



T.C.

ACIBADEM MEHMET ALİ AYDINLAR ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**TNBS İLE İNDÜKLENEN KOLİT MODELİNDE
DOKOSAHEKSAENOİK ASİT (DHA)'NIN İNFLAMATUVAR
YANITTAKİ ROLÜNÜN ARAŞTIRILMASI**

LEMAN ARSLAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN

Doç. Dr. Hande Yapışlar

İSTANBUL-2020



T.C.

ACIBADEM MEHMET ALİ AYDINLAR ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**TNBS İLE İNDÜKLENEN KOLİT MODELİNDE
DOKOSAHEKSAENOİK ASİT (DHA)'NIN İNFLAMATUVAR
YANITTAKİ ROLÜNÜN ARAŞTIRILMASI**

LEMAN ARSLAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN

Doç. Dr. Hande Yapışlar

İSTANBUL-2020

BEYAN

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

12.02.2020

Leman Arslan



TEŞEKKÜR

Tezimin her aşamasında yardımcı olarak ilerlememi sağlayan, yeni deneysel yöntemleri öğreten, değerli danışman hocam Doç. Dr. Hande Yapışlar'a,

Yüksek lisans eğitimim boyunca her konuda bana destek veren, bilgi ve tecrübelerini paylaşan bölüm başkanınız değerli hocam Prof. Dr. Güldal Süyen'e,

Kolit modelinin oluşturulmasındaki ve biyokimyasal analizlerdeki katkıları için değerli hocam Dr. Öğr. Üyesi Meltem Kolgazi'ye ve doktora öğrencisi Sümeyye Çilingir'e,

Histolojik analizdeki katkıları için değerli hocalarım Prof. Dr. Serap Arbak ve Dr. Öğr. Üyesi Merve Açıknel Elmas'a,

Yüksek lisans eğitimimdeki katkıları için değerli hocalarım Doç. Dr. Melike Şahiner'e ve Dr. Öğr. Üyesi Mehmet Ergen'e,

Lisans eğitimim boyunca bilimsel düşünceyi ve yöntemi anlamamı sağlayan ayrıca yüksek lisans eğitimim boyunca da beni cesaretlendiren, mesleki bilgi birikimimin oluşmasındaki büyük katkıları için değerli hocalarım Prof. Dr. İlyas Göz'e ve Prof. Dr. Sevil Başoğlu'na,

Çalışma hayatım boyunca bilimsel bilgi, görgü ve tecrübeleriyle yol gösteren değerli hocam İsmail Meral'e,

Son olarak yetişmemde çok büyük emekleri olan, her zaman, her konuda beni destekleyen aileme çok teşekkür ederim.

Bu tez, Acıbadem Mehmet Ali Aydınlar Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu Başkanlığı tarafından 2018/03/07 numaralı proje ile desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
ÖZET	1
SUMMARY	2
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	3
2. GENEL BİLGİLER.....	5
2.1. İnflamatuvar Bağırsak Hastalıkları (İBH).....	5
2.1.1. Ülseratif kolit (ÜK).....	6
2.1.2. Crohn hastalığı (CH).....	6
2.1.3. İnflamatuvar bağırsak hastalılarının epidemiyolojisi	8
2.1.4. İnflamatuvar bağırsak hastalıklarında klinik.....	9
2.1.5. İnflamatuvar bağırsak hastalıklarında tedavi	9
2.2. Serbest Radikaller ve Oksidatif Stres	10
2.2.1. Reaktif oksijen türleri (ROS)	12
2.3. Antioksidan Savunma Sistemleri.....	15
2.4. İnflamasyon.....	21
2.4.1. Nötrofiller.....	22
2.4.2. Nükleer faktör kappa B (NF-kB).....	22
2.4.3. Tümör nekroz faktör- α (TNF- α).....	23
2.4.4. İnterlökin-6 (IL-6)	23
2.4.5. İnterlökin-10 (IL-10).....	23
2.4.6. İBH patogeneğinde serbest radikallerin ve inflamasyonun rolü	24
2.5. Dokosaheksaenoik Asit (DHA).....	25
2.5.1. DHA'nın antiinflamatuvar etkileri	27
2.5.2. DHA'nın antioksidan etkileri	28
2.6. Deneysel Kolit Hayvan Modelleri.....	30
2.6.1. Trinitrobenzensülfonik asit (TNBS) ile oluşturulan deneysel kolit modeli	30
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	31
3.1. Deneysel Gruplarının Oluşturulması	31
3.2. Kolit Modelinin Oluşturulması.....	32

3.3.	Kolit Şiddetinin Değerlendirilmesi.....	32
3.3.1.	Makroskopik değerlendirme	33
3.3.2.	Mikroskopik değerlendirme	34
3.4.	Oksidan ve Antioksidan Parametreler	35
3.4.1.	Dokuda malondialdehit (MDA) düzeyi	35
3.4.2.	Dokuda glutatyon (GSH) düzeyi	35
3.4.3.	Dokuda total oksidan kapasitesi (TOS), total antioksidan kapasite (TAS) ve oksidatif stres indeksi (OSİ) düzeyleri	36
3.5.	İnflamatuvar ve Antiinflamatuvar Parametreler.....	37
3.5.1.	Dokuda Miyeloperoksidaz (MPO) Düzeyi Tayini	37
3.5.2.	ELISA ölçümleri	37
3.6.	İstatistiksel Analiz	38
4.	BULGULAR	39
4.1.	Vücut Ağırlıklarının Değerlendirilmesi.....	39
4.2.	Kolon Ağırlıklarının Değerlendirilmesi.....	40
4.3.	Morfolojik Sonuçlar ve Histopatolojik Skorlama	41
4.3.1.	Makroskopik hasar skoru	41
4.3.2.	Histolojik değerlendirme ve mikroskopik hasar skoru.....	42
4.4.	Oksidasyon ve Antioksidan Etkiler	47
4.4.1.	MDA düzeyi	47
4.4.2.	GSH düzeyi	48
4.4.3.	TAS, TOS ve OSİ düzeyleri	49
4.5.	İnflamatuvar ve Antiinflamatuvar Etkiler.....	53
4.5.1.	MPO düzeyi.....	53
4.5.2.	NF-kB düzeyi	54
4.5.3.	TNF- α düzeyi	54
4.5.4.	IL-6 düzeyi	55
4.5.5.	IL-10 düzeyi	56
5.	TARTIŞMA ve SONUÇ	57
6.	KAYNAKLAR.....	63
7.	EK-1: ETİK KURUL ONAYI	73
8.	ÖZGEÇMİŞ	74

KISALTMA VE SİMGELER

AA	Araşidonik asit
ABTS	2,2'-azinobis (3-etilbenzotiyazolin 6-sülfonat)
ALA	Alfa linolenik asit
ANOVA	Varyans analizi
AsA	Asetik asit
°C	Santigrat derece
CAT	Katalaz
CH	Crohn hastalığı
COX	Siklooksijenaz
Cu ⁺²	Bakır
DAİ	Islak doku ağırlık indeksi
DHA	Dokosaheksaenoik asit
DSS	Dekstran sodyum sülfat
EC-SOD	Ekstrasellüler süperoksit dismutaz
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
EPA	Eikosapentaenoik asit
ESS	Ekstrasellüler
Fe ⁺²	Demir
g	Gram
GSH	Glutasyon
GSH-PX	Glutasyon peroksidaz
GSSG	Okside glutasyon
GSSG-R	Glutasyon redüktaz
H&E	Hematoksilen-eozin
H ⁺	Hidrojen iyonu
H ₂ O	Su

H ₂ O ₂	Hidrojen peroksit
HETAB	Heksadesiltrimetilammonyum bromide
IL-10	İnterlökin-10
IL-6	İnterlökin-6
İBH	İnflamatuvar bağırsak hastalıkları
İSS	İntrasellüler
kg	Kilogram
L	Litre
LA	Linoleik asit
LOX	Lipoksijenaz
LT	Lökotrien
MDA	Malondialdehit
mg	Miligram
ml	Mililitre
MPO	Miyeloperoksidaz
n-3	Omega 3
NADPH	Nikotinamid-adenin-dinükleotid fosfat
NF-kB	Nüklear Faktör kappa B
ng	Nanogram
nm	Nanometre
µmol	Mikromol
µm	Mikrometre
NOS	Nitrik oksit sentaz
O ₂ ⁻	Süperoksit radikali
¹ O ₂	Singlet oksijen
OH ⁻	Hidroksil radikali
OSİ	Oksidatif stres indeksi
PG	Prostaglandin

pg	Pikogram
pH	Hidrojenin gücü (power of hydrogen)
PUFA	Poliansature yağ asitleri
Rv	Resolvin
ROS	Reaktif oksijen türleri
SF	Serum fizyolojik
SOD	Süperoksit dismutaz
TAS	Total antioksidan kapasitesi
TNBS	Trinitrobenzensülfonik asit
TNF- α	Tümör nekroz faktör- α
TOS	Total oksidan kapasitesi
U	Ünite
ÜK	Ülseratif kolit
XO	Ksantin oksidaz

ŞEKİLLER LİSTESİ

	Sayfa No
Şekil 1. İBH patojenizden sorumlu tutulan faktörler.....	5
Şekil 2. Serbest radikal yapısı	10
Şekil 3. Serbest radikal oluşumuna sebep olan endojen ve eksojen faktörler.....	11
Şekil 4. Oksijen molekülü ve türevlerinin basitleştirilmiş gösterimi	12
Şekil 5. Serbest radikallere karşı antioksidan savunma mekanizmaları	16
Şekil 6. Glutasyonun kimyasal yapısı	17
Şekil 7. Glutasyon peroksidazın katalitik siklusu	19
Şekil 8. Reaktif oksijen moleküllerinin hücrel kontrolü.....	21
Şekil 9. Oksidatif stres ve inflamasyon ilişkisi, kronik inflamasyona götüren mekanizmalar	25
Şekil 10. Dokosaheksaenoik asit (DHA)'in moleküler yapısı (DHA 22:6 n3).....	26
Şekil 11. LA: linoleik asit ve ALA: alfa linolenik asit'in vücuttaki enzimatik dönüşümü	26
Şekil 12. AA, EPA ve DHA moleküllerinden lipit mediatörlerin sentezi	28
Şekil 13. DHA'nın beyindeki antioksidan aktivitesi	29
Şekil 14. Deney grupları şeması.....	32
Şekil 15. Deney gruplarının kolit öncesindeki ve sonrasındaki ağırlık farkları.	39
Şekil 16. Deney gruplarının kolon DAİ düzeyleri.....	41
Şekil 17. Deney gruplarının makroskopik hasar skoru	42
Şekil 18. Deney gruplarının mikroskopik hasar skoru	46
Şekil 19. Deney gruplarının MDA düzeyleri	47
Şekil 20. Deney gruplarının GSH düzeyleri	48
Şekil 21. Deney gruplarının TAS düzeyleri.....	50
Şekil 22. Deney gruplarının TOS düzeyleri.....	51
Şekil 23. Deney gruplarının OSİ düzeyleri.....	52
Şekil 24. Deney gruplarının MPO düzeyleri.....	53
Şekil 25. Deney gruplarının TNF- α düzeyleri.....	54
Şekil 26. Deney gruplarının IL-6 düzeyleri	56

TABLolar LİSTESİ

	Sayfa No
Tablo 1. Ülseratif kolit ve Crohn hastalığının başlıca farkları	7
Tablo 2. Enzimlerin fonksiyonlarına göre sınıflandırılması.....	16
Tablo 3. Makroskopik hasar skalası.....	33
Tablo 4. Mikroskopik hasar skalası	34
Tablo 5. Deney gruplarının kolit oluşturulmadan öncesinde ve oluşturulduktan sonrasında vücut ağırlıkları, kolon doku ağırlık indeksi	40
Tablo 6. Deney gruplarının kolon dokusunun makroskopik ve mikroskopik hasar skorları	46
Tablo 7. Deney gruplarının biyokimyasal analiz sonuçları	49
Tablo 8. Deney gruplarının total antioksidan kapasite ve total oksidan kapasite düzeyleri.....	52
Tablo 9. Deney gruplarının sitokin düzeyleri (<i>MPO, NF-kB, TNF-α</i>).....	55
Tablo 10. Deney gruplarının sitokin düzeyleri (IL-6, IL-10).....	56

RESİMLER LİSTESİ

	Sayfa No
Resim 1. Kalın bağırsak histolojisi.....	6
Resim 2. Crohn hastalığı ve ülseratif kolitte tutulumun şekli ve bölgeleri	7
Resim 3. İBH'ın dünya ülkelerine göre dağılımı.	8
Resim 4. Kontrol grubuna ait kolon doku kesiti. (Parafin kesit, H&E boyaması)....	43
Resim 5. Kolit grubuna ait kolon doku kesiti (Parafin kesit, H&E boyaması).	44
Resim 6. DHA grubuna ait kolon doku kesiti (Parafin kesit, H&E boyaması).	45



ÖZET

İnflamatuvar bağırsak hastalıkları (İBH), gastrointestinal kanalın kronik inflamasyonuyla seyreden bir hastalık grubudur. TNBS ile indüklenen kolit modeli İBH'de oluşan patolojik semptomların çoğunu taklit edebilen bir kolit modelidir. Dokosaheksaenoik asit (DHA) antiinflamatuvar etkili, uzun zincirli bir omega 3 yağ asitidir. Bu çalışmanın amacı DHA'nın, TNBS kolit modelindeki inflamasyon ve oksidatif stres üzerindeki etkilerini belirlemektir. Çalışmada dişi Wistar Albino sıçan kullanılarak 3 grup oluşturuldu. Kontrol (n=8) ve kolit gruplarına (n=10) 4 hafta boyunca gavaj yoluyla serum fizyolojik, kolit+DHA grubuna (n=10) 600 mg/kg/gün DHA verildi. 4 haftanın sonunda kolit ve kolit+DHA gruplarına rektal yoldan TNBS verildi ve 3 gün sonra sakrifiye edildi. Kolon dokuları çıkarılarak makroskopik ve mikroskopik değerlendirme yapıldı. Miyeloperoksidaz (MPO), malondialdehit (MDA), glutatyon (GSH) düzeyleri, total antioksidan (TAS) ve total oksidan kapasiteleri (TOS), nükleer faktör-kappa B (NF-kB), interlökin-6 (IL-6), IL-10 ve tümör nekroz factor- α (TNF- α) düzeyleri ölçüldü. İstatistiksel değerlendirme, SPSS 23 versiyonu kullanılarak t testi ve varyans analizi (ANOVA), Tukey ve Games-Howell çoklu karşılaştırma testleri yapıldı. Grafikler için GraphPad Prism 8 programı kullanıldı. Çalışmanın sonunda DHA'nın kolonda makroskopik ve mikroskopik hasar skorunu düşürdüğü ve inflamasyonun göstergesi olan sitokin düzeylerini azalttığı gözlemlendi. Ayrıca oksidatif stresin göstergeleri olan MDA ve TOS seviyelerini düşürdüğü, TAS ve GSH düzeylerini ise koruduğu gözlemlendi. TNBS ile oluşturan kolit modelinde DHA'nın nötrofil infiltrasyonunu engellediği, endojen antioksidan düzeylerini koruduğu, lipid peroksidasyonunu engellediği ve proinflamatuvar sitokin düzeylerini azalttığı; bu sayede doku düzeyinde antiinflamatuvar ve antioksidan etkiler göstererek koruyucu olduğu düşünülmektedir.

Anahtar Sözcükler: Deneysel kolit, DHA, İnflamasyon, Oksidatif stres, TNBS

SUMMARY

Investigation of Docosahexaenoic Acid (DHA) in Inflammatory Response in TNBS-Induced Colitis Model

Inflammatory bowel diseases (IBDs) are chronic inflammation of gastrointestinal tract. Trinitrobenzenesulfonic (TNBS) induced colitis model has the ability to mimic IBD pathology. Docosahexaenoic acid (DHA) is a long chain omega-3 fatty acid (n-3 PUFA) with an antiinflammatory effects. The aim of this study is to investigate the possible protective effects of DHA molecule in TNBS induced colitis model. Female Wistar Albino rats were divided into 3 groups. Control (n=8) and colitis groups (n=10) were treated with saline, colitis+DHA group (n=10) were treated with DHA (600 mg/kg/day) via gavage for the 4 weeks. At the end of 4th week, TNBS was administered to colitis and colitis+DHA groups intrarectally and rats were sacrificed three days later. Colon tissues were collected for macroscopic and microscopic evaluation. Myeloperoxidase (MPO) activity, malondialdehyde (MDA) and glutathione (GSH) levels, total antioxidant (TAS) and total oxidant status (TOS), interleukin-6 (IL-6), IL-10, nuclear factor-kappa B (NF- κ B), tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) levels were measured. Student's t-test, ANOVA, Tukey and Games-Howell tests were used for statistical analysis (SPSS 23 version). GraphPad Prism8 was used for graphics. DHA has a protective effect including macroscopic and microscopic damage score of colon. This protective effect was also associated with decreased proinflammatory cytokines. Additionally DHA reduced the oxidative markers such as MDA and TOS levels significantly compared to colitis group. It was determined that DHA decreased neutrophil infiltration, lipid peroxidation and proinflammatory cytokine levels in TNBS-induced colitis model and thus it was found to be protective by demonstrating anti-inflammatory and antioxidative effects at tissue level.

Keywords: DHA, Experimental colitis, Inflammation, Oxidative stress, TNBS

1. GİRİŞ VE AMAÇ

İnflamatuvar bağırsak hastalıkları (İBH), gastrointestinal kanalın kronik tekrarlayan inflamatuvar yanıtı ile ilgili hastalıklardır. Ülseratif kolit (ÜK) ve Crohn hastalığı (CH) İBH'nin majör iki formudur. İBH'nin etiolojisi halen bütünüyle bilinmemekle birlikte yapılan çalışmalarda genetik, çevresel, mikrobiyal ve immün sisteme ait faktörlerin patogeneze rol oynadığını bildirilmektedir (1). İBH'nin insidansı ve prevalansı dünya genelinde hızla artmaktadır ve gelişmiş ülkelerde en yüksek insidans ve prevalans değerlerine sahiptir. ÜK insidansı Kuzey Amerika'da 19.2/100000; prevalansı 505/100000 kişi olarak bildirilmiştir. CH insidansı Kuzey Amerika'da yılda 20.2/100000 kişi; prevalansı 322/100000 olarak bildirilmiştir (2).

İBH'nin patogenezinin incelenmesi, potansiyel tedavi yöntemlerinin geliştirilmesi amacıyla deneysel kolit hayvan modelleri kullanılmaktadır. Kullanılan modeller arasında 2,4,6-trinitrobenzensülfonik (TNBS) ile indüklenen kolit modeli patolojik semptomlarının çoğunu taklit edebilen ve tekrarlanabilir bir model olmasıyla öne çıkmaktadır (3, 4). Bu nedenle bu tez çalışmasında TNBS ile indüklenen kolit modelinin kullanılması, hastalığın oluşturduğu etkilerin değerlendirilmesi, hastalığın oluşum mekanizmasının incelenmesi, potansiyel tedavi yöntemlerinin belirlenmesi ve bu yöntemlerin etki mekanizmalarının tartışılmasına imkan sağlayacaktır.

Reaktivitelerinin yüksek olması nedeniyle reaktif oksijen türlerinin (ROS) ve lipit peroksitlerinin, hücrenin antioksidan savunma kapasitesinin üzerinde oluşmaları; hücrelerin DNA, protein ve membran lipitlerinde hasara yol açmaktadır. Artmış ROS üretimi sonucu oluşan oksidatif stres, doku hasarı ve fibrozis oluşumuna katkı sağlayan en önemli faktör olarak görülmektedir. CH doku hasarı ve fibrozis oluşumu ile karakterizedir (5). CH'ye sahip kişilerde süperoksit (O_2^-), hidrojen peroksit (H_2O_2), hidroksil (OH^-), singlet oksijen (1O_2) gibi reaktif oksijen türlerinin arttığı; buna karşılık antioksidan savunma düzeylerinin azaldığı bilinmektedir. Ayrıca CH'de IL-1, IL-8 ve TNF-a gibi proinflamatuvar sitokin düzeyleri artmakta (6, 7); ancak artan

proinflamatuvar sitokinler ile antiinflamatuvar sitokin düzeyleri arasında dengesizlik olduğu bilinmektedir (5).

Dokosaheksaenoik asit (DHA) antiinflamatuvar etkili, uzun zincirli çoklu doymamış bir omega 3 yağ asitidir (n-3 PUFA). DHA'nın kan lipitlerini ve lipoproteinlerini dengeleyerek kardiyovasküler homeostasisi sağladığı, yaşlı bireylerde ve alzheimer hastalığına sahip kişilerde hücre metabolizmasını, bölünmesini ve farklılaşmasını kontrol ederek emosyonel ve kognitif durumu iyileştirdiği, inflamasyonu düzenleyici etkiler gösterdiği bilinmektedir (8).

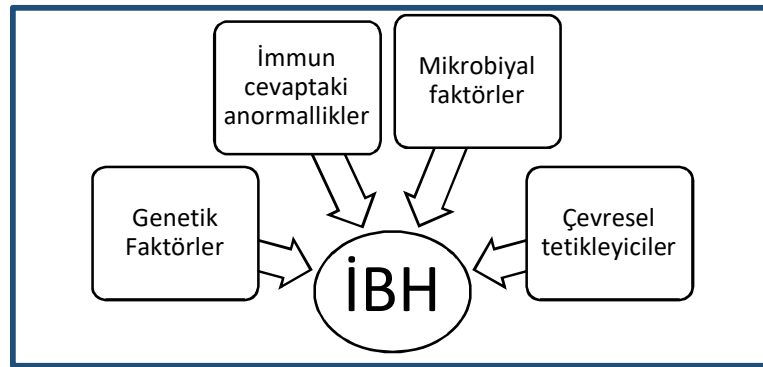
DHA, hücre membranının fosfolipit yapısına katılarak inflamatuvar süreçte etkisini gösterir. n-3 PUFA yağ asitlerinin hayvanlarda kronik kolit üzerinde olumlu etkilerinin olduğu literatürde belirtilmiş olsa da, n-3 PUFA yağ asitlerinin majör bileşeni olan DHA'nın, TNBS ile oluşturulmuş kolit modelindeki inflamasyon üzerine olan tüm etki mekanizmaları henüz kesin olarak bilinmemektedir.

Bu çalışmadaki amacımız, n-3 PUFA'nın literatürdeki anti-inflamatuvar etkilerinden de yola çıkarak intragastrik yolla verilen DHA'nın, TNBS kolit modelindeki terapötik etkilerini, proinflamatuvar moleküller üzerindeki tedavi edici ve koruyucu etkilerinin boyutlarını belirlemektir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. İnflamatuvar Bağırsak Hastalıkları (İBH)

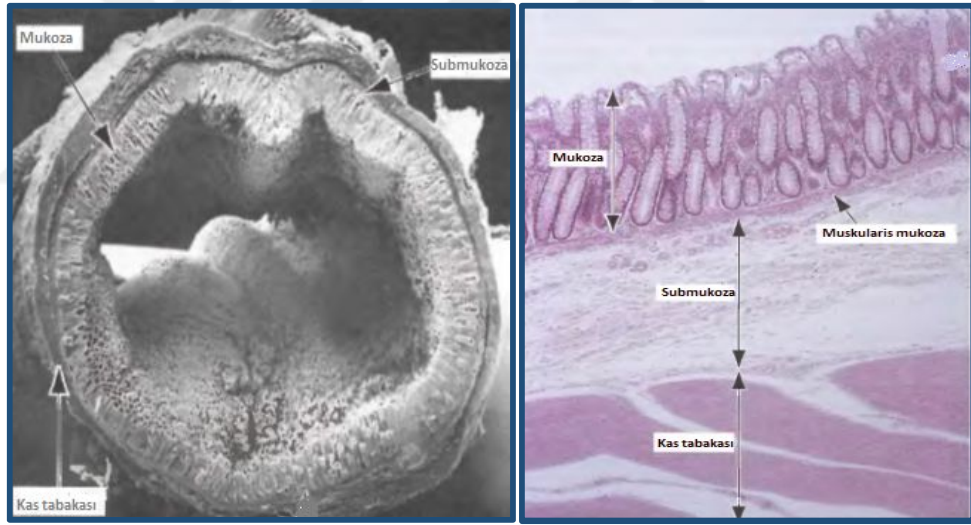
İBH, gastrointestinal kanalın kronik idiyopatik inflamasyonu olarak tanımlanan ve etiyojisi bilinmeyen bir hastalık grubudur. Mukozal bariyerde bozulma ve inflamasyon ile başlayıp anormal immün yanıtla devam ederek kanamalara ve çeşitli komplikasyonlara yol açabilir (9). İlgili bölgeye inflamatuvar hücre göçü ve sitokin kemotaksisi ilerleyici doku harabiyetine sebep olur (10). İnflamatuvar bağırsak hastalıklarının etiyojisi tam olarak bilinmemekle beraber patogenezinde genetik faktörler, bağırsak mikrobiyotasındaki değişiklikler, immün sistemdeki anormallikler, iklim, çevre kirliliği ve sigara kullanımı gibi çevresel tetikleyiciler sorumlu tutulmaktadır (11) (Şekil 1). Küresel obeziteye paralel olarak İBH'nin insidansı ve prevalansı da artmaktadır. İBH'li hastaların %15-40'mın obez olduğu, %20-40'mın ise fazla kilolu olduğu bilinmektedir (12). Sosyoekonomik olarak gelişmiş ülkelerdeki modern yaşam tarzının etkileri olan stres, ilaç kullanımı, yanlış beslenme gibi etkenler de bağırsak mikrobiyota bileşimini etkilemektedir. Bütün bu süreçler mukozal bariyerde hasara yol açarak inflamasyonu tetikleyebilmekte ve İBH'ye zemin hazırlayabilmektedir (13). İBH'nin iki majör klinik formu ülseratif kolit (ÜK) ve Crohn hastalığı (CH)'dir.



Şekil 1. İBH patogenezinde sorumlu tutulan faktörler

2.1.1. Ülseratif kolit (ÜK)

ÜK bir kalın bağırsak (kolon) hastalığıdır. Kolonda rektumdan başlayarak proksimale doğru değişik seviyelerde tutulum gösteren, tekrarlayan, atak ve remisyonlarla seyreden kronik, idiyopatik bir hastalıktır. ÜK, kolonun tamamını da tutabilen, yüzeysel tutulum gösteren bir hastalıktır. Özellikle kolonun mukoza ve submukoza tabakalarının yüzeysel bölümünde inflamasyon olduğu görülür (14) (Resim 1). Lezyonun başlangıç ve bitiş yeri arasında sağlıklı alan bulunmaz, tutulum devamlıdır. Her yaşta görülmekle birlikte en çok 30'lu yaşlarda ortaya çıkan ve her iki cinsiyette de eşit oranda görülen bir hastalıktır. Etiyolojisinde endoskopik ve histolojik değerlendirmeler sonucunda diğer nonenfeksiyöz barsak hastalıklarından ayrılır. Hastalığın en ciddi risklerinden biri, kolonik perforasyona yol açabilme riski nedeniyle, akut kolit atağıdır (15).



Resim 1. Kalın bağırsak histolojisi (16)

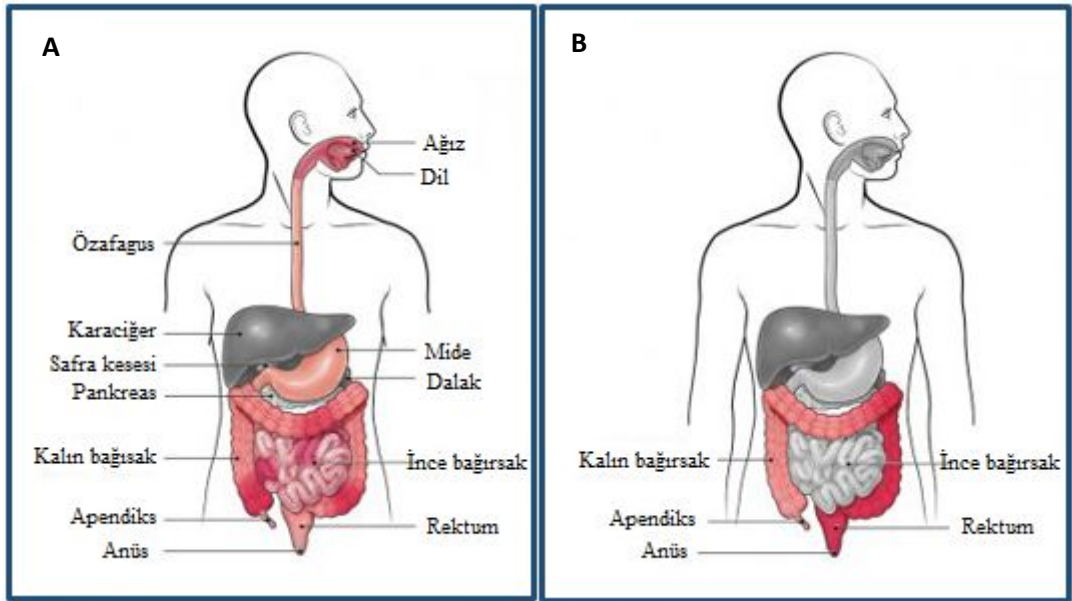
2.1.2. Crohn hastalığı (CH)

ÜK yalnızca kolon ve rektumu etkilerken, CH ağızdan anüse kadar gastrointestinal kanalın herhangi bir yerinde aralıklarla tutulum gösterebilir. Kolonun tüm tabakalarında transmural tutulum görülür. Kronik seyirli bir hastalıktır (17).

Klinikte intestinal granüloma, strüktür ve darlık ÜK'de görülmezken; CH'da görülür (18). ÜK'nın ve CH'nın başlıca farkları Tablo 1'de özetlenmiş; tutulum şekli ve bölgeleri Resim 2'de gösterilmiştir.

Tablo 1. ÜK ve CH'nın başlıca farkları

	ÜK	CH
Tutulum yeri	Kolon ve rektum	Gis kanalın herhangi bir yeri
Tutulum şekli	Aralıksız tutulum	Segmental tutulum
Histolojik bulgular	Mukozal inflamasyon, granüloma	Transmural inflamasyon, kript abseleri
Prognoz	Atak ve remisyon	Kronik
Striktür, fistül	Görülmez	Görülür

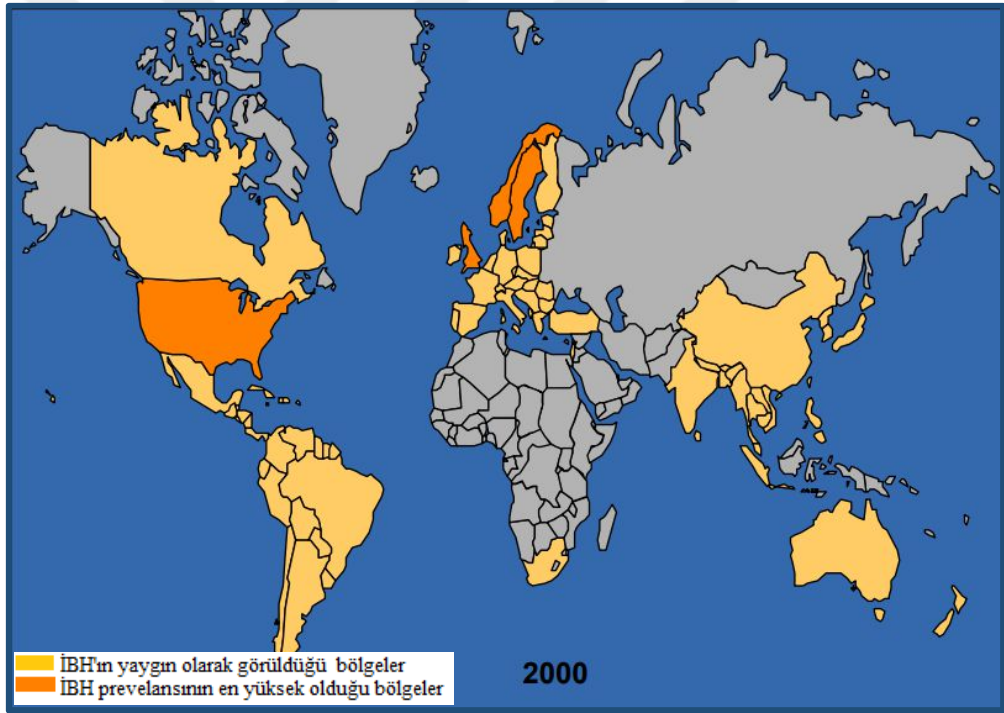


Resim 2. Crohn hastalığı (A) ve ülseratif kolitte (B) tutulumun şekli ve bölgeleri.

Kaynak: (19)

2.1.3. İnflamatuvar bağırsak hastalarının epidemiyolojisi

İBH son yüzyılda, dünya genelinde hızla artan küresel bir halk sağlığı sorunu haline gelmektedir (20). Gelişmiş ülkelerde daha yaygın şekilde görülmekle birlikte gelişmekte olan ülkelerde de insidansı yükselmektedir. En yüksek prevalansın Avrupa’da ve Kuzey Amerika’da olduğu belirlenmiştir. ÜK prevalansının Norveç’te 505/100000, ABD’de 286/100000; CH prevalansının Almaya’da 322/100000, Kanada’da 319/100000 olduğu bildirilmiştir (21). Ülkemizde CH ve ÜK için insidansın sırasıyla 2,6/100000 ve 1,4/100000 olduğu bilinmektedir (22). İBH’nin dünya ülkelerine göre dağılımını Resim 3’te gösterilmiştir.



Resim 3. İBH’nin dünya ülkelerine göre dağılımı

Kaynak: (18)

2.1.4. İnflamatuvar bağırsak hastalıklarında klinik

ÜK ve CH'nin semptomları arasında belirgin farklar bulunur. ÜK'nın başlıca semptomu kanlı-mukuslu ishaldir. Tutulum yalnızca rektumda ise kan dışkının yüzeyinde; üst bölgelerde de tutulum varsa kan, dışkı ile karışık şekilde görülür. CH'de ise oluşacak semptomları kolonun tutulum yeri belirler. CH'nin tipik semptomu karın ağrısıdır. Steatoreli veya steatoresiz formaları olmakla birlikte ishal yaygın şekilde görülür (23).

Her iki hastalık da hem lokal hem sistemik çeşitli komplikasyonlara yol açabilir. Başlıca komplikasyonlar striktür, fistül, perforasyon, toksik megakolon ve kanserdir. Başlıca bulgular abdominal ağrı, ateş, kusma, rektal kanama, pelviste intestinal kramplar, kas spazmları, malnutrisyon ve kilo kaybı olarak söylenebilir (24).

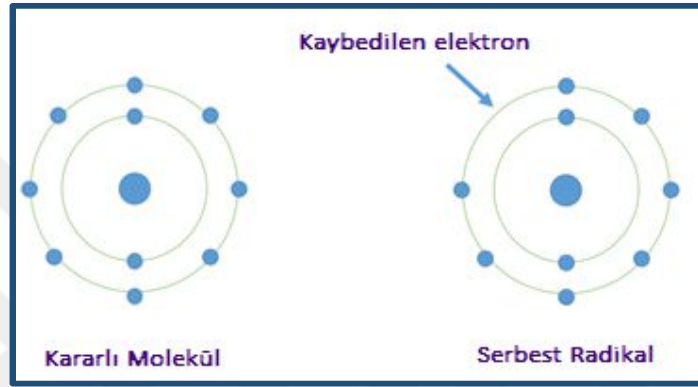
2.1.5. İnflamatuvar bağırsak hastalıklarında tedavi

İBH hastalarına büyük oranda medikal tedavi uygulanır. Ancak sürekli ilaç kullanımı ve uzun süreli takiplere rağmen klinik remisyona başarısına ulaşamamaktadır. Bu da hastalığa sahip kişilerin yaşam kalitesini ciddi şekilde bozmaktadır (25).

Tedavide hedef, semptomları ve komplikasyonları azaltmak, remisyonu idame ettirmektir. Bu amaçla tedavide kortikosteroidler, azathioprine, 6-merkaptopürin, TNF- α inhibitörleri, interlökin-10, NF-kB antisense oligonükleotit gibi ciddi sistemik yan etkileri olan antiinflamatuvar ve immünosupresif ilaçlar kullanılır (26). Cerrahi tedaviler eskiye göre yaygın olmamakla birlikte hastalığa sahip bazı kişilerde hasarlı bölgenin cerrahi olarak çıkarılması gerekir. Ancak ÜK ve CH gastrointestinal kanalın farklı bölümlerini etkilediği için iki hastalık için farklı prosedürler uygulanır (19).

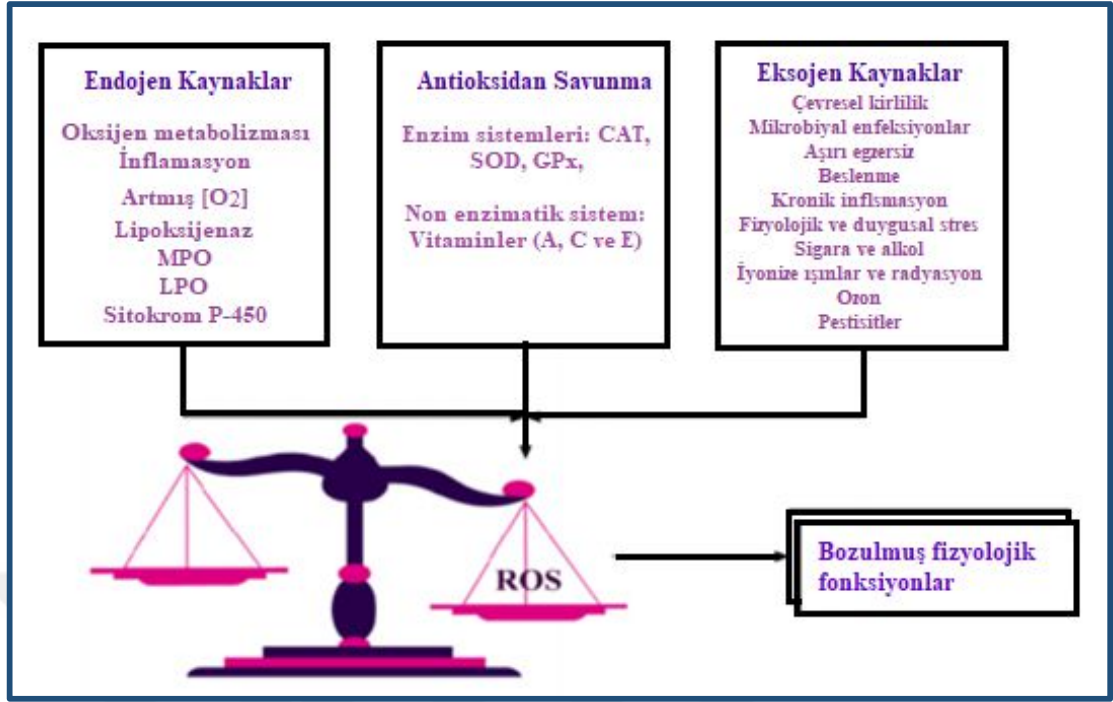
2.2. Serbest Radikaller ve Oksidatif Stres

Son yörüngesinde bir veya birden fazla eşlenmemiş elektronu bulunan, reaktivitesi yüksek, molekül ağırlığı düşük, kararsız moleküllere serbest radikaller adı verilmektedir (Şekil 2). Serbest radikaller kararlı bir yapıda olmadıkları için reaktivitesi yüksek moleküllerdir ve reaksiyona girmeleri çok kolaydır (27).



Şekil 2. Serbest radikal yapısı

Vücutta endojen ve eksojen birtakım faktörler serbest radikallerin oluşumuna yol açar (Şekil 3). Endojen faktörlere mitokondri, peroksizom, endoplazmik retikulum, NADPH oksidaz, sitokrom P-450, nitrik oksit sentaz (NOS), siklooksijenaz (COX), ksantin oksidaz (XO) aktivitesi (28, 29); eksojen faktörlere ise sigara, ultraviyole ışınlar, iyonize radyasyon, çevre kirliliği, alkol, çeşitli metaller örnek olarak verilebilir (30).



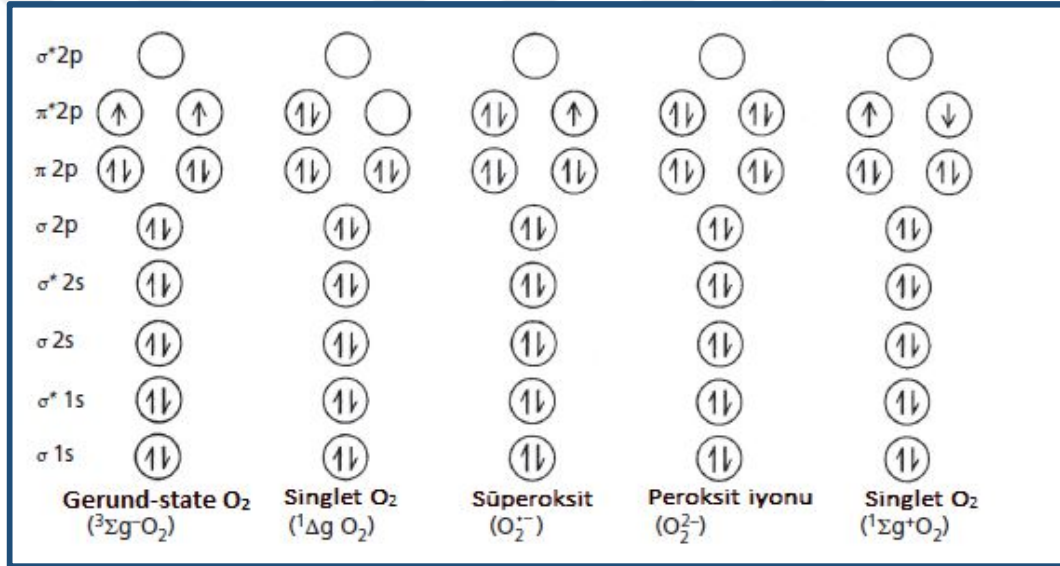
Şekil 3. Serbest radikal oluşumuna sebep olan endojen ve eksojen faktörler

Kaynak: (30).

Serbest radikaller hücrede sinyal iletiminde anahtar rol oynar. Hücrenin büyümesini ve gelişmesini düzenler. Ayrıca hücre ölümünden de sorumludurlar (31). Diğer bir ifadeyle serbest radikaller homeostazis için gereklidir; ancak hücrenin savunma kapasitesinin üzerinde serbest radikal oluşumu oksidatif strese yol açar. Artan oksidatif strese karşı yetersiz kalan antioksidan savunma sistemleri sonucu hücrede oksidatif hasar meydana gelir. Serbest radikaller membranda bulunan yağ asitleri ile reaksiyona girer ve yağ asidinden bir H⁺ molekülünü kopararak lipid radikali oluşturur. Bu lipid radikalleri, O₂ ile reaksiyona girerek lipid peroksil radikali haline gelir. Bu peroksit radikalleri membrandaki diğer PUFA'ları oksitleyerek yeni bileşikler oluşturur. Üç veya daha fazla çift bağ içeren PUFA'ların peroksidasyonu sonucu oluşan bileşik malondialdehit (MDA) olarak adlandırılır. MDA düzeyinin ölçülmesiyle oksidatif hasarın varlığı tespit edilir (32).

2.2.1. Reaktif oksijen türleri (ROS)

Oksijenden türeyen serbest radikaller, biyolojik sistemlerde oluşan en önemli serbest radikallerdir. Oksijen molekülünün elektron alarak indirgenmesiyle oluşur. Oksijen molekülünün kendisi ise son yörüngesinde bir çift eşlenmemiş elektron bulundurmasına rağmen serbest radikal olarak adlandırılmaz. Çünkü son yörüngesindeki tekli elektronların spinleri aynıdır ve bu hali oksijen molekülünün en kararlı halidir (ground-state O_2) (33). Oksijen molekülü ve türevlerinin basitleştirilmiş gösterimi Şekil 4'te gösterilmiştir.



Şekil 4. Oksijen molekülü ve türevlerinin basitleştirilmiş gösterimi

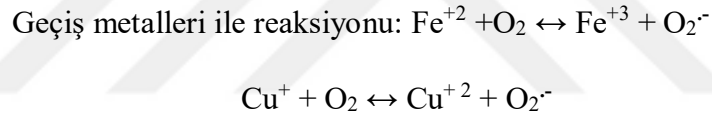
Kaynak: (33)

– Süperoksit Radikali (O_2^-)

Hemen tüm aerobik hücrelerde oluşan ve moleküler oksijenin bir elektron alarak indirgenmesiyle oluşan bir moleküldür (34). Diğer radikallere göre reaktivitesi daha azdır. Oksijen molekülünün bir elektron almasıyla oluşur.



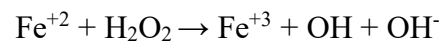
Süperoksit radikalinin üretim yeri çoğunlukla mitokondridir (35). Mitokondriyal solunum zinciri sonucu oluşan elektron kaçakları, oksijen molekülünün süperoksit radikale dönüşmesine neden olur. O_2^- oluşuktan sonra mitokondri iç membranından kolaylıkla geçer (36). Çoğunluğu suya dönüştürülen O_2 'nin %1-3'ü süperoksit anyonuna dönüşür (37). Hücrel koşullarda oluşan süperoksit, indirgeyici ya da oksitleyici olabilir. Spontan veya enzimatik dönüşüm ile daha zararlı olan hidrojen peroksiti (H_2O_2) oluşturduğundan ve geçiş metalleri iyonlarının indirgenmesine neden olduğundan önemlidir (38).



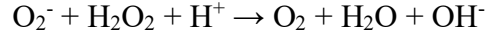
– Hidroksil Radikali (OH^-)

Hidroksil radikalleri diğer oksijen radikalleri arasında en reaktif serbest radikaldir. Bu nedenle en toksik moleküldür (38). Hidroksil radikali birkaç farklı yolla oluşabilir:

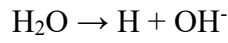
Hidrojen peroksitin (H_2O_2) demir ile reaksiyonu sonucu oluşabilir. Bu reaksiyona *Fenton Reaksiyonu* adı verilir.



Hidrojen peroksidin süperoksit radikali ile reaksiyonu sonucu oluşabilir. Bu reaksiyona *Haber-Weiss reaksiyonu* adı verilir. Süperoksit üretiminin arttığı koşullarda OH⁻ üretimi de artış gösterir.

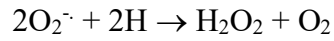


Suyun yüksek enerjili iyonize edici radyasyona maruz kalması ile oluşabilir (39).



– Hidrojen Peroksit (H₂O₂)

Hidrojen peroksit, eşlenmemiş elektronu bulunmadığı için tek başına serbest radikal değildir. Ancak süperoksit molekülü ile Haber-Weiss reaksiyonuna girerek en reaktif serbest radikal olan hidroksil radikalini oluşturabileceği için serbest radikal biyokimyasında önemlidir (40). Süperoksidin, süperoksit dismutasyon enzimi (SOD) katalizörlüğünde, dönüşümü ile oluşur (39).



Eşlenmemiş elektronu bulunmadığı için tek başına serbest radikal olmamasına rağmen serbest radikal oluşumunda rol oynar. Fe⁺², Cu⁺² gibi geçiş metallerinin varlığında Fenton reaksiyonu ile, süperoksit radikallerinin varlığında ise Haber-Weiss reaksiyonu ile en güçlü oksitleyici radikal olan hidroksil radikalini (OH⁻) oluşturur (41).

– Singlet Oksijen (1O_2)

Oksijen molekülünün daha reaktif formu olan singlet oksijen, O_2 'nin enerji alması ve elektronlarını yeniden düzenlemesiyle oluşur. Her iki singlet oksijen formu da ($^1\Sigma_g^+$, $^1\Delta_g$), O_2 'nin kararlı halinden daha fazla enerjiye sahiptir. Bu sayede O_2 'nin oksidasyon kapasitesi şiddetli bir şekilde artar. Singlet oksijen doğrudan proteinleri, DNA ve lipitleri okside edebilir (42). $^1\Delta_gO_2$ formu, eşlenmemiş elektronu bulunmadığı için serbest radikal olarak adlandırılmaz (43).

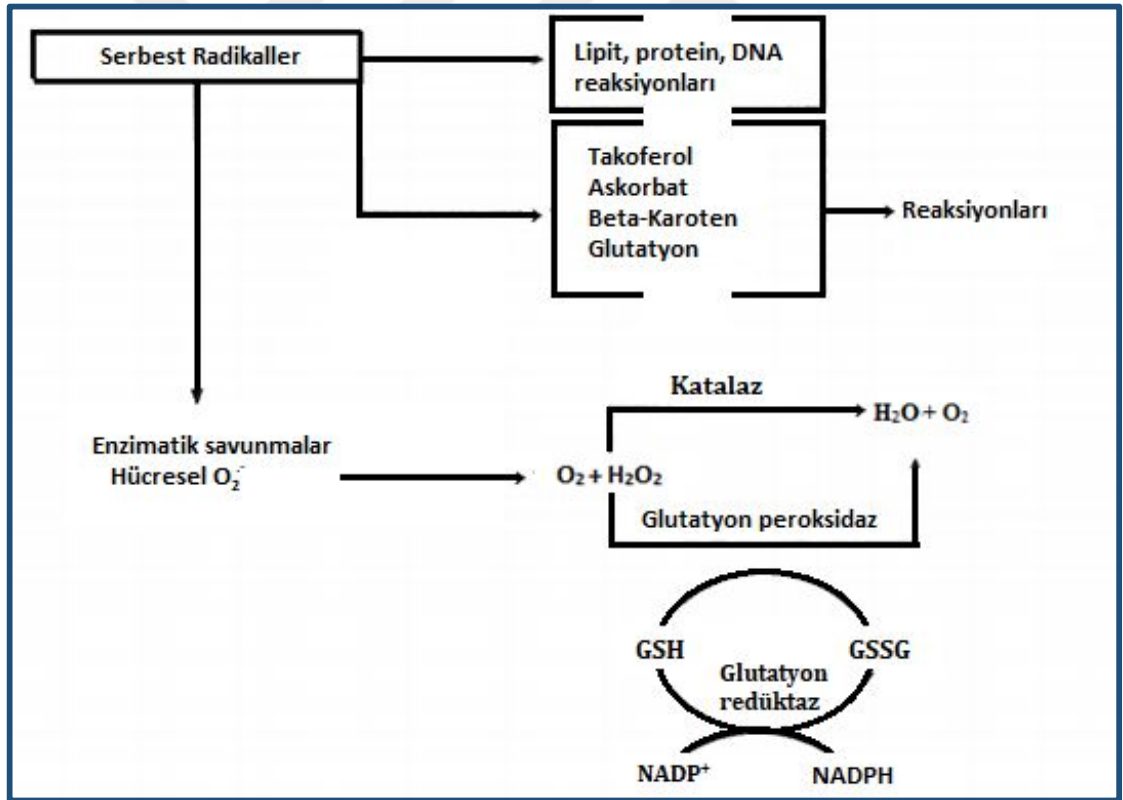
2.3. Antioksidan Savunma Sistemleri

Düşük bir konsantrasyonda bulunduğu okside edilebilir bir substratın oksidasyonunu önemli ölçüde geciktiren veya inhibe eden moleküllere antioksidanlar denir. Antioksidanlar oksidasyonu çeşitli mekanizmalarla engelleyebilirler. Bu sayede hücrenin lipitlerini, proteinlerini ve DNA'sını oksidasyona karşı korurlar (33).

Antioksidanlar fonksiyonlarına göre enzimatik ve nonenzimatik antioksidanlar olarak sınıflandırılır (Tablo 2). Bulduğu yere göre intrasellüler (İSS) veya ekstrasellüler (ESS) olabilir. En yaygın bilinen intrasellüler antioksidanlar, birer enzim olan: süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT) ve glutatyon peroksidazdır (GSH-PX). Bu antioksidanların plazma, doku sıvısı, serebrospinal sıvı, sinovial sıvı, seminal plazma gibi ekstrasellüler kompartmanlarda aktivitesi çok düşük miktarlarda bulunur veya hiç bulunmaz. ESS'deki önemli antioksidanlar: ekstrasellüler süperoksit dismutaz (EC-SOD), transferrin, laktoferrin, hemoglobin, seruloplazmin, albümin, askorbik asit, ürik asittir (44). Vücuttaki çeşitli antioksidan savunma mekanizmaları Şekil 5'te gösterilmiştir.

Tablo 2. Antioksidanların fonksiyonlarına göre sınıflandırılması

Nonenzimatik antioksidanlar	Enzimatik antioksidanlar
E vitamini	Süperoksit dismutaz
Ubikinon	Katalaz
Metal şelatörler	Glutasyon peroksidaz
Retinoik asit	Glutasyon redüktaz
Glutasyon	
Ürat	

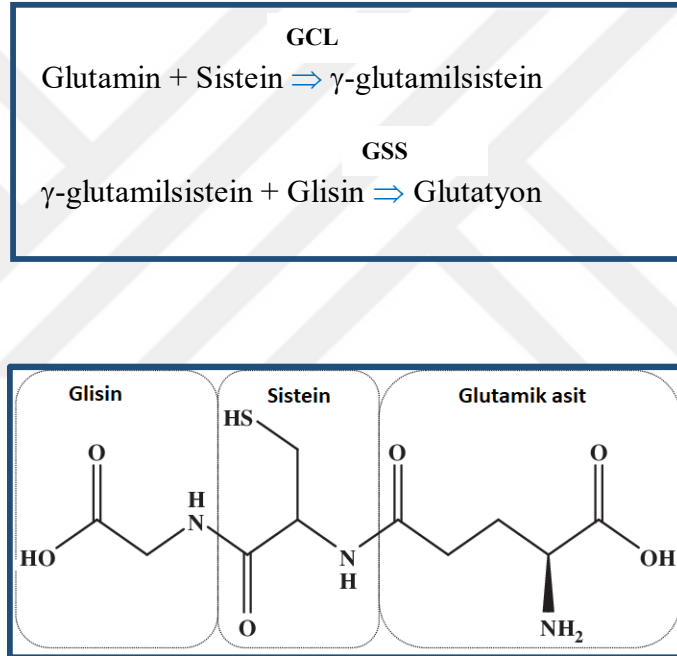


Şekil 5. Serbest radikallere karşı antioksidan savunma mekanizmaları

Kaynak: (45)

– Glutasyon (GSH)

Glutasyon hücre içinde özellikle sitoplazma, mitokondri ve nükleusta yaygın olarak bulunan en önemli intrasellüler, non-enzimatik antioksidan moleküllerinden biridir. Hücre içinde tripeptit (glutamik asit, sistein, glisin) olarak sentezlenir. Glutamin ve sistein amino asitlerinden, glutamin-sistein ligaz (GCL) enziminin katalizörlünde, γ -glutamilsistein oluşur. γ -glutamilsistein ve glisin, glutasyon sentetaz enzimi (GSS) katalizörlüğünde glutasyon oluşur (Şekil 6) (46).



Şekil 6. Glutasyonun kimyasal yapısı

Kaynak: (47)

Glutasyon oksidatif strese karşı hücreyi korumada kullanılan, ana indirgeyici moleküldür. Çeşitli elektrofilik bileşiklerin ve peroksitlerin, glutasyon peroksidaz ve glutasyon S-transferans katalizörlüğünde, detoksifikasyonunda anahtar rol oynar. Oksidatif hasara karşı koruyuculuğu, sülfidril grubunu (SH) vererek gerçekleştirir. Vücutta endojen olarak üretilip; diyet, toksin, inflamasyon, stres, travma, yaşlanma, radyasyon gibi çeşitli faktörler tarafından tüketilir (48). Detoksifikasyon görevine ek olarak GSH, glikoksalaz sistemi, ribonükleotidin deoksiribonükleotide indirgenmesi,

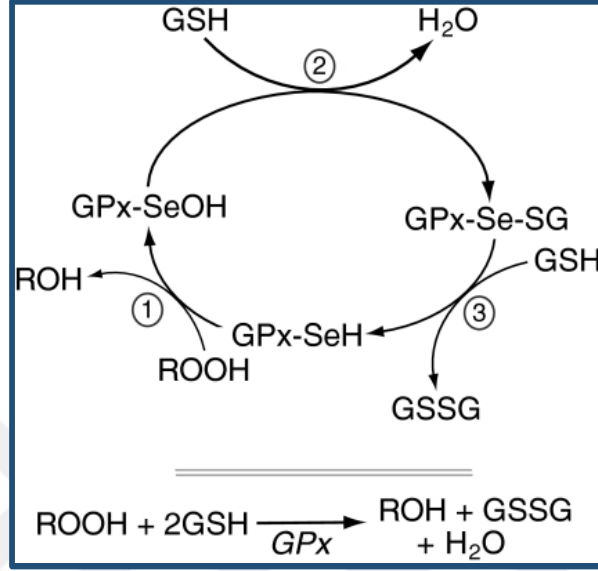
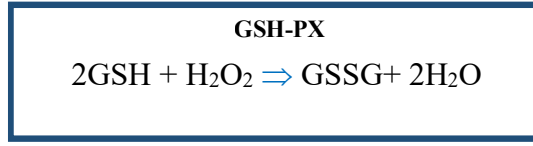
protein ve gen ekspresyonu gibi diğere hücresele reaksiyonlarda da görev alır (49). Hücre içinde okside (GSSG) veya indirgenmiş (GSH) halde bulunabilir. Optimal GSH:GSSG oranının korunması hücrenin hayatta kalması için elzemdir (50).

GSH, ROS'a karşı koruyucu görevini glutatyon peroksidaz (GPx) ve glutatyon redüktaz (GSSG-R) gibi kendisiyle ilişkili bazı enzimlerle birlikte yapar (48). Vücudun antioksidan savunmasında enzimatik ve non-enzimatik sistemler birlikte görev yapsa da, antioksidan savunma kapasitesi esas olarak glutatyon tarafından temsil edilir (51).

– Glutatyon peroksidaz (GPX)

Reaktif oksijen moleküllerinin (H_2O_2 , O_2^- gibi) aşırı artışı hücre için toksiktir. Bu nedenle bu moleküllerin hücre içinde miktarı, GPx, süperoksit dismutaz (SOD), ve katalaz (CAT) enzimlerinin işbirliği ile sıkı şekilde kontrol edilir (52). GPx isoformları oksidasyon mekanizması sırasında transkripsiyonel olarak üretilir. Yapısında koenzim olarak selenyum mineralini bulundurur (53). Glutatyonu, okside glutatyon (glutatyon disülfid [GSSG]) katalizler. H_2O_2 'yi, H_2O 'ya dönüştürebilir. Ya da lipit hidroperoksitlerini (ROOH) kararlı alkollere dönüştürebilir. GPx ve GSSG-R arasındaki denge hücredeki indirgenmiş GSH düzeyinin sürdürülmesini sağlar. GPx'in alt üniteleri aşağıdaki gibidir:

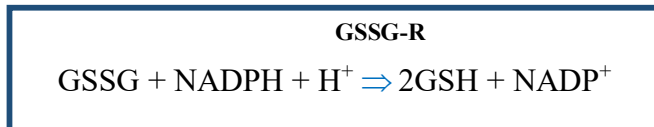
- GPx1: Pek çok hücrenin sitozolünde bulunur.
- GPx2: Sadece GI kanalda, sitozolde bulunur.
- GPx3: Plazmada bulunur.
- GPx4: Serbest radikaller tarafından hasarlanan kompleks lipitlere (kolesterol, lipoprotein gibi) bağlı olarak mitokondride bulunur (48). Glutatyon peroksidazın katalitik siklusu Şekil 7'de gösterilmiştir.



Şekil 7. Glutatyon peroksidazın katalitik siklusu
Kaynak: (54)

– **Glutatyon redüktaz (GSSG-R)**

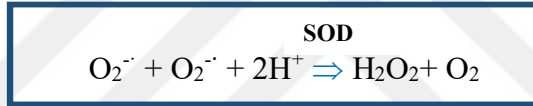
Glutatyonun (GSH) GPx katalizörlüğünde oksitlenmesiyle oluşan okside glutatyon (GSSG), glutatyon redüktaz (GSSG-R) enzimi ile NADPH'ı kullanarak indirgenir. Oksidatif stres durumunda GSSG-R enziminin transkripsiyonu düzenlenir. Ekspresyonunun değişmesi kanser ve yaşlanma ile ilişkilidir (49).



– Süperoksit Dismutaz (SOD)

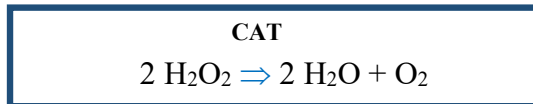
Süperoksit ($O_2^{\cdot -}$) spontan veya enzimatik olarak hidrojen peroksit'e dönüşebilir. Enzimatik dönüşüm süperoksit dismutaz (SOD) enzimi tarafından katalizlenir. Süperoksit dismutaz enziminin bulunduğu yere göre üç ayrı izoformu bulunmaktadır:

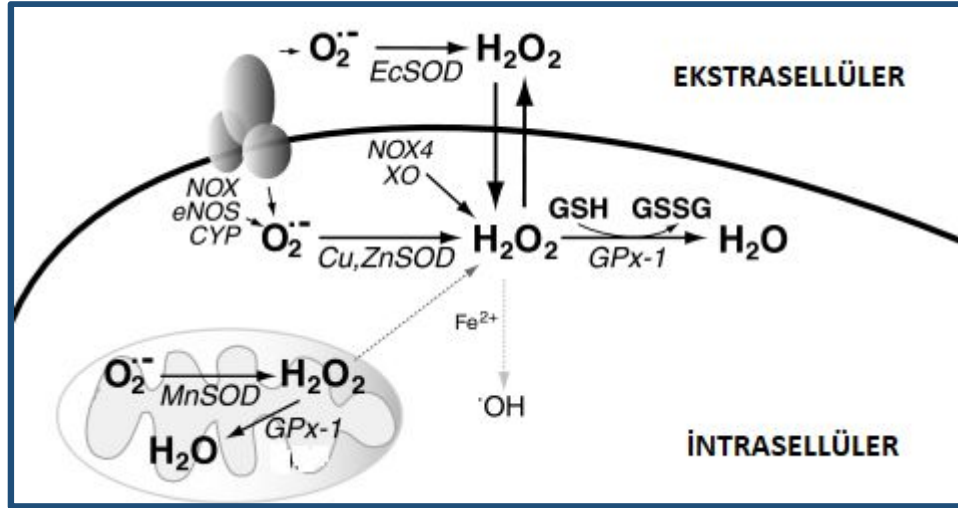
- Ekstrasellüler SOD (EC-SOD): Ekstrasellüler alanda bulunur
- Sitoplazmik SOD (Cu,Zn-SOD): Sitoplazmada bulunur. Yapısında bakır ve çinko minerallerini bulundurur.
- Mitokondriyal SOD (Mn-SOD): Mitokondride bulunur. Yapısında manganez mineralini bulundurur (39).



– Katalaz

Hidrojen peroksitin H_2O ve O_2 'ye indirgenmesinden sorumludur. Mitokondri, endoplazmik retikulum, peroksizom gibi hücre içi organellerde bulunur (55). Başlıca karaciğer, böbrek ve eritrositlerde bulunur. Kolit ve kolon kanserinin gelişmesi katalaz aktivitesinin azalmasıyla ilişkilendirilmiştir (56). Şekil 8'de hücresel antioksidan savunma sistemi özetlenmiştir.





Şekil 8. Reaktif oksijen moleküllerinin hüresel kontrolü. Mitochondriyal solunum veya bazı enzimlerin (NADPH oksidaz (NOX), endotelial nitrik oksit sentaz (eNOS), veya sitokrom p 450 (CYP)) aktivitesi sonucu oluşan süperoksit, spontan veya enzimatik olarak H_2O_2 'ye dönüşür. 3 ayrı izoformu bulunan süperoksit dismutaz enzimi (ECsOD, Cu,ZnSOD, MnSOD) bu dönüşümü gerçekleştirir. H_2O_2 oksidatif stres durumunda serbest demir atomuyla beraber hareket ederek hidroksil radikaline dönüşür. H_2O_2 ; GPx, katalaz, peroksideroksinler (Prx) tarafından indirgenir

Kaynak: (53).

2.4. İnflamasyon

Enfeksiyon veya doku hasarına karşı vücudun verdiği yanıtı inflamasyon denir. İmmünolojik olaylar ve inflamasyon sırasında bağışıklık sistemi hücreleri veya diğer bazı hücreler tarafından (örn: endotel hücreleri ve fibroblast) sentezlenen ve salgılanan, salındığı zaman çevre hücrelere (parakrin), kendisine (otokrin) veya kanda dolaşarak (hormonal) diğer hücrelere etki eden protein yapısındaki habercilere sitokin denir. Yani sitokinler hücreler arasında mesaj ileten bağışıklık sistemi hücrelerinin haberleşmesini sağlayan biyolojik mediyatörlerdir. Bazı sitokinler proinflamatuvar, bazıları antiinflamatuvar, bazıları ise immünomodülatör etki gösterir. Ülseratif kolitte sitokinler, ülseratif kolit şiddetinin ve süresinin artmasına; doku ve mukoza hasarına sebep olur. Bu moleküllerin baskılanması, remisyona ulaşması için önemlidir. Sitokinler antijene özgün değildir; ancak antijen oluşacak sitokin profilinin belirleyicisi olabilir (57).

2.4.1. Nötrofiller

İnsanda en fazla bulunan lökosit nötrofildir. Olgunlaşmış nötrofiller kanda ve karaciğer, dalak, kemik iliği gibi bazı dokularda bulunur (58). Nötrofiller akut inflamasyon sırasında bölgeye ilk gelen hücrelerdir (59). Bu sayede patojenin temizlenmesinde ve inflamasyonun giderilmesinde önemli rol oynar. Miyeloperoksidaz (MPO) nötrofiller tarafından salgılanan bir enzimdir. Nötrofilik miyeloperoksidaz enzimi organizmanın en güçlü oksidan kaynaklarından biridir. MPO, hidrojen peroksit tarafından klorür iyonlarının oksidasyonu yoluyla hipoklorik asit üretimini katalize eder. Çeşitli uyarıcıların etkisiyle fagositler miyeloperoksidaz içeren granüllerini ekstrasellüler aralıktaki fagositik vakuol içine boşaltırlar. Yani inflamasyon durumunda MPO düzeyi, nötrofil infiltrasyonunun bir göstergesi olarak ölçülür (32).

2.4.2. Nüklear faktör kappa B (NF-kB)

İnflamasyon sırasında salınan sitokinler özgün reseptörlerine bağlanarak çeşitli sinyal mekanizmaları üzerinden hücreye etki ederler. Bu sinyal mekanizmalarından biri NF-kB (Nüklear Faktör kappa B) indüksiyonudur (60, 61). NF-kB, hücre sitoplazmasında bulunan inflamatuvar ve immün cevapta önemli etkileri olan bir transkripsiyon faktörüdür. Aktive olmamış hücrenin sitoplazmasında, nükleusa geçmesini önleyen özel proteinlere bağlı olarak bulunur. Hücre aktive olduğunda spesifik kinazlar bu proteinlerin parçalanmasını sağlar. Böylece serbest kalan NF-kB nükleusa geçer ve bazı sitokinler, adhezyon molekülleri, inflamatuvar enzimler, reseptörler ve kendisinin inhibitörü olan proteinler gibi birçok genin regülasyonunu etkiler (61).

2.4.3. Tümör nekroz faktör- α (TNF- α)

TNF- α tek çekirdekli hücrelerden üretilen proinflamatuvar bir sitokindir. IL-1 β ve IL-6 üretimi, fibroblast proliferasyonu, adhezyon molekül ekspresyonu, pro-koagülan faktör aktivasyonu ve akut yanıtın başlamasını sağlar. Makrofaj ve lenfositleri aktive eder. B lenfositleri uyarır. T hücreden IFN- γ üretimini artırır. NF- κ B yolunu aktive eder. Bu nedenle artmış TNF- α ekspresyonu, mukozal bariyer fonksiyonunun hasarlanmasına, inflamasyonun şiddetlenmesine neden olur (62, 63). Son yıllarda TNF- α inhibitörü ilaçlar da İBH tedavisi için kullanılmaya başlamıştır.

2.4.4. İnterlökin-6 (IL-6)

IL-6, makrofajlardan üretilen proinflamatuvar sitokindir. ÜK'li hastaların doku biyopsi ve serum örneklerinde, IL-6 seviyesinin artmış olduğu tespit edilmiştir. IL-6, çözünebilir reseptörüne (sIL-6R) bağlanarak sinyal iletim sürecinde önemli rol oynar. IL6/sIL-6 hücre içi sinyal mekanizmalarını değiştirerek hedef genlerin transkripsiyonunu uyarır. ÜK gibi bazı inflamatuvar hastalıklarda IL-6 ve IL-6R düzeyi artar ve ÜK ile ilişkili klinik belirtiler görülür (64).

2.4.5. İnterlökin-10 (IL-10)

IL-10 monositlerden, B ve T lenfositlerinden sentezlenir. Monositlere antijen sunum kapasitesini azaltarak TNF- α , IL-1 β ve IL-6 üretimini inhibe eder. IL-10 mukozal immün sistemi koruyucu etkiler gösterir (65).

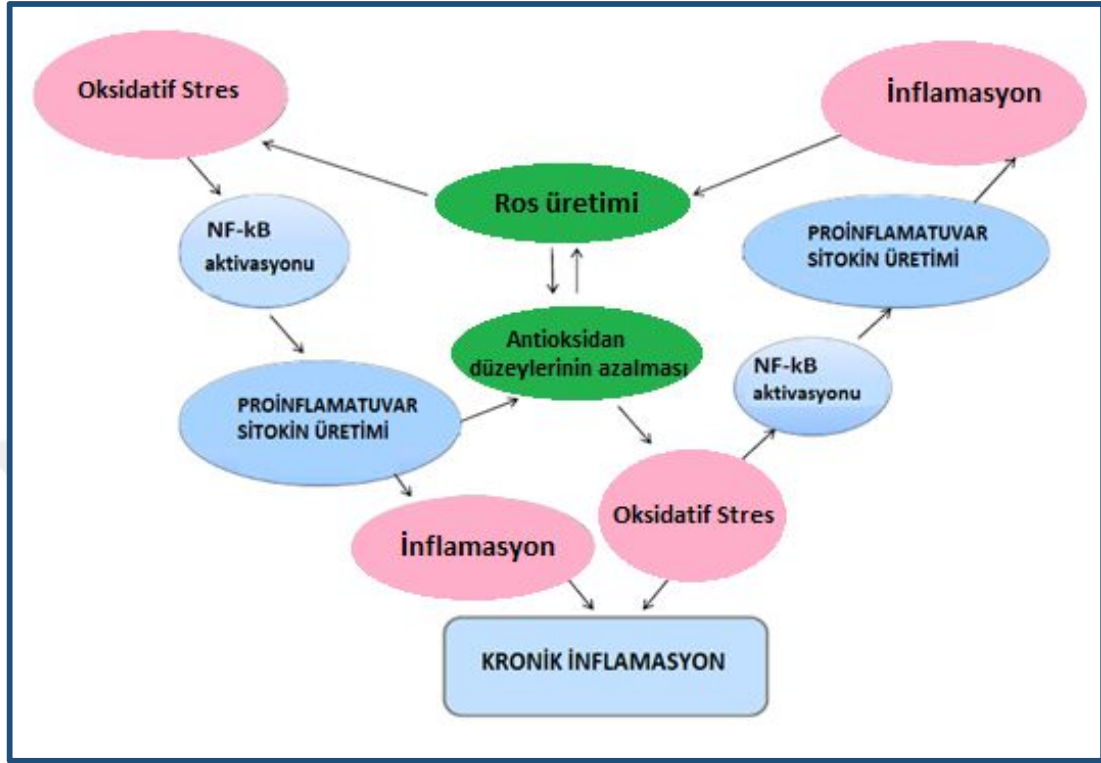
2.4.6. İBH patogenezinde serbest radikallerin ve inflamasyonun rolü

Protein fosforilasyonu, hücresel bağışıklık, apoptozis, hücre farklılaşması ve transkript faktör aktivasyonu gibi birçok fizyolojik sürecin gerçekleşmesi için minimal düzeyde ROS üretimi gereklidir. Ayrıca ROS, sekonder sinyal molekülleri gibi de davranabilir (66). Bununla beraber hücrenin savunma kapasitesinin üzerinde ROS üretimi İBH, metabolik sendrom ve kanser gibi pek çok hastalığın gelişimine yol açar (67).

Ülseratif kolitte, proinflamatuvar sitokinlerin, reaktif oksijen ve nitrojen bileşiklerinin düzeylerinin arttığı bilinmektedir (68). Ayrıca nötrofil infiltrasyonunun göstergesi olan MPO düzeyinin de arttığı bilinmektedir (69). Başka bir çalışmada ÜK'de artan nitrik oksit düzeylerinin TNF- α üretimini uyardığı, bunun da nötrofil infiltrasyonuna sebep olduğu belirlenmiştir (70). Artan nötrofil düzeyleri ise NF-kB gibi bazı transkripsiyon faktörlerinin sentezini uyarmaktadır (69). İnflamatuvar bağısak hastalıklarında oksidatif stres sinyallerinin gastrointestinal kanalın mukozal bariyerinde bozulmaya ve bakteriyel invazyona yol açarak inflamasyonu başlattığı ve İBH gelişimini tetiklediği bilinmektedir (71). Artmış reaktif oksijen moleküllerinin organizmaya etkileri aşağıdaki maddelerle özetlenebilir:

1. Membran geçirgenliğini artırır
2. Hücresel stresi artırır
3. Fakültatif anaerobik bakterileri artırır.
4. İntestinal mukozal bariyer fonksiyonunun bozulmasına ve
5. İnflamasyona yol açar (72, 73).

Reaktif oksijen moleküllerinin ve inflamasyon sinyallerinin kronik inflamasyonu oluşturma süreci Şekil 9’da gösterilmiştir.



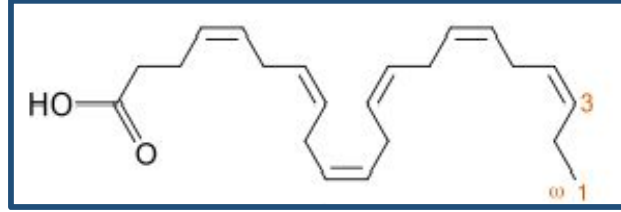
Şekil 9. Oksidatif stres ve inflamasyon ilişkisi, kronik inflamasyona götüren mekanizmalar

Kaynak: (74)

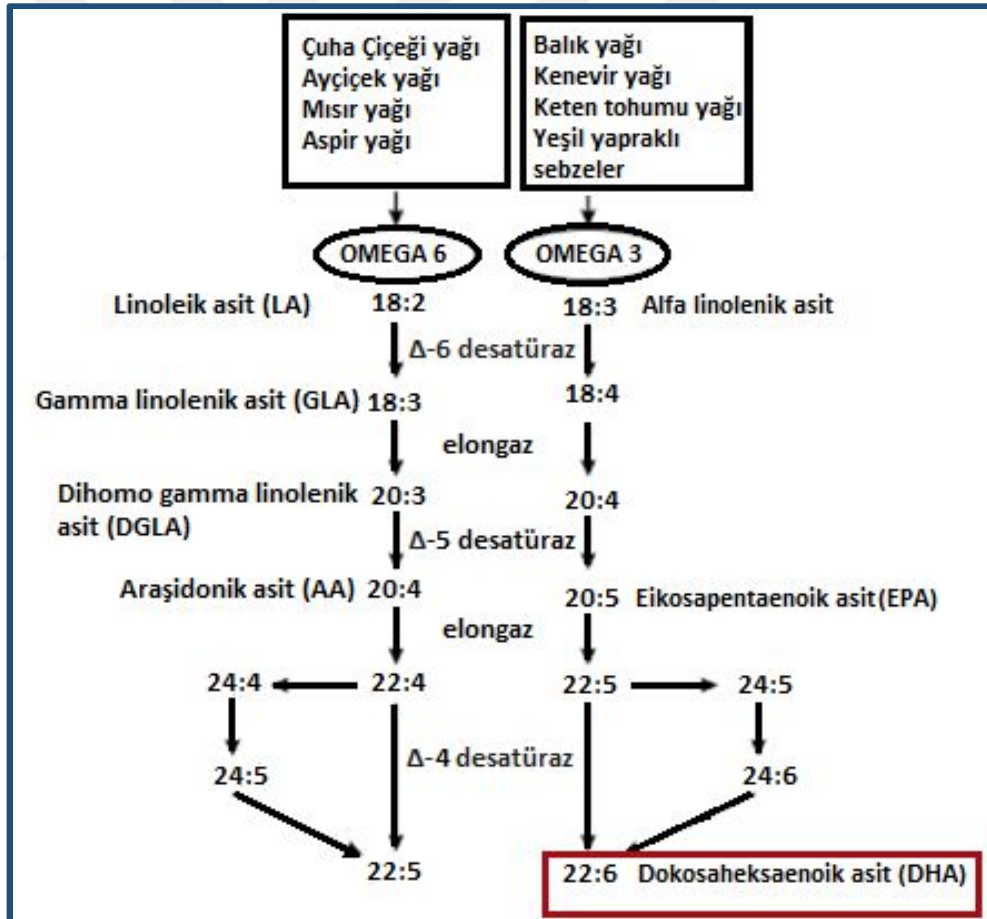
2.5. Dokosaheksaenoik Asit (DHA)

Alfa linolenik asit (ALA; 18:3 n3) ile linoleik asit (LA; 18:2 n6) vücutta sentezlenemeyen, diyetle dışarıdan alınması gereken iki esansiyel yağ asitidir. Bu moleküller diyetle vücuda alındıktan sonra Şekil 11’de gösterildiği gibi bir dizi enzimatik dönüşüme uğrayarak hücre membranına yerleşecek formlarına dönüşürler. LA’nın vücutta enzimatik dönüşüme uğramasıyla 22 karbonlu, 4 çift bağlı araşidonik asit (AA; 22:4 n3) molekülü; ALA’nın enzimatik dönüşüme uğramasıyla 22 karbonlu 5 çift bağlı eikosapentaenik asit (EPA; 20:5 n3) ve 22 karbonlu 6 çift bağlı dokosaheksaenoik asit (DHA; 22:6 n3) molekülleri oluşur (Şekil 10). Ancak bu dönüşüm hızı oldukça yavaştır (özellikle de DHA için). Bu enzimatik dönüşümün

dışında EPA ve DHA molekülleri balık yağı ile doğrudan da alınabilir. Sonuçta EPA ve DHA molekülleri hücre membranının fosfolipit yapısına katılır ve inflamatuvar süreçte etki gösterir. Nitekim omega-3 zengin diyetle beslenmeden sonra hücre fosfolipidlerindeki EPA ve DHA oranının yükseldiği bunun da inflamatuvar yanıtta önemli olduğu bildirilmiştir (75).



Şekil 10. Dokosaheksaenoik asit (DHA)'in moleküler yapısı (DHA 22:6 n3)



Şekil 11. LA: linoleik asit ve ALA: alfa linolenik asit'in vücuttaki enzimatik dönüşümü

Kaynak: (76)

2.5.1. DHA'nın antiinflamatuvar etkileri

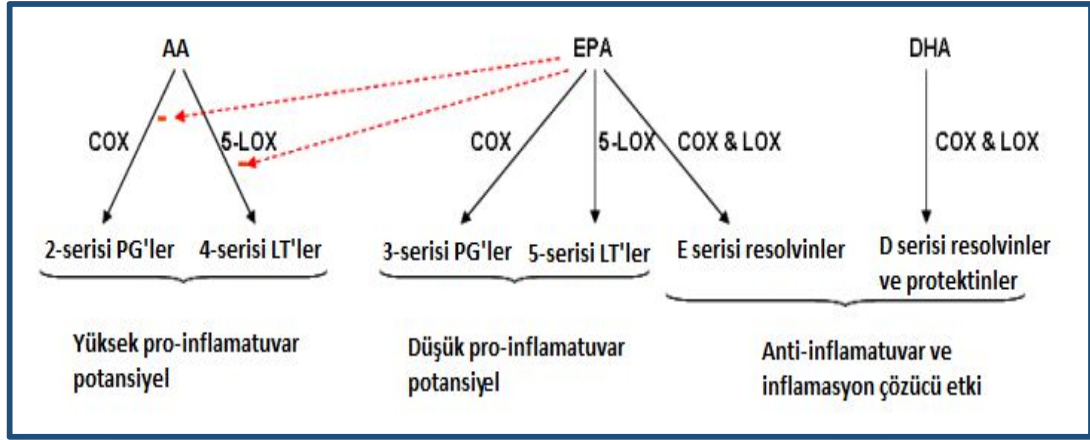
DHA hem antiinflamatuvar etkileri ile hem de inflamasyonun çözülmesini destekleyici etkileri ile inflamatuvar süreçte rol oynar (77, 78). DHA anti-inflamatuvar etkilerini adezyon molekülü ekspresyonunu azaltmak, araşidonik asitten türeyen lipit mediyatörlerin üretimini arttırmak, DHA'dan türeyen lipit mediyatörlerin üretimini arttırmak gibi çeşitli yollardan gösterir. DHA'nın aynı zamanda NF-kB yolağını da inhibe ettiği gösterilmiştir (79).

EPA ve DHA moleküllerinin antiinflamatuvar etkilerinde bu moleküllerinden üretilen lipit mediyatörler de rol oynar. AA'dan üretilen lipit mediyatörler, yüksek proinflamatuvar potansiyele sahip olup inflamasyonda yol açarken, EPA'dan üretilen lipit mediyatörlerin bazıları düşük proinflamatuvar etkiler, bazıları antiinflamatuvar etkiler gösterir. DHA'dan türeyen lipit mediyatörler ise antiinflamatuvar ve inflamasyon çözücü etkiler gösterir (Şekil 12). EPA ve DHA'dan türeyen resolvinler ve protektinler inflamatuvar yanıtın düzenlenmesini, hücrel hasarın giderilmesini ve inflamasyonun temizlenmesini sağlayarak inflamatuvar yanıtın önlenmesinde etkiler gösterir (80).

Akut inflamasyon sırasında plazmada bulunan n-3 PUFA yağ asitlerinden olan EPA ve DHA molekülleri intersitisyel sıvıya geçer. Enterositlerin ve nötrofilin etkileşmesiyle sentezlenen 15- lipoksijenaz (15-LOX) enzimiyle ara metabolite; ardından nötrofilden türetilen 5-LOX enzimiyle D serisi resolvinlere dönüşür (RvD1, RvD2, RvD3, RvD4) (81). Yapılan çalışmalarda RvD1'in nötrofil transmigrasyonunu inhibe ettiği, adezyon moleküllerini bloke ederek kemotaksiyi durdurduğu bildirilmiştir (82, 83, 84).

AA'dan türeyen lipit mediyatörler TNF- α , IL-6 gibi proinflamatuvar sitokinlerin ve ROS'ların üretimini arttırarak inflamasyonu şiddetlendirir. EPA ve DHA

molekülleri ise AA ile yarışarak AA'dan türeyen inflamatuvar lipid mediyatörlerin, sitokinlerin ve ROS üretimini azaltır (85).



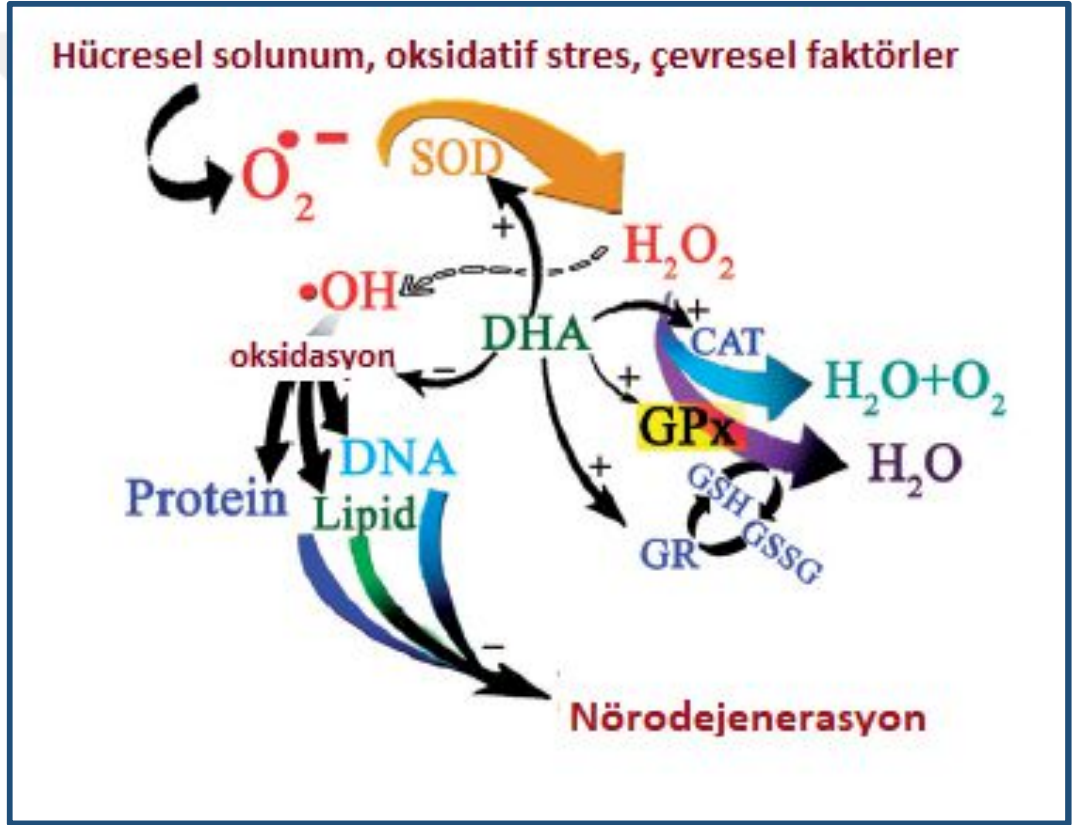
Şekil 12. AA, EPA ve DHA moleküllerinden lipid mediyatörlerin sentezi. COX, siklooksijenaz; LOX, lipoksijenaz; LT, lökotrien; PG, prostaglandin. Resolvinler: EPA ve DHA'dan üretilen antiinflamatuvar ve inflamasyon çözücü moleküller

Kaynak: (86)

2.5.2. DHA'nın antioksidan etkileri

Yağ asitleri membran fosfolipitlerinin ana bileşenidir. Omega 3 ve omega 6 yağ asitleri hücre membranının fosfolipit yapısına katılarak hücrenin yapı ve fonksiyonunda önemli rol oynar. Fosfolipitler ve doymamış yağ asitleri membranın akışkanlığını; trans yağ asitleri, doymuş yağ asitleri ve kolesterol ise membranın stabil olmasını sağlar (87). Bununla beraber molekülün yapısında bulunan çift bağ sayısı arttıkça hücreler oksidasyona daha açık hale gelirler. DHA'nın yapısında bolca bulunan çift bağlar bu molekülü oksidasyona açık hale getirmesine rağmen DHA antioksidan etkili bir moleküldür. Öyleyse DHA bu antioksidan etkisini nasıl gerçekleştirir? Bu durum DHA'nın in-vivo ve in-vitro ortamda farklı etkiler gösteriyor olabileceğini düşündürmüştür (8). Nitekim DHA'nın tek başına verildiği bir çalışmada DHA'nın beyin, karaciğer ve endotel hücrelerinde oksidatif strese karşı yatkınlık oluşturmadığı, aksine oksidatif stresi iyileştirdiği belirlenmiştir. Bu etkisi AA molekülleri ile yarışmasından kaynaklanır. AA pek çok hücre çeşidinde sinyal iletim mekanizmalarını aktive eder ve hücreyi oksidatif strese eğilimli hale getirir. Nitekim

AA konsantrasyonu ile oksidatif stresin bir göstergesi olan lipit peroksitlerinin konsantrasyonu arasında pozitif korelasyon; DHA ile lipit peroksitlerinin konsantrasyonu arasında negatif korelasyon olduğu bilinmektedir (8). Ayrıca oral yoldan verilen DHA'nın beyinde katalaz, glutasyon peroksidaz ve glutasyon redüktaz enzim aktivitelerini arttırarak antioksidan kapasiteyi arttırdığı bulunmuştur (88). Yine bir çalışmada DHA'nın sıçan iskelet kasında CAT ve GSH-PX enzimlerinin mRNA ekspresyonunu arttırdığı belirlenmiştir (8). Bu bulgular DHA'nın oksidatif strese karşı koruyucu bir çoklu doymamış yağ asidi olduğunu göstermektedir.



Şekil 13. DHA'nın beyindeki antioksidan aktivitesi. Hücresel solunum, oksidatif stres ve çevresel faktörler O_2 'yi oksitleyerek $O_2^{\cdot-}$ radikalini oluşturur. SOD enzimi, $O_2^{\cdot-}$ molekülünü nötralize ederek H_2O_2 radikalini oluşturur. H_2O_2 ise reaktivitesi çok yüksek olan $\cdot OH$ radikalini oluşturur. $\cdot OH$ hücrenin DNA, protein ve lipitlerini okside ederek hücrede hasar meydana getirir. DHA, hücre hasarını antioksidan enzimler olan CAT, GSH-PX, GSSG-R enzim düzeylerini arttırarak inhibe eder.

Kaynak: (8)

2.6. Deneysel Kolit Hayvan Modelleri

İnflamatuvar bağırsak hastalarına potansiyel tedavi yöntemlerinin geliştirilmesi amacıyla deneysel kolit hayvan modelleri kullanılmaktadır. Asetik asit (AcOH), dekstran sodyum sülfat (DSS), trinitrobenzensülfonik asit (TNBS) gibi kimyasal ajanlarla oluşturan kolit modelleri, İBH ile aynı histolojik olaylar ve benzer mekanizmalarla inflamasyon oluşturulur (89).

2.6.1. Trinitrobenzensülfonik asit (TNBS) ile oluşturulan deneysel kolit modeli

Deneysel kolit hayvan modelleri arasında 2,4,6-trinitrobenzensülfonik (TNBS) ile indüklenen model patolojik semptomların çoğunu taklit edebilen ve tekrarlanabilir bir model olmasıyla öne çıkmaktadır (3, 4). TNBS etanol içerisinde çözülerek rektal yoldan uygulanır. Etanol, mukozadaki epitel bariyeri hasarlayarak TNBS'nin bağırsak duvarına nüfuz etmesini sağlar (90, 91). Bu sayede transmural kolite neden olur. Oluşan transmural kolitin histolojik ve immünolojik değişiklikler de dahil olmak üzere birçok özellik açısından insanda oluşan koliti yansıtan bir model olduğu gösterilmiştir (92).

Çalışmanın amacı n-3 PUFA'nın literatürdeki anti-inflamatuvar etkilerinden yola çıkarak intragastrik yolla doğrudan verilen DHA'nın, TNBS kolit modelindeki olası terapötik etkilerini; proinflamatuvar ve antiinflamatuvar moleküller üzerindeki etkileri ile antioksidan etkileri üzerinden araştırmaktır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Deney Gruplarının Oluşturulması

Çalışmada 200-250 gram ağırlığında 28 adet dişi Wistar Albino sıçan kullanılmıştır. Sıçanlar, Acıbadem Mehmet Ali Aydınlar Üniversitesi Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi'nden (ACUDEHAM) temin edilmiş, çalışma süresince 12 saat aydınlık/karanlık döngüsünde standart nem (%60-70) ve sıcaklık (22 ± 1 °C) koşulları altında tutulmuştur. Sıçanların fizyolojik gereksinimlerine yönelik ad libitum tarzda beslenmeleri ve suya serbest bir şekilde erişimleri sağlanmıştır. Çalışmanın etik kurul onayı Acıbadem Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan, (Onay tarih ve numara: 07/05/2018 ACU/HADYEK 2018/21 – EK-1) alınmıştır.

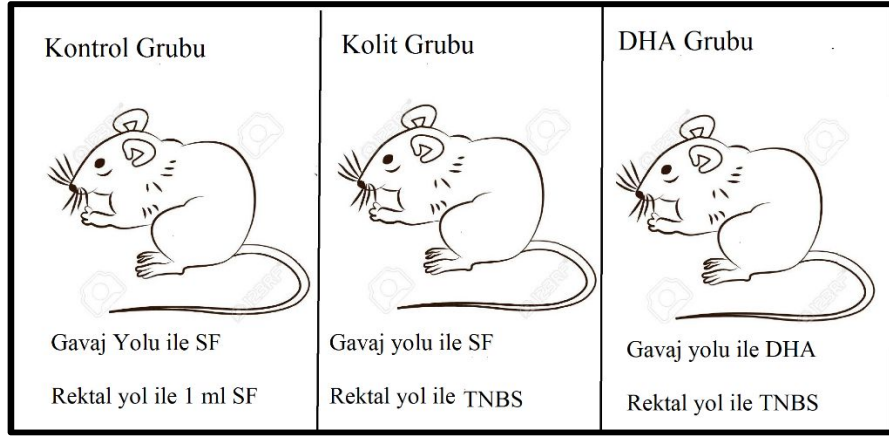
Deney Grupları:

Çalışmada kullanılan toplam 28 adet sıçandan randomize olarak 3 farklı deney grubu oluşturulmuştur (Şekil 14). Deney gruplarının oluşturulması deneyin başında, sıçanlara herhangi bir uygulama yapılmadan önce gerçekleştirilmiştir. Çalışmanın deney grupları:

Kontrol grubu (A): (n=8) 4 hafta boyunca gavaj yolu ile serum fizyolojik (%0.9 SF) verildi. 4. haftanın sonunda, 8 cm'lik bir kanül aracılığıyla intrarektal olarak 1ml serum fizyolojik uygulandı.

Kolit grubu (B): (n=10) 4 hafta boyunca gavaj yolu ile serum fizyolojik verildi. 4. haftanın sonunda intrarektal olarak 1ml TNBS verilerek kolit oluşturdu.

Kolit+DHA grubu (C): (n=10) 4 hafta boyunca gavaj yolu ile 600 mg/kg/gün DHA (Geekee-A) verildi. 4. haftanın sonunda intrarektal olarak 1ml TNBS verilerek kolit oluşturuldu. Sıçanlar her hafta tartılarak verilecek DHA miktarı hesaplandı.



Şekil 14. Deney grupları şeması

3.2. Kolit Modelinin Oluşturulması

Bir gecelik (16 saat) açlığın ardından izofloran anestezisi altına alınan, kolitin indükleneyeceği gruplardaki (B ve C) sıçanların her birine %40'lık etanolde çözülmüş 15 mg/mL TNBS çözeltisinin 1 mL'si, 8 cm'lik bir kanül aracılığı ile kolon içerisine intrarektal yoldan verildi. Sıçanlar, kolit modeli oluşturulduktan sonra üç gün daha yaşatılıp, üçüncü günün sonunda dekapitasyon yöntemi ile sakrifiye edildi.

3.3. Kolit Şiddetinin Değerlendirilmesi

Sıçanlar sakrifikasyon öncesinde tartılarak ağırlıkları kaydedildi. Sakrifikasyon sonrasında rektumdan başlayarak 8 cm uzunluğundaki kolon parçası çıkarıldı. Salin içerisinde yıkanarak feçesten ayrılan kolon tartılarak ağırlığı belirlendi. Sonrasında kolon ağırlıkları aşağıdaki formüle göre değerlendirildi:

$$Doku\ ağırlık\ indeksi\ (DAİ) = \frac{Kolon\ ağırlığı\ (g)}{Sakrifikasyon\ öncesi\ vücut\ ağırlığı\ (g)} \times 100$$

3.3.1. Makroskopik değerlendirme

Toplanan kolon örnekleri mukozal lezyonları, ülserasyon varlığı ve ülserasyonun büyüklüğüne göre makroskopik olarak incelenip skorlandı. Makroskopik değerlendirme için Wallace ve ark. (93) tarafından modifiye edilmiş makroskopik hasar skalası kullanıldı (Tablo 3). Değerlendirme tek kör olarak bu konuda deneyimi olan uzman fizyolog tarafından yapıldı.

Tablo 3. Makroskopik hasar skalası

Kaynak: (93)

Skor	Anlamı
0	Hasar yok
1	Fokal hiperemi var, ülser yok
2	Hiperemi veya kolon duvarında kalınlaşma olmaksızın lineer ülserasyon
3	Bir bölgede inflamasyon ile birlikte lineer ülserasyon
4	İki ya da daha fazla bölgede ülserasyon ve inflamasyon bölgesi
5	İki ya da daha fazla majör ülserasyon ve inflamasyon, bir ya da daha fazla yerdeki hasarın 1 cm'den daha uzun kolon segmentini tutması
6-10	Ülser ve inflamasyon bölgesinin 2 cm'den daha uzun kolon segmentini tutması (her 1 cm'lik hasar için skor 1 birim arttırıldı)

3.3.2. Mikroskopik değerlendirme

Dekapitasyon sonrası alınan kolon örnekleri, makroskopik değerlendirmeleri tamamlandıktan sonra %10'luk nötral tamponlu formalin içinde fikse edildi. Fiksasyonu takiben kolon dokuları, yükselen etil alkol serisi (%70, %90, %96, %100) ile dehidrate edilip, ardından ksilen ile saydamlaştırıldı. Dokular daha sonra parafine gömüldü. Mikrotom (Thermo Scientific) ile 5 µm kalınlığında kesitler alınarak sıcak su banyosuna aktarıldıktan sonra lamlara alındı. Kesitlere, histolojik değerlendirme için hematoksilin-eozin (H&E) boyası uygulandı. Boyama için lam üzerine alınan doku kesitleri, ksilende 30 dk boyunca bekletildi. Ardından azalan alkol serisinde (%100, %90, %70) 5'er dakika bekletilip musluk suyu ile yıkandı. Hematoksilende 5 dk bekletilerek boyanan doku kesitleri musluk suyu ile 5 dk boyunca yıkayıp, 1 dk boyunca %70'lik alkolde bekletildi. Daha sonra eozinde 3 dk bekletilerek boyama tamamlandı. Sonrasında yükselen alkol serisinden (%70, %90, %100) geçirildikten sonra ksilen damlatılarak üzeri kapatıldı. Histolojik değerlendirme için, ışık mikroskobu altında yüzey epitel dokusu, mukozada ödem ve inflamatuvar hücrelerin varlığı, vazokonjesyon ve kanama dereceleri incelenip, uzman histolog tarafından 0 ila 3 arasında skorlandı (Tablo4).

Tablo 4. Mikroskopik hasar skalası

Kaynak: (94)

Skor	Anlamı
0	Hasar yok
1	Hafif hasar
2	Orta seviyede hasar
3	Ciddi hasar

3.4. Oksidan ve Antioksidan Parametreler

Kolon mukozasındaki malondialdehit (MDA), glutatyon (GSH) düzeyleri ile total antioksidan kapasite (TAS) ve total oksidan kapasite (TOS) düzeylerini belirlemek için sakrifikasyon sırasında çıkarılan kolon dokuları küçük parçalara ayrılıp, alüminyum folyo ile sarılarak analiz gününe kadar -80 °C'de saklandı.

3.4.1. Dokuda malondialdehit (MDA) düzeyi

Kolon dokuları tartılarak üzerlerine ağırlığının 9 katı hacimde %10'luk triklorik asit solüsyonu eklenmiş ve homojenize edilmiştir. Homojenizasyondan işleminden sonra doku homojenatları, 3.000 rpm'de, +4 °C'de, 15 dk boyunca santrifüj (Thermo Fisher Scientific) edildi. Santrifüj bitiminde örneklerden süpernatantları alınarak 9.000 rpm'de, +4°C'de, 8 dk daha santrifüj edildi. Sonrasında cam tüplere 750 µl tiyobarbitürik asit ve 750 µl doku örnekleri eklenmiş ve 20 dk boyunca kaynatma işlemi uygulanmıştır. Oluşan renk değişimi spektrofotometrede (Hitachi/U-1900) 535 nm'de okutuldu. Elde edilen sonuçlar $1.56 \times 10^{-5} \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ katsayısı ile çarpılarak sonuçlar analiz edildi (95).

3.4.2. Dokuda glutatyon (GSH) düzeyi

Kolon dokuları tartılarak ağırlığının 9 katı hacimde %10'luk triklorik asit solüsyonu ile homojenize edildi. 3.000 rpm'de, +4 °C'de, 15 dk boyunca santrifüj edildi. Süpernatantlar alınarak 10.000 devirde, 4°C 'de, 8 dk daha santrifüj edildi. Süpernantları iyice ayrılan peletler Modifiye Ellman yöntemi (40 mg DTNB + 100 ml %1 Na sitrat) kullanılarak spektrofotometrede 412 nm'de okutuldu ve sonuçlar analiz edildi (96)

3.4.3. Dokuda total oksidan kapasitesi (TOS), total antioksidan kapasite (TAS) ve oksidatif stres indeksi (OSİ) düzeyleri

Total oksidan kapasite (TOS), sıçan TOS kiti (Rel Assay Diagnostics marka) kullanılarak spektrofotometrik yöntem ile ölçüldü. Örnekte bulunan oksidan moleküller, ferröz demir iyonunu okside ederek ferrik demir iyonuna dönüştürür. Ferrik iyon asidik medyum içinde ksilenol turuncu bir renk oluşturur. Spektrofotometre ile belirlenen renk yoğunluğu örnekteki total oksidan molekül miktarını gösterir. Sonuçlar $\mu\text{mol Equiv H}_2\text{O}_2/\text{L}$ olarak ifade edilir (97).

Total antioksidan kapasite (TAS) sıçan TAS kiti (Rel Assay Diagnostics marka) kullanılarak spektrofotometrik yöntem ile ölçüldü. Testin prensibi kararlı bir radikal katyonu olan ABTS (2,2'-azinobis (3-etilbenzotiyazolin 6-sülfonat)) molekülünün karakteristik renginin, antioksidanlar tarafından açılmasına dayanır. Sprektrofometre ile belirlenen renk yoğunluğu total antioksidan molekül miktarını gösterir. Sonuçlar $\text{mmol Trolox equivalent /L}$ olarak ifade edilir (98).

TOS ve TAS düzeylerinin oranı oksidatif stres indeksi (OSİ) olarak kabul edilir. TAS değeri $\mu\text{ol/L}$ birimine çevrildikten sonra oksidatif stres indeksi (OSİ) aşağıdaki formüle göre hesaplanır (99) (100) (101):

$$\text{Oksidatif Stres İndeksi (OSİ)} = \frac{\text{TOS } (\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ equivalent/L})}{\text{TAS } (\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ equivalent/L})} \times 100$$

3.5. İnflamatuvar ve Antiinflamatuvar Parametreler

Kolon mukozasındaki MPO, NF-kB, TNF- α , IL-6, IL-10, protein düzeylerini belirlemek için kolon dokuları küçük parçalara ayrılıp, alüminyum folyo ile sarılarak analiz gününe kadar -80 °C'de saklandı.

3.5.1. Dokuda Miyeloperoksidaz (MPO) Düzeyi Tayini

Kolon dokuları tartılarak ağırlığının 9 katı hacimde %5'lik HETAB solüsyonu (50mM potasyum fosfat tamponu içinde; pH:6) ile homojenize edilerek, 12.000 rpm'de, +4 °C'de, 10 dk boyunca santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra kalan pellet, 50 mM potasyum fosfat tamponu içinde tekrar homojenize edildi. Ardından her bir tüpe 50 mM potasyum fosfat tamponu, 30 mM o-dianisidin, 60 mM H₂O₂ ve örnek koyuldu. Su banyosunda 37 °C'de 3 dakika süren reaksiyon başlatılıp, 3 dakikanın sonunda %2'lik sodyum azid ile durduruldu. Örnekler 5.000 rpm'de, 4°C'de, 15 dk boyunca santrifüj edilip, spektrofotometrede 460 nm'de okutuldu (102).

3.5.2. ELISA ölçümleri

Kolon mukozasındaki sitokin düzeylerini belirlemek amacıyla kolon dokusu tampon çözelti içerisinde homejenize edildi. Sonrasında NF-kB, TNF- α , IL-6, IL-10 düzeyleri üretici firmanın yönergeleri doğrultusunda Elisa Kiti (Enzyme-Linked İmmuno Sorbent Assay) (Rel Assay Diagnostics Marka) kullanılarak ölçüldü. Standart eğri oluşturularak sitokin konsantrasyonları belirlendi.

3.6. İstatistiksel Analiz

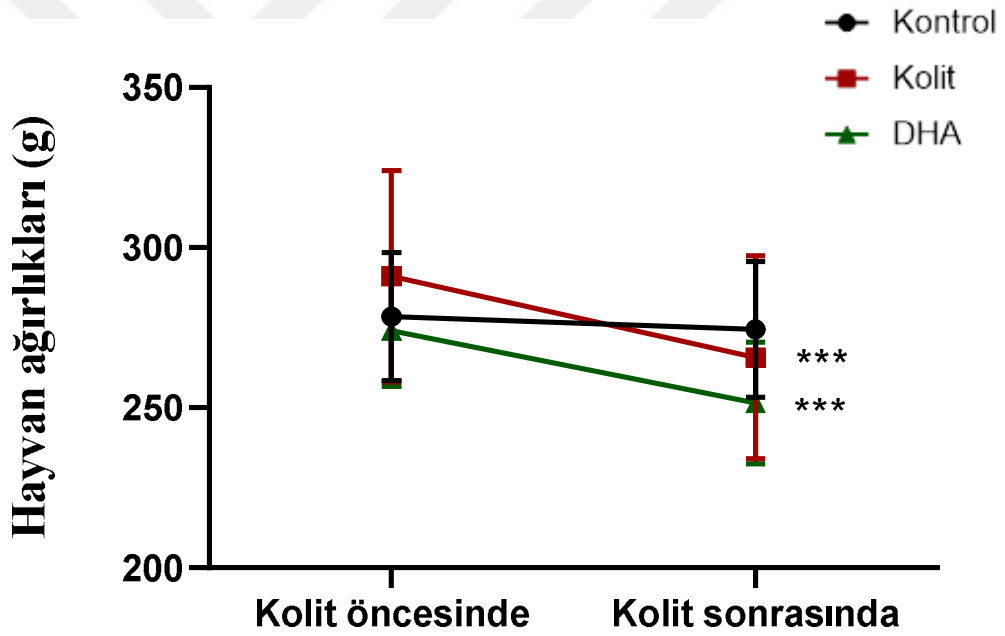
Deney sonunda elde edilen veriler ortalama \pm standart sapma olarak ifade edildi. Gruplar arasındaki farklılığın değerlendirilmesinde bağımsız gruplar için t testi, tek yönlü gruplar arası varyans analizi (ANOVA), Tukey ve Games-Howell çoklu karşılaştırma testleri kullanıldı. Alfa anlamlılık düzeyinin 0.05'ten küçük olması ($p < 0.05$) halinde veriler, istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. İstatistiksel değerlendirme için SPSS 23 versiyonu kullanıldı. Grafikler Graphpad Prism8 programı kullanılarak oluşturuldu.



4. BULGULAR

4.1. Vücut Ağırlıklarının Değerlendirilmesi

Kolit oluşturulmadan önce ve oluşturulduktan üç gün sonrasında deney gruplarının vücut ağırlıkları ölçülerek ağırlık farkı hesaplanmıştır. Hesaplanan ağırlık farkı iki yönlü varyans analizi ile (ANOVA) karşılaştırılmıştır. Kolit ve DHA gruplarında kolit modeli oluşturulmadan önce ve oluşturulduktan sonra anlamlı bir ağırlık değişiminin olduğu belirlenmiştir ($p < 0,001$). Kolit grubunda ise anlamlı bir ağırlık değişimi görülmemiştir (Tablo 5 ve Şekil 15).



Şekil 15. Deney gruplarının kolit öncesindeki ve sonrasındaki ağırlık farkları.

***: $p < 0,001$

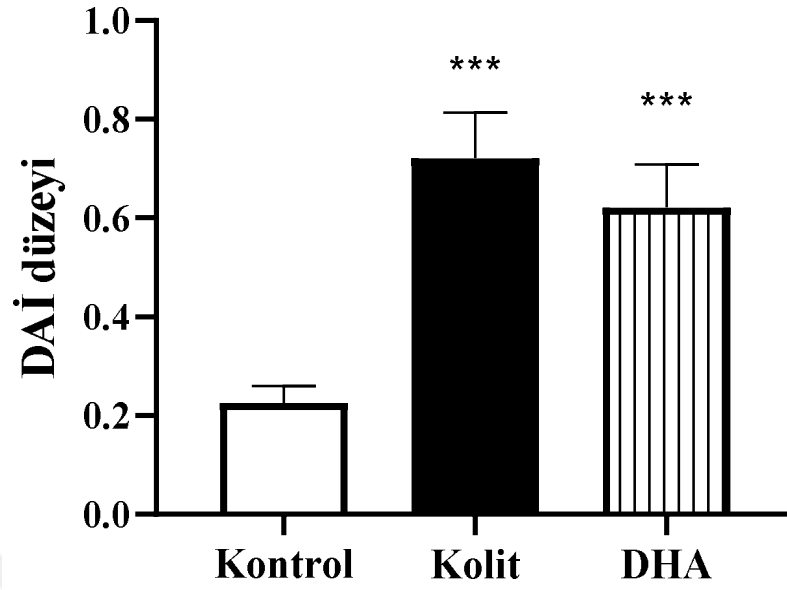
4.2. Kolon Ağırlıklarının Değerlendirilmesi

Gruplar arasındaki kolon DAİ düzeyi farkı tek yönlü gruplar arası varyans analiziyle karşılaştırılmıştır. Testin sonucu 0,05 alfa düzeyine göre anlamlı bulunmuştur. ($F = 94,84, p = 0,00$). Gruplar arasındaki farkı belirlemek için analiz sonrası Games-Howell testi kullanılmıştır. Kolit ($X = 0,72, S = 0,09$) ve DHA gruplarının ($X = 0,62, S = 0,09$) kolon DAİ düzeylerinin kontrol grubuna ($X = 0,23, S = 0,04$) göre anlamlı olarak yüksek olduğu (sırasıyla; $p = 0,000, p = 0,000$); DHA grubunun DAİ düzeyinin ise kolit grubundan hafifçe düşük olmakla beraber aradaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlenmiştir ($p > 0,05$) (Tablo 5 ve Şekil 16).

Tablo 5. Deney gruplarının kolit oluşturulmadan öncesinde ve oluşturulduktan sonrasında vücut ağırlıkları (g), kolon doku ağırlık indeksi (DAİ) (g/100 g vücut ağırlığı) (ortalama \pm standart sapma)

Gruplar	Kolit öncesi vücut ağırlığı (X \pm SS)	Kolit sonrası vücut ağırlığı (X \pm SS)	DAİ (X \pm SS)
Kontrol (n = 8)	278,41 \pm 19,98	274,45 \pm 21,21	0,23 \pm 0,04
Kolit (n = 10)	291,09 \pm 32,98	265,69 \pm 31,60	0,72 \pm 0,09***
Kolit+DHA (n = 10)	273,95 \pm 17,40	251,44 \pm 19,05	0,62 \pm 0,09***

***: $p < 0,001$ kontrol grubuna göre kıyaslanmıştır.

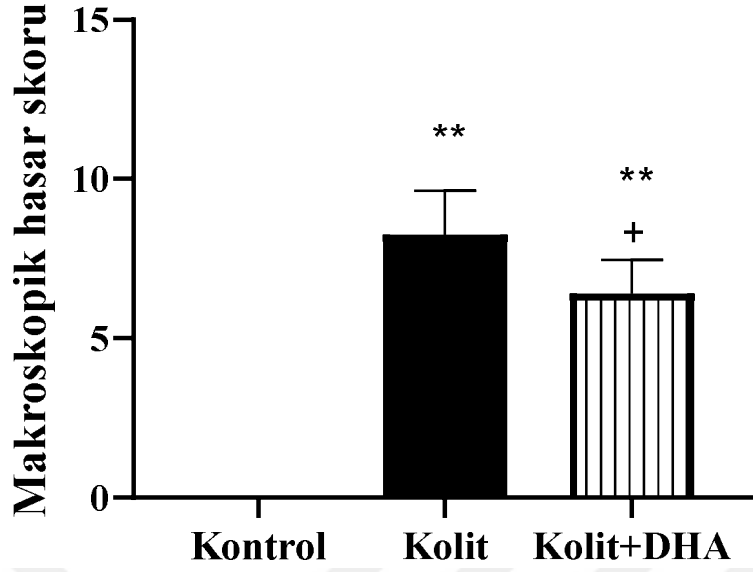


Şekil 16. Deney gruplarının kolon DAİ düzeyleri. ***: $p < 0,001$ kontrol grubuna göre kıyaslanmıştır.

4.3. Morfolojik Sonuçlar ve Histopatolojik Skorumla

4.3.1. Makroskopik hasar skoru

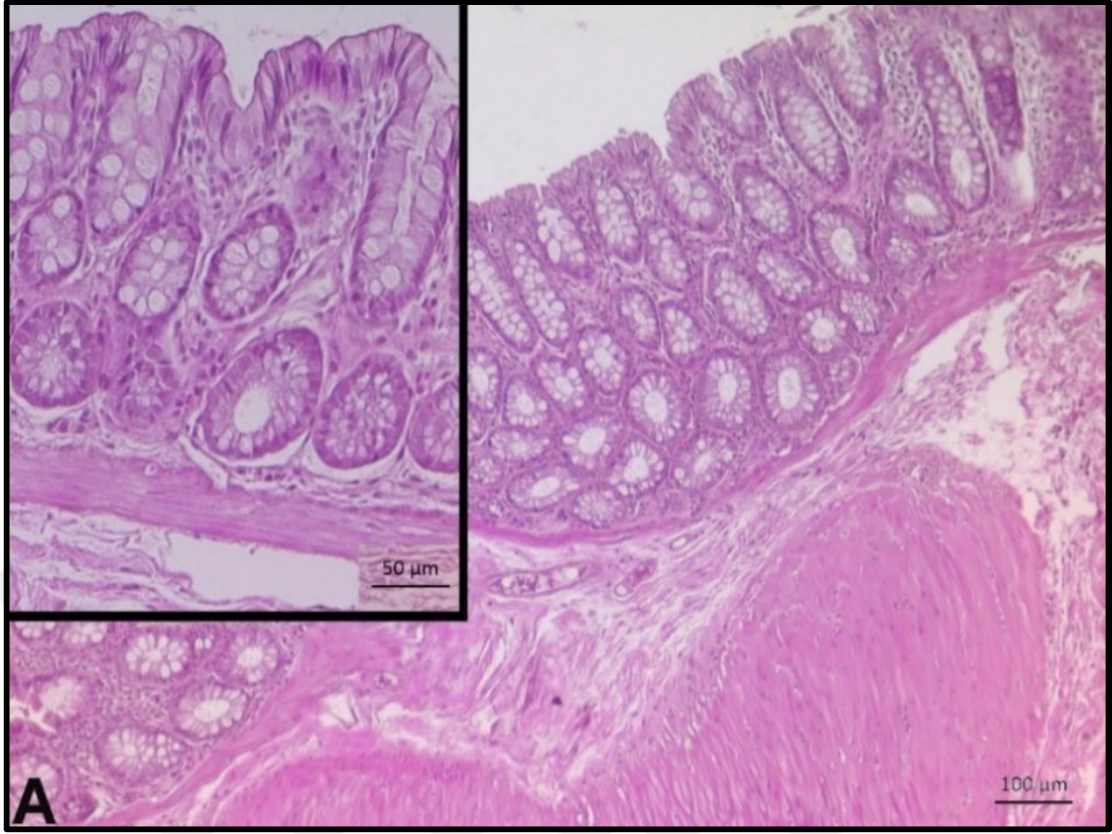
Gruplar arasında kolon dokularının makroskopik hasar skorları arasındaki fark tek yönlü gruplar arası varyans analiziyle karşılaştırılmıştır. Testin sonucu 0,05 alfa düzeyine göre anlamlı bulunmuştur ($F = 146,32$, $p = 0,00$). Gruplar arasındaki farkı belirlemek için analiz sonrası Games-Howell testi ile kullanılmıştır. Kolit ($ort = 8,25$, $SS = 1,39$) ve DHA gruplarının hasar skorlarının ($ort = 6,40$, $SS = 1,07$) kontrol grubunun hasar skorundan anlamlı olarak yüksek olduğu ($p < 0,01$) ve DHA grubunun hasar skorunun kolit grubundan anlamlı olarak düşük olduğu belirlenmiştir ($p < 0,05$) (Tablo 6 ve Şekil 17).



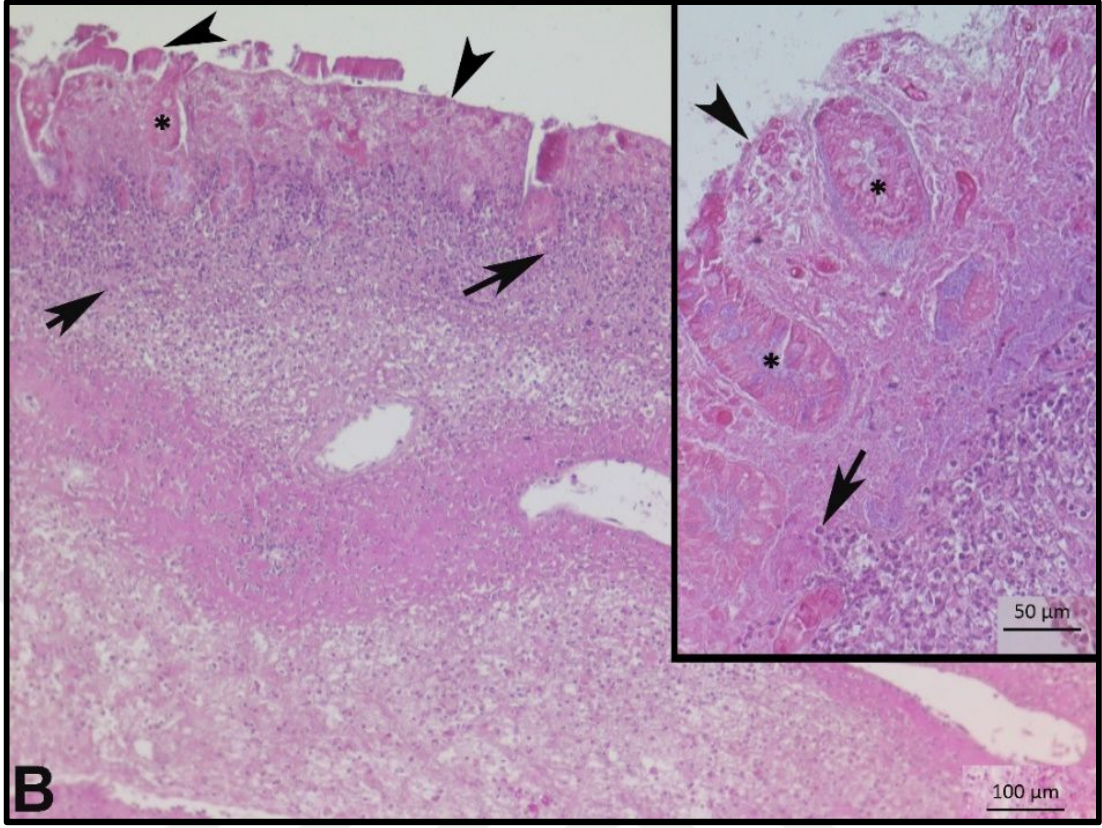
Şekil 17. Deney gruplarının makroskopik hasar skoru. **: $p < 0,01$ kontrol grubuna göre kıyaslanmıştır. +: $p < 0,05$ kolit grubuna göre kıyaslanmıştır.

4.3.2. Histolojik değerlendirme ve mikroskopik hasar skoru

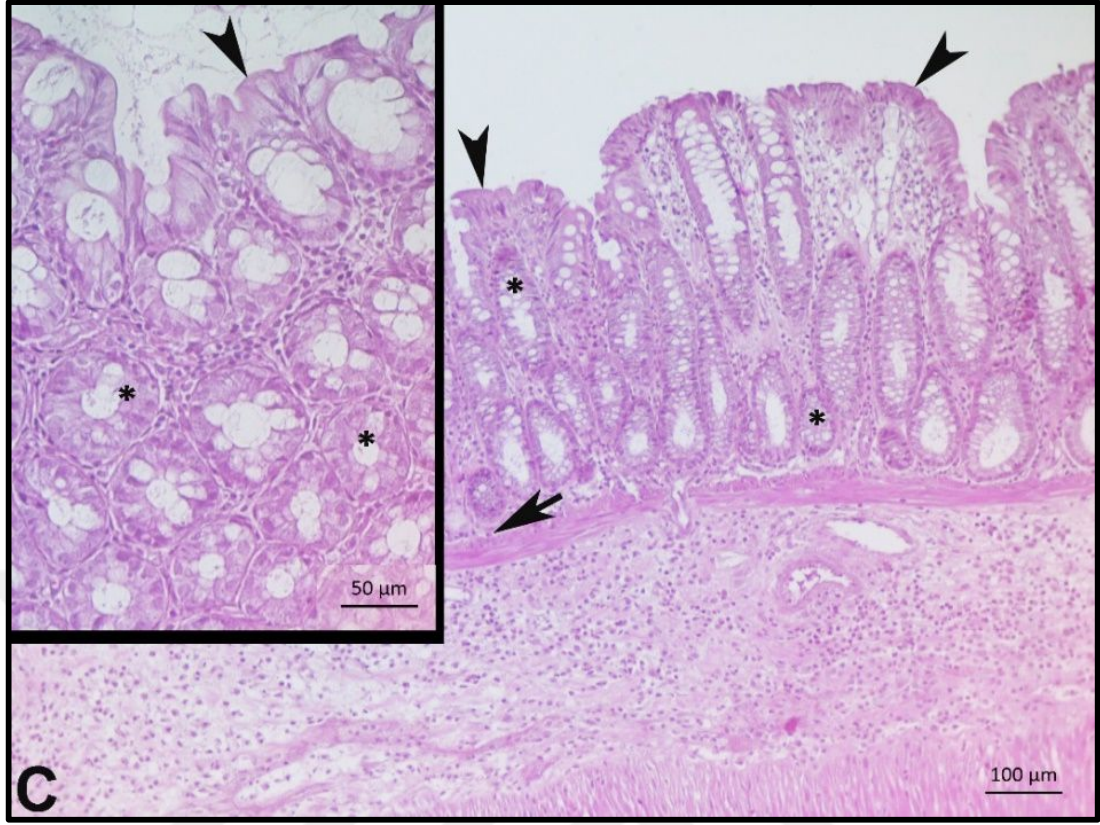
Kolon dokusu örneklerinde, kontrol grubunda (Resim 4) normal morfoloji gözlenirken; kolit grubunda (Resim 5) kolon epitelinde yer yer açılma ve dökülme, salgı bezi yapısında dejenerasyon ve mukozada nötrofil infiltrasyonu gözlenmiştir. DHA grubunda (Resim 6) ise hafif düzeyde yüzey epitelinde dökülme, bez morfolojisinde iyileşme ve az sayıda nötrofil infiltrasyonu gözlenmiştir.



Resim 4. Kontrol grubuna ait kolon doku kesiti. (Parafin kesit, H&E boyaması)

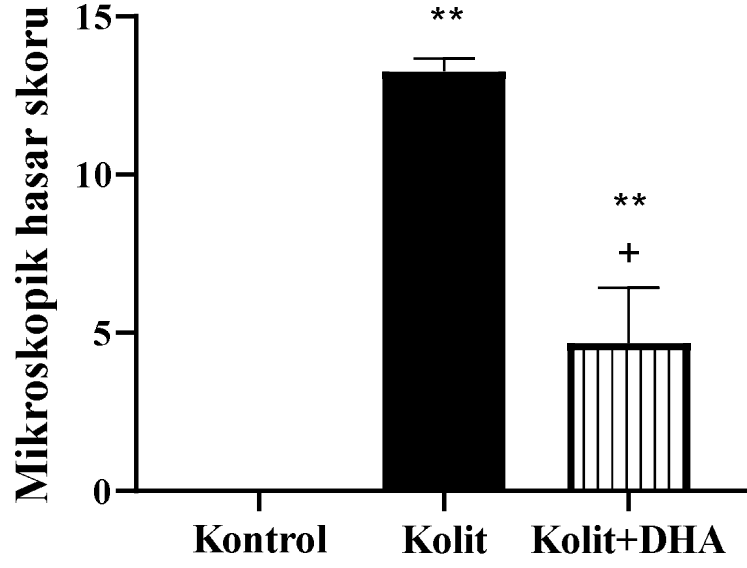


Resim 5. Kolit grubuna ait kolon doku kesiti, epitelde dökülme (ok başı), bez yapısında dejenerasyon (yıldız), nütrofil infiltrasyonu (ok). (Parafin kesit, H&E boyaması).



Resim 6. DHA grubuna ait kolon doku kesiti, düzenli yapıda epitel (ok başı), bez morfolojisinde iyileşme (yıldız), nötrofil infiltrasyonu (ok). (Parafin kesit, H&E boyaması).

Gruplar arasında mikroskopik hasar skorları arasındaki fark tek yönlü gruplar arası varyans analiziyle karşılaştırılmıştır. Testin sonucu 0,05 alfa düzeyine göre anlamlı bulunmuştur ($F = 217,78$, $p = 0,00$). Gruplar arasındaki farkı belirlemek için analiz sonrası Games-Howell testi kullanılmıştır. Kolit ($ort = 13,25$, $SS = 0,42$) ve DHA gruplarının mikroskopik hasar skorlarının ($ort = 4,66$, $SS = 1,75$) kontrol grubunun hasar skorundan anlamlı olarak yüksek olduğu ($p < 0,01$) ve DHA grubunun hasar skorunun kolit grubundan anlamlı olarak düşük olduğu belirlenmiştir ($p < 0,01$) (Tablo 6 ve Şekil 18).



Şekil 18. Deney gruplarının mikroskopik hasar skoru. **: $p < 0,01$ kontrol grubuna göre kıyaslanmıştır. +: $p < 0,05$ kolit grubuna göre kıyaslanmıştır.

Tablo 6. Deney gruplarının kolon dokusunun makroskopik ve mikroskopik hasar skorları

Gruplar	Makroskopik hasar skoru (X ± SS)	Mikroskopik hasar skoru (X ± SS)
Kontrol (n = 8)	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
Kolit (n = 10)	8,25 ± 1,39**	13,25 ± 0,42**
Kolit+DHA (n = 10)	6,40 ± 1,07**#	4,66 ± 1,75**#

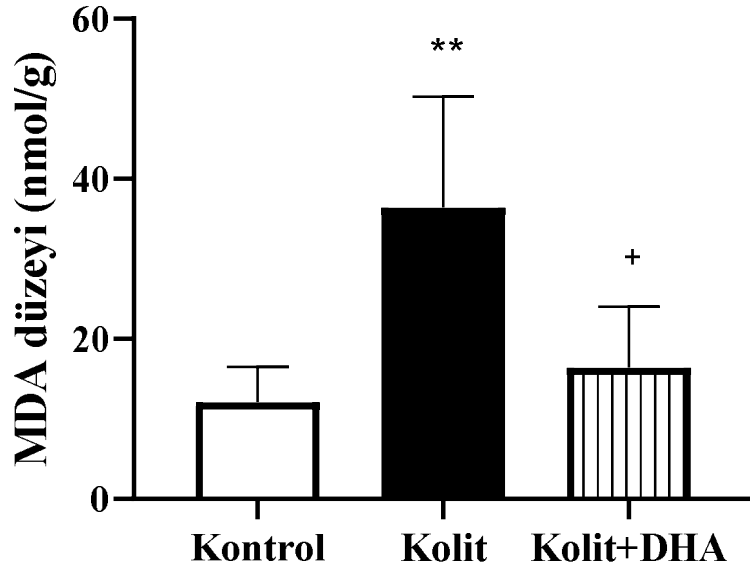
** : $p \leq 0,01$ kontrol grubuna göre kıyaslanmıştır.

: $p \leq 0,05$ kolit grubuna göre kıyaslanmıştır.

4.4. Oksidasyon ve Antioksidan Etkiler

4.4.1. MDA düzeyi

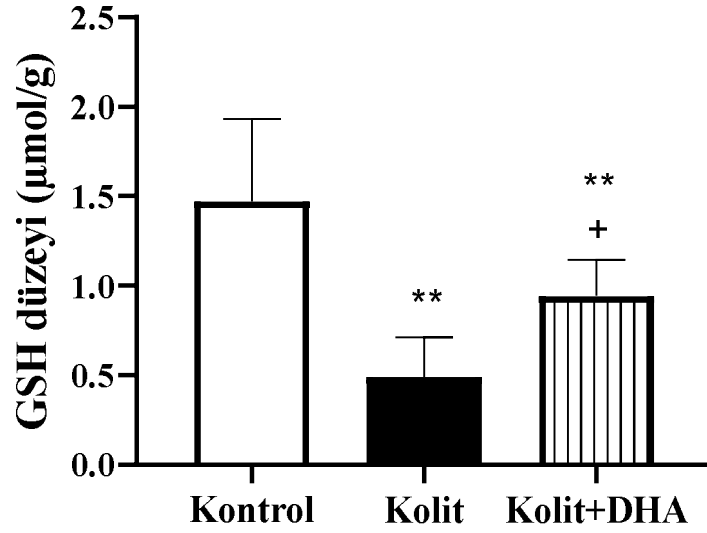
Oksidan hasarın bir göstergesi olan MDA seviyelerinin grupları arasındaki farkı tek yönlü gruplar arası varyans analiziyle karşılaştırılmıştır. Testin sonucu 0,05 alfa düzeyine göre anlamlı bulunmuştur ($F = 17,79$, $p = 0,00$). Gruplar arasındaki farkı belirlemek için analiz sonrası Tukey testi kullanılmıştır. Kolit grubunun MDA düzeyinin ($ort = 32,05$, $S = 7,14$) kontrol grubunun ($ort = 12,05$, $S = 4,42$) göre anlamlı olarak düşük olduğu ($p < 0,01$); DHA grubunun da MDA düzeyinin ($ort = 16,37$, $S = 7,70$) kolit grubundan anlamlı olarak düşük olduğu belirlenmiştir ($p < 0,01$) (Tablo 5 ve Şekil 19).



Şekil 19. Deney gruplarının MDA düzeyleri. **: $p < 0,01$ kontrol grubuna göre kıyaslanmıştır. +: $p < 0,05$ kolit grubuna göre kıyaslanmıştır.

4.4.2. GSH düzeyi

Dokudaki endojen antioksidan glutatyon miktarının göstergesi olan GSH düzeyinin deney grupları arasındaki farkı bağımsız gruplar için t testi ile karşılaştırılmıştır. Testin sonucunda 0,05 alfa düzeyine göre kolit grubunun GSH düzeyinin ($ort = 0,49, S = 0,22$) kontrol grubundan ($ort = 1,47, SS = 0,46$) anlamlı olarak düşük olduğu ($t = 4,74, p < 0,05$) ve DHA grubunun GSH düzeyinin ($ort = 0,66, S = 0,27$) kolit grubundan anlamlı olarak yüksek olduğu belirlenmiştir ($t = 3,69, p < 0,05$) (Tablo 7 ve Şekil 20).



Şekil 20. Deney gruplarının GSH düzeyleri. **: $p < 0,01$ kontrol grubuna göre kıyaslanmıştır. +: $p < 0,05$ kolit grubuna göre kıyaslanmıştır.

Tablo 7. Deney gruplarının biyokimyasal analiz sonuçları (MDA: nmol/g ve GSH: $\mu\text{mol/g}$) (ortalama \pm standart sapma)

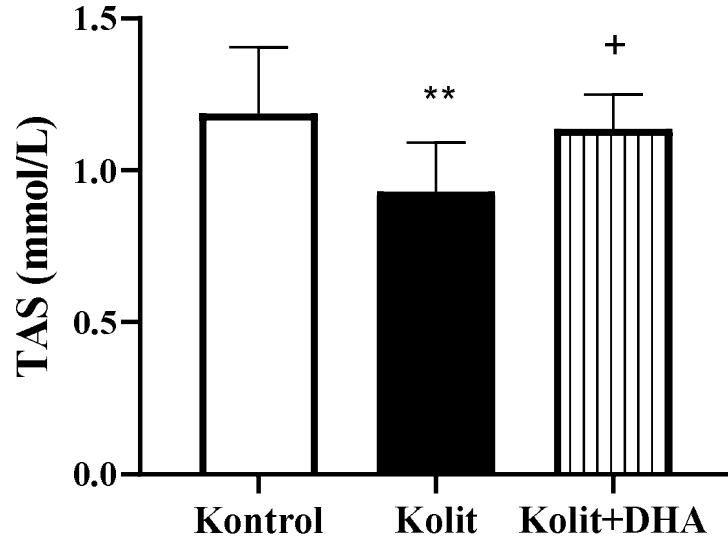
Gruplar	MDA	GSH
Kontrol ($n = 8$)	12,05 \pm 4,42	1,47 \pm 0,46
Kolit ($n = 10$)	32,05 \pm 7,14**	0,49 \pm 0,22**
Kolit+DHA ($n = 10$)	16,37 \pm 7,70 [#]	0,66 \pm 0,27** [#]

** : $p \leq 0,01$ kontrol grubuna göre kıyaslanmıştır.

[#] : $p \leq 0,05$ kolit grubuna göre kıyaslanmıştır.

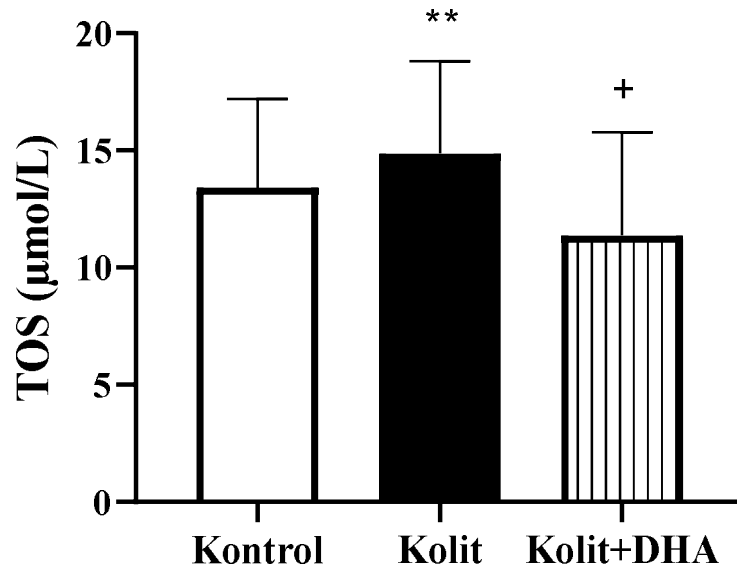
4.4.3. TAS, TOS ve OSİ düzeyleri

Gruplar arasındaki TAS düzeyi farkı bağımsız gruplar için t testi ile karşılaştırılmıştır. Testin sonucunda 0,05 alfa düzeyine göre kolit grubunun TAS düzeyinin ($X = 0,93$, $S = 0,16$) kontrol grubundan ($ort = 1,25$, $S = 0,16$) anlamlı olarak düşük olduğu ($t = 3,6$, $p < 0,05$) ve DHA grubunun TAS düzeyinin ($ort = 1,13$, $S = 0,12$) kolit grubunun TAS düzeyinden anlamlı olarak yüksek olduğu belirlenmiştir ($t = 2,75$, $p < 0,05$) (Tablo 8 ve Şekil 21).



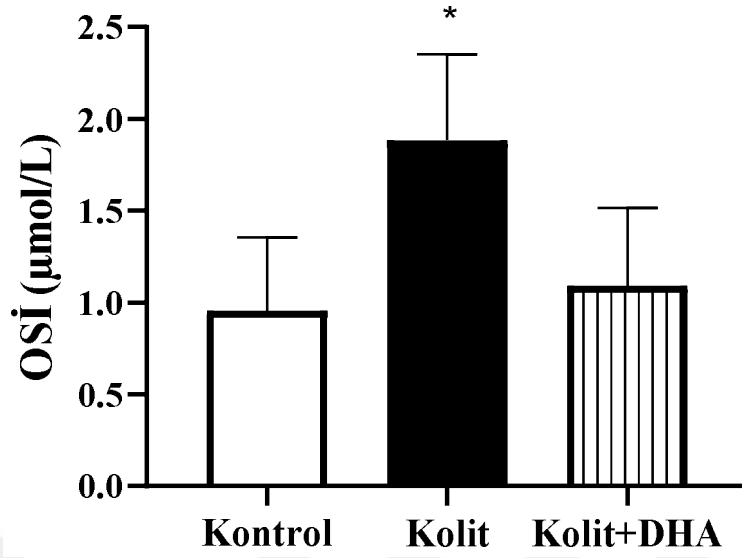
Şekil 21. Deney gruplarının TAS düzeyleri. **: $p < 0,01$ kontrol grubuna göre kıyaslanmıştır. +: $p < 0,05$ kolit grubuna göre kıyaslanmıştır.

Gruplar arasındaki TOS düzeyi farkı bağımsız gruplar için t testi ile karşılaştırılmıştır. Testin sonucunda 0,05 alfa düzeyine göre kolit grubunun TOS düzeyinin ($ort = 16,03$, $S = 2,43$) kontrol grubundan ($ort = 11,51$, $S = 3,48$) anlamlı olarak yüksek olduğu ($t = 2,67$, $p < 0,05$) ve DHA grubunun TOS düzeyinin ($ort = 11,38$, $S = 4,00$) kolit grubundan anlamlı olarak düşük olduğu belirlenmiştir ($t = 2,37$, $p < 0,05$) (Grafik 8 ve Tablo 8).



Şekil 22. Deney gruplarının TOS düzeyleri. **: $p < 0,01$ kontrol grubuna göre kıyaslanmıştır. +: $p < 0,05$ kolit grubuna göre kıyaslanmıştır.

Gruplar arasındaki OSİ düzeyi farkı bağımsız gruplar için t testi ile karşılaştırılmıştır. Testin sonucunda 0,05 alfa düzeyine göre kolit grubunun OSİ düzeyinin ($X = 1,88$, $S = 0,47$) kontrol grubundan ($ort = 0,96$, $S = 0,40$) anlamlı olarak yüksek olduğu ($t = 3,21$, $p < 0,05$) belirlenmiştir. DHA grubunun OSİ düzeyinin ise ($ort = 1,09$, $S = 0,43$) kolit grubundan hafifçe düşük olmakla beraber aradaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlenmiştir ($t = 2,31$, $p > 0,05$) (Tablo 8 ve Şekil 23).



Şekil 23. Deney gruplarının OSI düzeyleri. *: $p < 0,05$ kontrol grubuna göre kıyaslanmıştır.

Tablo 8. Deney gruplarının total antioksidan kapasite (TAS) ve total oksidan kapasite (TOS) düzeyleri (TAS: mmol/L; TOS: µmol/L; OSI: µmol/L) (ortalama ± standart sapma)

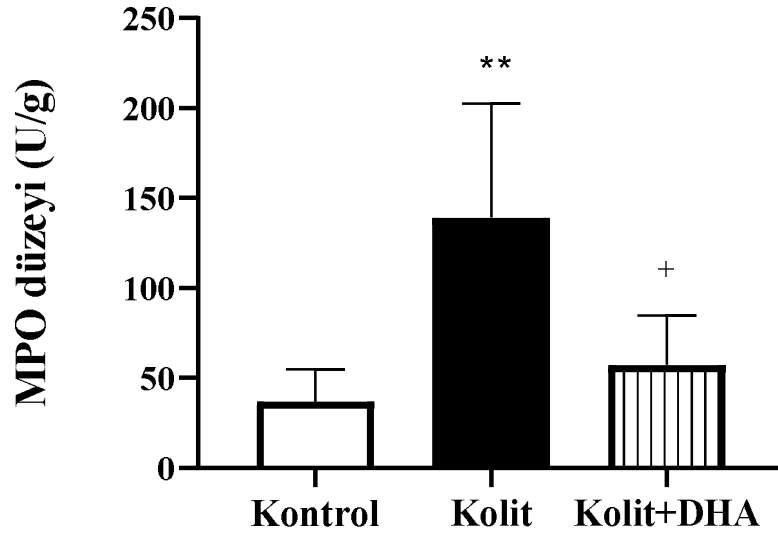
Gruplar	TAS	TOS	OSİ
Kontrol (n=8)	1,13±0,12	11,51±3,48	0,86±0,51
Kolit (n=10)	0,97±0,19**	15,47±2,75**	1,64±0,53*
Kolit+DHA (n=10)	1,23±0,28 [#]	12,66±4,21 [#]	1,41±1,17

*: $p \leq 0,05$ kontrol grubuna göre kıyaslanmıştır. **: $p \leq 0,01$ kontrol grubuna göre kıyaslanmıştır. #: $p \leq 0,05$ kolit grubuna göre kıyaslanmıştır.

4.5. İnflamatuvar ve Antiinflamatuvar Etkiler

4.5.1. MPO düzeyi

Kolitin kolonda oluşturduğu nötrofil infiltrasyonun bir göstergesi olan MPO düzeyinin deney grupları arasındaki farkı tek yönlü gruplar arası varyans analiziyle karşılaştırılmıştır. Testin sonucu 0,05 alfa düzeyine göre anlamlı bulunmuştur ($F = 13,68$, $p = 0,00$). Gruplar arasındaki farkı belirlemek için analiz sonrası Tukey testi kullanılmıştır. Kolit grubunun MPO düzeyinin ($ort = 139,03$, $S = 63,63$) Kontrol grubuna ($ort = 36,78$, $S = 18,12$) göre anlamlı olarak düşük olduğu ($p < 0,01$); DHA ($ort = 57,08$, $S = 27,67$) grubunun da MPO düzeyinin kolit grubuna göre anlamlı olarak düşük olduğu belirlenmiştir ($p < 0,05$) (Tablo 9 ve Şekil 24).



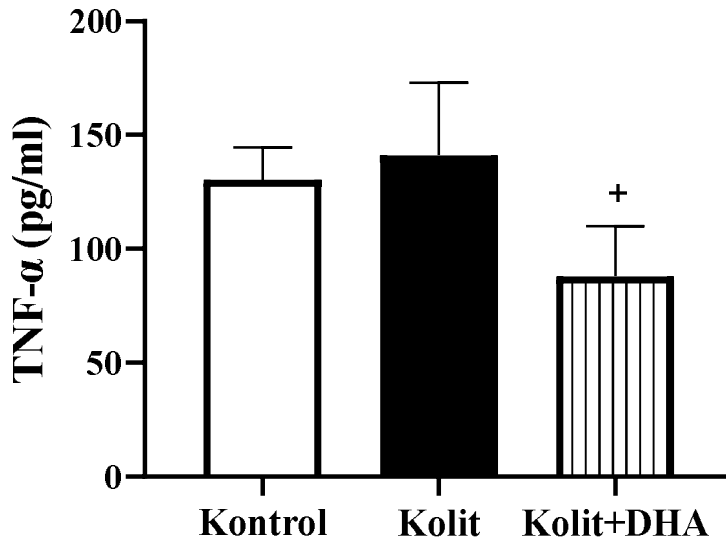
Şekil 24. Deney gruplarının MPO düzeyleri. +: $p < 0,05$ kolit grubuna göre kıyaslanmıştır. **: $p < 0,01$ kontrol grubuna göre kıyaslanmıştır.

4.5.2. NF-kB düzeyi

İnflamatuvar ve immün cevapta önemli etkiler gösteren bir transkripsiyon faktörü olan NF-kB düzeyi farkı tek yönlü gruplar arası varyans analiziyle karşılaştırılmıştır. Testin sonucu 0,05 alfa düzeyine göre anlamlı olmadığı bulunmuştur ($F = 4,36, p > 0,05$) (Tablo 9).

4.5.3. TNF- α düzeyi

Proinflamatuvar sitokin olan TNF- α düzeyi farkı tek yönlü gruplar arası varyans analiziyle karşılaştırılmıştır. Testin sonucu 0,05 alfa düzeyine göre anlamlı olduğu bulunmuştur ($F = 6,84, p < 0,01$) (Tablo 8). Gruplar arasındaki farkı belirlemek için analiz sonrası Tukey testi gerçekleştirilmiştir. Kolit ($X = 141,10, S = 31,91$) grubunun TNF- α düzeyinin DHA grubundan ($X = 93,48, S = 26,67$) anlamlı olarak yüksek olduğu belirlenmiştir. ($p < 0,05$). Diğer gruplar arasında anlamlı bir fark görülmemiştir ($p > 0,05$) (Tablo 9 ve Şekil 25).



Şekil 25. Deney gruplarının TNF- α düzeyleri. +: $p < 0,05$ kolit grubuna göre kıyaslanmıştır.

Tablo 9. Deney gruplarının sitokin düzeyleri (MPO: U/g; NF-kB: ng/ml, TNF- α pg/ml) (ortalama \pm standart sapma)

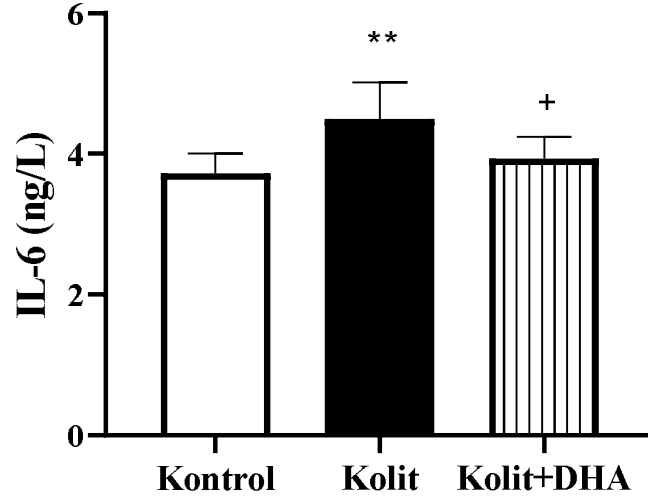
Gruplar	MPO	NF-kB	TNF- α
Kontrol ($n = 8$)	36,78 \pm 18,12	1,8 \pm 0,44	130,23 \pm 14,36
Kolit ($n = 10$)	139,03 \pm 63,63**	2,18 \pm 0,36	141,10 \pm 31,91
Kolit+DHA ($n = 10$)	57,08 \pm 27,67#	1,88 \pm 0,04	93,48 \pm 26,67#

** $: p \leq 0,01$ kontrol grubuna göre kıyaslanmıştır.

$: p \leq 0,05$ kolit grubuna göre kıyaslanmıştır.

4.5.4. IL-6 düzeyi

Proinflamatuvar bir sitokin olan IL-6 düzeyinin deney grupları arasındaki farkı tek yönlü gruplar arası varyans analiziyle karşılaştırılmıştır. Testin sonucunda 0,05 alfa düzeyine göre kolit grubunun IL-6 düzeyinin ($ort = 4,49, S = 0,53$) kontrol grubundan ($ort = 3,73, S = 0,28$) anlamlı olarak yüksek olduğu ($ort = 5,74, p < 0,05$); DHA grubunun IL-6 düzeyinin ($ort = 3,87, S = 0,30$) kolit grubundan anlamlı olarak düşük olduğu belirlenmiştir ($p < 0,05$) (Tablo 10 ve Şekil 26).



Şekil 26. Deney gruplarının IL-6 düzeyleri. **: $p < 0,01$: kontrol grubuna göre kıyaslanmıştır. +: $p < 0,05$ kolit grubuna göre kıyaslanmıştır.

4.5.5. IL-10 düzeyi

Deney grupları arasındaki IL-10 düzeyi farkı tek yönlü gruplar arası varyans analiziyle karşılaştırılmıştır. Testin sonucu 0,05 alfa düzeyine göre anlamlı olmadığı bulunmuştur ($F = 0,64, p > 0,05$) (Tablo 10).

Tablo 10. Deney gruplarının sitokin düzeyleri (IL-6: ng/L; IL-10: ng/L) (ortalama ± standart sapma)

Gruplar	IL-6	IL-10
Kontrol ($n = 8$)	3,73±0,28	76,82±7,84
Kolit ($n = 10$)	4,49±0,53**	71,38±16,53
DHA ($n = 10$)	3,87±0,30#	70,61±2,8

** $: p \leq 0,01$ kontrol grubuna göre kıyaslanmıştır. # $: p \leq 0,05$ kolit grubuna göre kıyaslanmıştır.

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

İBH, gastrointestinal kanalın kronik ya da tekrarlayan immün yanıtı ile ilgili hastalıklarını tanımlamaktadır. İnflamatuvar sitokinlerin ve reaktif oksijen moleküllerinin üretimi ve salınımdaki artış ile karakterize bir hastalıktır. Etiyolojisi tam olarak bilinmemekte ancak patogenezinden nötrofil infiltrasyonu, sitokin, araşidonik asit ve reaktif oksijen metabolitleri, pro-inflamatuvar mediatörlerin aşırı üretimi gibi pek çok faktörün sorumlu olduğu düşünülmektedir. Özellikle de serbest radikal üretimindeki artışa karşın doku antioksidan düzeylerinin azalması patogenezden sorumlu en önemli faktör olarak görülmektedir (103).

Linoloik asit (LA) ve α -linolenik asit (ALA) vücutta sentezlenemeyen esansiyel yağ asitleridir. Bu esansiyel yağ asitlerinin vücutta enzimatik dönüşüme uğramasıyla AA, EPA ve DHA molekülleri oluşur. EPA ve DHA molekülleri doğrudan balık yağı ile de vücuda alınabilir. Bu moleküller membran fosfolipit yapısına yerleşerek inflamatuvar süreçte etkiler gösterir. AA ve EPA moleküllerin hem inflamatuvar hem de antiinflamatuvar etkilerinin olduğu, DHA molekülünün ise güçlü antiinflamatuvar etkiler gösterdiği bilinmektedir (104).

Çalışmamızda, DHA'nın kolit modeli üzerindeki inflamasyona ve oksidatif strese olan olası etkileri farklı parametreler açısından araştırılmış ve değerlendirilmiştir. Değerlendirmede öncelikle sıçanların gruplar arasındaki vücut ağırlık kayıpları, kolonun doku ağırlık indeksleri, kolon dokularının makroskopik ve mikroskopik hasar skorları ölçülmüştür. Deneysel kolit modeli oluşturulan gruplarda sulu diyare ve buna bağlı olarak ağırlık kaybı görülmüştür. Kolit modeli oluşturulmadan önce ve oluşturulduktan üç gün sonrasında oluşan ağırlık farkları değerlendirildiğinde kolit oluşturulan gruptaki ağırlık kaybının, kontrol grubu ile kıyaslandığında istatistiksel açıdan anlamlı düzeyde bir ağırlık kaybı olduğu; DHA grubu ile kolit grubu arasındaki ağırlık farkının ise birbirine yakın olduğu görülmüştür.

İBH, kronik inflamasyon artmış histolojik hasar skoru, nötrofil infiltrasyonu, kript hücre kaybı, artmış proinflamatuvar mediatörler ile karakterizedir (105). Çalışmada deneysel kolit oluşturulan sıçanların makroskopik ve mikroskopik hasar skorunun kontrol grubuna göre anlamlı olarak yükseldiği görülmüştür. DHA uygulamasının ise hasar skorunu kolit oluşturulan gruba göre makroskopik ve mikroskopik düzeyde anlamlı olarak düşürdüğü görülmüştür. Ayrıca DHA uygulamasının yüzey epitelindeki dökülmeyi azalttığı, bez morfolojisinde iyileşme sağladığı da gözlenmiştir.

İnflamatuvar bağırsak hastalıklarında oksidatif stresin arttığı bilinmekle birlikte aralarındaki ilişkinin mekanizması henüz tam olarak aydınlatılamamıştır. Literatürde inflamasyonun olduğu dokularda ROS'ların artmış olduğu birçok çalışmada gösterilmiştir. Bu artıştan kolonik epitelium, mikrovasküler endotelium veya inflamatuvar hücreler gibi (özellikle nötrofiller) pek çok faktör sorumlu tutulmaktadır (106, 107). Diğer yandan inflamatuvar yanıtın oluşmasında süperoksit radikali ve hidrojen peroksit gibi ROS'ların üretimindeki artış etkili olmaktadır. Kruidenier ve ark yaptıkları bir çalışmada İBH'da oluşan mukozal doku hasarından ROS moleküllerine maruz kalmanın sorumlu olduğunu savunmuşlardır (108). Başka bir çalışmada ise TNBS ile indüklenen kolit modelinde süperoksit dismutaz tedavisinin, iyileştirici etkisinin olabileceği öne sürülmüştür (109).

MDA, vücutta PUFA'ların serbest radikaller tarafından oksidasyona uğraması sonucu oluşmaktadır (110). MDA düzeyi, serbest radikallerin hücre membranında oluşturduğu lipid peroksidasyonunun göstergesi olarak kullanılır (111). Çalışmamızda, TNBS uygulamasının kolit ve DHA gruplarında kontrol grubuna göre MDA düzeyini istatistiksel olarak anlamlı şekilde yükselttiği; DHA uygulanmasının ise kolon dokusundaki MDA düzeyini anlamlı şekilde düşürdüğü görülmüştür (Tablo 3). Bu sonuç, DHA'nın, ROS'un mukozada oluşturduğu oksidatif hasarı azaltılmasıyla ilişkili olabileceğini düşündürmektedir.

Glutasyon oksidatif strese karşı hücreyi koruyan hücre içerisindeki en önemli antioksidan moleküllerden biridir. Hücrelerin sitoplazma, çekirdek ve mitokondrilerinde bulunur. GSH düzeyleri inflamasyon süresince düşüş gösterir (112). Kimyasal olarak GSH eksikliği oluşturulan farelerde kolonik mukozada şiddetli bozulma olduğu, diyare gelişimi ve kilo kaybının olduğu gösterilmiştir (113). Glutasyon düzeyleri hem inflamasyon şiddetinin hem de oksidatif stres düzeyinin göstergesi olarak değerlendirilir (114).

Çalışmamızda deneysel kolit modeli oluşturulan sıçanların kolon dokusunda GSH düzeylerinin istatistiksel olarak anlamlı seviyede düştüğü, DHA uygulanan grupta ise kolit grubuna göre anlamlı olarak yüksek olduğu görülmüştür (Tablo 6). Yapılan bir çalışmada indometazinden iki saat önce bir seferde verilen 100 mg/kg/gün verilen DHA'nın sıçanlarda indometazin ile oluşturulan gastrik hasarı iyileştirdiği, MPO ve MDA ve TNF- α düzeylerini azalttığı ve endojen antioksidan olan GSH düzeyini koruduğunu göstermiştir (115). Bir başka çalışmada 14 gün boyunca gavaj yoluyla 500 mg/kg/gün verilen DHA'nın, farelerde paraquat ile oluşturulan akciğer hasarını iyileştirdiği, MPO aktivitesini ve MDA düzeyini düşürdüğü, GSH düzeyini koruduğu belirlenmiştir. DHA'nın oksidatif stresi azaltıcı ve serbest radikallere karşı koruyucu etkisi literatürde farklı çalışmalarda da gösterilmiştir.

Literatürde deneysel kolit modelinde TAS ve TOS seviyelerinin ölçüldüğü bir çalışma bulunmamaktadır. Ancak bu bağlamda elde ettiğimiz veriler, çalışmamızın oksidatif stres ile ilişkili diğer verileri ile örtüşmektedir. TAS ve TOS düzeyleri değerlendirildiğinde kolit grubunun TOS düzeyinin kontrol grubuna kıyasla anlamlı olarak yüksek olduğu; TAS düzeyinin ise anlamlı olarak düşük olduğu görülmüştür. DHA uygulanan grupta TAS seviyelerinin kolit oluşturulan grupla kıyaslandığında anlamlı olarak yükseldiği, TOS seviyelerinde ise anlamlı bir düşüş olduğu görülmüştür. Oksidatif stres indeksinde ise kolit ve DHA grupları arasında anlamlı bir fark görülmemiştir.

İBH'nin patogeneğinde nötrofiller ve makrofajlar gibi inflamatuvar hücrelerin önemli etkilerinin olduğuna işaret eden pek çok çalışma bulunmaktadır (116). Miyeloperoksidaz enzimi nötrofillerde sentezlenen kuvvetli antibakteriyel ve antiviral etkiler gösteren bir peroksidaz enzimidir. Deneysel kolit modelinde ise akut inflamasyonun ve oksidatif stresin göstergesidir (117). Yapılan bir çalışmada, ÜK hastalarının mukozasında MPO düzeylerinin yükseldiğini; bunun da maligniteye yol açtığı gösterilmiştir (118). Ayrıca ROS üretimindeki artıştan sorumlu en önemli faktörün de nötrofil infiltrasyonu olduğu iddia edilmiştir (119, 120).

Çalışmamızda kolit oluşturulan grubun kolon dokusunda kontrol grubuna kıyasla, MPO enzim aktivitesinin anlamlı olarak yükseldiği; DHA uygulamasının ise MPO enzim aktivitesini kontrol grubu düzeylerine kadar düşürdüğü görülmüştür (Tablo 3). MPO artışının ülseratif kolitte akut inflamasyon ve oksidatif stresin göstergesi olduğu ve nötrofiller tarafından salgılanan bir enzim olduğu düşünüldüğünde, DHA MPO'yu azaltıcı etkisini nötrofil infiltrasyonunu azaltarak gerçekleştiriyor olabilir. Nitekim literatürde inflamasyon ile ilişkili farklı hastalık modelleri ile yapılan çalışmalarda DHA uygulamasının nötrofil infiltrasyonunu azalttığı gösterilmiştir (121, 122).

İnflamasyon NF-kB, TNF- α , IL-6 gibi çok çeşitli sitokinlerin dolaşımında ya da dokuda artmış oldukları durumu ifade eder. İnflamasyonun başlangıç aşamalarında aktive olan NF-kB transkripsiyonu; erken immün yanıtta, akut fazda ve inflamatuvar yanıtta etkili olan pek çok hücrel gen transkripsiyonunu regüle etmektedir. Aktive olmuş NF-kB düzeyi mukozal inflamasyonun şiddeti ile korelasyon göstermektedir. Ayrıca NF-kB'nin aktivasyonu, hücrel dinlenme potansiyeline ve intrasellüler indirgenmiş GSH/okside GSH düzeyine bağlıdır (103).

Çalışmada deneysel kolit modeli oluşturulan gruptaki sıçanların NF-kB seviyelerinin kontrol grubu ile kıyaslandığında anlamlı olarak artmış olduğu, DHA uygulanan grupta ise kolit oluşturulan grupla kıyaslandığında NF-kB düzeylerinin düştüğü ancak bu düşüşün, istatistiksel açıdan anlamlı olmadığı görüldü (Tablo 3).

Çalışmamızda DHA'nın bir pro-inflamatuvar sitokin olan TNF- α seviyelerine olan etkisine baktığımızda, deneysel kolit modeli oluşturulan grupta kontrol grubu ile kıyaslandığında TNF- α düzeyinde bir artış olduğu ancak bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlendi. DHA uygulamasının ise kolit grubuna göre TNF- α düzeyini anlamlı şekilde düşürdüğü görüldü ($p < 0,05$; Tablo 3). Günümüzde de, İnfliximab gibi proinflamatuvar sitokin inhibitörleri, TNF inhibitörleri İBH hastalıklarının tedavisinde kullanılmaktadır (123).

İnflamasyon göstergesi açısından incelediğimiz diğer bir sitokin olan IL-6, CD4 T hücrelerinin farklılaşmasını sağlayarak doğal ve edinsel immün yanıt arasında iletişim sağlayan; bu sayede inflamasyonun oluşmasında oldukça önemli rol oynayan bir sitokindir. Daha önce yapılmış birkaç çalışmada IL10^{-/-} farelerde kendiliğinden kolit oluşurken, IL-6'nın düzeylerinin de yükseldiği belirlenmiştir (124, 125, 126). Bizim çalışmamızda da literatürle uyumlu olarak kolit oluşturulan grupta kontrol grubuna kıyasla IL-6 düzeyi anlamlı olarak yükselmiştir (Tablo 3). DHA uygulamasının ise kolit grubu ile kıyaslandığında, IL-6 düzeyini anlamlı olarak düşürdüğünü gözlenmiştir.

IL-10 mukozal immün sistem için önemli bir düzenleyici sitokindir. IL-10 knock-out veya IL-10 reseptör 2 knock-out farelerde yapılan çalışmalarda, yardımcı T hücreleri (Th)-1 aracılı intestinal inflamasyon geliştiği gösterilmiştir (127, 128). IL-10, Th hücrelerin aktivitesini artırarak, TNF- α , IL-1 β , IL-6 ve IL-8 gibi proinflamatuvar sitokin ve kemokin üretimini baskılayarak antiinflamatuvar etkiler gösterir (129). Nitekim TNBS kolit modelinde IL-10 kodlayan adenoviral vektörün verildiği bir çalışmada, IL-10 tedavisinin ağırlık kaybını önlediği, dışkıdaki bazı

inflamatuvar parametreleri (IL-1 β ve TNFR-2) düşürdüğü, kolondaki histolojik skoru düşürdüğü görülmüştür (130). Çalışmamızda beklenenin aksine; kolit, DHA ve kontrol grupları arasında IL-10 düzeyinde anlamlı bir fark oluşmadı.

DHA'nın antiinflamatuvar etkileri olan bir molekül olduğu literatürdeki farklı çalışmalarla gösterilmiştir. DHA bu etkilerini adhezyon molekül ekspresyonunu azaltmak, lipid mediyatörlerin üretimini artırmak, lipid peroksidasyonunu ve oksidatif stresi azaltmak, nötrofil infiltrasyonunu baskılamak gibi çeşitli yollardan göstermektedir. DHA'nın aynı zamanda NF-kB yolağını da inhibe ettiği gösterilmiştir (79). Bilindiği gibi yağ asitleri hücre membran fosfolipitlerinin ana bileşenidir. DHA hücre membranının fosfolipit yapısına yerleşerek membranın dayanıklılığını artırmakta, hücrenin serbest radikallere, lipid peroksidasyonuna ve artan oksidatif strese karşı olan hassasiyetini azaltmaktadır. Bu şekilde hücrenin yapısal bütünlüğünün dış şartlara rağmen korunmasında önemli rol oynamaktadır.

Çalışmamızda TNBS ile oluşturulan kolit modelinde makroskopik ve mikroskopik hasar skorlarının arttığı; MDA ve TOS düzeylerinin yükseldiği; GSH ve TAS düzeylerinin azaldığı; proinflamatuvar bir sitokin olan IL-6 düzeylerinin yükseldiği görülmüştür. DHA uygulaması ise biyokimyasal parametreleri pozitif yönde düzeltmiş ve doku düzeyinde belirgin bir iyileşme sağlamıştır. Çalışmanın sonucunda DHA'nın bu etkilerini nötrofil infiltrasyonunu engelleyerek, yüksek ihtimalle nötrofil kaynaklı ROS üretimini baskılayarak, GSH içeriğini koruyarak, proinflamatuvar sitokinler olan IL-6 ve TNF- α düzeylerini düşürerek, ayrıca kolon epitelindeki dökülmeyi azaltarak ve salgı bezlerinin yapısında iyileşme sağlayarak gösterdiği düşünülmüştür.

6. KAYNAKLAR

1. Abraham BP, Ahmed T, Ali T. Inflammatory Bowel Disease: Pathophysiology and Current Therapeutic Approaches. *Gastrointestinal Pharmacology*. 2017;115-146.
2. Molodecky NA, Soon IS, Rab DM, Ghali WA, Ferris M, Chernoff G, Benchimol EI, Panaccione R, Subrata G, Berkema HW, Kaplan G. Increasing Incidence and Prevalence of the Inflammatory Bowel Diseases With Time, Based on Systematic Review. *Gastroenterology* 2012; 142(1): 46-54.
3. Kandhare AD, Raygude KS, Ghosh P, Gosavi TP, Bodhankar SL. Patentability of animal models India and the globe. *Int J Pharm Biol Arc* 2011; 4(2):1024-1032.
4. de Faria FM, Luiz-Ferreira A, Socca EAR, de Almeida ACA, Dunder RJ, Manzo LP, Silva MA, Vilegas W, Rozza AL. Effects of *Rhizophora mangle* on experimental colitis induced by TNBS in rats. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2012; (2012).
5. Alzoghaibi MA. Concepts of oxidative stress and antioxidant defense in Crohn's disease. *World journal of gastroenterology: WJG* 2013; 39(19):6540.
6. Rogler G, Andus T. Cytokines in inflammatory bowel disease. *World J Surg* 1998; 22:382-389.
7. León AJ, Garrote JA, Arranz E. Cytokines in the pathogenesis of inflammatory bowel diseases. *Med Clin* 2006; 127(4):145-152.
8. Hashimoto M, Hossain S, Mamun AA, Matzuzaki K, Arai H. Docosahexaenoic acid: one molecule diverse functions. *Critical Reviews in Biotechnology* 2017; 37(5):579-597.
9. Aktan H. *Gastroenteroloji*. Ankara : Makro Yayıncılık, 1988:173-179.
10. Pinchas S, Stenson WF. Enhanced Synthesis of Leukotriene B4 by Colonic Mucosa in Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterology* 1984; 86(3):453-460.
11. Kaser A, Zeissig S, Blumberg RS. Inflammatory Bowel Disease. *Annu Rev Immunol* 2010:573-621.
12. Singh S, Picardo S, Seow CH. Management of Inflammatory Bowel Diseases in Special Populations: Obese, Old or Obstetric. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*; 2019.
13. Shanahan F, Quigley EM. Manipulation of the microbiota for treatment of IBS and IBD-challenges and controversies. *Gastroenterology* 2014; 146 (6):1554-1563
14. Bassaganya-Riera J, Viladomiu M, Pedragosa M, Claudio DS, Carbo A, Shaykhtudinov R, Jobin C, Arthur JC, Corl BA, Vogel H, Storr M, Hontecillas R. Probiotic Bacteria Produce Conjugated Linoleic Acid Locally in the Gut That Targets Macrophage PPAR γ to Suppress Colitis. *Plos One* 2012; 7(2).

15. Conaghan PJ, Mortensen NJ. Inflammatory Bowel Disease: Ulcerative Colitis. In *Coloproctology*; 2017:157-176
16. Kierszenbaum AL. *Histology and Cell Biology: an introduction to pathology*. United States of America: Mosby, 2002:438-439.
17. Corridoni D, Arseneau, KO, Cominelli F. Inflammatory Bowel Disease. *Immunology Letters*; 2014:231-235.
18. Loftus EV, Sandborn WJ. Epidemiology of İnflammatory Bowel Disease. *Gastroenterology Clinics of North America*; 2002:1-20.
19. CDC. National Center for Chronic Disease Prevention and Health Promotion, Centers for Disease Control and Prevention. Centers for Disease Control and Prevention. [Çevrimiçi] 22 March 2018. [Alıntı Tarihi: 20 09 2019.] <https://www.cdc.gov/ibd/what-is-IBD.htm>.
20. Kaplan GG. The global burden of IBD: from 2015 to 2025. *Nature reviews gastroenterology & hepatology* 2015; 12(12):720.
21. Ng SC, Shi HY, Hamidi N, Underwood FE, Tang W, Benchimol EI, Sung JJ. Worldwide incidence and prevalence of inflammatory bowel disease in the 21st century: a systematic review of population-based studies. *Lancet*; 2017:2769-78.
22. Göktürk S, Karaca Ç. İnflamatuar Barsak Hastalıkları Epidemiyolojisi. *Turkiye Klinikleri Gastroenterohepatology*; 2012:11-16.
23. Ökten A. *Gastroenterohepatoloji*. Ankara: Nobel Tıp Kitapevleri, 2001:189-192.
24. Martins NB, Peppercorn AM. Inflammatory bowel disease. *Am J Manag Care* 2004; 10(8):544-52.
25. Maunder RG, Lancee WJ, Hunter JJ, Greenberg GR, Steinhilber A. Hillary Attachment Insecurity Moderates the Relationship Between Disease Activity and Depressive Symptoms in Ulcerative Colitis. *Inflamm Bowel Dis*; 2005:919-926.
26. Sandborn WJ, Feagan BG, Rutgeerts, Hanauer S, Colombel JF, Sands BE, Lukas M, Fedorak RN, Lee S, Bressler B, Fox I, Rosario M, Sankoh S, Xu J, Stephens K, Milch C, Parikh A. Vedolizumab as induction and maintenance therapy for Crohn's disease. *The New England Journal of Medicine* 2013; 369(8):711-721
27. Halliwell B. Oxidative stress, nutrition and health. Experimental strategies for optimization of nutritional antioxidants intake in humans. *Free Radical Research* 1996; 25(1):25:57.
28. Muller F. The nature and mechanism of superoxide production by the electron. *J Am Aging Assoc* 2000; 23(4):227-253.

29. Khosravi MP, Adeleh GG, Farhad S, Najafi M. The effects of oxidative stress on the development of atherosclerosis. *Biological chemistry* 2019; 400(6):711-732.
30. Nakazawa H, Genka C, Fujishima M. Pathological aspects of active oxygens/free radicals. *The Japanese Journal of Physiology* 1996; 46 (1):15-32.
31. Suzuki N, Miller G, Morales J, Shulaev V, Torres MA, Mittler R. Respiratory burst oxidases: the engines of ROS signaling. *Current Opinion in Plant Biology* 2011; 14(6):691–699.
32. Gözükar EM. *Biyokimya* 2. baskı. İstanbul: Nobel Tıp Kitapevi, 2011:561-565.
33. Halliwell B; Gutteridge JMC. *Free Radicals in Biology and Medicine*. 5th Edition. New York: Oxford University Press, 2015:20-22.
34. Miller DM, Garry RB, Aust SD. Transition metals as catalysts of “autoxidation” reactions. 1990, *Free Radical Biology & Medicine* 1990; 8(1):95-108.
35. Cadenas E, Sies H. The lag phase. *Free radical research* 1998; 28 (6):601-609.
36. Kovacic, P, Pozos RS, Somanathan R, Shangari N, O’Brien PJ. Mechanism of Mitochondrial Uncouplers, Inhibitors, and Toxins: Focus on Electron Transfer, Free Radicals, and Structure - Activity Relationships. *Current Medicinal Chemistry* 2005; 12(22):2601-2623.
37. Muller FL, Liu YR, Holly V. Complex III releases superoxide to both sides of inner mitochondrial membrane. *J Biol Chem* 2004; 279(47):49064-49073.
38. Greenwald RA. Oxygen radicals, inflammation, and arthritis: pathophysiological considerations and implications for treatment. *Seminars in Arthritis and Rheumatism* 1991; 20(4):219-240.
39. Akkuş İ. Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri. Konya: Mimoza Yayınları, 1995:1-132.
40. Erden M. Serbest Radikaller. *Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri Dergisi* 1992; 12(3):201-207.
41. Elstner EF. Oxygen radicals—biochemical basis for their efficacy. *Klinische Wochenschrift* 1991; 69(21-23):949-956.
42. Foote CS, Valentine JS, Greenberg A. JF Liebman. *Active oxygen in chemistry* 2nd ed. New York: Springer Science & Business Media, 2012.
43. Halliwell B. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant physiology*; 2006; 141(2):312-322.
44. Halliwell B, Gutteridge JMC. Antioxidants of Human Extracellular Fluids. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 1990; 280(1):1-8.
45. Kavas GÖ. Serbest Radikaller ve Organizma üzerine Etkileri. *Türkiye Klinikleri* 1989; 9(1):1-8.

46. Karabulut, H, Gülay MŞ. Antioksidanlar. Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Vet Fak Dergisi 2016; 1(1):65-76
47. Jahanban-Esfahlana A, Panahi-Azar V, Sajedi S. Interaction of glutathione with bovine serum albumin: Spectroscopy and molecular docking. Food Chemistry 2006; 202:426-431.
48. Adeoye O, Olawumi J, Opeyemi A, Christiania O. Review on the role of glutathione on oxidative stress and infertility. JBRA assisted reproduction 2018; 22(1):61-66
49. Mullineaux P, Creissen GP. Glutathione reductase: regulation and role of glutathione reductase: regulation and role in oxidative stress. Oxidative stress and the molecular biology of antioxidant defenses. NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1997:667–713
50. Townsend DM, Tew KD, Tapiero H. The importance of glutathione in human disease. 2003, Biomedicine and Pharmacotherapy 2003; 57 (3-4):145-155.
51. Luberda Z. The role of glutathione in mammalian gametes. Reprod Biol 2005; 5(1):5-17.
52. Townsend DM, Tew KD, Tapiero H. Importance of glutathione in human disease. Biomedicine & Pharmacotherapy 2003; 57(3-4):145-155.
53. Lubos E, Loscalzo J, Handy DE. Glutathione peroxidase-1 in health and disease: from molecular mechanisms to therapeutic opportunities. Antioxidants & redox signaling 2011; 15(7):1957-1997.
54. Battin EE, Brumaghim LJ. Antioxidant activity of sulfur and selenium: a review of reactive oxygen species scavenging, glutathione peroxidase, and metal-binding antioxidant mechanisms. Cell biochemistry and biophysics 2009; 55(1):1-23.
55. Limón-Pacheco J, Gonsbatt ME. Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis. Mutation Research 2009; 45:137-147.
56. LeBlanc JG, Carmen SD; Miyoshi A, et al. Use of superoxide dismutase and catalase producing lactic acid bacteria in TNBS induced Crohn's disease in mice. Journal of Biotechnology 2011; 151(2):287-293.
57. Widmaier EP, Raff H, Strang KT. Vander İnsan Fizyolojisi: Vücut Fonksiyon Mekanizmaları. çeviren: Tuncay Özgünen, Ankara: Güneş Tıp Kitapevi, 2014.
58. Summers C, Rankin SM, Condliffe AM, Singh N, Peters AM, Chilvers E. Neutrophil kinetics in health and disease. Trends Immunol 2010; 31(8):318–324.
59. Kolaczowska E, Kubes P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. Nat. Rev. Immunol 2013; 13(3):159–175.
60. Widmaier EP, Raff H, Strang KT. Vander İnsan Fizyolojisi: Vücut Fonksiyon Mekanizmaları. çeviren: Tuncay Özgünen, Ankara: Güneş Tıp Kitapevi, 2014.

61. Kılıçturgay K. İmmünoloji. Bursa: Güneş ve Nobel Kitapevleri, 1997:174-176.
62. Carswell EA, Old LJ, Kassel RL, Green S, Fiore N, Williamson B. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1975; 72(9):3666-3670.
63. Vieira SM, Lemos HP, Grespan R, Napimoga MH, Dal-Secco D, Freitas A, Cunha TM, Souza-Junior DA, Jamur MC, Fernandes KS, Oliver CS, Teixeira MM, Cunha FQ. A crucial role for TNF- α in mediating neutrophil influx induced by endogenously generated or exogenous chemokines. *British journal of pharmacology* 2009; 158(3):779-789.
64. Stanley AC, Wong CX, Micaroni M, Venturato J, Khromykh T, Stow JL, Lacy P. The Rho GTPase Rac1 is required for recycling endosome-mediated secretion of TNF in macrophages. 2014, *Immunology and cell biology* 2014; 92(3):275-286.
65. Yazdi AS, Guarda GRN, Drexler SK, Tardivel A, Couillin I, Tschopp J. Nanoparticles activate the NLR pyrin domain containing 3 (Nlrp3) inflammasome and cause pulmonary inflammation through release of IL-1 α and IL-1 β . *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2010; 107(45):19449-19454.
66. Dahan A, Amidon GL, Zimmermann EM. Drug targeting strategies for the treatment of inflammatory bowel disease: a mechanistic update. *Expert Review of Clinical Immunology* 2010; 6(4):543–550.
67. Daschner, PJ, Grisham MB, Espey MG. Redox relationships in gut-microbiome interactions. *Free Radical Biology and Medicine* 2017; 100(105):1-2.
68. Saraggi D, Fassan M, Mescoli C, Scarpa M, Valeri N, Michielan A, D'Incá R, Rugge, M. The molecular landscape of colitis-associated carcinogenesis. *Digestive and Liver Disease* 2017; 49(4):326-330.
69. Muthas D, Reznichenko A, Balendran CA, Böttcher G, Clausen IG, Mårdh CK, Ottosson T, Uddin M, MacDonald TT, Danese S, Hansen Berner HM. Neutrophils in ulcerative colitis: a review of selected biomarkers and their potential therapeutic implications. *Gastroenterology* 2017; 52(2):125-135.
70. Yasukawa K, Tokuda H, Tun X, Utsumi H, Yamada KI. The detrimental effect of nitric oxide on tissue is associated with inflammatory events in the vascular endothelium and neutrophils in mice with dextran sodium sulfate-induced colitis. *Free Radical Research* 2012(12):1427–1436.
71. Tian T, Wang Z, Zhang J. Pathomechanisms of Oxidative Stress in Inflammatory Bowel disease and potential antioxidant therapies. *Oxidative medicine and cellular longevity* 2017:177-199.
72. Mao X, Yang Q, Chen D, Yu B, He J. Benzoic acid used as food and feed additives can regulate gut functions. *BioMed Research International* 2019.

73. Sung MK, Yeon YJ, Park SY, Park JHY, Choi MS. Obesity-induced metabolic stresses in breast and colon cancer. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2011; 1229(1):61-68.
74. Gammone MA, Riccioni G, Parrinello G, D'Orazio N. Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids: Benefits and Endpoints in Sport. *Nutrients* 2018; 11(1):46.
75. Healy DA, Wallace FA, Miles EA, Calder PC, Newsholme P. Effect of low-to-moderate amounts of dietary fish oil on neutrophil lipid composition and function. *Lipids* 2000; 35(7):763-768.
76. Haag M. Essential Fatty Acids and the Brain. *The Canadian Journal of Psychiatry* 2003; 48(3):195-203.
77. Marion-Letellier R, Savoye G, Beck PL, Panaccione R, Ghosh S. Polyunsaturated fatty acids in inflammatory bowel diseases: a reappraisal of effects and therapeutic approaches. *Inflammatory Bowel Dis* 2013; 19(3):650-651.
78. Weyland KH, Chiu CY, Gomolka B, Waechter SF, Wiedenmann B. Omega-3 fatty acids and their lipid mediators: towards an understanding of resolvins and protectin formation. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 2012; 97(3-4):73-82.
79. Li D, Sinclair A, Wilson A, Nakkote S, Kelly F, Abedin L, Mann N, Turner A. Effect of dietary alpha-linolenic acid on thrombotic risk factors in vegetarian men. *The American journal of clinical nutrition* 1999; 69(5):872-882.
80. Levy BD. Resolvins and protectins: natural Pharmacophores for resolution biology. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2010; 82 (4-6):327-32.
81. Serhan CN, Charles N, Dalli J, Karamnov S, Choi A, Park CK, Xu ZZ, Ji RR, Zhu M, Petasis NA. Macrophage proresolving mediator maresin 1 stimulates tissue regeneration and controls pain. *The FASEB Journal* 2012; 26(4):1755-1765.
82. Sun YP, Oh SF, Uddin J, Yang R, Gotlinger K, Campbell E, Colgan SP, Petasis NA, Serhan CN. Resolvin D1 and its aspirin-triggered 17R epimer. Stereochemical assignments, anti-inflammatory properties, and enzymatic inactivation. *Journal of Biological Chemistry* 2007; 282(13):9323-9334.
83. Kasuga K, Yang R, Porter TF, Agrawal N, Petasis NA, Irimia D, Toner M, Serhan CN. Rapid appearance of resolvin precursors in inflammatory exudates: novel mechanisms in resolution. *The Journal of Immunology* 2008; 181(12):8677-8687.
84. Krishnamoorthy S, Recchiuti A, Chiang N, Yacoubian S, Lee CH, Yang R, Petasis NA, Serhan CN. Resolvin D1 binds human phagocytes with evidence for proresolving receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2010; 107(4):1660-1665.
85. Calder PC. Marine omega-3 fatty acids and inflammation. *Biochim Biophys Acta* 2015; 1851 (4):469-84.
86. Calder PC. Omega-3 Fatty Acids and Inflammatory Processes. *Nutrients* 2010; 2(3):355-374.



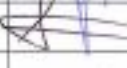







87. Li D, Wahlqvist ML, Sinclair AJ. Advances in n-3 polyunsaturated fatty acid nutrition. *Asia Pac J Clin Nutr* 2019; 28(1):1.
88. Hossain MS, Hashimoto M, Gamoh S, Masumura S. Antioxidative effects of docosahexaenoic acid in the cerebrum versus cerebellum and brainstem of aged hypercholesterolemic rats. 1999, *Neurochem* 1999; 72 (3):1133-1138.
89. İşman ÇA. Deneysel Hipotroidizimin Sıçanda Trinitrobenzen Sulfonik Asit (TNBS) ile Oluşturulan Kolit Modelinde Hasar Parametrelerinin Etkisi. M.Ü.Tıp Fakültesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Uzmanlık Tezi, İstanbul, 2002.
90. Millar AD, Rampton DS, Chander CL, Claxson AW, Blades S, Coumbe A, Panetta J, Morris CJ, Blake DR. Evaluating the antioxidant potential of new treatments for inflammatory bowel disease using a rat model of colitis. *Gut* 1996; 39(3):407-415.
91. Neurath MF, Fuss I, Kelsall BL, Stüber E, Strober W. Antibodies to interleukin 12 abrogate established experimental colitis in mice. *Journal of Experimental Medicine* 1995; 182(5):1281-1290.
92. Randhawa PK, Singh K, Singh N, Jaggi AS. A review on chemical-induced inflammatory bowel disease models in rodents. *The Korean journal of physiology & pharmacology* 2014; 18(4):279-288.
93. Wallace JL, Le T, Carter L, Appleyard CB, Beck PL. Hapten-induced chronic colitis in the rat: alternatives to trinitrobenzene sulfonic acid. *Journal of pharmacological and toxicological methods* 1995; 33(4):237-239.
94. Gue M, Bonbonne C, Fioramonti J, More J, Rio-Lacheze CD, Comera C, Bueno L. Stress-induced enhancement of colitis in rats: CRF and arginine vasopressin are not involved. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 1997; 272(1):G84-G91.
95. Kolgazi M, Cantali-Ozturk C, Deniz R, Ozdemir-Kumral ZN, Yuksel M, Sirvanci S, Caglayan-Yeğen B. Nesfatin-1 alleviates gastric damage via direct antioxidant mechanisms. 1, 2015, *J Surg Res*. 2015; 193(1):111-8.
96. Kolgazi M, Uslu U, Yuksel M, Velioglu-Ogunc A, Ercan F, Alican, I. The role of cholinergic anti-inflammatory pathway in acetic acid-induced colonic inflammation in the rat. 1, 2013, *Chem Biol Interact* 2013; 205 (1):72-80.
97. Erel O. A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. *Clinical biochemistry* 2005; 38(12):1103-1111.
98. Erel O. A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radicalcation. *Clinical biochemistry* 2004; 37(4):277-285.

99. Yumru M, Savas HA, Kalenderoglu A, Bulut M, Celik H, Eren O. Oxidative imbalance in bipolar disorder subtypes: a comparative study. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry* 2009; 33 (6):1070-1074.
100. Kosecik M, Erel O, Sevinc E, Selek S. Increased oxidative stress in children exposed to smoking. *International journal of cardiology* 2005; 100(1):61-64.
101. Harma M, Harma M, Erel O. Increased oxidative stress in patients with hydatidiform mole. *Swiss medical weekly* 2003; 133(4142).
102. Pazar A, Kolgazi M, Memisoglu A, Bahadir E, Sirvanci S; Yaman A, Yegen-Caglayan B, Ozek E. The neuroprotective and anti-apoptotic effects of melatonin on hemolytic hyperbilirubinemia-induced oxidative brain damage. *Journal of pineal research* 2016; 60(1):74-83.
103. Necefli A, Tulumoglu B, Giriş M, Barbaros U, Gündüz M, Olgac V, Güloğlu R, Toker G. The Effect of Melatonin on TNBS-Induced Colitis. 2006, *Digestive Diseases and Sciences* 2006; 51(9):1538–1545.
104. Hersberger M. Potential role of the lipoxygenase derived lipid mediators in atherosclerosis: leukotriens, lipoxins and resolvins. 2010, *Clin Chem Lab Med* 2010; 48(8):1063-1073.
105. Tyagi A, Kumar U, Santosh VS, Reddy S, Mohammed SB, Ibrahim A. Partial replacement of dietary linoleic acid with long chain n-3 polyunsaturated fatty acids protects against dextran sulfate sodium-induced colitis in rats. 2014, *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids* 2014; 91(6):289-297.
106. Kawashima K, Fuji T. The lymphocytic cholinergic system and its biological function. 2013, *Life Sci* 2013; 72 (18-19):2101-2109.
107. Tayebati SK, El-Assouad D, Ricci AA, Amenta F. Immunochemical and immunocytochemical characterization of cholinergic markers in human peripheral blood lymphocytes. *J. Neuroimmunol* 2002; 132:147-255.
108. Kruidenier L, Meeteren ME, Kuiper I, Jaarsma D, Lamers CB, Zijlstra FJ, Verspaget HW. Attenuated mild colonic inflammation and improved survival from severe DSS-colitis of transgenic Cu/Zn-SOD mice. *Free Radic. Biol. Med.* 2003; 34(6):753-765.
109. Han W, Mercenier A, Ait-Belgnaoui A, Pavan S, Lamine F, II, S Van; Kleerebezem M, Salvador-Cartier C; Hisbergues M, Bueno L, Theodorou V, Fioramonti, JI. Improvement of an experimental colitis in rats by lactic acid bacteria producing superoxid dismutase. *Inflamm. Bowel Dis.* 2006; 12(11):1044-1052.
110. Horton AA, Fairhurst S, Bus JS. Lipid peroxidation and mechanisms of toxicity. *Critical Reviews in Toxicology* 1987; 18(1):27-79.

111. Seljeskog E, Hervig T, Mansoor TMA. A novel HPLC method for the measurement of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS). A comparison with a commercially available kit. *Clinical biochemistry* 2006; 39(9):947-954.
112. Joo, M, Kim HS, Kwon TH, Palikhe A, Zaw TS, Jeong JH, Sohn UD. Anti-inflammatory effects of flavonoids on TNBS-induced colitis of rats. 1, 2015, *The Korean Journal of Physiology & Pharmacology* 2015; 19(1): 43-50.
113. Mårtensson, JJ ve Meister A. Glutathione is required for intestinal function. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1990; 87(5):1715-1719.
114. Guan G, Lan S. Implications of antioxidant Systems in Inflammatory Bowel Disease. *BioMed research international* 2018.
115. Pineda-Peña EA , Martínez-Pérez Y, Galicia-Moreno M, Navarrete A, Segovía J, Muriele P, Favarie L, Castañeda-Hernández G, Chávez-Piña AE. Participation of the anti-inflammatory and antioxidative activity of docosahexaenoic acid on indomethacin-induced gastric injury model. *Eur J Pharmacol* 2018; 818:585-592.
116. Maloy KJ, Powrie F. Intestinal homeostasis and its breakdown in inflammatory bowel disease. *Nature* 2011; 474 (7351):298–306.
117. Zhu H, Li YR. Oxidative stress and redox signaling mechanisms of inflammatory bowel disease: Updated experimental and clinical evidence. *Exp. Biol. Med* 2012; 237(5):474-480.
118. Ullman TA, Itzkowitz SH. Intestinal inflammation and cancer. *Gastroenterology* 2011; 140:1807-1816.
119. Kawashima K, Fujii T. The lymphocytic cholinergic system and its biological function. *Life Sci* 2003; 70 (18-19):2101-2109.
120. Tayebati SK, El-Assouad D, Ricci A, Amenta F. Immunochemical and immunocytochemical characterization of cholinergic markers in human peripheral blood lymphocytes. 2002, *J. Neuroimmunol* 2002; 132(1-2):147-155.
121. He J, Pham TL, Kakazu A, Bazan HE. Recovery of corneal sensitivity and increase in nerve density and wound healing in diabetic mice after PEDF plus DHA treatment. *Diabetes* 2017; 66(9):2511-2520.
122. Nordgren TM, Friemel TD, Heires AJ, Poole JA, Wyatt TA, Romberger DJ. The omega-3 fatty acid docosahexaenoic acid attenuates organic dust-induced airway inflammation. *Nutrients* 2014; 6(12):5434-5452.

123. Wen J, Teng B, Yang P, Chen X, Li C, Jing Y, Wei J, Zhang C. The potential mechanism of Bawei Xileisan in the treatment of dextran sulfate sodium-induced ulcerative colitis in mice. *Journal of ethnopharmacology* 2016; 188:31-38.
124. Kawachi S, Jennings S, Panes JJ, Cockrell A, Laroux FS, Gray L, Specian RA. Cytokine and endothelial cell adhesion molecule expression in interleukin10-deficient mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2000; 278(5):G734-G743.
125. Ye M, Joosse ME, Liu L, Sun Y, Dong Y, Cai C, Song Z, Zhang J, Brant S, Lazarev M, Li X. Deletion of IL-6 exacerbates colitis and induces systemic inflammation in IL-10-deficient mice. *Journal of Crohn's and Colitis* 2019.
126. Glehen O, Mithieux F, Traverse-Glehen A, Isaac S, Bienvenu J, François Y, Chung R, Gilly FN. Enteral immunotherapy in the treatment of chronic enterocolitis. *Hepatogastroenterology* 2003; 50(51):670-675.
127. Berg DJ, Davidson N, Kühn R, Müller W, Menon S, Holland G, Thompson-Snipes L, Leach, MW, Rennick D. Enterocolitis and colon cancer in interleukin-10 deficient mice are associated with aberrant cytokine production and CD4+ Th1-like responses. *J Clin Invest* 1996; 98(4):1010-1020.
128. Spencer SD, Marco FD, Hooley J, Pitts-Meek S, Bauer M, Ryan AM, Sordat B, Gibbs VC, Aguet M. The orphan receptor CRF2-4 is an essential subunit of the interleukin 10 receptor. *J Exp Med* 1998; 187(4):571-578.
129. Moore KW, Malefyt, RW, Coffman RL, O'Garra A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol* 2001; 19(1):683-765.
130. Lindsay J, Montfrans CV, Brennan F, Deventer SV, Drillenburger P, Hodgson H, Velde A; Pena M SR. IL-10 gene therapy prevents TNBS-induced colitis. *Gene Therapy* 2002; 9(24):1715-1721.

7. EK-1: ETİK KURUL ONAYI

 ACIBADEM MEHMET ALİ AYDINLAR ÜNİVERSİTESİ			
ACIBADEM MEHMET ALİ AYDINLAR ÜNİVERSİTESİ		HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU	
KARAR FORMU			
BAŞVURU TARİHİ: 07.05.2018		KARAR TARİHİ: 07.05.2018	
BAŞVURU SAYISI: 2018/20		KARAR SAYISI: 2018/21	
<p>Acıbadem Mehmet Ali Aydınlar Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı'ndan Doç. Dr. Hande YAPIŞLAR'ın yürütücüsü olduğu "TNBS ile indüklenen kolit modelinde dokosaheksaenoik asit (DHA)'nın inflamatuvar yanıtta rolünün araştırılması." isimli proje başvurusu Acıbadem Mehmet Ali Aydınlar Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun "07.05.2018" tarih ve "03" sayılı toplantısında görüşülmüş ve etik açıdan</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> Uygun <input type="checkbox"/> Düzeltilmesi Gerekir <input type="checkbox"/> Koşullu Olarak Uygun <input type="checkbox"/> Uygun Değil</p> <p>olarak değerlendirilmiştir.</p>			
Kurul Üyesi	İmza	Karara Katılıyorum	Karara Katılmıyorum
Prof. Dr. Güldal Söyen (Başkan)		<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Prof. Dr. Serap Arbak (Başkan Vekili)		<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Prof. Dr. İsmail Hakkı Ulus		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Prof. Dr. Alp Bayramoğlu		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Prof. Dr. Yeşim Işıl Ülman		<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Doç. Dr. Figen Demir		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Yrd. Doç. Dr. Devrim Öz Arslan		<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Sabiha Turgut Genç		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Vet. Hek. Samed Özer		<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Ferhat Bılgılı		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

8. ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Leman	Soyadı	Arslan
Doğum yeri	Konya/Karatay	Doğum tarihi	31.07.1995
Uyruğu	T.C.	Telefon	05347193454
E-mail	lemanarslan@gmail.com		

Eğitim Düzeyi

	Mezun olduğu kurumun adı	Mezuniyet yılı
Lisans	Acıbadem Mehmet Ali Aydınlar Üniversitesi Sağlık Bilimleri Fakültesi Beslenme ve Diyetetik Bölümü	2017
	Acıbadem Mehmet Ali Aydınlar Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Psikoloji Bölümü (çift anadal)	2018
Lise	Beyşehir Anadolu Öğretmen Lisesi	2013

İş Deneyimi

Görevi	Kurum	Süre
Araştırma görevlisi	Bezmialem Vakıf Üniversitesi	2019-halen

Yabancı Diller

Yabancı diller	Okuduğunu anlama	Konuşma	Yazma
İngilizce	İyi	Orta	Orta

Yabancı Dil Sınav Notu	
Yökdil	67,5

	Sayısal	Sözel	Eşit Ağırlık
Ales Puanı	75,75	64,77	74,80

Program	Kullanım becerisi
Mikrosoft Office Word-Power Point-Excel	İyi
SPSS	İyi
GraphPad	İyi
EndNote	İyi

Yer Aldığı Projeler

Investigating the effect of indoline derivative on tumor size in colon cancer induced mice. Acıbadem Üniversitesi Projesi –**ARAŞTIRMACI**- devam etmektedir. (Proje Yürütücüsü: Doç. Dr. Hande Yapışlar, Acıbadem Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Fizyoloji Anabilim Dalı)

Katıldığı Kurslar

Acıbadem Üniversitesi tarafından 06.10.2017-22.2017 tarihleri arasında düzenlenen “Deney hayvanları kullanım eğitim programı” adlı sertifika programı

Uzman Laboratuvar tarafından 21.12.2019 tarihinde verilen “Elisa Cihazının Çalışma Prensipleri, Kullanım ve Uygulamaları” adlı sertifika programı.