yüksektir ve Gal-1, 15 ng/ml kadar düşük dozda dahi epiteldeki hücre yüzeyi reseptörlerine bağlanabilir. 129/SvJ soyu fare bağırsak hücrelerinde yüksek seviyelerde bulunan Gal-1 ve Gal-1 bağlayan reseptörlerinin, bu glikan bağlayıcı proteinin villuslardaki epitel hücrelerinin döngüsünü düzenleyerek, bağırsak homeostazının sağlanmasında önemli bir rolü olduğunu düşündürmektedir (Muglia ve diğ., 2011). Bu bulgular ışığında DSS ile oluşturulan akut kolit modelinde eksojen Gal-1 uygulamasının, hastalığı olası önleme mekanizmasını araştırdığımız çalışmamızda, endojen Gal-1 ekspresyonunun en düşük olduğu fare soyu olan C57BL/6 fareler tercih edilmiştir.

Uygulanan DSS'nin moleküler ağırlığı, dozu ve uygulama süresi açısından çalışmamız ile paralellik gösteren bir başka çalışmada, erkek CD1 farelere 36-50 kDa moleküler ağırlıktaki % 3 DSS (w/v) solüsyonu 5 gün boyunca oral olarak verilmiş ve 7. günde farelerin kolon dokuları toplanarak analiz edilmiştir (Matos ve diğ., 2013). Farelere % 3 DSS uygulaması kanlı diyare ve sürekli ağırlık kaybı ile karakterize şiddetli bir kolit hasarı meydana getirmiş (Melgar ve diğ., 2005, Matos ve diğ., 2013) ve bunun sonucunda HAI'de artış, vücutta ağırlık kaybı, makroskobik kolon hasarı ve kolon uzunluğunda azalmalar gözlenmiştir. Bunun yanı sıra, DSS uygulanan farelerin kolon kesitlerinde ülserli bölgeler, kript yapısında bozulmalar, yaygın polimorf nuklear hücre infiltrasyonu gözlenmiş ve ciddi mikroskobik hasar tespit edilmiştir. Tüm bu bulgular, C57BL/6 farelere % 3 DSS (w/v)'nin 5 gün boyunca uygulandığı ve kolit oluşumundan sonraki günlerde rektumda kanlı dışkı ile birlikte ciddi ağırlık kaybının gözlemlendiği ve HAI'nin tüm bireylerde 3'ün üstünde seyrettiği, kolon uzunluğunda ise kontrol bireylere oranla belirgin azalmanın olduğu bizim çalışmamızla uyumludur. Ayrıca, Matos ve diğ. (2013) tarafından gerçekleştirilen bu çalışmanın histopatolojik bulguları, mikroskobik olarak genellikle mukozada ve yer yer submukozada gözlenen yaygın inflamatuvar hücre infiltrasyonu, submukozal ödem, bazı bireylerde tamamen bozulmuş kript yapısı ve kaybı ile birlikte yaygın ülserasyon ve nekroz bulgularının tespit edildiği bizim deney sonuçlarımızla da benzerlik göstermektedir.

Ülseratif kolit patogenezi ve DSS ile oluşturulan kolon hasarı, bağırsak mukozasına çok sayıda lökositin infiltrasyonu ile direkt olarak ilişkilidir. DSS ile oluşturulan kolitin akut fazı esnasında, mukozaya nötrofil infiltrasyonunun kolon inflamasyondaki en önemli olaylardan biri olduğu söylenebilir. Ek olarak, nötrofillerde bulunan bir enzim olan MPO'nun, HOCl gibi sitotoksik oksidanların oluşumunu katalizlediği de bilinmektedir (Baumgart ve Carding, 2007, Kaser ve diğ., 2010). Bento ve diğ. (2012), adaptif immün yanıtta önemli rol oynayan CD4⁺ ve CD8⁺ T hücrelerinin, DSS kolitin akut periyodunda değişmediğini göstermişlerdir. Bu çalışma, T ve B hücreleri olmayan farelerde DSS'nin koliti uyarabildiğinin gösterilmesi ile desteklenmiştir (Wirtz ve diğ., 2007). Çalışmamızda mikroskobik bulgularımızı destekleyecek biçimde, kolondaki mukozal nötrofil infiltrasyonunun bir göstergesi olan MPO seviyelerinde kolit grubunda, kontrol grubuyla karşılaştırıldığında önemli bir artış olduğu dikkati çekmiştir. Farelerde DSS ile kolit oluşturulan pek çok çalışmada, kolon dokularında MPO seviyelerinin, mikroskobik

gözlemlerle tespit edilen inflamasyon hasarının şiddeti ile paralel şekilde artış gösterdiği rapor edilmiştir (Lee ve Lim, 2007; Song ve diğ., 2013; Zhao ve diğ., 2013). Tüm bu sonuçlar, bizim kolit grubundaki MPO bulgularımızla birlikte, kalın bağırsak mukozasına nötrofil infiltrasyonunun inflamasyonla seyreden kolit hasarından sorumlu en önemli süreçlerden biri olduğu gerçeğini destekler niteliktedir.

Farelere intrarektal yoldan TNBS uygulanması ile oluşturulan, Crohn hastalığı ile klinik ve histolojik benzerliklere sahip kolon inflamasyonunun tetiklendiği bir deneysel modelde Gal-1'in iyileştirici etkisinin değerlendirildiği bir çalışmada, TNBS uygulanması ile birlikte eş zamanlı olarak 7 gün boyunca günlük olarak 0.04, 0.4 ve 1 mg/kg dozlarda intravenöz olarak Gal-1 enjekte edilen BALB/c fareler, 7. günde sakrifiye edilerek, kolon dokuları incelemeye tabi tutulmuştur. Sadece TNBS uygulanan grupta farelerin distal kolonlarında yapılan histolojik incelemelerde kolon duvarında kalınlaşmalar, lamina propreda yoğun inflamatuvar infiltrasyon, goblet hücre kaybı ve kript yapısında bozulmalar ile kriptlerin kaybı gibi mikroskobik bulgular, MPO seviyesinde önemli bir artış ve ciddi ağırlık kayıpları tespit edilmiştir (Santucci ve diğ., 2003). TNBS uygulamasından önce farelere Gal-1 ön enjeksiyonu, subepitelial ödem haricinde TNBS grubundaki farelerde gözlenen histolojik hasarı iyileştirerek uygulanan doza bağlı olarak (özellikle 1 mg/kg Gal-1) kolon hasarının yayılımını, histolojik hasar skorunu, vücut ağırlığındaki kayıpları ve MPO seviyesini belirgin derecede azaltmış ve TNBS ile oluşturulan kolon hasarına karşı koruyucu bir rol oynamıştır (Santucci ve diğ., 2003). Bizim çalışmamızda da farelere DSS ve Gal-1'in birlikte verildiği grupta, yukarıdaki bulgular ile uyumlu olacak şekilde distal kolon dokusunda, submukozal bazı alanlarda orta derecede ödem, birkaç bireyin lamina propreasında hafif inflamatuvar hücre infiltrasyonu, kript yapısında hafif bozukluklar dışında genel olarak kontrol bireylerdekine benzer bir görünüm mevcuttur. Gal-1'in DSS verilen farelere ön enjeksiyonu, DSS'nin neden olduğu yaygın inflamatuvar hücre infiltrasyonu, geniş alanlarda goblet hücre kaybı ve kript yapısındaki ciddi bozuklukları önleyerek, kolon morfolojisini korumuştur. DSS uygulanan farelere Gal-1'in ön enjeksiyonu mukozal yapıyı ve kript bütünlüğünü koruyarak, histolojik hasar skorunu DSS kolit grubuna göre önemli derecede azaltmıştır. Ayrıca, DSS verilen gruba Gal-1'in ön enjeksiyonu, DSS kolit grubuna göre kolon uzunluğunda bir artışa, % ağırlık kaybında azalmaya ve HAI'de istatistiksel olarak anlamlı derecede düşüşe neden olarak kolit oluşumunu

önlemiştir. Bunun yanı sıra, Gal-1 enjeksiyonu kolit gruplarında MPO seviyesinde azalmaya neden olarak, PMN infiltrasyonunu önlemiştir. Bu bilgiler ışığında, inflamatuvar bir bağırsak hastalığı olan ülseratif kolitte Gal-1'in, kolon mukozası ve submukozasına lökositlerin göçünü önleyerek, anti-inflamatuvar bir etki gösterdiğini söyleyebiliriz.

Ülseratif kolitte, epitel hücre proliferasyonu ve apoptoz arasındaki dengenin bozulması söz konusudur (Jones ve Gores, 1997, Watson ve Pritchard, 2000). Ülseratif kolitte inflamasyonlu kolon mukozasındaki epitel hücre hasarı, bu hücrelerin apoptozu ile sonuçlanabilir. Epitel bariyerin yıkımı, kalın bağırsakta bulunan mikroorganizmaların invazyonuna yol açarak, kolon mukozasında kronik inflamasyona neden olur. Bazı çalışmalarda, ülseratif kolitte hem proliferasyonun hem de apoptozun anormal biçimde arttığı rapor edilmiştir (Strater ve diğ., 1997, Iimura ve diğ., 2000). Sıçanlara tekrarlayan sikluslar ile uygulanan % 4 DSS ile oluşturulan kronik kolitte, kolondaki epitel hücrelerin proliferasyon ve apoptoz oranları belirgin derecede artmıştır (Vetuschi ve diğ., 2002). Bu artışların alevlenme ve hafifleme sikluslarından kaynaklandığı ileri sürülmektedir. Oysa ki, farelerde akut kolit modeli oluşturduğumuz bizim çalışmamızda, 5 gün boyunca uygulanan DSS'nin kolon mukozasındaki hücrelerinin proliferasyonu üzerinde azaltıcı etkileri olduğu tespit edilmiştir. Buna paralel olarak, 8 gün boyunca moleküler ağırlığı 5 kDa olan % 5 DSS (w/w) içecek şekilde standart kemirgen toz yemi verilen erkek BALB/cA Jcl farelerde oluşturulan akut kolit modelinde, 8. günün sonunda kontrol grubundaki farelere göre, vücut ağırlıklarında azalma ve histolojik hasar skorunda tespit edilen belirgin bir artışın yanı sıra, hücre siklusunun aktif fazlarını gösteren anti-fare Ki-67 antikoru kullanılarak yapılan immünohistokimyasal işaretlemelerde kolon epitel hücrelerinin mitotik aktiviteleri gözlemlenmiştir (Araki ve diğ., 2010). Kontrol grubundaki bireylerde kriptlerin bazal kısımlarında anti-Ki-67 pozitif hücreler çok sayıda bulunurken; DSS verilen farelerdeki immün işaretlemede azalma tespit edilmiştir. Yani, farelere DSS uygulanması kriptlerde çoğalmakta olan epitel hücre oranını kontrol grubundaki bireylere kıyasla belirgin şekilde azaltmıştır (Araki ve diğ., 2010). Bu bulgular, kısa süreli DSS uygulamasının epitel hücrelerini G₀ fazına sokarak hücre siklusunu bloke ettiği ve onarım mekanizmaları uyarılmadan önce apoptotik sürecin de tetiklenmesi ile, mukozal hasarın olduğu şeklinde açıklanabilir. Muhtemelen, farelere tekrarlayan sikluslar halinde DSS

verilmesi, kolon epitelinin kronik inflamasyona maruz kalmasına neden olacak ve onarım mekanizmaları devreye sokularak, mukozal alanda hücre proliferasyonunun artışı uyaracaktır. Yine Tessner ve diğ. (1998), DSS ile farelerde oluşturdukları akut kolit modelinde, bromodeoksiüridin işaretleme yöntemi kullanarak, çoğalan epitel hücrelerin % 90 oranında azaldığını rapor etmişlerdir. Yukarıda bahsedilen akut çalışmalardan elde edilen bulgulara benzer şekilde çalışmamızda da 5 gün süreyle farelere uygulanan DSS, mukozal alandaki hücrelerde fare anti-Ki-67 immünohistokimyası ile belirlenen proliferasyon indeksini kontrol grubuna göre önemli ölçüde azaltarak, yaygın kript hasarına neden olmuştur.

Rekombinant Gal-1, hücre proliferasyonu üzerinde konsantrasyona da bağlı olarak bifazik etkiler gösterir. Düşük konsantrasyonlarda Gal-1 mitojeniktir ve laktoz ile inhibisyona duyarlıdır. Bu lektinin proliferasyon üzerindeki inhibitör etkileri ise daha yüksek konsantrasyonlarda gerçekleşir ve laktozdan bağımsızdır (Adams ve diğ., 1996). Gal-1 vasküler düz kas hücreleri (Moiseeva ve diğ., 2000), pulmoner arter endotel hücreleri (Sanford ve Harris-Hooker, 1990), hepatik satellit hücreleri (Maeda ve diğ., 2003) ve fare BALB3T3 fibroblast hücreleri (Yamaoka ve diğ., 1991) üzerinde mitojenik etkiye sahiptir ve bu etki lektin aktivitesi ile ilişkilidir. Oysa ki Gal-1, fare embriyonik fibroblastların çoğalmalarını inhibe edici bir etki de gösterir (Yamaoka ve diğ., 1991). Pankreatik satellit hücreler, pankreatit gibi inflamasyon veya hasar durumlarında aktifleşerek, yüksek dozda Gal-1 eksprese eder. Gal-1, sıçan pankreatik dokularından izole edilen ve 14 gün boyunca kültürde aktive olan bu satellit hücrelerin proliferasyonlarını ERK yolağı üzerinden ve β -galaktozid aktivitesine bağlı olarak uyarır. Bromodeoksiüridin metoduyla tespit edilen hücre proliferasyonu, Gal-1'in dozuna bağlı olarak artış göstermektedir (Masamune ve diğ., 2006). Ayrıca, antisens cDNA transfeksiyonu ile Gal-1 geninin inhibisyonu sıçan kökenli glioma hücre hattında tümör gelişimini durdurmaktadır (Yamaoka ve diğ., 2000). Bu bulgular Gal-1'in proliferasyonu arttırıcı etkisini kanıtlar niteliktedir. Çalışmamızda da yukarıda verilen bulgular ile uyumlu olarak, sadece Gal-1 enjeksiyonu yapılan farelerin kolon mukozasındaki hücre proliferasyon indeksi, kontrol grubuna göre artış göstermiştir. Ek olarak, DSS'nin kolon epitel hücrelerinin proliferasyonu üzerindeki baskılayıcı etkileri, Gal-1'in ön olarak enjeksiyonu ile inhibe edilmiş ve kolit grubuna göre proliferasyonda belirgin bir artış ile sonuçlanmıştır.

Bu çalışma planlanırken hedeflerimizden biri de, DSS ile akut olarak oluşturulan kolit hasarında oksidatif stresin ve anti-oksidan savunma sisteminin rolünü tespit edebilmek ve Gal-1'in kolon dokusunda DSS ile oluşan oksidatif hasarda oksidan/anti-oksidan sistem üzerindeki bilinmeyen etkilerini açığa çıkarabilmektir.

Reaktif oksijen metabolitleri, sitokinler, araşidonik asit metabolitleri ve nötrofil infiltrasyonu ile birlikte pro-inflamatuvar araçların aşırı üretimi gibi çok sayıdaki faktör ülseratif kolit oluşumuna neden olabilir. Fizyolojik şartlar altında oksidan ve anti-oksidan sistemler arasında var olan denge, patolojik durumlarda bozulur (Dincer ve diğ., 2007). Ülseratif kolitte aktif hale gelen ve kolon mukozasına göç eden aktif nötrofiller, burada ROT'ları üreterek kolon dokusunda oksidatif hasara neden olurlar (Naito ve diğ., 2007). Reaktiviteleri çok yüksek olan ROT'ların DSS uygulanmasından sonra kolon mukozasındaki seviyelerinin önemli derecede arttığı bildirilmiştir (Araki ve diğ., 2003). Bağırsak epitel hücre membranlarında, artmış ROT düzeyleri, serbest radikal saldırısı ve ülseratif kolit oluşumunun erken safhalarında gerçekleşen ve hastalığın gelişiminde kritik bir öneme sahip olan lipid peroksidasyonu yolu ile oksidatif hasar meydana gelir. Hasar oluşan inflamasyonlu dokuda, ROT üretiminin artması ile pozitif bir feedback mekanizması oluşur ve anti-oksidan sistem yetersiz kalır (Seril ve diğ., 2003). Lipid peroksidasyonu sonucu oluşan MDA, membran komponentlerine çapraz bağlanarak, hücre toksisitesine neden olur (Zhao ve diğ., 2013). Anti-oksidan savunmanın önemli unsurlarından biri olan SOD, reaktif oksijen türlerini ortadan kaldırarak, ROT'lar ile oluşan oksidatif hasara karşı hücreleri korur. GSH-Px ise organik peroksitlerin ve H₂O₂'nin detoksifikasyonunun yanı sıra, lipid moleküllerinin realkilasyonu aracılığı ile hücresel membranların rejenerasyonunu da sağlar (Chen ve diğ., 2003, Ademoglu ve diğ., 2004).

Literatürde, DSS ile kolit modellerinde oksidatif stres ve anti-oksidan sistemin incelendiği çalışmalar mevcuttur (Lee ve Lim, 2007; Yao ve diğ., 2010; Song ve diğ., 2013; Zhao ve diğ., 2013). Yao ve diğ. (2010) % 5 DSS'nin 7 gün uygulanması ile Zhao ve diğ. (2013) ise moleküler ağırlığı 5000 Da olan % 5 DSS'nin 10 gün uygulanması ile oluşturdukları akut kolit modellerinde inflamasyonlu kolon dokusundaki oksidan/anti-oksidan parametreleri araştırdıkları çalışmalarında, kolon MPO ve MDA seviyelerinin kolit grubunda kontrol gruplarına göre arttığını; SOD ve GSH-Px aktivitelerinin kolit

gruplarında kontrol gruplarına oranla azaldığını ve DSS'nin oksidatif hasarı arttırarak, anti-oksidan cevabı baskıladığını tespit etmişlerdir. % 5 DSS'nin 7 gün boyunca erkek ICR soyu farelere uygulanması ile oluşturulan akut kolit modelinde, CAT, SOD ve GSH-Px aktivitelerinin DSS grubunda kontrol grubuna göre belirgin derecede azaldığı rapor edilmiştir (Lee ve Lim, 2007). Song ve diğ. (2013) tarafından yapılan bir başka çalışmada ise, 7 gün boyunca uygulanan moleküler ağırlığı 36.000-50.000 Da olan % 3'lük DSS, kolon homojenatlarındaki GSH seviyelerini kontrol grubuna oranla azaltmış, MDA seviyelerini ise önemli derecede arttırmıştır. Bizim bulgularımız da yukarıda sözü edilen çalışmalarla uyumlu olarak, kolon dokusunda MPO ve MDA seviyelerinin DSS ile oluşturulan kolit grubunda, kontrol grubuna kıyasla önemli derecede arttığını; GSH seviyeleri ile SOD, GSH-Px ve CAT aktivitelerinin ise kolit grubunda anlamlı derecede azaldığını göstermektedir. Bu sonuçlar, DSS kolit modelinde, nötrofil ve makrofaj aktivasyonu ve lipid peroksidasyonu ile bağlantılı olarak kolon dokusunda oksidatif stresin arttığını ve anti-oksidan savunma sisteminin büyük ölçüde baskılandığını göstermektedir.

Galektin-1'in çeşitli dokularda oksidan ve anti-oksidan sistem üzerindeki etkileri bilinmemektedir. Bununla birlikte, *in vitro* bir çalışmada Gal-1'in oksidatif strese karşı hücreleri koruduğuna dair bulgular mevcuttur (Ito ve diğ., 2011). Oksidatif strese duyarlı olan EAhy926 vasküler endotel hücre soyuna oksidatif stres oluşturmak amacıyla 10 µM dozda H₂O₂ uygulanmış ve 200 µg/ml dozda verilen Gal-1'in oksidatif strese karşı bu hücreleri koruduğu tespit edilmiştir. Yani, Gal-1 vasküler endotel hücrelerde H₂O₂ ile oluşturulan oksidatif stres aracılı apoptozu inhibe etmektedir. Bunun yanı sıra, hipoksi ve oksidatif stres durumlarında, kanser hücrelerinde Gal-1 ekspresyonunun arttığı da bildirilmektedir (Ito ve diğ., 2011).

Literatürde galektin-1'in sağlıklı veya hasar görmüş kolon dokusunda veya başka herhangi bir dokuda oksidatif stres belirteci olarak doku MDA düzeyi veya anti-oksidan sistemin parametreleri olan GSH, GSH-Px, CAT, SOD üzerindeki etkilerini inceleyen herhangi bir çalışma tespit edilememiştir. Bu yönüyle çalışmamız galektin-1'in MDA ve GSH düzeyleri ve anti-oksidan enzim aktiviteleri üzerindeki etkilerini ortaya koyan ilk çalışma olma niteliğindedir. Bu çalışmada DSS verilen farelere galektin-1'in ön uygulanması, kolit grubuna göre kolon homojenatlarında GSH düzeyleri, GSH-Px, CAT

ve SOD aktivitelerinde istatistiksel olarak belirgin bir artışa, lipid peroksidasyonunun göstergesi olan MDA seviyelerinde ise kolit grubundaki bireylere oranla belirgin bir azalmaya neden olmuştur. Bu bulgular ışığında, oksidatif stresin uyarıldığı DSS kolit modelinde, galektin-1'in kolon dokusunda anti-oksidan savunma mekanizmasını aktive ederek, oksidatif hasara karşı koruyucu etki gösterdiğini söyleyebiliriz.

Sitokinler immün fonksiyonların düzenlenmesinde önemli rol oynayan moleküllerdir. İnflamatuvar bağırsak hastalıklarında pro- ve anti-inflamatuvar sitokinler arasındaki dengenin bozulduğu bilinmektedir. DSS ile oluşturulan kolitte kalın bağırsak mukozasına inflamatuvar hücrelerin göçü, bağırsak epitel hücreleri ve inflamatuvar hücreler tarafından üretilen, kolon hasarına katkıda bulunan pro-inflamatuvar sitokin düzeylerindeki artışla korelasyonludur (Rogler ve Andus, 1998). İnflamatuvar bağırsak hastalığı olan kişilerin kolon biyopsilerinde IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, IFN- γ ve TNF- α gibi pro-inflamatuvar sitokin seviyelerinin arttığı; IL-4 gibi anti-inflamatuvar sitokin düzeylerinin azaldığı rapor edilmiştir (Obermier ve diğ., 1999). DSS ile oluşturulan kolit modelinde kolitin gelişim sürecinde özellikle TNF- α ve IFN- γ 'nın önemli rol oynadığı gösterilmiştir (Obermier ve diğ., 1999). DSS ile oluşturulan ülseratif kolitte erkek C57BL/6 farelere % 2.5 DSS (36.000-50.000 Da) 7 gün boyunca uygulanmış ve DSS'nin uygulandığı aynı periyotta fosfotidilinositol 3-kinaz inhibitörlerinin akut hastalık modeli üzerindeki koruyucu rolü araştırılmıştır. Bu çalışmada, kolon dokularındaki TNF- α , IL-1 β ve IFN- γ seviyelerinin akut DSS kolitin oluşturulma fazında, kontrole göre belirgin derecede arttığı rapor edilmiştir (Van Dop ve diğ., 2010). 5 gün süre ile % 3 DSS uygulanan ve DSS uygulaması ile başlayıp 7 gün süre ile iyileştirici ajanın uygulandığı başka bir çalışmada ise, DSS uygulanan grupta ELISA yöntemi ile kolon homojenatlarında TNF- α ve IL-1 β sitokin seviyelerinde önemli bir artış saptanmakla birlikte; TNF- α ve IFN- γ mRNA ekspresyonlarında da belirgin artış gözlenmiştir (Matos ve diğ., 2013). Bizim çalışmamızda da, yukarıda sözü edilen bulgulara benzer şekilde, kontrol grubuna oranla DSS grubundaki kolon doku homojenatlarında pro-inflamatuvar bir sitokin olan TNF- α seviyeleri istatistiksel olarak anlamlı bir artış göstermiştir.

Galektin-1'in TNF- α sitokin seviyelerine etkilerinin incelendiği konkonavalin A ile oluşturulan bir *in vivo* karaciğer hasar modelinde, konkonavalin A'nın

uygulanmasından 30 dakika önce intravenöz olarak 40 µg dozda enjekte edilen Gal-1, hasar grubunda 2. saatte pik yapan plazma TNF-α seviyelerini neredeyse tamamen baskılamıştır (Santucci ve diğ., 2000). Aynı çalışmada Gal-1'in *in vitro* ortamda sitokin salınımını etkileme durumu da değerlendirilmiştir. Bu amaçla, farelerin dalaklarından izole edilen makrofajlar lipopolisakkaritler ile *in vitro* ortamda uyarılmış ve artan konsantrasyonlarda Gal-1 ile inkübe edilmiştir. Hücre kültürü süpernatantlarındaki TNF-α seviyeleri 12 µM dozda uygulanan Gal-1 ile belirgin derecede azalmıştır (Santucci ve diğ., 2000). Zimosan ile farelerde oluşturulan bir akut peritonit modelinde, zimosan enjeksiyonundan 15 dakika önce 0.3 µg Gal-1'in intraperitoneal olarak uygulanması peritonit oluşturulmasının 4. saatinde hem nötrofillerin göçünü engellemiş hem de serumda yapılan ölçümlere göre TNF-α ve IL-1β salınımını baskılamıştır (Gil ve diğ., 2010). Bunun dışında TNBS ile oluşturulan farelerdeki kolit modelinde, intrarektal TNBS uygulamasından sonra 7 gün boyunca farklı dozlarda (0.04, 0.4 ve 1 mg/kg) Gal-1'in intravenöz olarak uygulandığı ve bu lektinin hastalığı önleyici etkisinin değerlendirildiği bir çalışmada, TNBS uygulanmasından sonra hem dokuda hem de plazmadaki TNF-α, IL-1β, IL-12 ve IFN-γ gibi Th1 aracılı pro-inflamatuvar sitokinlerin seviyeleri önemli derecede artmış, Gal-1 enjeksiyonu ise hem plazmadaki hem de kolon mukozasındaki bu pro-inflamatuvar sitokin düzeylerini doza bağımlı olarak belirgin şekilde azaltmıştır. 1 mg/kg dozda Gal-1 enjekte edilen farelerin pro-inflamatuvar sitokin düzeyleri, kolit oluşturulan gruba oranla diğer dozlara göre en düşük seviyededir (Santucci ve diğ., 2003). Çalışmamızda Gal-1 verilen gruptaki TNF-α düzeylerinde kontrol grubuna oranla bir artış tespit edilmesine rağmen, DSS verilen gruba Gal-1'in ön uygulaması, yukarıdaki çalışmaya benzer şekilde kolon homojenatlarındaki TNF-α seviyelerini kolit grubuna göre istatistiksel olarak belirgin derecede azaltmış ve kontrol bireylerdeki düzeye yaklaştırmıştır. Bu bulgular Gal-1'in, inflamasyon varlığında yükselmiş TNF-α düzeylerini düşürerek, anti-inflamatuvar etki gösterdiğini ve kolon hasarına karşı koruyucu rol oynayabileceğini göstermiştir.

IL-10 aktif monositler, B ve T hücreleri tarafından sentezlenir (Mosmann ve Moore, 1991). İnflamasyonda aktif haldeki makrofajlardan TNF-α, IL-1β, ve IL-6 gibi sitokinlerin salınımını da inhibe eder. IL-10 sadece T hücre aktivasyonunun regülasyonunda değil, aynı zamanda akut inflamatuvar cevabın baskılanmasında da rol oynar (De Waal Malefyt ve diğ., 1991; Fiorentino ve diğ., 1991). Günümüzde IL-10'un

inflamatuvar bağırsak hastalıklarında anti-inflamatuvar etkilere sahip olduğu bilinmektedir. IL-10 geni çıkarılmış farelerde kronik kolitin geliştiğinin görülmesi IL-10'un immün regülasyondaki önemini kanıtlar niteliktedir (Wirtz ve Neurath, 2007). C57BL/6 farelerin kullanıldığı ve % 3 DSS (40 kDa) ile 7 gün süreyle akut kolit oluşturulan bir çalışmada, kolit grubundaki serum TNF- α düzeylerinin kontrollere göre oldukça yüksek olduğu, IL-10 seviyelerinin ise kontrol gruba göre düştüğü gösterilmiştir (Alex ve diğ., 2009). 36-50 kDa ağırlığındaki DSS'nin 7 gün boyunca farelere uygulandığı başka bir çalışmada ise, rekombinant IL-10'un intraperitoneal olarak enjeksiyonu, hastalığın şiddetini IL-10 uygulanmayan farelere göre önemli derecede azaltmıştır (Cardania ve diğ., 2013). Biz de çalışmamızda, yukarıdaki bulgular ile uyumlu olarak, DSS ile akut kolit oluşturduğumuz farelerin kolon dokularındaki IL-10 düzeylerinin kontrol grubuna göre belirgin derecede düşük olduğunu tespit ettik.

Galektin-1'in IL-10 anti-inflamatuvar sitokin seviyelerine etkilerinin incelendiği bir çalışmada, deneysel olarak oluşturulmuş otoimmün bir retinal hastalık modelinde, farelere intraperitoneal olarak immünizasyonu takiben 1.6 mg/kg dozda Gal-1 uygulanmıştır. Gal-1 enjekte edilen farelerin ve kontrol farelerin lenf düğümü hücreleri immünizasyonun 21. gününde izole edilip, kültürü yapılmıştır. Bu hücreler *in vitro*da uyarıldıktan 48 saat sonra kültür süpernatantlarındaki IL-10 düzeyleri incelendiğinde, kontrol grubuna göre Gal-1 enjeksiyonu yapılan grupta IL-10 seviyelerinin yüksek olduğu gözlenmiştir (Toscana ve diğ., 2006). *In vivo* Gal-1'in etkilerinin arttırılması için stabil Gal-1 homodimerlerinin kullanıldığı bir başka çalışmada, periferal kan mononükleer hücrelere, dimerik stabil Gal-1 uygulanmasının doğal Gal-1'e göre IL-10 üretimini arttırdığı gözlenmiştir (Van Der Leij ve diğ., 2007). İnsan böbrek allograftlarını reddeden numunelerde *in vivo* T hücre cevabı için, IL-10'un protein ve mRNA ekspresyonlarının çalışıldığı ve *in vitro*da ise T hücreleri üzerinde IL-10 üretiminin incelendiği bir çalışmada, α CD3 ile stimüle edilen total periferal kan mononükleer hücre kültürlerinde yüksek konsantrasyonda dimerik Gal-1 (20 μ M) varlığında, doza ve lektin aktivitesine bağlı olarak, IL-10 üretiminin arttığı saptanmıştır (Van Der Leij ve diğ., 2004). Böbrek allograftlarının reddedilmesinde, T hücre aracılığı ile oluşan immün yanıtlar önemlidir. Reddetmenin olduğu hastalarda normal kişilere göre Gal-1, IL-10 ve IFN- γ mRNA ekspresyonları daha yüksektir. Aktif veya aktif olmayan T hücrelerinde IL-10 seviyelerinin azalması, immün yanıtın baskılanmasından

sorumlu mekanizma olabilir (Van Der Leij ve diğ., 2007). Literatürde Gal-1'in kolon dokusunda IL-10 düzeyleri üzerindeki etkisinin incelendiği herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Çalışmamızda, sadece Gal-1 enjeksiyonu yapılan grupta kontrol grubundaki bireylere oranla kolon homojenatlarındaki IL-10 seviyelerinin düşük olduğu tespit edilmesine karşın, DSS verilen farelere Gal-1'in ön enjeksiyonu IL-10 düzeylerini DSS ile kolit oluşturulan gruba göre önemli derecede yükseltti. Bu bulgu, yapılan *in vitro* çalışmalardan ve diğer dokulardan farklı olarak, uygulanan Gal-1'in dozuna ve süresine bağlı olarak, kolon dokusundaki IL-10 ekspresyon düzeylerinin farklı şekillerde etkilenebileceği şeklinde yorumlanabilir. Bunun yanı sıra, çalışmamızda Gal-1'in inflamasyon durumlarında aktivite göstererek, hasarlı kolon dokusunda IL-10 aracılığıyla anti-inflamatuvar bir etkiye sahip olduğu belirlenmiştir. Bu bulgular doğrultusunda, Gal-1'in DSS ile oluşturulan kolon hasarında koruyucu etkisinin önemli mekanizmalarından birinin IL-10 anti-inflamatuvar sitokin üretimini uyarması olduğu söylenebilir.

Galektin-1, inflamatuvar hastalıklar için potansiyel bir terapötik ajan olarak değerlendirilebilir. Gal-1, post-translasyonel modifikasyonlar geçirmediği için, rekombinant bakterilerce kolaylıkla sentezlenebilir ve laktozil sepharose kolonlarda saflaştırılabilir. Fakat araştırmalarda kullanılan rekombinant Gal-1'in kendi moleküler yapısından kaynaklanan çeşitli sınırlandırmalar vardır. Bu sorunların üstesinden gelebilmek için, Gal-1 preparasyonları çeşitli kimyasallar kullanılarak stabilize edilebilir. Gal-1 molekül içi ve moleküller arası disülfid köprülerini oluşturan çok sayıda sülfidril grubuna sahiptir. Bu nedenle de, hızlı olarak oksidasyona uğrayabilir veya CRD'lerin katlanmasında bozulmalara neden olabilir. Bu oksidatif inaktivasyondan kaçınmak amacıyla, ditiyoeritrol gibi indirgeyici ajanlar Gal-1 preparatlarına eklenebilir. Bundan başka, Gal-1'in ligandlarına düşük afinite gösteren monomerik forma dönüşmesinin engellenmesi de, aktivitesinin korunması için oldukça önemlidir. Gal-1'in dimerik yapısının korunması amacıyla gerçekleştirilen yeni çalışmaların sayısı gün geçtikçe artmaktadır. Dimerik ve stabil Gal-1 preparatlarının oluşturulması bu lektinin fonksiyonunu artıracak, otoimmün ve inflamatuvar hastalıkların tedavisi için yeni terapötik yaklaşımlar sağlayacaktır. Gal-1'in sitokin üretiminin düzenlemesi, hücre proliferasyonu ve ölümü arasındaki dengeleri sağlanması ve oksidatif hasarı önleyici

etkileri, onun çeşitli inflamatuvar ve oksidatif stres kökenli hastalıkların tedavisi için umut vaat edici bir molekül olmasını sağlamaktadır.

Bu çalışmada elde edilen bulgulara dayanarak vardığımız sonuçları ve çalışmanın özgün yönlerini kısaca şu şekilde özetleyebiliriz:

- Bu çalışma, DSS ile oluşturulan deneysel kolit modelinde eksojen olarak verilen Gal-1'in etkilerini inceleyen ilk deneysel çalışma olma niteliğindedir.
- Bu tezde, Gal-1'in kolon dokusunda oksidatif hasar ve anti-oksidan sistem üzerindeki rolü ilk kez tespit edilmiştir.
- 5 gün boyunca % 3 DSS verilen C57BL/6 soyu farelere rekombinant insan Gal-1'in ön uygulaması, kolite bağlı olarak oluşan kilo kaybını azaltmış, hastalık aktivite indeksini düşürmüştü ve kolon uzunluğunu arttırmıştır.
- Gal-1'in DSS verilen farelere ön enjeksiyonu, histolojik hasar skorunu düşürerek, DSS'nin distal kolonda meydana getirdiği dejeneratif hasarı büyük ölçüde indirgemıştır.
- DSS verilen gruba Gal-1 uygulaması, kolon mukozasında hücre proliferasyonunu uyararak, hastalığın şiddetini hafifletmiştir.
- Gal-1'in, DSS ile oluşturulan fare akut kolit modelinde kolon dokusunda gözlenen MDA artışını geri döndürerek; azalmış olan GSH düzeyleri ile GSH-Px, CAT ve SOD enzim aktivitelerini arttırarak oksidatif stresi baskıladığı ve anti-oksidan etkiler gösterdiği ilk kez ortaya konulmuştur.
- DSS kolit modelinde kolonda meydana gelen inflamasyon, rekombinant insan Gal-1'in farelere uygulanması ile belirgin olarak azalmıştır. Gal-1 kolon dokusunda, MPO ve TNF- α seviyelerinin indirgenmesine ve IL-10 seviyelerinin artışına neden olarak anti-inflamatuvar etkiler göstermiştir.
- Sonuç olarak, farelerde DSS ile oluşturulan akut kolit modelinde Gal-1'in hücre çoğalmasını uyarıcı, koruyucu, anti-oksidan ve anti-inflamatuvar etkilere sahip olduğunu söyleyebiliriz.
- Bu çalışma, rekombinant insan galektin-1'in ülseratif kolitin tedavisinde kullanılabilecek yeni bir terapötik ajan olarak hizmet edebilecek potansiyelde olduğunu göstermesi açısından önem taşımaktadır.

KAYNAKLAR

- Adams, L., Scott, G.K., Weinberg, C.S., 1996, Biphasic modulation of cell growth by recombinant human galectin-1, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1312, 137-144.
- Ademoglu, E., Erbil, Y., Tam, B., Barbaros, U., Ilhan, E., Olgac, V., Mutlu-Turkoglu, U., 2004, Vitamin E and selenium have beneficial effects on trinitrobenzenesulfonic acid-induced experimental colitis, *Digestive Diseases and Sciences*, 49, 102-108.
- Aebi, H., 1984, Catalase *in vitro*, *Methods Enzymology*, 105, 121-126.
- Ahmed, N., Gabius, H.J., Sabesan, S., Oscarson, S., Brewer, C.F., 2004, Thermodynamic binding studies of bivalent oligosaccharides to galectin-1, galectin-3, and the carbohydrate recognition domain of galectin-3, *Glycobiology*, 14, 817-825.
- Akkus, I., 1995, *Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri*, Mimoza Yayınları, Kuzucular Ofset, Konya-Türkiye, 38.
- Alex, P., Zachos, N.C., Nguyen, T., Gonzales, L., Chen, T.E., Conklin, L.S., Centola, M., Li, X., 2009, Distinct cytokine patterns identified from multiplex profiles of murine DSS and TNBS-induced colitis, *Inflammatory Bowel Diseases*, 15 (3), 341-352.
- Alkharfy, K.M., Kellum, J.A., Matzke, G.R., 2000, Unintended immunomodulation: part II. Effects of pharmacological agents on cytokine activity, *Shock*, 13, 346-360.
- Almkvist, J., Dahlgren, C., Leffler, H., Karlsson, A., 2002, Activation of the neutrophil nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase by galectin-1. *Journal of Immunology*, 168, 4034-4041.
- Andersen, M.R., Atkin, C.L., Eyre, H.J., 1982, Intact form of myeloperoxidase from normal human neutrophils, *Archives Biochemistry Biophysics*, 214 (1), 273-283.
- Araki, Y., Andoh, A., Fujiyama, Y., 2003, The free radical scavenger edaravone suppresses experimental dextran sulphate sodium-induced colitis in rats, *International Journal of Molecular Medicine*, 12, 125-129.
- Araki, Y., Mukaisyo, K., Sugihara, H., Fujiyama, Y., Hattori, T., 2010, Increased apoptosis and decreased proliferation of colonic epithelium in dextran sulfate sodium-induced colitis in mice, *Oncology Reports*, 24 (4), 869-874.

- Arrick, B.A., Nathan, C.F., 1984, Glutathione metabolism as a determinant of therapeutic efficacy: a review, *Cancer Research*, 44, 4224-4232.
- Ashwell, G. and Morell, A.G., 1974, The role of surface carbohydrates in the hepatic recognition and transport of circulating glycoproteins, *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology*, 41, 99-128.
- Aydın, A., Sayal, A. ve Işimer, A., 2001, *Serbest Radikaller ve Antioksidan Savunma Sistemi*, Gülhane Askeri Tıp Akademisi, Ayın Kitabı, GATA Basımevi, Ankara, 20, 48.
- Barondes, S.H., 1988, Bifunctional properties of lectins: Lectines redefined, *Trends in Biochemical Sciences*, 13, 480-482.
- Barondes, S.H., Cooper, D.N., Gitt, M.A., Leffler, H., 1994, Galectins: Structure and function of a large family of animal lectins, *The Journal of Biological Chemistry*, 269, 20807-20810.
- Barrionuevo, P., Beigier-Bompadre, M., Ilarregui, J.M., Toscano, M.A., Bianco, G.A., Isturiz, M.A., Rabinovich, G.A., 2007, A novel function for galectin-1 at the crossroad of innate and adaptive immunity: galectin-1 regulates monocyte/macrophage physiology through a nonapoptotic ERK-dependent pathway, *Journal of Immunology*, 178, 436-445.
- Bättig, P., Saudan, P., Gunde, T., Bachmann, M.F., 2004, Enhanced apoptotic activity of a structurally optimized form of galectin-1, *Molecular Immunology*, 41, 9-18.
- Baum, L.G., Seilhamer, J.J., Pang, M., Levine, W.B., Beynon, D., Berliner, J.A., 1995, Synthesis of an endogeneous lectin, galectin-1, by human endothelial cells is up-regulated by endothelial cell activation, *Glycoconjugate Journal*, 12, 63-68.
- Baumgart, D.C., Carding, S.R., 2007, Inflammatory bowel disease: cause and immunobiology, *Lancet*, 369, 1627-1640.
- Bento, A.F., Leite, D.F., Marcon, R., Claudino, R.F., Dutra, R.C., Cola, M., Martini, A.C., Calixto, J.B., 2012, Evaluation of chemical mediators and cellular response during acute and chronic gut inflammatory response induced by dextran sodium sulfate in mice, *Biochemical Pharmacology*, 84, 1459-1469.
- Berg, D.J., Zhang, J., Weinstock, J.V., Ismail, H.F., Earle K.A., Alila H., Pamukcu, R., Moore, S., Lynch, R.G., 2002, Rapid development of colitis in NSAID-treated IL-10-deficient mice, *Gastroenterology*, 123, 1527-1542.
- Beutler, E., Duron, O., Kelly, B.M., 1963, Improved method for the determination of blood glutathione, *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 61, 882-888.
- Blaser, C., Kaufmann, M., Muller, C., Zimmermann, C., Wells, V., Mallucci, L., Pircher, H., 1998, Beta-galactoside-binding protein secreted by activated T cells inhibits antigen-induced proliferation of T cells, *European Journal of Immunology*, 28, 2311-2319.

- Blitstein-Willinger, E., Schutz, G., Diamantstein, T., 1976, Changes in thymocyte reactivity to lectins by B-cell mitogens of the type of sulphated polyanions, *Immunology*, 30, 529-533.
- Blumberg, R.S., Saubermann, L.J., Strober, W., 1999, Animal models of mucosal inflammation and their relation to human inflammatory bowel disease, *Current Opinion in Immunology*, 11, 648-656.
- Blumberg, R.S., Strober W., 2001, Prospects of research in inflammatory bowel disease, *Jama*, 285, 643-647.
- Bradfield, J.W.B., Souhami, R.L., Addison, J.E., 1974, The mechanism of the adjuvant action of dextran sulphate, *Immunology*, 26, 383-386.
- Camby, I., Belot, N., Lefranc, F., Sadeghi, N., de Launoit, Y., Kaltner, H., Musette, S., Darro, F., Danguy, A., Salmon, I., et al., 2002, Galectin-1 modulates human glioblastoma cell migration into the brain through modifications to the actin cytoskeleton and levels of expression of small GTPases, *Journal of Neuropathology Experimental Neurology*, 61, 585-596.
- Camby, I., Decaestecker, C., Lefranc, F., Kaltner, H., Gabius, H.J., Kiss, R., 2005, Galectin-1 knocking down in human U87 glioblastoma cells alters their gene expression pattern, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 335, 27-35.
- Camby, I., Mercier, M.L., Lefranc, F., Kiss, R., 2006, Galectin-1: a small protein with major functions, *Glycobiology*, 16 (11), 137-157.
- Cardania, D., Dusio, G.F., Luchini, P., Sciarabba, M., Solimene, U., Rumio, C., 2013, Oral administration of interleukin-10 and anti-IL-1 antibody ameliorates experimental intestinal inflammation, *Gastroenterology Research*, 6 (4), 124-133.
- Carr, A.C., Winterbourn, C.C., 1997, Oxidation of neutrophil glutathione and protein thiols by myeloperoxidase-derived hypochlorous acid, *Biochemical Journal*, 327, 275-281.
- Casey, L.C., 2000, Immunologic response to infection and its role in septic shock, *Critical Care Clinics*, 16, 193-213.
- Cavdar, C., Sifil, A., Camsarı, T., 1997, Reaktif oksijen partikülleri ve antioksidan savunma, *Türk Nefroloji Diyaliz ve Transplantasyon Dergisi*, 6, 92-95.
- Cedeno-Laurent, F., Barthel, S.R., Opperman, M.J., Lee, D.M., Clark, R.A., Dimitroff, C.J., 2010, Development of a nascent galectin-1 chimeric molecule for studying the role of leukocyte galectin-1 ligands and immune disease modulation, *Journal of Immunology*, 185, 4659-4672.
- Cedeno-Laurent, F. and Dimitroff, C.J., 2012, Galectin-1 research in T cell immunity: Past, present and future, *Clinical Immunology*, 142, 107-116.

- Cheeseman, K.H., Slater, T.F., 1993, An introduction to free radical biochemistry, *British Medical Bulletin*, 49 (3), 479-480.
- Chen, H.J., Wu, S.B., Chang, C.M., 2003, Biological and dietary antioxidants protect against DNA nitration induced by reaction of hypochlorous acid with nitrite, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 415, 109-116.
- Chiariotti, L., Salvatore, P., Frunzio, R., Bruni, C.B., 2004, Galectin genes: regulation of expression, *Glycoconjugate Journal*, 19, 441-449.
- Cho, M. and Cummings, R.D., 1995, Galectin-1, a beta-galactoside-binding lectin in Chinese hamster ovary cells, physical and chemical characterization, *The Journal of Biological Chemistry*, 270, 5198-5206.
- Cho, J.H., 2003, Significant role of genetics in IBD: the NOD2 gene, *Reviews in Gastroenterological Disorders*, 3, 18-22.
- Cooper, H.S., Murthy, S.N., Shah, R.S., Sedergran, D.J., 1993, Clinicopathologic study of dextran sulfate sodium experimental murine colitis, *Laboratory Investigation*, 69 (2), 238-249.
- Cooper, D.N. and Barondes, S.H., 1999, God must love galectins; he made so many of them, *Glycobiology*, 9, 979-994.
- Cooper, D.N., 2002, Galectinomics: finding themes in complexity. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1572, 209-231.
- Dagli, U., 2006, *İnflamatuvar barsak hastalıklarının epidemiyolojisi*, In: *İnflamatuvar Barsak Hastalıkları Derneği Kitabı*, Arda, K., Cetinkaya, H., Daglı, U., Disibeyaz, S., Ensari, A., Gundogdu, H., Hamzaoğlu, H.O., Suleymanlar, I., Tezel, A., Torunler, M., (ed.), *İnflamatuvar Barsak Hastalıkları Derneği Yayınları*, 5-10.
- Delibas, N., Ozcankaya, R., 1995, Serbest radikaller, *SDÜ Tıp Fakültesi Dergisi*, 2 (3), 11-17.
- De Waal Malefyt, R., Haanen, J., Spits, H., Roncarolo, M.G., Te Velde, A., Figdor, C., Johnson, K., Kastelein, R., Ysel, H., De Vries, J.E., 1991, Interleukin 10 (IL-10) and viral IL-10 strongly reduce antigen-specific human T cell proliferation by diminishing the antigen presenting capacity of monocytes via down-regulation of class II major histocompatibility complex expression, *Journal of Experimental Medicine*, 174, 915.
- Dias-Baruffi, M., Zhu, H., Cho, M., Karmakar, S., McEver, R.P., Cummings, R.D., 2003, Dimeric galectin-1 induces surface exposure of phosphatidylserine and phagocytic recognition of leukocytes without inducing apoptosis, *Journal of Biological Chemistry*, 278, 41282-41293.

- Dickinson, D.A. and Forman, H.J., 2002, Cellular glutathione and thiols metabolism, *Biochemical Pharmacology*, 64, 1019-1026.
- Dieleman, L.A., Palmen, M.J., Akol, H., Bloemena, E, Pena, A.S., Meuwissen, S.G., Van Rees, E.P., 1998, Chronic experimental colitis induced by dextran sulphate sodium (DSS) is characterized by Th1 and Th2 cytokines, *Clinical and Experimental Immunology*, 114 (3), 385-391.
- Dincer, Y., Erzin, Y., Himmetoglu, S., Gunes, K.N., Bal, K., Akcay, T., 2007, Oxidative DNA damage and antioxidant activity in patients with inflammatory bowel disease, *Digestive Diseases and Sciences*, 52, 1636-1641.
- Drickamer, K., 1988, Two distinct classes of carbohydrate-recognition domains in animal lectins, *Journal of Biological Chemistry*, 263, 9557-9560.
- Dubuquoy, L., Jansson, E.A., Deeb S., Rakotobe, S., Karoui, M., Colombel J.F., Auwerx, J., Pettersson, S., Desreumaux, P., 2003, Impaired expression of peroxisome proliferator-activated receptor γ in ulcerative colitis, *Gastroenterology*, 124, 1265-1276.
- Duvnjak. M., Bilić, A., Barsić, N., Tomasić, V., Stojavljević, S., 2013, Classical medications in the treatment of inflammatory bowel diseases, *Acta Medica Croatica*, 67 (2), 111-124.
- Elad-Sfadia, G., Haklai, R., Ballan, E., Gabius, H.J., and Kloog, Y., 2002, Galectin-1 augments Ras activation and diverts Ras signals to Raf-1 at the expense of phosphoinositide 3-kinase, *Journal of Biological Chemistry*, 277, 37169-37175.
- Farrell, R.J., Peppercorn, M.A., 2002, Ulcerative colitis, *Lancet*, 359, 331-340.
- Fillatreau, S., Gray, D., Anderton, S.M., 2008, Not always the bad guys: B cells as regulators of autoimmune pathology. *Nature Reviews Immunology*, 8, 391-397.
- Fiorentino, D.F., Zlotnik, A., Mosmann, T.R., Howard, M., O'Garra, A., 1991, IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages, *Journal of Immunology*, 147, 3815.
- Fischer, C., Sanchez-Ruderisch, H., Welzel, M., Wiedenmann, B., Sakai, T., Andre, S., Gabius, H.J., Khachigian, L., Detjen, K.M., Rosewicz, S., 2005, Galectin-1 interacts with the $\alpha_5\beta_1$ fibronectin receptor to restrict carcinoma cell growth via induction of p21 and p27, *Journal of Biological Chemistry*, 280, 37266-37277.
- Gautam, M.K. and Goel, R.K., 2012, Animal models for induction of ulcerative colitis, *Inventi rapid: Animal Models & Cell Assay*, 2012 (4), 1.
- Gil, C.D., Gullo, C.E., Oliani, S.M., 2010, Effect of exogenous galectin-1 on leukocyte migration: modulation of cytokine levels and adhesion molecules, *International Journal Clinical and Experimental Pathology*, 4, 74-84.

- Gilat, T., Grossman, A., Fireman, Z., Rozen, P., 1986, *Inflammatory bowel disease in jews*, In: The genetics and epidemiology of inflammatory bowel disease, McConnell, R., Rozen, R., Langman, M., Gilat, T., (ed.), Karger, New York, 11, 141.
- Günzl, P., Bauer, K., Hainzl, E., Matt, U., Dillinger, B., Mahr, B., Knapp, S., Binder, B.R., Schabbauer, G., 2010, Antiinflammatory properties of the PI3K pathway are mediated by IL- 10/DUSP regulation, *Journal of Leukocyte Biology*, 88, 1259-1269.
- Halliwell, B., 1994, Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence? *The lancet*, 344, 721-724.
- Halliwell, B., Gutteridge, J., 2007, *Free Radicals in Biology and Medicine*, Oxford Science Publications, USA, 019856869X.
- Hanauer, SB., 2006, Inflammatory bowel disease: Epidemiology, pathogenesis, and therapeutic opportunities, *Inflammatory Bowel Diseases*, 12, 3-9.
- He, J. and Baum, L.G., 2006, Endothelial cell expression of galectin-1 induced by prostate cancer cells inhibits T-cell transendothelial migration, *Laboratory Investigations*, 86 (6), 578-590.
- Hirabayashi, J., Hashidate, T., Arata, Y., Nishi, N., Nakamura, T., Hirashima, M., Urashima, T., Oka, T., Futai, M., Muller, W.E., Yagi, F., Kasai, K., 2002, Oligosaccharide specificity of galectins: a search by frontal affinity chromatography, *Biochimica et Biophysica Acta*, 19 (1572), 232-254.
- Hibi, T. and Ogata, H., 2006, Novel pathophysiological concepts of inflammatory bowel disease, *Journal of Gastroenterology*, 41, 10-16.
- Hittlet, A., Legendre, H., Nagy, N., Bronckart, Y., Pector, J.C., Salmon, I., Yeaton, P., Gabius, H.J., Kiss, R., and Camby, I., 2003, Upregulation of galectins-1 and -3 in human colon cancer and their role in regulating cell migration, *International Journal of Cancer*, 103, 370-379.
- Ho, G.T., Nimmo, E.R., Tenesa, A., Fennell, J., Drummond, H., Mowat, C., Arnott, D., Satsangi, J., 2005, Allelic variations of the multidrug resistance gene determine susceptibility and disease behavior in ulcerative colitis, *Gastroenterology*, 128, 288-296.
- Huang, T.C., Tsai, S.S., Liu, L.F., Liu, Y.L., Liu, H.J., Chuang, K.P., 2010, Effect of *Arctium lappa* L. in the dextran sulfate sodium colitis mouse model, *World Journal of Gastroenterology*, 16 (33), 4193-4199.
- Hudcovic, T., Stepankova, R., Cebra, J., Tlaskalova- Hogenova H., 2001, The role of microflora in the development of intestinal inflammation: acute and chronic colitis induced by dextran sulfate in germ-free and conventionally reared

- immunocompetent and immunodeficient mice, *Folia Microbiologica*, 46 (6), 565-572.
- Huflejt, M.E. and Leffler, H., 2004, Galectin-4 in normal tissues and cancer, *Glycoconjugate Journal*, 20, 247-255.
- Hughes, R.C, 1999, Secretion of the galectin family of mammalian carbohydrate-binding proteins, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1473, 172-185.
- Iimura, M., Nakamura, T., Shinozaki, S., Iizuka, B., Inove, Y., Suzuki, S., Hayashi, N., 2000, Bax is downregulated in inflamed colonic mucosa of ulcerative colitis, *Gut*, 47, 228-235.
- Iqbal, A.J., Sampaio, A.L., Maione, F., Greco, K.V., Niki, T., Hirashima M., Perretti, M., Cooper, D., 2011, Endogenous galectin-1 and acute inflammation: emerging notion of a galectin-9 pro-resolving effect, *American Journal of Pathology*, 178, 1201-1209.
- Isık, F., 2009, *Trinitrobenzen sülfonik asit (TNBS) ile oluşturulan deneysel kolitte çörek otu (nigella sativa) yağının koruyucu etkisinin incelenmesi*, Yüksek lisans tezi, Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
- Ito, K., Scott, S.A., Cutler, S., Dong, L.F., Neuzil, J., Blanchard, H., Ralph, S.J., 2011, Thiodigalactoside inhibits murine cancers by concurrently blocking effects of galectin-1 on immune dysregulation, angiogenesis and protection against oxidative stress, *Angiogenesis*, 14, 293-307.
- Jones, B.A. and Gores, G.J., 1997, Physiology and pathophysiology of apoptosis in epithelial cells of the liver, pancreas, and intestine, *American Journal of Physiology*, 273, 1174-1188.
- Kanneganti, M., Mino-Kenudson, M., Mizoguchi, E., 2011, Animal models of colitis-associated carcinogenesis, *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2011, 342637.
- Kaser, A., Zeissig, S., Blumberg, R.S., 2010, Inflammatory bowel disease, *Annual Review of Immunology*, 28, 573-621.
- Kavas, G., 1989, Serbest radikaller ve organizma üzerine etkileri, *Türkiye Klinikleri*; 9 (1), 1-8.
- Kawada, M., Arihiro, A., Mizoguchi, E., 2007, Insights from advances in research of chemically induced experimental models of human inflammatory bowel disease, *World Journal of Gastroenterology*, 13 (42), 5581-5593.
- Keshavarzian, A., Fusunyan, R.D., Jacyno, M., Winship, D., Macdermott, R.P., Sanderson, I.R., 1999, Increased interleukin-8 (IL-8) in rectal dialysate from

- patients with ulcerative colitis: evidence for a biological role for IL-8 In inflammation of the colon, *American Journal Of Gastroenterology*, 94, 704-712.
- Kettle, A.J., Winterbourn, C.C., 1994, Assays for the chlorination activity of myeloperoxidase, *Methods in Enzymology*, 233, 502-513.
- Kim, H.S., Berstad, A., 1992, Experimental colitis in animal models, *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 27 (7), 529-537.
- Kitajima, S., Takuma, S., Morimoto, M., 1999, Changes in colonic mucosal permeability in mouse colitis induced with dextran sulfate sodium, *Experimental animals / Japanese Association for Laboratory Animal Science*, 48 (3), 137-143.
- Kitajima, S., Takuma S., Morimoto M., 1999, Tissue distribution of dextran sulfate sodium (DSS) in the acute phase of murine DSS-induced colitis, *Journal of Veterinary Medical Science*, 61 (1), 67-70.
- Kitajima, S., Takuma S., Morimoto, M., 2000, Histological analysis of murine colitis induced by dextran sulfate sodium of different molecular weights, *Experimental Animals*, 49 (1), 9-15.
- Kitajima, S., Morimoto, M., Sagara, E., 2002, A model for dextran sodium sulfate (DSS)-induced mouse colitis: bacterial degradation of DSS does not occur after incubation with mouse cecal contents, *Experimental Animals*, 51 (2), 203-206.
- Kruidenier, L., and Verspaget, H.W., 2002, Review article: oxidative stress as a pathogenic factor in inflammatory bowel disease-radicals or ridiculous?, *Alimentary Pharmacology Therapeutics*, 16 (12), 1997-2015.
- La, M., Cao, T.V., Cerchiaro, G., Chilton, K., Hirabayashi, J., Kasai, K., Oliani, S.M., Chernajovsky, Y., Perretti, M., 2003, A novel biological activity for galectin-1: inhibition of leukocyte-endothelial cell interactions in experimental inflammation, *American Journal of Pathology*, 163, 1505-1515.
- Lau, K.S., Partridge E.A., Grigorian A., Silvescu, C.I., Reinhold, V.N., Demetriou, M., Dennis, J.W., 2007, Complex N-glycan number and degree of branching cooperate to regulate cell proliferation and differentiation, *Cell*, 129 (1), 123-134.
- Lawrance R.A. and Burk R.F., 1976, Glutathion peroxidase activity in selenium defficient rat liver, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 71 (4), 952-958.
- Ledwozyw, A., Michalak, J., Stepien, A., Kadziolka, A., 1986, The relationship between plasma triglycerides, cholesterol, total lipids and lipid peroxidation products during human atherosclerosis, *Clinica Chimica Acta*, 155 (3), 275-283.
- Lee S.J., Lim, K.T., 2007, Glycoprotein isolated from *Ulmus davidiana* Nakai modulates inflammatory related factors in mouse colonic tissues, *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 23, 234-241.

- Leffler, H., Carlsson, S., Hedlund, M., Qian, Y., Poirier, F., 2004, Introduction to galectins, *Glycoconjugate Journal*, 19, 433-440.
- Leppanen, A., Stowell, S., Blixt, O., Cummings, R.D., 2005, Dimeric galectin-1 binds with high affinity to alpha 2,3-sialylated and nonsialylated terminal N-acetyllactosamine units on surface-bound extended glycans, *Journal of Biological Chemistry*, 280, 5549-5562.
- Lewis, J.D., Deren, J.J., Lichtensten G.R., 1999, Cancer risk in patient with inflammatory bowel diseases, *Gastroenterology Clinics of North America*, 28, 459-477.
- Lindberg, E., Tysk, C., Andersson, K., Järnerot, G., 1988, Smoking and inflammatory bowel disease. A case control study, *Gut*, 29 (3), 352-357.
- Liu, F.T., and Rabinovich, G.A., 2005, Galectins as modulators of tumour progression, *Nature Reviews Cancer*, 5, 29-41.
- Loftus, E.V. Jr, Sandborn, W.J., 2002, Epidemiology of inflammatory bowel disease, *Gastroenterology Clinics of North America*, 31 (1), 1-20.
- Lopez-Lucendo, M.F., Solis, D., Andre, S., Hirabayashi, J., Kasai, K., Kaltner, H., Gabius, H.J., Romero, A., 2004, Growth-regulatory human galectin-1: crystallographic characterisation of the structural changes induced by single-site mutations and their impact on the thermodynamics of ligand binding, *Journal of Molecular Biology*, 343, 957-970.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951, Protein measurement with the folin phenol reagent, *The Journal of Biological Chemistry*, 193 (1), 265-275.
- Maeda, N., Kawada, N., Seki, S., Arakawa, T., Ikeda, K., Iwao, H., Okuyama, H., Hirabayashi, J., Kasai, K., Yoshizato, K., 2003, Stimulation of proliferation of rat hepatic stellate cells by galectin-1 and galectin-3 through different intracellular signaling pathways, *Journal of Biological Chemistry*, 278, 18938-18944.
- Masamune, A., Satoh, M., Hirabayashi, J., Kasai, K., Satoh, K., Shimosegawa, T., 2006, Galectin-1 induces chemokine production and proliferation in pancreatic stellate cells, *American Journal of Physiology Gastrointestinal and Liver Physiology*, 290, 729-736.
- Matheson, N.R., Wong, P.S., Travis, J., 1981, Isolation and properties of human neutrophil myeloperoxidase, *Biochemistry*, 20, 325-330.
- Mathieu, A., Nagy, N., Decaestecker, C., Ferdinande, L., Vandenbroucke, K., Rottiers, P., Cuvelier, C.A., Salmon, I., Demetter, P., 2008, Expression of galectins-1, -3 and -4 varies with strain and type of experimental colitis in mice, *International Journal of Experimental Pathology*, 89 (6), 438-446.

- Matos, I., Bento, A.F., Marcon, R., Claudino, R.F., Calixto, J.B., 2013, Preventive and therapeutic oral administration of the pentacyclic triterpene α,β -amyrin ameliorates dextran sulfate sodium-induced colitis in mice: The relevance of cannabinoid system, *Molecular Immunology*, 54, 482-492.
- Melgar, S., Karlsson A., Michaelsson, E., 2005, Acute colitis induced by dextran sulfate sodium progresses to chronicity in C57BL/6 but not in BALB/c mice: correlation between symptoms and inflammation, *American Journal of Physiology*, 288 (6), 1328-1338.
- Melgar, S., Karlsson, L., Rehnstrom, E., Karlsson, A., Utkovic, H., Jansson, L., Michaelsson, E., 2008, Validation of murine dextran sulfate sodium-induced colitis using four therapeutic agents for human inflammatory bowel disease, *International Immunopharmacology*, 8 (6), 836-844.
- Mennigen, R., Nolte, K., Rijcken, E., Utech, M., Loeffler, B., Senninger, N., Bruewer, M., 2009, Probiotic mixture VSL#3 protects the epithelial barrier by maintaining tight junction protein expression and preventing apoptosis in a murine model of colitis, *American Journal of Physiology*, 296 (5), 1140-1149.
- Mills, K.H.G., 2004, Regulatory T cells: friend or foe in immunity to infection?, *Nature Reviews Immunology*, 4, 841-855.
- Mizoguchi, E., Mizoguthi, A., Takedatsu, H., Cario, E., De Jong, Y.P., Ooi, C.J., Xavier, R.J., Terhorst, C., Podolsky, D.K., Bhank, A.K., 2002, Role of tumor necrosis factor 2 (TNFR2) in colonic epithelial hyperplasia and chronic intestinal inflammation in mice, *Gastroenterology*, 122, 134-144.
- Moiseeva, E.P., Javed, Q., Spring, E.L., De Bono, D.P., 2000, Galectin 1 is involved in vascular smooth muscle cell proliferation, *Cardiovascular Research*, 45, 493-502.
- Moiseeva, E.P., Williams, B., Samani, N.J., 2003, Galectin -1 inhibits incorporation of vitronectin and chondroitin sulfate B into the extracellular matrix of human vascular smooth muscle cells, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1619, 125-132.
- Mosmann T.R. and Moore K.W., 1991, The role of IL-10 in crossregulation of TH1 and TH2 responses, *Immunology Today*, 12 (3), 49-53.
- Muglia, C., Mercer, N., Toscano, M.A., Schattner, M., Pozner, R., Cerliani, J.P., Gobbi, R.P., Rabinovich, G.A., Docena, G.H., 2011, The glycan-binding protein galectin-1 controls survival of epithelial cells along the crypt-villus axis of small intestine, *Cell Death Disease*, 2 (5), 163.
- Munoz, C., Misset, B., Fitting, C., Bleriot, J.P., Carlet, J., Cavaillon, J.M., 1991, Dissociation between plasma and monocyte-associated cytokines during sepsis, *European Journal of Immunology*, 21, 2177-2184.

- Naito, Y., Takagi, T., Yoshikawa, T., 2007, Neutrophil-dependent oxidative stress in ulcerative colitis, *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*, 41, 18-26.
- Nakajima, K., 1979, Effects of dextran sulphate on blood coagulation and fibrinolysis in spontaneously hypertensive rats, *Journal of Inflammation Research*, 1, 331-337.
- Nickel, W., 2005, Unconventional secretory routes: direct protein export across the plasma membrane of mammalian cells, *Traffic*, 6, 607-614.
- Novelli, F., Allion E.A., Wells, V., Forni, G., Mallucci, L., 1999, Negative cell cycle control of human T cells by beta-galactoside binding protein (beta GBP): induction of programmed cell death in leukaemic cells, *Journal of Cell Physiology*, 178, 102-108.
- Oberholzer, A., Oberholzer, C., Moldawer, L.L., 2000, Cytokine signaling regulation of the immune response in normal and critically ill states, *Critical Care Medicine*, 28, 3-12.
- Obermeier, F., Kojouharoff, G., Hans, W., Schölmerich, J., Gross, V., Falk, W., 1999, Interferongamma(IFN-gamma)- and tumour necrosis factor (TNF)-induced nitric oxide as toxic effector molecule in chronic dextran sulphate sodium (DSS)-induced colitis in mice, *Clinical Experimental Immunology*, 116, 238-245.
- O'Farrell, A.M., Liu, Y., Moore, K.W., Mui, A.L., 1998, IL-10 inhibits macrophage activation and proliferation by distinct signaling mechanisms: evidence for Stat3-dependent and -independent pathways, *Embo Journal*, 17, 1006-1018.
- Offner, H., Celnik, B., Bringman, T.S., Casentini-Borocz, D., Nedwin, G.E., Van Den Bark, A.A., 1990, Recombinant human beta-galactoside binding lectin suppresses clinical and histological signs of experimental autoimmune encephalomyelitis, *Journal of Neuroimmunology*, 28, 177-184.
- Ohkusa, T., 1985, Production of experimental ulcerative colitis in hamsters by dextran sulfate sodium and changes in intestinal microflora, *Nihon Shokakibyō Gakkai Zasshi*, 82 (5), 1327-1336.
- Okayasu, I., Hatakeyama, S., Yamada, M., Ohkusa, T., Inagaki, Y., Nakaya, R., 1990, A novel method in the induction of reliable experimental acute and chronic ulcerative colitis in mice, *Gastroenterology*, 98 (3), 694-702.
- Outenreath, R.L. and Jones, A.L., 1992, Influence of an endogenous lectin substrate on cultured dorsal root ganglion cells, *Journal of Neurocytology*, 21, 788-795.
- Okten, A., Mungan, Z., Cakaloğlu, Y., 2001, *Gastroenterohepatoloji*, Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul, ISBN: 975-420-083-1.
- Ozkan, T.B., 2003, İnflamatuvar bağırsak hastalıkları, *Güncel Pediatri*, 1, 79-91..

- Pace, K.E., Lee, C., Stewart, P.L., Baum, L.G., 1999, Restricted receptor segregation into membrane microdomains occurs on human T cells during apoptosis induced by galectin-1, *Journal of Immunology*, 163, 3801-3811.
- Paglia, D.E., Valentine, W.N., 1967, Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase, *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 70 (1), 158-169.
- Patnaik, S.K., Potvin, B., Carlsson, S., Sturm, D., Leffler, H., Stanley, P., 2006, Complex N-glycans are the major ligands for galectin-1, -3, and -8 on Chinese hamster ovary cells, *Glycobiology*, 16, 305-317.
- Paul, G., Khare, V., Gasche, C., 2011, Inflamed gut mucosa: downstream of interleukin-10, *European Journal of Clinical Investigation*, 42 (1), 95-109.
- Paulson, J.C., 1989, Glycoproteins: What are the sugar chains for?, *Trends in Biochemical Sciences*, 14, 272-276.
- Paz, A., Haklai, R., Elad-Sfadia, G., Ballan, E., Kloog, Y., 2001, Galectin-1 binds oncogenic H-Ras to mediate Ras membrane anchorage and cell transformation, *Oncogene*, 20, 7486-7493.
- Penninckx, M., 2000, A short review on the role of glutathione in the response of yeasts to nutritional, environmental, and oxidative stress, *Enzyme and Microbial Technology*, 26 (9-10), 737-742.
- Perillo, N. L., Pace, K.E., Seilhamer, J.J., Baum, L.G., 1995, Apoptosis of T cells mediated by galectin-1, *Nature*, 378, 736-739.
- Perillo, N.L., Uittenbogaart, C.H., Nguyen, J.T., Baum, L.G., 1997, Galectin-1, an endogenous lectin produced by thymic epithelial cells, induces apoptosis of human thymocytes, *Journal of Experimental Medicine*, 185, 1851-1858.
- Perse M., Cerar A., 2012, Dextran sodium sulphate colitis mouse model: Traps and Tricks, *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2012, 718617.
- Peterson, W.L., Graham, D.Y., 2002, *Ulcerative colitis*, In: *Gastrointestinal and liver disease pathophysiology, diagnosis, management*, Jewell, D.P., Sleisenger, M.H. (ed.), Saunders, 2039-2067.
- Pietro, G., Lawrance, S., 1999, Epidemiology and the natural course of inflammatory bowel disease, *Gastroenterology Clinics of North America*, 28, 255-281.
- Podolsky, D.K., 2002, Inflammatory bowel disease, *The New England journal of medicine*, 347 (6), 417-429.
- Pohl, C., Hombach, A., Kruis, W., 2000, Chronic inflammatory bowel disease and cancer, *Hepatogastroenterology*, 47, 57-70.

- Rabinovich, G.A., Modesti, N.M., Castagna, L.F., Landa, C.A., Riera, C.M., Sotomayor, C. E., 1997, Specific inhibition of lymphocyte proliferation and induction of apoptosis by CLL-I, a beta-galactoside-binding lectin, *Journal of Biochemistry (Tokyo)*, 122, 365-373.
- Rabinovich, G.A., Iglesias, M.M., Modesti, N.M., Castagna, L. F., Wolfenstein-Todel, C., Riera, C.M., Sotomayor, C.E., 1998, Activated rat macrophages produce a galectin-1-like protein that induces apoptosis of T cells: biochemical and functional characterization, *Journal of Immunology*, 160, 4831-4840.
- Rabinovich, G.A., Daly, G., Dreja, H., Tailor, H., Riera, C.M., Hirabayashi, J., Chernajovsky, Y., 1999, Recombinant galectin-1 and its genetic delivery suppress collagen-induced arthritis via T cell apoptosis, *Journal of Experimental Medicine*, 190, 385-398.
- Rabinovich, G.A., Sotomayor, C.E., Riera, C.M., Bianco, I., Correa, S.G., 2000, Evidence of a role for galectin-1 in acute inflammation. *European Journal of Immunology*, 30, 1331-1339.
- Rabinovich, G.A., Baum, L.G., Tinari, N., Paganelli, R., Natoli, C., Liu, F.T., Iacobelli, S., 2002, Galectins and their ligands: amplifiers, silencers or tuners of the inflammatory response?, *Trends Immunology*, 23, 313-320.
- Rabinovich, G.A., Liu, F.T., Hirashima, M., Anderson, A., 2007, An emerging role for galectins in tuning the immune response: lessons from experimental models of inflammatory disease, autoimmunity and cancer, *Scandinavian Journal of Immunology*, 66, 143-158.
- Reimund, J.M., Wittersheim, C., Dumont, S., Muller, C.D., Baumann, R., Poindron, P., Duclos, B., 1996, Mucosal inflammatory cytokine production by intestinal biopsies in patients with ulcerative colitis and Crohn's disease, *Journal of Clinical Immunology*, 16, 144-150.
- Ricketts, C.R., 1952, Dextran sulphate- α synthetic analogue of heparin, *Biochemical Journal*, 51, 129-133, 1952.
- Rogler, G., Andus, T., 1998, Cytokines in inflammatory bowel disease, *World Journal of Surgery*, 22, 382-389.
- Salomonsson, E., Larumbe, A., Tejler, J., Tullberg, E., Rydberg, H., Sundin, A., Khabut, A., Frejd, T., Lobsanov, Y.D., Rini, J.M., Nilsson, U.J., Leffler, H., 2010, Monovalent interactions of galectin-1, *Biochemistry*, 49, 9518-9532.
- Sanchez-Muñoz, F., Dominguez-Lopez, A., Yamamoto-Furusho, J.K., 2008, Role of cytokines in inflammatory bowel disease, *World Journal of Gastroenterology*, 14 (27), 4280-4288.
- Sands, B.E., 2000, Therapy of inflammatory bowel disease, *Gastroenterology*, 118, 68-82.

- Sanford, G.L and Harris-Hooker, S., 1990, Stimulation of vascular cell proliferation by β -galactoside-specific lectins, *Faseb Journal*, 4, 2912-2918.
- Santucci, L., Fiorucci, S., Cammilleri, F., Servillo, G., Federici, B., Morelli, A., 2000, Galectin-1 exerts immunomodulatory and protective effects on concanavalin A-induced hepatitis in mice, *Hepatology*, 31, 399-406.
- Santucci, L., Fiorucci, S., Rubinstein, N., Mencarelli, A., Palazzetti, B., Federici, B., Rabinovich, G.A., and Morelli, A., 2003, Galectin-1 suppresses experimental colitis in mice, *Gastroenterology*, 124, 1381-1394.
- Sartor, R.B., 1995, Microbial factors in the pathogenesis of Crohn's disease, ulcerative colitis and experimental intestinal inflammation: Inflammatory Bowel Disease, *Lippincott Williams and Wilkins*, 96-124.
- Sayım, N.Y., 2010, *Deneysel kolit modelinde TNF-alfa blokerlerinin (infliximab ve etanercept) inflamasyon sürecine etkisi*, Uzmanlık tezi, Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi.
- Schraufstatter, I.U., Browne, K., Harris, A., Hyslop, P.A., Jackson, J.H., Quehenberger, O., Cochrane, C.G., 1990, Mechanisms of hypochlorite injury of target cells, *Journal of Clinical Investigation*, 85, 554-562.
- Schwarz, F.P., Ahmed, H., Bianchet, M.A., Amzel, L.M., Vasta, G.R., 1998, Thermodynamics of bovine spleen galectin-1 binding to disaccharides: correlation with structure and its effect on oligomerization at the denaturation temperature, *Biochemistry*, 37, 5867-5877.
- Seelenmeyer, C., Wegehingel, S., Lechner, J., Nickel, W., 2003, The cancer antigen CA125 represents a novel counter receptor for galectin-1, *Journal of Cell Sciences*, 116, 1305-1318.
- Serafini, M., and Del Rio, D., 2004, Understanding the association between dietary antioxidants, redox status and disease: Is the total antioxidant capacity the right tool?, *Redox Report*, 9 (3), 145-152.
- Seril, D.N., Liao, J., Yang, G.Y., Yang, C.S., 2003, Oxidative stress and ulcerative colitis-associated carcinogenesis: studies in humans and animal models, *Carcinogenesis*, 24, 353-362.
- Sharon, N. and Lis, H., 1972, Lectins: cell agglutinating and sugar-specific proteins, *Science*, 4053, 949-959.
- Sharon, N. and Lis, H., 1989, Lectins as cell recognition molecules, *Science*, 246, 227-234.
- Shihabi, A., Li, W.G., Miller, F.J., Weintraub, N.L., 2002, Antioxidant therapy for atherosclerotic vascular disease: the promise and the pitfalls, *American Journal of Physiology Heart and Circulatory Physiology*, 282, 797-802.

- Simsek, F., 1999, Serbest oksijen radikalleri, antioksidanlar ve lipit peroksidasyonu, *Türkiye Klinikleri Pediatrik Bilimler Dergisi*, 8, 42-47.
- Song, O., 2004, Oxidative Stress: A Theoretical Model or Biological Reality?, *Comptes Rendus Biologies*, 327, 649-662.
- Song, J.L., Qian, Y., Li, G.L., Zhao, X., 2013, Anti-inflammatory effects of kudingcha methanol extract (*Ilex kudingcha* C.J. Tseng) in dextran sulfate sodium-induced ulcerative colitis, *Molecular Medicine Reports*, 8 (4), 1256-1262.
- Stowell, S.R., Dias-Baruffi, M., Penttila, L., Renkonen, O., Nyame, A.K., Cummings, R.D., 2004, Human galectin-1 recognition of poly-N-acetylglucosamine and chimeric polysaccharides, *Glycobiology*, 14, 157-167.
- Strater, J., Wellisch, I., Riedl, S., Walczak, H., Koretz, K., Tandara, A., Krammer, P.H., Moller, P., 1997, CD95 (APO-1/fas) mediated apoptosis in colon epithelial cells a possible role in ulcerative colitis, *Gastroenterology*, 113, 160-167.
- Stucchi, A., Reed, K., O'Brien, M., Cerda, S., Andrews, C., Gower, A., Bushell, K., Amar, S., Leeman, S., Becker, J., 2006, A new transcription factor that regulates TNF-alpha gene expression, LITAF, is increased in intestinal tissues from patients with CD and UC, *Inflammatory Bowel Disease*, 12, 581-587.
- Sun, Y., Oberley, L.W., Li, Y., 1988, A Simple method for clinical assay of superoxide dismutase, *Clinical Chemistry*, 34 (3), 497-500.
- Symons, A., Cooper, D.N., Barclay, A.N., 2000, Characterization of the interaction between galectin-1 and lymphocyte glycoproteins CD45 and Thy-1, *Glycobiology*, 10, 559-563.
- Teichberg, V.I., Silman, I., Beitsch, D.D., Rescheff, G., 1975, A β -D-galactoside binding protein from electric organ tissue of *Electrophorus electricus*, *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.*, 72, 1383-1387.
- Tessner, T.G., Cohn, S.M., Schloemann, S., Stenson, W.F., 1998, Prostaglandins prevent decreased epithelial cell proliferation associated with dextran sodium sulfate injury in mice, *Gastroenterology*, 115, 874-882.
- Thijs, L.G., Hack, C.E., 1995, Time course of cytokine levels in sepsis, *Intensive Care Medicine*, 21, 56-63.
- Thompson-Chagoyan, O.C., Maldonado, J., Gil, A., 2005, Aetiology of inflammatory bowel disease (IBD): role of intestinal microbiota and gut-associated lymphoid tissue immune response, *Clinical Nutrition*, 24, 339-352.
- Toscano, M.A., Commodaro, A.G., Ilarregui, J.M., Bianco, G.A., Liberman, A., Serra, H.M., Hirabayashi, J., Rizzo, L.V., Rabinovich, G.A., 2006, Galectin-1 suppresses autoimmune retinal disease by promoting concomitant Th2- and T regulatory-

- mediated anti-inflammatory responses, *Journal of Immunology*, 176 (10), 6323-6332.
- Toscano, M.A., Bianco, G.A., Ilarregui, J.M., Croci, D.O., Correale, J., Hernandez, J.D., Zwirner, N.W., Poirier, F., Riley, E.M., Baum, L.G., Rabinovich, G.A., 2007, Differential glycosylation of TH1, TH2 and TH-17 effector cells selectively regulates susceptibility to cell death, *Nature Immunology*, 8, 825-834.
- Tsai, C.M., Chiu, Y.K., Hsu, T.L., Lin, I.Y., Hsieh, S.L., Lin, K.I., 2008, Galectin-1 promotes immunoglobulin production during plasma cell differentiation, *Journal of Immunology*, 181, 4570-4579.
- Van Den Brule, F., Califice, S., Garnier, F., Fernandez, P.L., Berchuck, A., Castronovo, V., 2003, Galectin-1 accumulation in the ovary carcinoma peritumoral stroma is induced by ovary carcinoma cells and affects both cancer cell proliferation and adhesion to laminin-1 and fibronectin, *Laboratory Investigations*, 83, 377-386.
- Van Der Leij, J., Van Den Berg, A., Blokzijl, T., Harms, G., Van Goor, H., Zwiers, P., Van Weeghel, R., Poppema, S., Visser, L., 2004, Dimeric galectin-1 induces IL-10 production in T-lymphocytes: an important tool in the regulation of the immune response, *Journal of Pathology*, 204, 511-518.
- Van Der Leij, J., Van Den Berg, A., Harms, G., Eschbach, H., Vos, H., Zwiers, P., Van Weeghel, R., Groen, H., Poppema, S., Visser, L., 2007, Strongly enhanced IL-10 production using stable galectin-1 homodimers, *Molecular Immunology*, 44 (4), 506-513.
- Van Dop, W.A., Marengo, S., Te Velde, A.A., Ciruolo, E., Franco, I., Ten Kate, F.J., Boeckxstaens, G.E., Hardwick, J.C., Hommes, D.W., Hirsch, E., Van Den Brink, G.R., 2010, The absence of functional PI3K γ prevents leukocyte recruitment and ameliorates DSS-induced colitis in mice, *Immunology Letters*, 131 (1), 33-39.
- Varki, A., Cummings, R.D., Esko, J.D., Freeze, H.H., Stanley, P., Bertozzi, C.R., Hart, G.W., Etzler, M.E., 2009, *Essentials of Glycobiology*, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 417-429.
- Vas, V., Fajka-Boja, R., Ion, G., Dudics, V., Monostori, E., Uher, F., 2005, Biphasic effect of recombinant galectin-1 on the growth and death of early hematopoietic cells. *Stem Cells*, 23, 279-287.
- Vetuschi, A., Latella, G., Sferra, R., Caprilli, R., Gaudio, E., 2002, Increased proliferation and apoptosis of colonic epithelial cells in dextran sulfate sodium-induced colitis in rats, *Digestive Diseases and Sciences*, 47, 1447-1457.
- Wahl, G.M., Stern, M., Stark, G.R., 1979, Efficient transfer of large DNA fragments from agarose gels to diazobenzyloxymethyl-paper and rapid hybridization with dextran sulfate, *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 76, 3683.

- Walzel, H., Schulz, U., Neels, P., Brock, J., 1999, Galectin-1, a natural ligand for the receptor-type protein tyrosine phosphatase CD45., *Immunology Letters*, 67, 193-202.
- Wang, L., Friess, H., Zhu, Z., Frigeri, L., Zimmermann, A., Korc, M., Berberat, P.O., Buchler, M.W., 2000, Galectin-1 and galectin-3 in chronic pancreatitis. *Laboratory Investigations*, 80, 1233-1241.
- Watson, A.J. and Pritchard, D.M., 2000, Lesson from genetically engineered animal model. Apoptosis of intestinal epithelium: Lesson from transgenic and knockout mice, *American Journal of Physiology Gastrointestinal and Liver Physiology*, 278, 1-5.
- Whittem, C.G., Williams, A.D., Williams, C.S., 2010, Murine colitis modeling using dextran sulfate sodium (DSS), *Journal of Visualized Experiments*, 19 (35), 1652.
- Wirtz, S., and Neurath, M.F., 2007, Mouse models of inflammatory bowel disease, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 59 (11), 1073-1083.
- Wirtz, S., Neufert, C., Weigmann, B., Neurath M.F., 2007, Chemically induced mouse models of intestinal inflammation, *Nature Protocols*, 2 (3), 541-546.
- Yamamoto-Furusho, J.K., 2007, Innovative therapeutics for inflammatory bowel disease, *World Journal of Gastroenterology*, 13, 1893-1896.
- Yamaoka, K., Ohno, S., Kawasaki, H., Suzuki, K., 1991, Overexpression of a β -galactoside-binding protein causes transformation of BALB3T3 fibroblast cells, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 179, 272-279.
- Yamaoka, K., Mishima, K., Nagashima, Y., Asai, A., Sanai, Y., Kirino, T., 2000, Expression of galectin-1 mRNA correlates with the malignant potential of human gliomas and expression of antisense galectin-1 inhibits the growth of 9 glioma cells, *Journal of Neuroscience Research*, 59 (6), 722-730.
- Yan, Y., Kolachala, V., Dalmasso, G., Nguyen, H., Laroui, H., Sitaraman, S.V., Merlin, D., 2009, Temporal and spatial analysis of clinical and molecular parameters in dextran sodium sulfate induced colitis, *PLoS One*, 4 (6), 6073.
- Yao, J., Wang, J.Y., Liu, L., Li, y.x., Xun, A.Y., Zeng, W.S., Jia, C.H., Wei, X.X., Feng, J.L., Zhao, L., Wang, L.S., 2010, Anti-oxidant effects of resveratrol on mice with DSS-induced ulcerative colitis, *Archives of Medical Research*, 41, 288-294.
- Yarsan, E., 1998, Lipid Peroksidasyon Olayı ve Önlenmesine Yönelik Uygulamalar, *Yüzyüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 9 (1-2), 89-95.
- Zavodnik, I.B., Lapshina, E.A., Zavodnik, L.B., Bartosz, G., Soszynski, M., Bryszewska, M., 2001, Hypochlorous acid damages erythrocyte membrane proteins and alters lipid bilayer structure and fluidity, *Free Radical Biology Medicine*, 30, 363-369.

Zhao, J., Hong, T., Dong, M., Meng, Y., Mu, J., 2013, Protective effect of myricetin in dextran sulphate sodium-induced murine ulcerative colitis, *Molecular Medicine Reports*, 7, 565-570.

Zuniga, E., Rabinovich, G.A., Iglesias, M.M., Gruppi, A., 2001, Regulated expression of galectin-1 during B-cell activation and implications for T-cell apoptosis, *Journal of Leukocyte Biology*, 70, 73-79.

ÖZGEÇMİŞ



Kişisel Bilgiler

Adı Soyadı	Güliz AYKOL
Uyruğu	T.C.
Doğum tarihi, Yeri	1989, İstanbul
Telefon	0536 669 10 16
E-mail	guliz_aykol@hotmail.com
Web adres	-

Eğitim

Derece	Kurum/Anabilim Dalı/Programı	Yılı
Yüksek Lisans	İ.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü/ Biyoloji Anabilim Dalı /Zooloji Programı	2014
Lisans	Biyoloji Bölümü	2011
Lise	Çemberlitaş Kız Lisesi (Y.D.A.)	2007

Makaleler / Bildiriler

Aykol, G., Arda-Pirinççi, P., 2013, The Role Of Galectin-1 On Cell Proliferation And Oxidative Stress At Dextran Sulphate Sodium-Induced Colitis Model In Mice, *2nd International Congress of the Molecular Biology Association of Turkey, TURKIYE*, pp.103.