

T.C.  
SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ

SIÇANLARDA DEKSTRAN SÜLFAT SODYUM İLE  
UYARILAN KOLİTTE MELATONİNİN ETKİNLİĞİ

Dr. Ali Rıza BAYKAL

İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI  
UZMANLIK TEZİ

TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. Mehmet İŞLER

ISPARTA

2009

T.C.  
SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ

**SIÇANLARDA DEKSTRAN SÜLFAT SODYUM İLE  
UYARILAN KOLİTTE MELATONİNİN ETKİNLİĞİ**

**Dr. Ali Rıza BAYKAL**

**İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI  
UZMANLIK TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI**

**Prof. Dr. Mehmet İŞLER**

**Bu tez Süleyman Demirel Üniversitesi Araştırma Projeleri Yönetim Birimi  
tarafından 1341-TU-06 proje numarası ile desteklenmiştir.**

**ISPARTA**

**2009**

## İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER .....	i
TEŞEKKÜR .....	iv
KISALTMALAR .....	v
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	vii
TABLolar DİZİNİ .....	viii
<b>1. GİRİŞ .....</b>	<b>1</b>
<b>2. GENEL BİLGİLER.....</b>	<b>3</b>
2.1. İnflamatuar Barsak Hastalığı.....	3
2.1.1. İnflamatuar Barsak Hastalıklarının Patogenezi.....	3
2.1.2. Serbest Oksijen Radikalleri ve Oksidatif Stres .....	7
2.1.3. Serbest Oksijen Radikal Kaynakları .....	8
2.1.4. Serbest Oksijen Radikal Türleri .....	9
2.1.5. Serbest Radikallerin Hücreler Üzerindeki Etkileri .....	10
2.1.6. Lipidlerde Meydana Gelen Yapısal Değişiklikler.....	10
2.1.7. Proteinlerde Meydana Gelen Yapısal Değişiklikler .....	10
2.1.8. Enzimatik ve Nonenzimatik Antioksidan Sistemler .....	11
2.1.9. İnflamatuar Barsak Hastalığı Patogenezinde Serbest Oksijen Radikallerinin Rolü .....	13
2.2. İnflamatuar Barsak Hastalığında Klinik Özellikler.....	13
2.3. İnflamatuar Barsak Hastalıklarında Tedavi .....	15
2.3.1. İnflamatuar Barsak Hastalıklarında Antioksidan Tedavi ve Melatonin... 20	
2.3.2. Melatonin .....	20
2.3.3. Melatonin Metabolizması.....	21
2.3.4. Pineal ve Gastrointestinal Melatonin Arasındaki Farklılıklar.....	22
2.3.5. Melatoninin GIS Mukozasında ve Karaciğerdeki Lokalizasyonu ve Sentezi.....	22
2.3.6. Melatoninin Antioksidan Etkileri ve Gastrointestinal Patolojilerin Tedavisindeki Yeri .....	23
2.4. DSS Kolit Modeli.....	23
<b>3. MATERYAL VE METOD.....</b>	<b>25</b>
3.1. Materyal .....	25

3.1.1. Deney Hayvanları.....	25
3.1.2. Kullanılan Malzeme ve Aletler .....	25
3.2. Metod .....	26
3.2.1. Ratların Beslenme Modeli .....	26
3.2.2. Kolit Uyarılması.....	26
3.2.3. Deney Gruplarının Oluşturulması ve Deneyin Yapılması .....	26
3.2.4. Doku Örneklerinin Alınması.....	28
3.2.5. Klinik Değerlendirme.....	28
3.2.6. Kolitın Mikroskopik Değerlendirmesi .....	29
3.2.7. Örneklerin Homojenizasyonu ve Deney İçin Hazırlanması.....	30
3.2.8. Dokularda Biyokimyasal Analizler.....	30
3.2.9. İstatistiksel Değerlendirme .....	31
<b>4. BULGULAR (DENEY 1) .....</b>	<b>32</b>
4.1. Deney 1. Ratların Günlük Ağırlık Değişiklikleri.....	32
4.2. Deney 1. Klinik Değerlendirme .....	33
4.3. Deney 1. Kolonun Ağırlık, Boy ve Ağırlık/Boy Ölçümleri Sonucu Elde Edilen Veriler.....	34
4.4. Deney 1. Kolitın Mikroskopik Skorlaması .....	36
4.5. Deney 1. Biyokimyasal Analizler .....	38
4.5.1. Deney 1. Kolon Dokusunda MDA Düzeyi .....	38
4.5.2. Deney 1. Kolon Dokusunda TNF- $\alpha$ Düzeyleri .....	39
4.5.3. Deney 1. Kolon Dokusunda IL-10 Düzeyleri .....	40
4.5.4. Deney 1. Kolon Dokusunda MPO Aktivitesi.....	41
<b>5. BULGULAR (DENEY 2) .....</b>	<b>42</b>
5.1. Deney 2. Ratların Günlük Ağırlık Değişiklikleri.....	42
5.2. Deney 2. Klinik Değerlendirme .....	43
5.3. Deney 2. Kolonun Ağırlık, Boy ve Ağırlık/Boy Ölçümleri Sonucu Elde Edilen Veriler.....	45
5.4. Deney 2. Kolitın Mikroskopik skorlaması .....	47
5.5. Deney 2. Biyokimyasal Analiz Sonucu Elde Edilen Veriler .....	48
5.5.1. Deney 2. Kolon Dokusunda MDA Düzeyi .....	48
5.5.2. Deney 2. Kolon Dokusunda TNF- $\alpha$ Düzeyleri .....	49

5.5.3. Deney 2. Kolon Dokusunda IL-10 Düzeyleri .....	50
5.5.4. Deney 2. Kolon Dokusunda MPO Düzeyleri.....	51
<b>6. TARTIŞMA .....</b>	<b>53</b>
<b>7. SONUÇ.....</b>	<b>60</b>
<b>8. ÖZET.....</b>	<b>61</b>
<b>8. SUMMARY .....</b>	<b>62</b>
<b>9. KAYNAKLAR .....</b>	<b>63</b>

**TEŞEKKÜR**

Uzmanlık eğitimim süresince ve tez çalışmamda bana her türlü desteklerini esirgemeyen tez danışmanım Prof. Dr. Mehmet İŞLER başta olmak üzere değerli hocalarım Prof. Dr. M. Numan TAMER, Prof. Dr. M. Tuğrul SEZER, Prof. Dr. Yıldırım SONGÜR, Doç. Dr. M. Cem Koçkar, Doç.Dr. Ş. Ercan TUNÇ, Doç. Dr. Mehmet ŞAHİN, Yrd. Doç. Dr Banu Kale KÖROĞLU, Yrd. Doç. Dr. Z. Dilek AYDIN, Yrd. Doç. Dr. Altuğ ŞENOL, Doç. Dr. F. Nilgün KAPUCUOĞLU ve Prof. Dr Hüseyin VURAL'a, laboratuvar çalışmamda emeği geçen, Dr. Hüsnü Yusuf KARA, Dr. Abdulkadir BAŞTÜRK, Dr. Erkan CÜRE, Dr. Kasım DEMİR, Dr. Yunus UGAN'a, projemizi destekleyen Süleyman Demirel Üniversitesi Rektörlüğü Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimine ve çalışmalarım sırasında manevi desteği ile hep yanımda olan sevgili eşime, derin sevgi ve şükranlarımı sunarım.

**Dr. Ali Rıza BAYKAL**

## KISALTMALAR

<b>İBH</b>	: İnflamatuvar barsak hastalığı
<b>ÜK</b>	: Ülseratif kolit
<b>CH</b>	: Crohn hastalığı
<b>MPO</b>	: Myeloperoksidase
<b>MDA</b>	: Malondialdehide
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	: Tumor necrosis factor alfa
<b>IL</b>	: Interlökin
<b>IL-1<math>\beta</math></b>	: Interlökin 1-beta
<b>IL-6</b>	: Interlökin 6
<b>NSAİİ</b>	: Nonsteroid antiinflamatuvar ilaçlar
<b>APC</b>	: Antigen-presenting cell
<b>Th</b>	: T helper
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	: Interferon gama
<b>HLA</b>	: Human lökosit antijen
<b>5-ASA</b>	: 5-amino salisilik asit
<b>NF-<math>\kappa</math>B</b>	: Nükleer faktör kappa-B
<b>Ig</b>	: Immünglobulin
<b>Fab</b>	: Antigen-binding fragments
<b>DSS</b>	: Dextran sülfat sodyum
<b>TNBS</b>	: Trinitrobenzen sulfonik asit
<b>ir</b>	: İntrarektal
<b>ip</b>	: İntraperitoneal
<b>PBS</b>	: Phosphate-buffered saline
<b>SF</b>	: Serum fizyolojik
<b>H&amp;E</b>	: Hematoksilen ve eozin
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	: Transforming growth factor-beta
<b>VCAM-1</b>	: Vasküler hücre adezyon molekülü
<b>AANAT</b>	: Arilalkilamin-N-asetil transferaz
<b>HIOMT</b>	: Hidroksiindol-O-metiltransferaz
<b>MadCAM-1</b>	: Mukozal Adresin Hücre Adezyon Molekülü.
<b>KAT</b>	: Katalaz

<b>GSH-Px</b>	: Glutasyon peroksidaz
<b>SOD</b>	: Süperoksit dismutaz
<b>SOR</b>	: Süperoksit oksijen radikali
<b>ICA</b>	: İnterselüler adezyon molekülü
<b>iNOS</b>	: İnducible nitric oxide synthase
<b>PPAR-<math>\gamma</math></b>	: Peroxizome proliferator-activated receptor-gamma
<b>GSSG</b>	: Okside glutasyon
<b>GSH</b>	: Redükte glutasyon
<b>NOD 2</b>	: Nucleotide-binding oligomerization domain containing 2
<b>HAI</b>	: Hastalık Aktivite İndeksi



## ŞEKİLLER DİZİNİ

<b>Şekil 2.1:</b> Glutatyonun okside ve redükte formları arasında dönüşümü (GSH=Redükte glutatyon, GSSG=Okside glutatyon, GSH-Px=Glutatyon peroksidaz, GR=Glutatyon redüktaz, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> =Hidrojen peroksit). .....	12
<b>Şekil 4.1:</b> DSS ile eş zamanlı melatonin verilen ratların gruplara göre günlük ağırlık değişiklikleri .....	32
<b>Şekil 4.2:</b> DSS ile eş zamanlı melatonin verilen ratların çalışma boyunca günlük hastalık aktivite indeksleri.....	34
<b>Şekil 4.3:</b> DSS ile eş zamanlı melatonin verilen ratların gruplara göre kolon ağırlıkları .....	35
<b>Şekil 4.4:</b> DSS ile eş zamanlı melatonin verilen ratların gruplara göre kolon uzunlukları.....	36
<b>Şekil 4.5:</b> DSS ile eş zamanlı melatonin verilen ratların gruplara göre ağırlık/boy oranları .....	36
<b>Şekil 4.6:</b> DSS ile eş zamanlı melatonin verilen ratların gruplara göre kolitin mikroskopik skorlaması .....	37
<b>Şekil 4.7:</b> DSS ile eş zamanlı melatonin verilen ratların kolon dokusunda MDA düzeyi .....	37
<b>Şekil 4.8:</b> DSS ile eş zamanlı melatonin verilen ratların kolon dokusunda TNF- $\alpha$ düzeyleri.....	39
<b>Şekil 4.9:</b> DSS ile eş zamanlı melatonin verilen ratların kolon dokusunda IL-10 düzeyleri.....	40
<b>Şekil 4.10:</b> DSS ile eş zamanlı melatonin verilen ratların kolon dokusunda MPO aktivitesi .....	41
<b>Şekil 5.1:</b> DSS sonrası melatonin verilen ratların gruplara göre günlük ağırlık değişiklikleri.....	43
<b>Şekil 5.2:</b> DSS sonrası melatonin verilen ratların çalışma boyunca günlük hastalık aktivite indeksleri .....	45
<b>Şekil 5.3:</b> DSS sonrası melatonin verilen ratların gruplara göre kolon ağırlıkları ....	46
<b>Şekil 5.4:</b> DSS sonrası melatonin verilen ratların gruplara göre kolon uzunlukları ..	46
<b>Şekil 5.5:</b> DSS sonrası melatonin verilen ratların gruplara göre kolon ağırlık/boy oranları .....	47
<b>Şekil 5.6:</b> DSS sonrası melatonin verilen ratların gruplara göre kolitin mikroskopik skorlaması .....	48
<b>Şekil 5.7:</b> DSS sonrası melatonin verilen ratların kolon dokusunda MDA düzeyi ...	49
<b>Şekil 5.8:</b> DSS sonrası melatonin verilen ratların kolon dokusunda TNF- $\alpha$ düzeyleri.....	50
<b>Şekil 5.9:</b> DSS sonrası melatonin verilen ratların kolon dokusunda IL-10 düzeyleri.....	51
<b>Şekil 5.10:</b> DSS sonrası melatonin verilen ratların kolon dokusunda MPO aktivitesi .....	52

## TABLOLAR DİZİNİ

<b>Tablo 2.2:</b> İnflamatuvar Barsak Hastalıklarında Klinik Bulgular .....	14
<b>Tablo 3.1:</b> Kullanılan malzeme ve aletler .....	25
<b>Tablo 3.2.</b> HAİ .....	29
<b>Tablo 3.3:</b> Kolitin Mikroskopik Değerlendirmesi .....	29
<b>Tablo 4.1:</b> DSS ile eş zamanlı melatonin verilen ratların gruplara göre günlük ağırlık değişiklikleri .....	32
<b>Tablo 4.2:</b> DSS ile eş zamanlı melatonin verilen ratların çalışma boyunca günlük hastalık aktivite indeksleri .....	34
<b>Tablo 4.3:</b> DSS ile eş zamanlı melatonin verilen ratlarda, kolonun ağırlık, boy ve ağırlık/boy ölçümleri sonucu elde edilen veriler .....	35
<b>Tablo 4.4:</b> DSS ile eş zamanlı melatonin verilen ratların kolitin mikroskopik skorlaması .....	37
<b>Tablo 4.5:</b> DSS ile eş zamanlı melatonin verilen ratların deney gruplarına göre kolon MDA aktivitesi .....	38
<b>Tablo 4.6:</b> DSS ile eş zamanlı melatonin verilen ratların deney gruplarına göre kolon TNF- $\alpha$ aktivitesi .....	39
<b>Tablo 4.7:</b> DSS ile eş zamanlı melatonin verilen ratların deney gruplarına göre kolon IL- 10 aktivitesi .....	40
<b>Tablo 4.8:</b> DSS ile eş zamanlı melatonin verilen ratların deney gruplarına göre kolon MPO aktivitesi .....	41
<b>Tablo 5.1:</b> DSS sonrası melatonin verilen ratların gruplara göre günlük ağırlık değişiklikleri .....	42
<b>Tablo 5.2:</b> DSS sonrası melatonin verilen ratların çalışma boyunca günlük hastalık aktivite indeksleri .....	44
<b>Tablo 5.3:</b> DSS sonrası melatonin verilen ratlarda kolonun ağırlık, boy ve ağırlık/boy ölçümleri sonucu elde edilen veriler .....	46
<b>Tablo 5.4:</b> DSS sonrası melatonin verilen ratların gruplara göre kolitin mikroskopik skorlaması .....	47
<b>Tablo 5.5:</b> DSS sonrası melatonin verilen ratların deney gruplarına göre kolon MDA aktivitesi .....	48
<b>Tablo 5.6:</b> DSS sonrası melatonin verilen ratların deney gruplarına göre kolon TNF- $\alpha$ aktivitesi .....	49
<b>Tablo 5.7:</b> DSS sonrası melatonin verilen ratların deney gruplarına göre kolon IL- 10 aktivitesi .....	50
<b>Tablo 5.8:</b> DSS sonrası melatonin verilen ratların deney gruplarına göre kolon MPO aktivitesi .....	51

## 1. GİRİŞ

Crohn hastalığı (CH) ve ülseratif kolit (ÜK), gastrointestinal kanalın kronik inflamatuvar hastalıklarıdır (1). İnflamatuvar barsak hastalığı'nın (İBH) patogenezi kesin olarak aydınlatılamamakla birlikte; genetik, çevresel ve immünolojik faktörlerin rol oynadığı kabul edilmektedir (2).

İmmün sistemin dengeli ve düzenli bir şekilde çalışması ile normal bir konak savunması ve intestinal hasara karşı korunma sağlanmaktadır. Bu savunma mekanizmalarının bozulması, İBH'daki gibi kronik inflamasyona yol açabilmektedir (3).

ÜK patogenezinde, proinflamatuvar sitokin salınımındaki artışın önemli rolü olduğu kabul edilmektedir. ÜK'li hastaların inflamasyonlu mukozalarında yapılan incelemelerde, interlökin 1-beta (IL-1 $\beta$ ), interlökin 6 (IL-6) ve tümör nekroz faktörü alfa (TNF- $\alpha$ ) salınımında artış gözlenmiştir. Bununla birlikte, salgılanan proinflamatuvar sitokinlerin, nükleer faktör  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) proteini bağlayıcı bölgelerinin bulunduğu ve salınımlarının da bu faktör ile transkripsiyonel olarak düzenlendiği gösterilmiştir. NF- $\kappa$ B, p50 ve p65 alt birimlerine sahip, Rel transkripsiyon faktör ailesinden bir heterodimerdir ve NF- $\kappa$ B proteini, çeşitli uyarılar ile aktif hale gelmesi neticesinde, uyarılan genler immün ve inflamatuvar yanıtta önemli rol oynamaktadır (4-6). TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , büyüme faktörleri, bakteriyel lipopolisakkaritler ve oksidatif stres, NF- $\kappa$ B uyarılmasında etkili olmaktadır (7-9). Yapılan çalışmalarda, ÜK'li hastaların mukozasında, makrofajlarda ve epitelial hücrelerde, uyarılmış NF- $\kappa$ B proteinleri ile birlikte IL-1, IL-6 ve TNF- $\alpha$  salınımında artış olduğu gösterilmiştir (10).

İBH patogenezinde, serbest oksijen radikallerinin (SOR) meydana getirdiği mukozal hasarın, barsak mukozasına lökosit göçüne neden olduğunu, lökosit infiltrasyonunun da mukozada oksidatif hasarı artırdığını ve proinflamatuvar sitokin salınımı ile birlikte, lökosit göçündeki artışın bir kısır döngü içinde olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur (11).

Ek olarak, antioksidan savunma mekanizmalarının da, İBH'da azalmış olduğu gösterilmiştir (12). Önemli antioksidan enzimlerden biri olan SOD'un, İBH olan hastaların barsak mukozasında düşük düzeylerde bulunduğu ve İBH'da

inflame barsak mukozasındaki total glutatyon düzeylerinin inflamasyonsuz alanlara göre daha düşük bulunduğu daha önceden gösterilmiştir (12, 13).

Antioksidan maddelerin İBH'daki etkileri, deneysel kolit modellerinde ve İBH'da oksidatif hasara karşı koruyucu ve tedavi edici etkilerinin olduğu gösterilmiştir (14).

Melatonin (N-acetyl-5-methoxytryptamine), enzimatik yollarla triptofan'dan sentezlenerek salgılanan pineal bezin temel ürünüdür. İmmünoregülasyon, inflamatuvar cevaplar ve oksidatif streste önemli fizyolojik rolü vardır. Melatoninin birçok dokuda ve organda, etkili bir antioksidan özellikle molekül olduğu *invivo* ve *invitro* olarak gösterilmiştir (15). Melatonin, sadece direkt antioksidan olarak değil, dokulardaki antioksidan enzim aktivitelerini güçlendirerek indirekt antioksidan olarak da işlev görmektedir. Bugüne kadar kesin tedavisi bulunamamış olan İBH'na çözüm getirebilmek için düzenlenen bu projede, kullanılan dekstran sülfat sodyum (DSS) aracılı kolit modeli insan ülseratif kolitine benzer özelliklere sahiptir ve melatonin bu modelde daha önce kullanılmamıştır.

Bu çalışmanın amacı:

- Deneysel kolit oluşturulmuş ratlarda barsak dokusundaki patolojileri histopatolojik olarak incelemek,
- Barsak mukozasına lökosit infiltrasyonunun bir göstergesi olan myeloperoksidaz (MPO); lipid peroksidasyonunun önemli bir göstergesi olan malondialdehit (MDA); proinflamatuvar bir sitokin olan TNF- $\alpha$  ile, antiinflamatuvar sitokinlerden biri olan Interlökin 10 (IL-10) tayini yapılması ve melatoninin tüm bu parametreler üzerine olası etkilerini incelemektir.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. İnflamatuar Barsak Hastalığı

İBH, ataklar ve iyileşmeler ile seyreden, ömür boyu devam eden kronik inflamatuvar bir hastalıktır (11). İBH etyolojisinde, birçok neden sorumlu tutulmakla birlikte, barsak florasına karşı tolerans kaybı, immün sistem dengesinde bozulma, genetik ve çevresel faktörler suçlanmaktadır (1).

CH'da sıklıkla, gastrointestinal kanalın herhangi bir yerinde transmural ve atlayıcı özellikte lezyonlar mevcut olup, sıklıkla distal ileum ve kolonu tutmaktadır (1). Bununla birlikte, ÜK'deki inflamasyon kolon mukozasında ve submukozasında sınırlı olup, rektumdan proksimale doğru yayılım göstermektedir (16).

İBH hastalarının %6-%32'sinin, birinci ve ikinci derece akrabalarında, hastalığa rastlanmıştır (17). İkizlerde yapılan ve toplam 322 ikiz çiftin katıldığı üç çalışmada, İBH'da genetik ve çevresel katılımın rolü araştırılmış olup, CH'da monozigotik ve dizigotik ikizlerde oranlar sırası ile %37, %7, ÜK'de bu oran %10, %3 olarak bulunmuştur (18, 19). Etnik araştırmalarda, İBH prevalansı, beyazlarda en yüksek, siyah Amerikalılarda daha düşük ve en düşük oranda da Asyalı toplumlarda bulunmuştur (20, 21). İBH prevalansı, yahudi toplumlarında, coğrafik yerleşim yeri ve süresinden bağımsız olarak, herhangi bir etnik gruptan 2-4 kat daha fazla bulunmuştur (22).

#### 2.1.1. İnflamatuar Barsak Hastalıklarının Patogenezi

İBH patogenezi multifaktöriyel nedenlidir. Genetik faktörlerin de İBH etyopatogenezinde önemli rolü vardır. Fakat birçok İBH'lı hastanın yakın akrabalarında İBH gözlenmemektedir (11, 23). İBH'da genetik yatkınlık, tek bir gene bağlı değildir (17). Bazı genlere her iki hastalıkta da sık olarak rastlanırken, bazı genlerin hastalığa özgü olduğu görülmüştür (24).

Ailesinde, hastalıktan etkilenen birden fazla birey bulunan ailelerde, 1996 yılında yapılan genetik araştırmalarda, 16. kromozomda CH'na duyarlılığı artıran bir gen tanımlanmıştır (25, 26). Nucleotide-binding oligomerization domain containing 2 (NOD2) olarak bilinen bu genin infeksiyona karşı dirençte görevli olduğu ve bu gendeki mutasyonların, CH ile birliktelik içinde olduğu gösterilmiştir (27). NOD2

geni monositlerde kodlanmakta ve immün-inflamatuar yanıtların başlatılmasında etkili bir transkripsiyon faktörü olan NF- $\kappa$ B'yi uyarmaktadır (28, 29). NF- $\kappa$ B proteinin uyarılması da proinflamatuar sitokin üretiminin artışına neden olmaktadır. Genom tarama çalışmaları, ÜK ile 3., 7. ve 12. kromozom bölgeleri arasında ilişki olduğunu da göstermektedir (30). İmmün yanıtın düzenlenmesinde görevli olan, insan lökosit antijen bölgesi genleri (HLA) ile ÜK arasında, CH'da gözlenenden daha güçlü birliktelik saptanmıştır (27, 31). Bu birliktelik, yaygın ÜK olan hastalarda daha güçlü bulunmuştur. DR2 ile ÜK arasında pozitif, DR4 ve Drw6 ile arasında ise negatif birliktelik olduğu gösterilmiştir (32).

Farklı hayvan deneyleri ile yapılan çalışmalarda, duyarlı bir bireyde İBH gelişiminde luminal floranın da gerekli olduğu gösterilmiştir. Genetik olarak duyarlı olan hayvanlar, doğumdan itibaren mikrobial ortamdan arındırılmış ortamda gözlemlenirken, immün sistem aktivasyonunun ve kolitin gelişmediği, aynı hayvanlar luminal floraya sahip olduklarında kolit geliştirdikleri gözlenmiştir (32).

Genetik olarak yatkın bir bireyde, çevresel tetikleyici etkenler, İBH gelişimine neden olabilmektedir (33). İBH patogenezinde, çevresel tetikleyici nedenlerin etkisi, son elli yılda dünyada hızlı gelişmelerin olması ile, CH sıklığının artması, az gelişmiş ülkelerde de hızlı endüstrileşme ile birlikte CH tanılarının artması ile kendine destek bulmaktadır (27). Değişen çevredeki çeşitli etken maddeler, mukozal immün sistem'in ve enterik mikrofloranın gelişimini etkileyebilmektedir. Hijyenin değişmesi, steril ve nonfermente besinlerin tüketiminin yaygınlaşması, aşılama, yaş ve intestinal patojenlere ilk kez maruz kalma gibi nedenler de mukozal immün sistem gelişimini etkilemektedir (34). Çevresel tetikleyici etken maddeler, mukozal immün sistemin, uzun süreli ve aşırı miktarda uyarılmasına neden olabilmektedirler. Mukozal immün sistemin uyarılmasının, mukozal immün sistemdeki bir kusurdan mı, yoksa immün sistemin sürekli uyarılmasına mı bağımlı olduğu henüz açıklanamamıştır (17).

Artmış intestinal mukozal geçirgenliğin, CH patogenezinde etkili olduğu kabul edilmektedir (35). Zayıf bir intestinal mukozal bariyer, antijen emiliminde artışa neden olarak ve abartılı bir immün yanıtı yol açarak, olgun B hücre sayısında sistemik bir artışa neden olabilmektedir (35). Gastrointestinal kanalda mukozal

immün savunmanın bozulması ve lüminal bir antijen tarafından mukozal immün sistem'in uyarılması, İBH'daki doku hasarı ve klinik özelliklerin oluşmasına neden olabilmektedir (17).

Daha önceden, İBH olan hastalar ile normal bireylerin mikrobiyal ekolojisindeki farklılıklar güçlü araştırmalar ile ortaya konmamıştır (36). Elimizdeki veriler, İBH etyolojisinde hastalığa özgü bir etken patojen varlığını göstermemektedir (27). Bununla birlikte, yakın zaman önce, aktif İBH olan hastalarda, barsakta, anaerobik bakteri ve laktobasil sayısında önemli düşüklük olduğu gösterilmiştir (36).

Elimizdeki kanıtlar, sigara içmemiş olmanın ÜK ile, sigara içiciliğinin ise, CH ile birliktelik içinde olduğunu göstermektedir (37, 38). Eski ağır sigara içicilerinde, tüm eski sigara içicilerinde, sigara içmeyenlerde ve sigara içenlerde ÜK gelişmesi için relatif risk sırası ile 4.4, 2.5, 1.0 ve 0.6 olarak bulunmuştur (38). Bu birliktelikten temel olarak nikotin sorumlu tutulmakla birlikte, etki mekanizması açıklığa kavuşmamıştır (38).

Epidemiyolojik veriler, nonsteroidal antiinflamatuvar ilaçların (NSAİİ), ÜK alevlenmelerini tetikleyebileceğini göstermiştir (33). ÜK alevlenmelerindeki artışta, NSAİİ kullanımına bağlı, koruyucu mukozal prostanooidlerinin üretiminin azalmasının, artmış lökosit migrasyonunun etkili olduğu düşünülmektedir (39).

Psikolojik stres de ÜK'li hastaların % 40'ında potansiyel tetikleyici bir faktör olarak bildirilmiştir (40).

20 yaşından önce apendektomi olmanın, ÜK gelişiminde güçlü koruyucu etkisinin olduğu vaka-kontrollü klinik çalışmalar ve geniş populasyon bazlı çalışmalar ile gösterilmiştir (41-43).

CD4+ T hücreleri'nin, immün yanıtta önemli düzenleyici görevleri bulunmaktadır. CD4+ T hücreleri, görevlerine ve spesifik sitokinlere olan etkilerine göre, T helper 1 (Th1) ve T helper 2 (Th2) lenfositleri olarak iki başlıkta sınıflandırılmışlardır (44, 45). Uyarılmış mukozal CD4+ T hücreleri, intestinal inflamasyona neden olarak, inflamasyonu önleyerek veya kontrol ederek etkilerini gösterebilmektedir (46). Th1 lenfositleri, hücre aracılı immün yanıtı yönetir ve IL-2, IL-12 ve IFN- $\gamma$  sitokinlerinin salgılanmasını uyarır. Th2 lenfositleri, humoral

immün yanıtı aracılık eder ve IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 ve IL-13 sitokinlerinin salgılanmasını uyarır. Bu sitokinler karşılıklı olarak, bazı anahtar sitokinler aracılığı ile birbirlerinin salgılanmasını da düzenlemektedirler (44, 45). CH, daha çok Th1 tarafından salgılanan sitokinler ile, ÜK ise Th2 yanıtı ile ilişkilendirilmektedir (44, 47, 48). İBH patogenezinde, periferal kan ve kolonda lamina propriadaki CD4+ T hücreleri ile endojen flora arasındaki çapraz reaksiyonun ve konak florasına karşı anormal T hücre yanıtına neden olmasının, önemli rolü olduğu gösterilmiştir (49). Sitokinler lokal mikrovasküler yapılara etki ederek, adezyon moleküllerinin artışına neden olur ve inflamatuvar yanıtı artırır. Sitokinler doku hasarının oluşumunda etkisi olan, nötrofil ve makrofajların da dokuya göç etmesine, yol açarlar (46).

T hücrelerinin immünsüpresif etkileri ise, IL-10 ve TGF- $\beta$ , sitokinlerinin üretimi ile gerçekleşmektedir (50). IL-10, Th2 hücreleri tarafından üretilir ve Th1 hücrelerinden, IL-2 ve IFN- $\gamma$  üretimini baskılar. İBH hastalarında, lamina propriadan elde edilen mononükleer hücrelere, IL-10 uygulandığında, IL-1 $\beta$  ve TNF- $\alpha$  sekresyonunu baskıladıkları gösterilmiştir ve deneysel çalışmalardan elde edilen veriler, IL-10'un, İBH'da kullanımını desteklemektedir (51). TGF- $\beta$ , T hücreleri tarafından üretilen bir büyüme faktörü olmakla birlikte, hematopoetik ve nonhematopoetik hücreler tarafından da üretilmektedir ve TGF- $\beta$ 'nın hücre çoğalması, farklılaşması ve görevleri üzerine farklı etkileri mevcuttur. ÜK ve CH'da lamina propria hücrelerinde artmış TGF- $\beta$  salınımı gösterilmiş ve birkaç çalışma ile Th1 hücreleri üzerinde TGF- $\beta$ 'nin baskılayıcı etkisi olduğu gösterilmiştir (44, 52).

IFN- $\gamma$ 'nın, deneysel kolit modellerinde yüksek bulunduğu ve Th1 yanıtının gelişmesinde önemli olduğu gösterilmiştir. İBH tedavisinde, Th1 yanıtının önlenmesi ile, IFN- $\gamma$ 'nın doğrudan nötralizasyonu akılcı bir yaklaşım olsa da, IL-10 eksik farelerde, anti-IFN- $\gamma$  tedavisi ile faydalı bir etki gözlenmemiştir (44, 52).

IL-1 $\beta$  ve TNF- $\alpha$ , proinflamatuvar özellikler gösteren sitokinlerdir ve İBH'da mukozal inflamasyonun gelişmesinde önemli etkileri vardır (53, 54). Her iki sitokin de temel olarak makrofajlardan ve monositlerden salgılanarak, intestinal makrofajları, nötrofilleri, fibroblastları ve düz kas hücrelerini uyarır; böylelikle prostoglandinlerin, proteazların, inflamasyon ve doku hasarının diğer moleküler aracılarının, diğer inflamatuvar ve kemotaktik sitokinlerin artışına yol açar. İBH'da,



barsak dokusunda, IL-1 $\beta$  ve TNF- $\alpha$  sentezinin artmış olduğu gösterilmiştir. TNF- $\alpha$ , barsak dokusunda, mukozal inflamasyonda, villus epitelyal hücrelerinin apoptozunun uyarılmasında ve epitelyal bariyerin bozulmasında etkilidir. TNF- $\alpha$ , mukozal T hücrelerinden, IL-12 ve IL-18'den bağımsız olarak, IFN- $\gamma$  üretimini de artırmaktadır (55). TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  ve IL-6, ile kararlı bir durumda bulunur ve İBH daki konstitusyonel semptomların oluşumundan sorumludur (53).

NF- $\kappa$ B proteini, proinflamatuvar yanıtta anahtar rol oynayan bir transkripsiyon faktörüdür (56, 57). NF- $\kappa$ B proteininin, immün ve inflamatuvar yanıtta merkezi rol oynadığı kabul edilmektedir (58, 59). NF- $\kappa$ B, ReIA (p65) ve NF- $\kappa$ B (p50) dimerlerinden oluşmakta ve bu NF- $\kappa$ B dimerleri, inhibitör bir protein olan I $\kappa$ B proteini ile inaktif sitoplazmik kompleksler halinde bulunurlar (29). TNF- $\alpha$  ve IL-1 $\beta$  gibi inflamatuvar moleküller, büyüme faktörleri, bakteriel lipopolisakkaritler ve oksidatif stres, I $\kappa$ B inhibitör proteinin fosforilasyonu ile bileşimin çözülmesine neden olarak, NF- $\kappa$ B'nin uyarılmasını gerçekleştirmektedir (29). İBH hastalarının, mukozal lamina propriasında uyarılmış NF- $\kappa$ B düzeyleri yüksek bulunmuş ve NF- $\kappa$ B'nin uyarılması ile birlikte makrofajlardan TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 salınımının da artmış olduğu gösterilmiştir (60, 61). NF- $\kappa$ B'nin, İBH'da ve deneysel hayvan kolit modellerinde, kolit'in başlamasında ve ilerlemesinde önemli etkisi olduğu düşünülmektedir (56, 57). Bazı araştırmacılara göre, artmış serbest oksijen radikalleri (SOR) üretiminin NF- $\kappa$ B'yi uyarması, TNF- $\alpha$  üretiminde artışa neden olmakta, artan TNF- $\alpha$  düzeylerine bağlı inflamasyonun artması ile de tekrar SOR artışı bir kısır döngü içerisine girmektedir (62).

*Peroxisome proliferator-activated receptor'leri* (PPARs), transkripsiyon faktörlerinden, nükleer hormon reseptör ailesinin üyesidir ve aktiviteleri steroid hormonlar gibi küçük, yüksek affiniteli bağlayıcı özelliği olan lipofilik ligandlar tarafından düzenlenir. Kolondaki epitelyal hücreler yüksek düzeylerde PPARs proteinleri salgılar ve ÜK'de inflamatuvar sitokinlerin üretimine neden olabileceği ileri sürülmüştür (63).

### 2.1.2. Serbest Oksijen Radikalleri ve Oksidatif Stres

Oksijen (O<sub>2</sub>), insan vücudunda bütün hücrelere kolaylıkla girebilen bir moleküldür. O<sub>2</sub>, çok tüketilmektedir ve radikal olmaya çok uygundur bir yapıdadır.

Bu nedenle, serbest radikal denince aslında SOR akla gelmektedir. SOR; hücrede mitokondrial solunumda, hücre sel sinyal iletiminde ve bakteri fagositozu gibi görevler için fizyolojik olarak gereklidir (64-66).

Serbest radikaller, dış orbitallerinde bir veya daha fazla eşlenmemiş elektron taşırlar ve diğer biyolojik materyallerle reaksiyona girme eğilimi gösteren maddelerdir (64,67). Sonuçta serbest radikaller hücre sel hasar meydana getirirler (64, 65, 68). Oksidan ajanların artması halinde ve antioksidan savunmada yetersizlik olduğu durumlarda, artan oksidatif stres ile fosfolipidler, doymamış yağ asitleri, glikolipidler, ve membran proteinleri, serbest radikallerin hedefi haline gelirler (64-68).

SOR üretimi ile antioksidan savunma sistemi bir denge halindedir. SOR üretiminde aşırı artış olması veya antioksidan savunmada azalma olması, oksidatif strese neden olmaktadır. Polimorfonükleer lökositlerin uyarılması ile oluşan NADPH oksidaz, SOD, nitrik oksit sentaz (NOS) ve miyeloperoksidaz gibi enzimler,  $O_2^-$ ,  $H_2O_2$ , NO ve hipoklorik asit (HOCl) gibi reaktif ürünler oluşturarak solunum patlamasına neden olmaktadır (64-66). Bu maddeler çok reaktif moleküller olduklarından, bu moleküller, diğer atom ve moleküllerle elektron alışverişine girerler, onların kimyasal yapılarını değiştirebilirler (65, 68). Sonuç olarak, oksidan maddelerin arttığı ve antioksidan savunmanın yetersiz kaldığı durumlarda, organizmada oluşan oksidatif stres'e bağlı hücre sel metabolizma'nın bozulması nedeni ile moleküler düzeyde hasarlanma ve doku hasarı oluşur (65, 69).

Oksidatif hasar oluşumu ve serbest radikallerin artması, lipid peroksidasyonu ile DNA ve protein oksidasyonu ile hücre membranını geçirgenliğinin artmasına ve böylelikle hücre sel ölümün gerçekleşmesine neden olur (65, 69). Serbest radikal tepkimeleri sonucunda, genetik mutasyonlar da oluşabilmektedir (70, 71). Bu nedenler ile oksidatif stres'in önlenmesi, birçok hastalığın oluşumu ve progresyonu açısından oldukça önemlidir.

### 2.1.3. Serbest Oksijen Radikal Kaynakları

**Eksojen Kaynaklar:** İyonize ve non iyonize radyasyon, solventler, aromatik hidrokarbonlar, ksenobiotikler, hava kirliliği, hiperoksi, pestisitler, anestezik maddeler, sigara dumanı, alkol, uyuşturucu gibi bağımlılık yapan maddeler,

gıdalarda bulunan katkı maddeleri, sisplatin, metotreksat, siklosporin gibi antineoplastik ilaçlar, metal iyonları serbest oksijen radikalleri oluşumuna neden olabilen maddelerdir. Katekolamin düzeyinde artış sonrasında, katekolaminlerin oksidasyonu sonucunda da radikal üretimi artabilmektedir.

**Endojen Kaynaklar:** Tetrahidroproteinler, katekolaminler, hidrokinonlar, tioller, gibi küçük moleküllerin otooksidasyonu, endoplazmik retikulum ve nükleus membran elektron transport sistemleri (sitokrom p-450), peroksizomlarda var olan enzimler, mitokondrial elektron transport sistemi, makrofaj ve diğer fagositik hücrelerin aktivasyonu ile meydana gelen solunumsal patlama, travma, iskemi, intoksikasyon gibi durumların sonucu oluşan oksidatif stres, enzimler ve proteinler, XO, triptofan dioksijenaz, hemoglobin vs., lipooksijenaz, NADPH oksidaz, prostaglandin sentetaz içeren plazma membran enzimleri ve lipid peroksidasyonu, yaşlanma, serbest oksijen radikali oluşumuna neden olabilen endojen kaynaklar arasında sayılabilir.

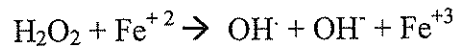
#### 2.1.4. Serbest Oksijen Radikal Türleri

Oksijen radikalleri en önemli serbest radikaldirler. İntoksikasyon, iskemi ve radyoaktivite maruziyeti, gibi durumlarda, mitokondride aerobik oksidatif fosforilasyon etkilenir ve elektron taşıma sisteminden elektron kaçakları meydana gelir. Oksijene bir elektron transferi ile redüksiyonu sonrasında, süperoksit serbest radikal anyonu (süperoksit,  $O_2^{\cdot-}$ ) oluşmaktadır (72, 73).

Oksijenin 2 elektronla redüklenmesi veya  $O_2^{\cdot-}$ 'nin dismutasyonu ile  $H_2O_2$  oluşur (67).



Serbest radikal biyokimyasında, hidrojen peroksit, çok önemlidir. Çünkü, geçiş metal iyonlarının bulunduğu ortamda parçalanıp oksijen radikallerinin reaktif olan ve biyolojik sistemlere çok hasar verebilen hidrosil radikalini ( $OH^{\cdot}$ ) oluşturabilirler (67).



Fenton reaksiyonu; hücre için son derece toksik olan  $OH^{\cdot}$  oluşur (74).

### 2.1.5. Serbest Radikallerin Hücreler Üzerindeki Etkileri

### 2.1.6. Lipidlerde Meydana Gelen Yapısal Değişiklikler

Reaktif oksijen türlerinin yıkıcı etkilerinden en çok lipidler etkilenir. Membran yüzeyinde serbest oksijen radikalleri ile hızla etkileşime girebilen çoklu doymamış yağ asitleri bol miktarda bulunmaktadır. Poliansatüre yağ asitlerinin oksidatif hasarı ile lipid peroksidasyonu gerçekleşir (69, 74). Bir lipid molekülünde iki doymamış bağ arasında bulunan bir metilen grubundan bir hidrojen atomunun çıkarılması ile lipid peroksidasyonu başlar ve lipid peroksidasyonu sonrasında hücrede, zincirleme reaksiyonlar oluşur (74). Peroksidasyon sonucunda oluşan lipid peroksil radikalleri (LOO<sup>·</sup>), bir sonraki poliansatüre yağ asidini okside ederek yeni zincirleme reaksiyonların oluşmasını tetiklemektedir (75). Lipid peroksil radikalleri, daha ileri parçalanma ile de, hidroperoksidlere, hidroperoksidler de aldehidlere dönüşürler. Aldehidlerin zararlı etkileri daha fazladır. Malondialdehid (MDA), bu aldehidler içinde en çok bilinen aldehittir. Dokuda MDA düzeyinin artışı da serbest oksijen radikallerinin arttığının göstergesidir (76). Oluşan MDA difüzyon ile hücrenin dış ortamına ya da iç kısmına giderek hasar oluşturabilir. Bu hasar ile membranın yapısında ve fonksiyonlarında büyük ölçüde bozulma gerçekleşir.

### 2.1.7. Proteinlerde Meydana Gelen Yapısal Değişiklikler

Proteinlerde *in vivo* olarak meydana gelen oksidatif değişiklikler, proteinlerin rol oynadığı çeşitli hücresel fonksiyonları etkiler. Oksidatif protein hasarı ile, reseptörler, sinyal ileti mekanizmaları, yapısal proteinler, transport sistemleri ve enzimlerin rol oynadığı hücresel olaylar etkilenir. Protein ve nükleik asit moleküllerinde hasar oluşturucu zincir reaksiyonlarının gerçekleşme ihtimali zayıftır ve bu nedenle protein ve nükleik asitler serbest radikallerin etkilerine karşı, poliansatüre yağ asitlerine göre daha dirençlidir (77). DNA molekülü serbest radikaller ile kolaylıkla hasara uğrayabilmektedir (74).

DNA molekülü hasarı sonucunda, kronik inflamasyon, enfeksiyon, yaşlanma, karsinogenezis, nörodejeneratif ve kardiyovasküler hastalıklar gibi çeşitli patolojiler oluşabilmektedir ve DNA molekülü kolaylıkla SOR tarafından hasara uğrayabilmektedir (78).

### 2.1.8. Enzimatik ve Nonenzimatik Antioksidan Sistemler

#### Nonenzimatik Antioksidanlar

**E Vitamini:** Vitamin E, lipid fazda çözünen zincir-kırıcı etkiye sahip bir antioksidandır.  $\alpha$ -tokoferol, dokularda, vitamin E aktivitesinin yaklaşık %90'ından sorumlu aktif ve yaygın formudur (75,78). Membranda lipid kısmında ve ekstrasellüler sıvılarda bulunur.  $O_2^{\cdot-}$ ,  $OH^{\cdot}$  gibi radikalleri inaktive ederek ve lipid peroksit zincirini kırarak lipid peroksidasyonu durdurur (79). C vitamini, süperoksit ve hidroksil radikalinin doğrudan temizleyicisidir, ekstrasellüler sıvılarda bulunur(79).

**Glutasyon:** Karaciğerde, glutamat, sistein ve glisin aminoasitlerinden sentezlenmektedir. Glutasyon, aynı zamanda oksidatif stresin ölçümünde kullanılan çok güçlü bir antioksidandır. Oksidatif durumlarda, redükte glutasyon (GSH) / okside glutasyon (GSSG) oranında azalma görülür. Proteinlerdeki  $-SH$  gruplarını redükte halde tutar ve oksidasyondan korur. Hücreleri oksidatif hasara karşı koruyan glutasyon, serbest radikaller ve peroksitler ile tepkimeye girer (80). Sistein, glutasyon sentezi için öncüdür. (64).

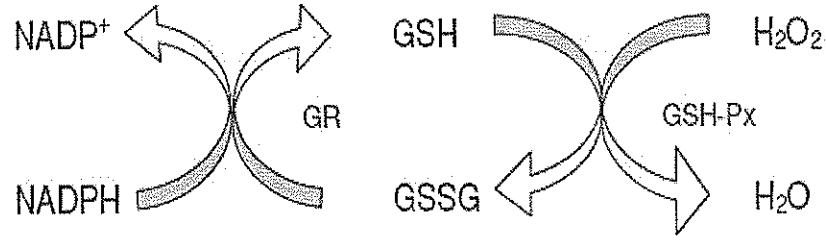
Transferrin, bilürubin, albümin, ürik asit, seruloplazmin, piruvat, taurin, beta karoten diğer nonenzimatik antioksidanlar arasında yer almaktadır (78,79-81-85).

#### Enzimatik Antioksidanlar

**Glutasyon Peroksidaz:** (GSH-Px), yapısında selenyum metali bulunur ve bu nedenle metalloenzimdir. GSH'ı redükte glutasyonun (GSH), okside glutasyon (GSSG) haline dönüştüren GSH-Px enzimi  $H_2O_2$ 'i suya indirger. Daha sonra okside glutasyon, glutasyon redüktaz (GR) enziminin katalizlediği reaksiyon ile NADPH harcanarak tekrar redükte hale dönüştürülebilir (86).

GSH-Px, GR enziminin katalizlediği reaksiyon şu şekildedir:





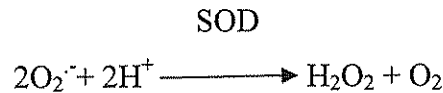
**Şekil 2.1.** Glutatyonun okside ve redükte formları arasında dönüşümü (GSH=Redükte glutatyon, GSSG=Okside glutatyon, GSH-Px=Glutatyon peroksidaz, GR=Glutatyon redüktaz, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>=Hidrojen peroksit).

**Katalaz:** (CAT), yapısında 4 “hem” grubu bulunan bir hemoprotein olan katalaz enzimi esas olarak peroksizomlarda bulunmaktadır (75). Enzimin aktivitesi bulunduğu dokulara göre farklılıklar gösterir. Karaciğer ve böbrekte yüksek aktivite gösterdiği saptanmıştır (67). Hidrojen peroksitin yüksek konsantrasyonlarda bulunduğu ortamlarda etkilidir (87). H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>’yi direkt olarak suya dönüştürür. Katalaz enzim aktivitesi, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> konsantrasyonunun arttığı durumlarda, belirgin olarak artış gösterirken, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> konsantrasyonu düşük olduğu durumlarda hidrojen peroksiti substrat olarak kullanan diğer antioksidan enzimler (GSH-Px gibi) devreye girer ve hidrojen peroksiti ortamdan uzaklaştırırlar (88). CAT peroksizomlarda (74), GSH-Px enzimi başlıca sitozol ve mitokondride daha etkilidir (64).

CAT enziminin katalizlediği reaksiyon şu şekildedir:



**Süperoksit Dismutaz:** Süperoksit Dismutaz (SOD), bir metalloenzimdir. Süperoksit anyonunun hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dönüştürülmesini katalizleyerek organizmayı toksik reaktif oksijen metabolitlerine karşı korumaktadır(89,90).



Bu tepkime spontan olarak da oluşabilmektedir, ancak SOD enzimi bu tepkimeyi katalize ettiğinde tepkimenin hızı normale göre 4 kat artar (91). Savunma mekanizmaları arasında SOD enzimi ilk görevi üstlenir ve SOD enzimi ile katalizlenen tepkime sonucu oluşan ürünler CAT enzimi tarafından temizlenmektedir. Fizyolojik şartlarda, O<sub>2</sub><sup>-</sup> radikalinin oluşumu oldukça fazladır. SOD, O<sub>2</sub><sup>-</sup> radikalinin

hücre içi konsatrasyonunu düşük seviyelerde tutarak  $O_2^-$  seviyelerinin kontrolünü sağlar ve hücreleri  $O_2^-$  radikallerinin etkilerinden korur (64).

### 2.1.9. İnflamatuar Barsak Hastalığı Patogenezinde Serbest Oksijen Radikallerinin Rolü

Aerobik bir metabolizmada, total  $O_2$  tüketiminden % 1-2 oranında SOR oluşmaktadır. Uyarılmış makrofajlardan ve lökositlerden de, inflammatuar reaksiyonlar sırasında SOR üretimi gerçekleşmediği bilinmektedir (86, 92, 93).

Histolojik olarak, İBH'da; ÜK'de mukozada, CH'da barsak duvarının derin katmanlarında, inflammatuar hücreler tarafından şiddetli bir infiltrasyon olduğu görülmüştür. Lenfosit ve plazma hücreleri yanında, nötrofil ve makrofajların da barsak dokusunda arttığı, nötrofil ve makrofajlar tarafından, yüksek miktarlarda SOR üretimi gerçekleştiği gösterilmiştir (94-97). Bununla birlikte, İBH'lı hastalarda ve deneysel kolit modellerinde hayvanlarda, kontrollere göre inflamasyonlu kolon mukozasında, çok daha fazla SOR üretimi olduğu gösterilmiştir (95-97).

Brody ve arkadaşları, İBH'da antioksidan savunma mekanizmalarında azalma olduğunu, İBH hastalarının mukozasında, SOD düzeyinin düşük olduğunu göstermiştir (12). Başka bir çalışma ile de, ÜK ve CH hastalarının inflame barsak mukozasında, total glutatyon düzeylerinin, inflamasyon olmayan mukozal alanlara göre daha düşük olduğunu gösterilmiştir (13). Başka bir çalışmada, ÜK'li hastaların, inflamasyonlu kolon mukozasında, GSH yokluğunda, GSSG yüksek miktarlarda saptanmıştır (98). Kontroubakis ve arkadaşları tarafından yapılan başka bir çalışmada, İBH'lı hastaların kolon mukozasında total serum plazma antioksidan kapasitesinin, kontroller ile karşılaştırıldığında hastalık aktivitesinden bağımsız olarak düşük bulunduğu gösterilmiştir (99). Elimizdeki veriler inflamasyonlu kolon mukozasında artmış SOR üretiminin ve antioksidan kapasitede azalmanın, kronik inflame kolon mukozasında önemli büyüklükte oksidatif strese neden olduğunu göstermektedir (94).

### 2.2. İnflamatuar Barsak Hastalığında Klinik Özellikler

CH, gastrointestinal kanalın herhangi bir bölümünde tutulum yapabilirken, sıklıkla distal ileum ve kolonu tutmaktadır (1). ÜK ise yalnızca kolonda tutulum yapmaktadır (1). CH ve ÜK'in farklı klinik, laboratuvar, endoskopik ve histolojik

bulguları olmasına rağmen her iki hastalık arasında bazı ortak noktalar mevcuttur (100). İBH'da gözlenen klinik bulgular Tablo 2.1'de gösterilmektedir.

İBH'da ekstraintestinal bulgular da gözlenmektedir. Sık görülen barsak dışı bulgulara, karaciğer, kemik, eklem, deri ve gözlerde rastlanmaktadır (100). Ekstraintestinal bulgular genellikle intestinal hastalıktan önce tespit edilmektedir; periferik artrit, eritema nodosum ve episklerit, hastalığın aktivitesine paralellik gösterirken, sakroileit, ankilozan spondilit, pyoderma gangrenozum, anterior üveit, ve primer sklerozan kolanjit ile hastalık aktivitesi arasında paralellik yoktur (101, 102). İ.B.H'da gözlenen klinik bulgular Tablo 2.2'de gösterilmiştir.

**Tablo 2.2: İnflamatuvar Barsak Hastalıklarında Klinik Bulgular**

Belirti/Bulgular	Ülseratif Kolit	Crohn Hastalığı
Tutulan barsak bölgesi	Kolonun iç yüzeyinde, devam eden yüzeyel lezyonlar şeklinde,	Çoğunlukla, ileumun alt kısmında, olmak üzere kolonda ve ince barsakta, etkilenen alanlar arasında normal dokular yama tarzında görülebilmektedir.
Diyare	Günde 4-5 atak halinde	Günde 4-5 atak halinde
Karın ağrısı	Hafif hassasiyet / alt karın bölgesinde kramp.	Karın sağ alt kadranda, ortadan, şiddetli dereceye varan hassasiyet.
Kanlı dışkılama	Hastalık şiddeti ile ilişkili olarak görülebilir.	Hastalık şiddeti ile ilişkili olarak görülebilir.
Halsizlik	Aşırı kan kaybının ve aneminin sonucunda görülebilmektedir.	Aşırı kan kaybı, anemi ve besin emiliminde yetersizlik sonucunda görülebilmektedir.
Ateş	Şiddetli vakalarda düşük dereceli	Şiddetli vakalarda düşük dereceli
Fizik muayene	Rektal muayenede; perianal irritasyon, fissür, hemoroid, fistül ve abse görülebilmektedir.	Peritoneal irritasyon bulguları, karında ve pelviste kitle
Kilo kaybı/iştahsızlık	Daha şiddetli vakalarda kilo kaybı	Barsak emiliminde ve sindirimde yetersizlik sonucunda, kilo kaybı ve iştahsızlık sıktır.
İştah	Hastalık alevlenmelerinde sıklıkla azalmıştır.	Hastalık alevlenmelerinde sıklıkla azalmıştır.
Kolon kanseri riski	Artmıştır	Artmıştır

Hastaların CH ve ÜK olarak doğru bir şekilde değerlendirilip tanı konması, medikal ve cerrahi tedavi rejimlerinin seçimi açısından önemlidir (100). CH'da görülen transmural inflamasyonlar, fistül, fissür ve darlık gelişimine neden olabilirler. Fistüller, iki barsak lup'u arasında, barsak ile cilt arasında veya barsak ile diğer safra kesesi gibi diğer bir organ arasında görülen anormal bağlantılardır.



Darlıklar sıklıkla barsak obstrüksiyonuna neden olurlar ve cerrahi rezeksiyon veya striktüroplasti ile tedavi edilebilirler (103).

Şiddetli karın ağrısı ve hassasiyet, abdominal distansiyon, azalmış barsak hareketleri, rebound hassasiyet, ateş ve taşikardi gibi semptom ve bulgular, toksik megakolon'un belirtisi olabilir. Toksik megakolon, sıklıkla ÜK ile birliktelik gösterirken, CH'da da gözlenmektedir (104).

CH ve ÜK'li hastalarda kolon kanseri gelişimi riski artmıştır (105, 106). En yüksek kolon kanseri riski, inflamasyonun splenik fleksuranın ilerisine yayıldığı vakalarda bulunmaktadır (107).

### 2.3. İnflamatuvar Barsak Hastalıklarında Tedavi

İBH'da medikal tedaviler, remisyonun indüksiyonunu ve idamesini amaçlar ve immün yolaktaki çeşitli noktalar hedeflenerek geliştirilmişlerdir.

İBH'da kür sağlanamamaktadır ancak, remisyonun indüksiyonunu ve devamını sağlayan tedavi yöntemleri kullanılabilir. Son zamanlarda, CH ve ÜK tedavisinde anti-TNF kullanımına yönelik önemli gelişmeler elde edilmiştir. CH ve ÜK tedavisinde, 5-ASA bileşikleri temel tedavi basamağı olmasına rağmen, CH'da özellikle idame tedavisindeki etkinliği bakımından şüpheler bulunmaktadır. Antibiyotiklerin kolonik CH tedavisindeki etkileri ise sınırlıdır. Steroidler diğer konservatif tedavi yöntemlerine yanıtız aktif hastalığı olanlarda, ilk seçenek olarak tercih edilmektedir. Sistemik olmayan, oral ve rektal uygulanan, Budesonid gibi steroidler, ileal ve sağ kolon CH ve distal tip ÜK'de, hafif ve orta dereceli hastalıkta etkilidir. 6-merkaptopürin (6-MP) ve azatiyopirin (AZA), CH ve ÜK tedavisinde, remisyonun devam ettirilmesinde steroid tedavisi yerine kullanılabilen etkili immünomodülatörlerdir. Metotreksat (MTX), CH'da remisyonun indüksiyonunda ve idamesinde kullanılan folat analogudur ve etkisini dihidrofolat redüktaz enzimini inhibe ederek gösterir. İnfliksimab ve adalimumab, CH'da, Amerika Birleşik Devletleri (A.B.D)'de ve Avrupa'da onaylanmış anti-TNF- $\alpha$  etkili moleküllerdir. ÜK'de ise, infliksimab kullanımı onay alan biyolojik ajandır (1).

İBH, yaşam boyunca, çok yönlü klinik özellikler ile karşımıza çıkabileceğinden dolayı, İBH olan hastalar birçok farklı yönden değerlendirilmelidirler (100). Beslenme, psikososyal destek, intestinal hastalığın ve

ekstraintestinal manifestasyonların kontrolü, İBH tedavisinde önemlidir (100). Hastalar sağlık kurumları ile yakın ve uzun süreli ilişkiler içerisinde olmalı, bulantı, kusma, ishal, ve karın ağrısı gibi yakınmalarına yönelik semptomatik tedavi alabilmelidirler (11).

Patogenezinde, gastrointestinal sistemde, mukozal immün sistem düzenlenmesindeki bozukluğun önemli rol oynadığı düşünülen İBH'nın patogenezi kesinlik kazanmamıştır (2). İBH etiyojisi kesin olarak aydınlatılmadığından dolayı da etkili bir tedavi yöntemi de geliştirilememiştir (2).

**a) Aminosalisilatlar:** Bu grup ilaçlar, ÜK ve CH'da, remisyona sağlanmasında ve devamında temel basamağı oluşturmaktadır (100). Sulfasalazin, sulfapiridin ve 5 aminosalisilat (5-ASA)'ın azo bağı ile bağlanması ile meydana gelmektedir (100). Kolonda bakteriel flora tarafından bağın parçalanması ile 5-ASA salınmakta ve salınan 5-ASA lokal olarak inflamasyonu azaltmaktadır (100, 108). 5-ASA, prostaglandinlerin ve lökotrienlerin üretimini, kemotaksisi engeller, aynı zamanda oksijen radikallerini yakalayıcı etkisi vardır ve NF- $\kappa$ B'yi inhibe ederek etkisini göstermektedir (100).

Yakın zaman önce, 5-ASA'nın selektif olarak, hücre proliferasyonunu ve apoptozisi kontrol eden, nükleer bir reseptör olan, PPAR- $\gamma$ 'ı uyardığı gösterilmiştir (1, 109). Sulfapyridine molekülleri ise kolondan emilir ve yüksek serum düzeyine ulaşabilmektedir.

Sulfasalazin'in yan etkilerinin çoğu sulfapyridin'den kaynaklanmaktadır (100). Sulfasalazini tolere edemeyen %10-%20 hasta grubuna 5-ASA'ya karşı intolerans vardır. 5-ASA'nın tek başına uygulanan formuna meselamin denmektedir (100, 110).

**b) Antibiotikler:** Antibiotikler luminal florayı değiştirerek ve mukozal immün sistemin uyarılmasını azaltarak etki etmektedir (100). Metronidazol aktif perianal ve kolonik CH'da etkilidir (100). Metronidazole'ün daha çok poşit tedavisinde birinci basamak tedavi olması önerilmektedir (110, 111).

Metronidazol, siprofloksasin, kombine antimikobakteriyeller ve son zamanlarda ornidazol ve rifaksimim, aktif CH'nın tedavisinde kullanılmaktadır (100). Antibiotikler sıklıkla perianal hastalık tedavisinde kullanılmaktadır. Aktif luminal

hastalığıdaki rolleri ve postoperatif tedavideki uygun ve etkin dozları netlik kazanmamıştır (1).

**c) Kortikosteroidler:** Birçok hücre tipinde, intrasitoplazmik glukortikoid reseptörlerine bağlanan glukortikosteroidlere yanıt olarak, immün sistemde lenfositlerin, monositlerin ve makrofajların proliferasyonunu, nötrofillerin inflamasyona olan göçünü ve sitokinlerin, lökotrienlerin ve prostoglandinlerin üretimini inhibe eden maddeler salgılanır (1).

Kortikosteroidler, CH ve ÜK'in remisyon indüksiyonunda güçlü antiinflamatuvar etkiye sahip olsalar da, remisyonun idamesinde etkili değildir (11, 112, 113). Kortikosteroidlere genel olarak 7-10 gün arasında yanıt alınmaktadır. Kronik kortikosteroid kullanımı ciddi yan etkileri nedeni ile sınırlıdır. Oral ve intravenöz formlarının yanında, distal CH ve ÜK'de enema şeklinde topikal olarak da uygulanabilir (100). Sistemik kortikosteroidlerin yan etkilerinden dolayı, araştırmalar, daha az toksik olan kortikosteroid türleri üzerine yoğunlaşmıştır (100). Budesonidin ilk geçişi % 90 oranında karaciğerden olduğundan, daha az sistemik yan etkisi vardır (100). Budesonid, distal ileal ve sağ kolonik hastalık için etkili bir geleneksel kortikosteroid tedavi rejimi olmakla birlikte, transvers ve distal kolonik hastalıkta daha az etkilidir (114, 115). İBH'da kullanılan diğer kortikosteroid tedavileri gibi, budesonid de remisyonun idamesinde etkili değildir (100).

#### **d) İmmünsüpresif tedaviler**

**AZA/6-MP:** 6-MP ve ön ilacı olan AZA, 6-tiyoguanin (6-TG) nükleotidlerine dönüşen pürin analoglarıdır (1). Aktif metabolitleri nükleik asit sentezini engeller ve uyarılmış lenfositler üzerinde antiproliferatif etkileri vardır. Son zamanlarda apoptozisi uyardıkları da gösterilmiştir (116,117).

AZA ve 6-MP'nin, CH'da remisyonun uyarılmasında ve devam ettirilmesinde etkili olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur (118,119). Aktif hastalıkta en iyi tedavi rejimi başlangıçta steroid gibi diğer bir indüksiyon tedavisi ile birlikte tedaviye başlanması, sonrasında takipler ile doz ayarlaması yapılmasıdır(1).

**Metotreksat:** Metotreksat bir folat analogudur ve dihidrofolat redüktaz'ın (DHFR) kompetitif inhibitörüdür (1). Metotreksat DNA sentezini engeller ve azalmış proinflamatuvar sitokin üretimi ve lenfosit apoptozu gibi antiinflamatuvar

etkileri mevcuttur (1). Metotreksat, CH'da remisyon idüksiyonunda ve idamesinde etkilidir (120, 121).

**Siklosporin:** Siklosporin şiddetli ÜK'de kullanılmaktadır (122). İ.v kortikosteroid tedavisine dirençli hastaların %50-80'i, i.v siklosporin tedavisi ile kolektomiden kurtulmaktadır (122).

**Mikofenolat mofetil:** Mikofenolat mofetil, mikofenolik asidin esterleştirilmiş bir ön ilacıdır. Mikofenolat mofetil yalnız guanozin nükleotidlerinin sentezini inhibe etmekle kalmayıp, T ve B hücrelerinin etkilerini dolaylı yollardan engeller. Bunlarla birlikte intestinal düz kas ve fibronektin sentezini engelleyerek darlık oluşumunu azaltabilir (1).

**Takrolimus:** Takrolimus öncelikli olarak allograft reddini engellemek için, kullanılan makrolid grubu antibiyotiktir (1). Siklosporine benzer şekilde kalsinörin'e bağlanır ve uyarılmış T lenfosit transkripsiyonunu baskılayarak ve T hücresi apoptozunu uyararak, IL-2, TNF- $\alpha$  ve IFN- $\gamma$  gibi proinflamatuvar sitokinlerin düzeylerini azaltır. Aynı zamanda IL-10 ve TGF- $\beta$  salınımını artırabilir ve barsakta lokal etkileri bulunmaktadır (1).

#### e) Biyolojik ajanlar

**İnfliksımab:** % 75 fare/% 25 insan anti-TNF- $\alpha$  monoklonal antikorudur. TNF- $\alpha$ , İBH patogeneğinde, merkezi birçok proinflamatuvar sürece aracılık eder (100). İnfliksımab, lüminal refrakter ve fistülide CH için önemli bir tedavi seçeneğidir (100). Önceleri çözünmüş haldeki TNF- $\alpha$ 'ya bağlanarak etki gösterdiğine inanılan İnfliksımab, temel olarak membrana bağlı TNF- $\alpha$ 'ya bağlanarak, antikor bağımlı hücre aracılı sitotoksosite ile hücre lizisine yol açarak veya kompleman fiksasyonu ile ve apoptozis ile etkisini göstermektedir (123).

**Adalimumab:** İnsan TNF- $\alpha$ 'sına karşı yüksek affinite ile bağlanan insan derive ağır ve hafif zincir değişken bölgeleri ile insan IgG1 sabit bölgesi içeren, rekombinan insan IgG1 monoklonal antikorudur. Adalimumab, A.B.D ve Avrupada, CH tedavisinde onaylanmıştır. Yapılan çalışmalarda, CH'da adalimumab grubunda, plasebo grubuna göre önemli oranda yüksek remisyon oranları izlenirken, adalimumab alan grupta steroid tedavisine göre önemli oranda daha az devam edildiği ve tama yakın fistül iyileşmesi görüldüğü bildirilmiştir (124).

**Sertulizumab:** Sertulizumab pegol veya CDP870 Fab fragmanı polietilen glikol ile kimyasal olarak bağlı monoklonal insan anti-TNF- $\alpha$  antikoru. İnfliximab ve adalimumab'ın aksine apoptozisi indüklemeyiz. Sertolizumab, CH'nin remisyon indüksiyonu ve idame tedavisinde denenmiştir ve plaseboya göre klinik cevap ve remisyon oranları belirgin olarak daha iyi bulunmuştur (1)

**Fontalizumab:** Geniş proinflatuar aktivitesi olan IFN- $\gamma$ , deneysel hayvan kolit modellerinde ve CH'da mukozada yüksek düzeyde bulunmuştur. Fontalizumab, IFN- $\gamma$  antikoru. CH'da fontalizumab alan grupta, plaseboya göre daha yüksek yanıt oranları gösterilmiştir (1).

**Selektif adezyon molekül inhibitörleri:** Vasküler alandan inflamasyonlu dokuya lökosit göçü, lökosit ve endotel arasındaki etkileşimler ile olmaktadır. İnflame endotelyum'a lökosit adezyonu öncelikle  $\alpha$ -4 ve  $\beta$ -2 integrinleri ile gerçekleşmektedir.  $\alpha$ -4 integrin, bütün beyaz kürelerde sentezlenmektedir.  $\alpha$ -4 integrini tanıyan endotelial ligandlar vasküler hücre adezyon molekülü (VCAM-1) ve mukozal adresin hücre adezyon molekülüdür (MadCAM-1). Natalizumab,  $\alpha$ -4 integrini hedefleyen bir rekombinant antikordur. MLN02 $\alpha$ 4 $\beta$ 7 ise heterodimerini tanıyan monoklonal bir antikordur (1).

**Diğer Biyolojik ajanlar:** Visilizumab, insan IgG2 monoklonal antikoru ve uyarılmış T hücreleri tarafından salgılanan, T hücrelerinin CD3 zincirine bağlanır. IL-6 ise CH patogenezinde inflamatuvar süreçte önemli rolü olan bir sitokindir. IL-6 sitokinine karşı monoklonal bir antikoru olan , IL-6R'un, deneysel kolit modellerinde, adezyon moleküllerinin ve multiple proinflatuar sitokinlerin salgılanmasını azalttığı gösterilmiştir. IL-12, Th1 aracılı inflamatuvar yanıtta önemli bir sitokindir. Anti-IL-12 antikoru ile olan klinik yanıtta, kolonik mononükleer hücrelerden IL-12, IFN- $\gamma$  ve TNF- $\alpha$  salınımında azalma olduğu görülmüştür. Talidomid'in, anti-TNF- $\alpha$  ve anti-IL-12 özellikleri bulunmaktadır ve Talidomid ile İBH olanların büyük kısmında klinik yanıt ve remisyon gözlenmiştir (1).

**f) Probiotikler:** Probiotikler, CH'da indüksiyon ve idame tedavisinde denenmişlerdir. Ancak değişik probiyotikler ile yapılan küçük randomize çalışmalar ile tutarsız sonuçlar elde edilmiştir (1).

### 2.3.1. İnflamatuvar Barsak Hastalıklarında Antioksidan Tedavi ve Melatonin

Antioksidan maddelerin İBH'daki temel etkilerini araştırmak üzere, hayvanlarda yapılan deneysel kolit modellerinde, farklı antioksidan maddelerin etkili oldukları gösterilmiştir. Örneğin; Trinitrobenzensulfonik asit (TNBS) aracılı deneysel kolit modelinde, glutasyon desteğinin, kolonik hasarı ve lipid peroksidasyonunu önemli derecede azalttığı, dextran sodyum sülfat (DSS) aracılı deneysel kolit modelinde de kan glutasyon düzeylerinde düşme olduğu, fakat farklı antioksidanların kullanılması ile kan glutathione düzeyinin normale döndüğü gösterilmiştir (125, 126). Yapılan başka bir çalışmada, farelerde GSH-Px gen ailesinin üyeleri tahrip edildiğinde, yaşamlarının 2-7. haftaları arasında şiddetli ileokolit geliştirdikleri gösterilmiştir (127).

Antioksidan maddelerin, deneysel kolitin engellenmesi ve iyileştirilmesine yönelik olarak yapılan farklı hayvan İBH modellerinde, İBH seyrinde güçlü etkileri olduğu gösterilmiştir (14).

### 2.3.2. Melatonin

İlk kez 1958'de tanımlanan melatonin (N-asetil-5-metoksitriptamin), (Lerner ve arkadaşları) omurgalılar tarafından pineal bezde ve başta gastrointestinal kanalda olmak üzere, bir çok farklı organda sentezlenen çok yönlü özelliği olan hormonal bir moleküldür (128). Melatonin biyosentezinde iki tane hız kısıtlayıcı enzimatik basamak mevcuttur (128). Bu enzimler ilk kez pinealositlerde tanımlanan, fakat gastrointestinal kanalda enteroendokrin (EE) hücrelerde de bulunan; arilalkilamin-N-asetil transferaz (AANAT) enzimi ve hidroksiindol-O-metiltransferaz (HIOMT) enzimleridir (128). Triptofan dolaşımından alınarak, önce serotonine dönüştürülür. Daha sonra serotonin, arilalkilamine-N-asetil transferaz (AANAT) enzimi aracılığı ile N-asetil serotonin'e dönüştürülür. N-asetil serotonin de, hidroksiindol-O-metiltransferaz (HIOMT) enzimi aracılığı ile melatonine metabolize edilir. Melatonin, sentezlendikten sonra kapiller dolaşıma salınır ve serebrospinal sıvıda daha yüksek konsantrasyonlara ulaştıktan sonra, vücuttaki diğer dokulara ulaşır (129).

Memelilerde sirkardiyan ritim, melatonin aracılığı ile hipotalamusta supraoptik kiazmada düzenlenir (129). Melatonin, salınımı karanlıkta uyarılan endojen bir nörohormon sinyaldir. Uyku ve uyanıklık döngüsü, pübertal gelişim ve mevsimsel uyumun sağlanması gibi fizyolojik görevleri vardır. Antioksidan etkisi yanında, fizyolojik etkilerinin büyük kısmını; membran MT1 ve MT2 reseptörleri aracılığı ile, kinon redüktaz 2, kalmodülin, kalretikülin, ve tübülün gibi intrasellüler proteinlerle etkileşerek göstermektedir. MT1 ve MT2 reseptörleri, G protein bağlı reseptörler olup, santral sinir sisteminin değişik bölgelerinde, kan damarları, meme bezi, gastrointestinal kanal, karaciğer, böbrek, safra kesesi, over, testis, prostat, deri ve immün sistem ile ilgili birçok periferal organda bulunmaktadır (129).

Melatoninin gastrointestinal kanalda; sirkardian uyum, serbest radikal tutucu etki ile hücre koruyucu etki, antioksidan ve antiinflamatuvar özellikler gibi bir çok etkisi vardır ve özefajit, gastrit, peptik ülser, pankreatit ve kolit gibi gastrointestinal lezyonlar üzerinde iyileştirici etkisi bildirilmiştir (128).

### 2.3.3. Melatonin Metabolizması

Dolaşımdaki melatonin, temel olarak karaciğerde iki basamakta metabolize edilmektedir. Birinci basamak, sitokrom p450 monooksijenazlar (CYP1A2, CYP1B1), ve daha az oranda CYP1B1 ile 6. karbonun hidroksilasyonu ile 6-hidroksimelatoninin oluşturulduğu basamaktır. Bu ürün, daha sonra sulfotransferaz ile sulfat ile konjuge edilerek, 6-sulfomelatonin veya UDP-sulfoglukotransferaz ile glukronik asit ile konjuge edilerek 6 hidroksimelatonin glukoronid oluşturulur (130).

İkinci alternatif katabolik yol ise indol bağının, indol amin 2-3 dioksijenaz ile veya miyeloperoksidaz ile okside edilerek açılması ile, N1-asetil-N2-formil5-metoksiknüramin (AFMK) ara ürününün oluşması, akabinde de daha stabil olan N1-asetil-5 metoksiknüramin'e (AMK) dönüştürülmesidir. Melatonin hücre içinde ve hücre dışında nonenzimatik olarak serbest radikaller ve diğer oksidanlar ile de metabolize edilmektedir (131,132).

Melatoninin antioksidan ve antiinflamatuvar etkinliği de, AFMK ve ANK gibi knüramine formları ile gerçekleştirilir (132, 133). Küçük miktarlarda melatonin ise idrar ile değişmeden atılır. Melatonin yüksek lipofilité özelliği nedeni ile biyolojik membranların hepsini geçerek vücuttaki her hücreye ve her hücre içi

organelle ulaşır. Melatonin'in birçok biyolojik etkisi membran reseptörleri aracılığı ile gerçekleşirken, bazı etkileri reseptör bağımsızdır (134-136). MT1, MT2, MT3 ve diğer reseptörler ile uyku eğilimi, uyku/uyanıklık hali, sirkardian ritim, kan basıncı regülasyonu, immün sistem aktivasyonu, serbest radikallerin detoksifikasyonu, GIS mukozasının, pankreasın ve karaciğerin zehirli antijenlere karşı korunması, tümör büyümesi, kemik formasyonu ve birçok durumu içeren fizyolojik fonksiyonların uyarılması gerçekleşmektedir (134).

#### **2.3.4. Pineal ve Gastrointestinal Melatonin Arasındaki Farklılıklar**

Yapılan araştırmalar, pineal bez kaynaklı ve gastrointestinal sistem kaynaklı melatonin arasında temel farklılıklar olduğunu göstermiştir. Pineal bezde üretilen melatonin, daha çok endokrin etki gösterirken, ekstrapineal melatoninin, parakrin ve otokrin etkisi vardır (137, 138). Gece salgılanan melatoninin pineal kaynaklı, gündüz salgılanan melatoninin çoğunlukla gastrointestinal kaynaklı olduğu kabul edilmektedir (139). Gastrointestinal dokudaki melatoninin konsantrasyonları, kandaki konsantrasyonunun 10-100 katından fazladır. Gastrointestinal kanalın geniş yüzey alanı bulunmasından dolayı da, melatonin gastrointestinal kanalda oldukça yüksek miktarlardadır. 1994 yılında Gerald tarafından, gece ve gündüz herhangi bir zamanda, gastrointestinal kanalın, pineal bezin en az 400 katı fazla oranında melatonin içerdiği gösterilmiştir (140).

#### **2.3.5. Melatoninin GIS Mukozasında ve Karaciğerdeki Lokalizasyonu ve Sentezi**

Melatonin gastrointestinal kanalda kısmen parakrin etki gösterir, kısmen de karaciğer tarafından alınmak üzere portal dolaşıma katılır. Karaciğerde metabolize edildikten sonra safra vasıtası ile ince barsağa salınan melatonin daha sonra tekrar enterohepatik dolaşıma katılır (128).

Gastrointestinal kanalın tümünde mukozal melatonin bağlayıcı bölgeler bulunmaktadır ve melatonin bağlayıcı bölgeler, özefagusta düşük düzeylerde izlenirken, kolonda en yüksek düzeylerde (136).



### 2.3.6. Melatoninin Antioksidan Etkileri ve Gastrointestinal Patolojilerin Tedavisindeki Yeri

Melatoninin, serotonin üzerindeki inhibitör etkisinin yanında, bir vitamin olarak da tanımlanabilir ve vitamin özelliği ile, vitamin C ve E'den güçlü etkilidir (141-144). Melatonin aynı zamanda güçlü bir antioksidan ve serbest radikal tutucusudur (143-148). Melatonin, bu özellikleri ile güçlü bir antiinflamatuvardır (149, 150). Melatonin uygulanması ile gastrointestinal immün sistemin temel yapısı olan, Peyer plaklarının sayısının ve büyüklüklerinin arttığı gösterilmiştir (150). Yapılan bir çalışmada, farelere bir hafta DSS uygulanarak kolit uyarıldıktan bir hafta sonra bütün farelerde kilo kaybı, kanlı dışkılama ve gıda alımında azalma olduğu gözlenmiştir. Kolit gözlenen farelerin kolon mukozasında goblet hücreleri ve submukozada yoğun lenfosit infiltrasyonu varlığı gözlenmiştir (151). 6-7 hafta, içme suyu ile günlük DSS uygulanan farelere i.p melatonin uygulanmasının 6-7 hafta süre ile devam edilmesinin kolit bulgularında gerilemeye neden olduğu ve bütün farelerin tekrar sağlığına kavuştukları gözlenmiştir (151).

Son dönemlerde İBH tedavisinde antioksidan ajanların kullanımı gündeme gelmemiştir (14). Melatonin, antioksidan ve antiinflamatuvar özellikleri olan bir moleküldür. Bugüne kadar kesin tedavisi bulunamamış olan İBH'na çözüm getirebilmek için düzenlenen bu projede, kullanılan dekstran sülfat sodyum (DSS) kolit modeli insan ülseratif kolitine benzer özelliklere sahiptir. Melatonin bu modelde daha önce kullanılmış olmakla birlikte, biz çalışmamızda içme suyu ile bir hafta süre ile günlük DSS uygulanması ile oluşturulan akut kolit modelinde, melatoninin koruyucu ve tedavi edici etkinliğini araştırdık.

### 2.4. DSS Kolit Modeli

DSS ilk defa Okayasu ve arkadaşları tarafından kolit gelişiminde lökositlerin rolünü araştırmak üzere kullanılmış ve oral yoldan % 5 DSS uygulanmasının, yalnız akut koliti değil, aynı zamanda kronik koliti de uyardığı gösterilmiştir (152). 5-7. gün arasında günlük içme suyu ile birlikte %3-%5 DSS uygulanmasının, komplet kript kaybı, kolon epitelinin yenilenmesinde yavaşlama ile seyreden yaygın hasara neden olduğu gösterilmiştir. Bu yenilenmenin asetik asit ve etanol gibi maddeler ile yapılan diğer akut kolit modellerinden daha yavaş olduğu

gözlenmiştir (153). Bu modeldeki klinik özellikler kilo kaybı, dışkı kıvamının yumuşaması/diare ve rektal kanamadır. Histopatolojik incelemeler, yaygın kript ve epitelyal hasar, granülosit ve mononükleer hücrelerin yaygın infiltrasyonu ve sıklıkla ülserasyonun eşlik ettiği doku ödemi oluştuğunu göstermiştir. DSS kolit modeli, kronik kolit modelinden daha çok akut modelidir ve patolojik skorlama genelde kolonun en şiddetli etkilenen kısmı olan distal segmentinde yapılmaktadır (153).

Farelerde gözlenen lezyonlarda, makrofajlardan IL-1 $\beta$ , IL-6 ve TNF- $\alpha$  üretiminin artmış olduğu gösterilmiştir. Luminal bakterilerin, DSS kolitindeki etkileri net olmamasına rağmen, DSS koliti antibiyotikler ile tedavi edilebilmektedir (153). DSS kolitinin en erken akut bulgusu yaygın kript hasarıdır. Kronik fazda (DSS verilmesi kesildikten 14 gün sonra), yara iyileşmesi görülen bölgelerin lamina propriasında, bazal kısımlarda CD4+ T hücreleri ve makrofajların, en sık bulunan hücreler olduğu gözlenmiştir. CD4+ T hücrelerinden, yüksek seviyelerde IFN- $\gamma$  ve IL-4 üretildiği ve bu durumun, Th1 ve Th2 hücrelerinin her ikisinin de immün uyarımına neden olduğu, ve kronik DSS aracılı kolitinde patojenik bir etkisi olduğunu gösterilmiştir (154).

### 3. MATERYAL VE METOD

Bu çalışma; Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Araştırma Merkezi, Biyokimya ve Patoloji Laboratuvarlarında gerçekleştirildi. Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulundan onay alındı ve çalışmamız etik kurul kurallarına uygun olarak yapıldı.

#### 3.1. Materyal

##### 3.1.1. Deneysel Hayvanları

Bu çalışmada; 18 haftalık, 200-250 gr ağırlığında 76 adet erkek Wistar-albino rat kullanıldı. Hayvanlar deney süresince standart nem, ışık (12 saat gün ışığı/12 saat karanlık) ve ısı koşullarında (23 °C) bulunduruldu ve standart rat yemi ile beslendi. Kaprofajiyi önlemek için kafes içine tel altlıklar yerleştirildi.

Her bir ratın yediği yem ve içtiği su/D.S.S miktarının belirlenmesi için ratlar tekli kafeslere konuldu. Ağırlık değişimlerinin belirlenmesi amacıyla çalışma boyunca her gün ratların ağırlıkları kaydedildi.

##### 3.1.2. Kullanılan Malzeme ve Aletler

**Tablo 3.1:** Kullanılan malzeme ve aletler

1	Soğutmalı santrifluj	(Eppendorf MR - 5415, Almanya)
2	Derin dondurucu	(Facis, Fransa)
3	Hassas terazi	(Scaltec, İsviçre)
4	Vorteks (karıştırıcı)	(Nüve NM 100, Türkiye)
5	Otomatik pipetler	(Gilson, Fransa), (Eppendorf MR 5415, Almanya)
6	UV spektrofotometre	(Shimadzu UV - 1601, Japonya)
7	Homojenizatör	(Ultra Turrax - T25, Almanya)
8	Sonifikatör	(Bandelin Sonoplus, Almanya)
9	Otoklav	(Nüve EN 500, Türkiye)
10	Melatonin	(Sigma-M5250, Amerika Birleşik Devletleri )
11	DSS	(Fluka-RA10585, Fransa )
12	MPO	(Immundiagnostik AG - K6631-061109, Almanya)
13	TNF- $\alpha$	(BioSource – KRC3011, Amerika Birleşik Devletleri)
14	IL-10	(BioSource – R121212A, Amerika Birleşik Devletleri)
15	MDA	(BioSource - KRC0101, Amerika Birleşik Devletleri)

### 3.2. Metod

#### 3.2.1. Rاتların Beslenme Modeli

Tüm ratların beslenmesinde standart rat yemi kullanıldı. Kontrol gruplarına deney boyunca standart çeşme suyu verildi. Deney gruplarına ise çeşme suyu içinde çözülmüş (%2,5 DSS (w/v), Molekül Ağırlığı 5 000 ile 10 000 arasında) solusyonu verildi. Melatonin, (Absolü etanol ve % 0,9 NaCl (1/10) oranında) çözümlenerek i.p uygulandı. Tüm grupların içtikleri çeşme suyu ve uygulanan i.p melatonin 12 saat arayla kontrol edilerek kaydedildi.

#### 3.2.2. Kolit Uyarılması

Deney gruplarına çeşme suyu içinde çözülmüş DSS %2,5 (w/v), Molekül Ağırlığı (5 000 ile 10 000 arasında) solusyonu verildi. DSS solusyonu, 12 saatte bir yeniden hazırlanıldı ve tüketilen miktar kaydedildi.

#### 3.2.3. Deney Gruplarının Oluşturulması ve Deneyin Yapılması

**DSS ile eş zamanlı Melatonin uygulama kolu:** (Kontrol grubunda 6, diğerlerinde 8 sıçan):

- 1) Grup (Kontrol):
  - 1-7. günlerde normal çeşme suyu içtiler.
  - 1-7. günler, ip melatonin çözgen sıvısı (MÇS) uygulandı.
- 2) Grup (Model grup):
  - 1-7. günlerde %2.5 DSS'li su içtiler.
  - 1-7. günler, ip MÇS uygulandı.
- 3) Grup (Melatonin 0.5 mg/kg):
  - 1-7. günlerde %2.5 DSS'li su içtiler.
  - 1-7. günler, ip 0.5 mg/kg melatonin uygulandı.
- 4) Grup (Melatonin 1 mg/kg):
  - 1-7. günlerde %2.5 DSS'li su içtiler.
  - 1-7. günler, ip 1 mg/kg melatonin uygulandı.

## 5) Grup (Melatonin 2 mg/kg):

- 1-7. günlerde %2.5 DSS'li içtiler.
- 1-7. günler, ip 2 mg/kg melatonin uygulandı.

Deneyin sonlandırılması: Sekizinci gün sabah, intraperitoneal ketamin 80 mg/kg + xylazine 10 mg/kg uygulanarak anestezide edilen sıçanların ağırlıkları ölçüldü. Servikal dislokasyondan sonra, batinları midline insizyonla açıldı (Diğer işlemler aşağıda açıklanmıştır).

**DSS sonrası Melatonin uygulama kolu:** (Kontrol grubunda 6, diğerlerinde 8 sıçan):

## 1) Grup (Kontrol):

- 1-7. günlerde normal çeşme suyu içtiler.
- 8-14. günler, ip melatonin çözgen sıvısı (MÇS) uygulandı.

## 2) Grup (Model grup):

- 1-7. günlerde %2.5 DSS'li su içtiler.
- 8-14. günler, ip MÇS uygulandı.

## 3) Grup (Melatonin 0.5 mg/kg):

- 1-7. günlerde %2.5 DSS'li su içtiler.
- 8-14. günler, ip 0.5 mg/kg melatonin uygulandı.

## 4) Grup (Melatonin 1 mg/kg):

- 1-7. günlerde %2.5 DSS'li su içtiler.
- 8-14. günler, ip 1 mg/kg melatonin uygulandı.

## 5) Grup (Melatonin 2 mg/kg):

- 1-7. günlerde %2.5 DSS'li su içtiler.
- 8-14. günler, ip 2 mg/kg melatonin uygulandı.

Deneyin sonlandırılması: 15. gün sabah, intraperitoneal ketamin 80 mg/kg + xylazine 10 mg/kg uygulanarak anestezide edilen sıçanların ağırlıkları ölçüldü. Servikal dislokasyondan sonra, batinları midline insizyonla açıldı (Diğer işlemler aşağıda açıklanmıştır).

#### 3.2.4. Doku Örneklerinin Alınması

DSS ile eş zamanlı melatonin uygulama kolundaki ratlar, 8. günü ve DSS sonrası Melatonin uygulama kolundaki ratlar, 15. günü sabahı intraperitoneal ketamin (80 mg/kg) + xylazine (10 mg/kg) ile anestezide edilen sıçanların:

Önce ağırlıkları tartıldı.

Servikal dislokasyonla yaşamlarına son verildi.

Ratların mid-line insizyonla batinları açılarak kolonları tümüyle (kolo-çekal bileşkeden, anüse kadar) çıkarıldı.

Kolon longitudinal olarak açıldı. Kolon PBS ile yıkanarak kurutma kağıdı ile kurutuldu.

Tüm kolon ağırlığı tartıldı.

Tüm kolonun uzunluğu ölçüldü.

Kolonun distal 10 cm'lik bölümü ayrıldı.

Distal 10 cm'lik bölümün ağırlığı ölçüldü.

Daha önce longitudinal olarak açılan kolon, sonra longitudinal olarak tümüyle ikiye ayrıldı. Sol laterali histolojik incelemede kullanıldı. Kolonun sağ laterali, biyokimyasal incelemelerde kullanıldı.

#### 3.2.5. Klinik Değerlendirme

Çalışma süresince ratların klinik değerlendirmesi, Cooper ve arkadaşlarının geliştirdiği bir yöntem olan, hastalık aktivite indeksi (HAI) değerlendirmesi ile yapıldı (133). İndekste vücut ağırlığı, aşikar rektal kanama ve dışkı kıvamının incelenmesi yer almaktadır. Deneysel kolit modellerinde, HAI günlük olarak hesaplanmakta ve DSS aracılı kolite yönelik tedavi denemelerinde, HAI skorlarında düşme gözlenmesi yol gösterici olmaktadır. Her parametre 0 ile 4 arasında değişen bir skala ile evrelendirilip, her 3 skorun toplanması ve sonucun ortalamasının

alınması ile elde edildi. Çalışmamızda ratların HAI'i günlük olarak hesaplandı (153). HAI skorlandırma metodu Tablo 3.2'de gösterilmiştir.

**Tablo 3.2. HAI**

Skor	Kilo kaybı	Dışkı kıvamı	Rektal kanama
0	(-)	Normal	Normal
1	1-5		
2	5-10	Yumuşak	
3	10-20		
4	>20	İshal	Rektal kanama

### 3.2.6. Kolitin Mikroskopik Değerlendirmesi

Sakrifiye edilen ratlardan alınan kolon örnekleri % 10'luk formaldehit kullanılarak fikse edildi. Parafin bloklar oluşturuldu. Oluşturulan parafin bloklardan 5 µm kalınlığında kesitler alınarak lam üzerinde preparatlar hazırlandı. Histopatolojik inceleme için hazırlanan preparatlar hematoksilin ve eozin (H&E) ile boyanarak ışık mikroskopunda (x100, x200 ve x400 büyütmede) değerlendirme yapılarak lezyonlar skorlandı (155).

**Tablo 3.3: Kolitin Mikroskopik Değerlendirmesi**

Özellik	Skor
<b>Epitel</b>	
Normal morfoloji	0
Goblet hücrelerinde kayıp	1
Geniş alanlarda goblet hücre kaybı	2
Kript kaybı	3
Geniş alanlarda kript kaybı	4
<b>İnfiltrasyon</b>	
İnfiltrasyon yok	0
Kriptler çevresinde infiltrasyon	1
Lamina(L) muskularis mukozaya ulaşan infiltrasyon	2
L. muskularis mukozaya ulaşan ağır infiltrasyon ve mukozanın aşırı ödemle kalınlaşması	3
L. submukozanın infiltrasyonu	4

### 3.2.7. Örneklerin Homojenizasyonu ve Deney İçin Hazırlanması

Kolon dokularının homojenizasyonunda ve biyokimyasal çalışmalarda pH:7.4 olan 0.05M PBS kullanıldı.

Homojenizasyon işlemi başlangıcında kolon dokularının yaş ağırlıkları tartıldı. Dokuların soğukluğu muhafaza edilerek cam tüpe konuldu. Dokuların üzerine ağırlığının 10 katı olacak şekilde tampon ilave edilerek miktarları kaydedildi. Plastik kaplar içine buz dolduruldu ve cam tüpteki dokular plastik kapların içerisine yerleştirilerek 16000 devir/dakika hızda homojenize edildi. Daha sonra buz dolu plastik kaplar içinde 30 saniye sonifikasyon yapıldı. Homojenatlar; ısı arttırılmadan, 5000 devir/dakika hızında 10 dakika süreyle santrifüj edilerek süpernatantları eppendorf tüplerine konuldu. Tüpler numaralandırıldı. Dokuların yaş ağırlıkları ve eklenen tampon miktarı kaydedildi (75).

### 3.2.8. Dokularda Biyokimyasal Analizler

Biyokimyasal analizler Süleyman Demirel Üniversitesi Biyokimya Anabilim Dalı laboratuvarında yapılmıştır.

Kolon dokusunda;

MPO (Immun diagnostik ELISA)

TNF- $\alpha$  (Biosource ELISA)

IL-10 (Biosource ELISA) aktiviteyi ELISA ile çalışıldı.

MDA (Immundiagnostik HPLC) seviyesi HPLC yöntemi ile ölçüldü.

Homojenat protein tayini Lowry metodu ile yapıldı (156).

**Myeloperoksidaz:** MPO, nötrofillerde ve daha küçük miktarlarda, makrofaj ve monositlerde bulunmaktadır. Nötrofillerden oluşan örneklerde, MPO aktivitesi, hücre sayısı ile doğrudan ilişkili olduğu gösterilmiştir ve MPO ölçümü, akut intestinal inflamasyonun derecesini değerlendirmek için faydalı bir yöntemdir (157). DSS'nin %0,5'lik oranında uygulandığında, kolon dokusunda, lökositoz ile birlikte, MPO aktivitesinde artışa neden olduğu bildirilmiştir (158).

**IL-10:** İlk defa 1989 yılında, bir sitokin-sentez inhibitörü olarak tanımlanmıştır. IL-10'un, aktif makrofaj, monosit ve dentritik hücreler üzerine



inhibitör etkilerinin olduğu ve Th1 hücreleri tarafından, IFN- $\gamma$  ve IL-2'yi baskıladığı bilinmektedir (159).

**Malondialdehid:** Lipid peroksidasyonu vücutta çok farklı yollar ile ölçülebilmektedir. Lipid oksidasyonunun ölçüm yöntemlerinden bir tanesi de tiyobarbitirik asid (TBA) ile etkileşen madde ölçümüdür. Dokuda TBA ile etkileşen madde ölçümü sonuçlarının hepsi lipid peroksidasyonu ile alakalı olmayabilir. TBA testinde önemli bir gelişme malondialdehide (MDA)-TBA'nın HPLC yöntemi ile izole edilmesidir. MDA lipid peroksidasyonu sonucunda oluşan aldehid ürünlerinden bir tanesidir ve serbest radikal hasarı sırasında dokularda artış gösterdiği bilinmektedir (66).

### 3.2.9. İstatistiksel Değerlendirme

Ölçüm verileri ortalama  $\pm$  standart hata şeklinde sunuldu. Histolojik skorlar hem ortalama  $\pm$  standart hata, hem de ortanca (minimum-maksimum) değerleriyle verildi. Gruplar arasındaki kantitatif verilerin farklılaşmasının önemi tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile belirlendi ve varyans analizinde anlamlı farklılaşma saptanmışsa *post hoc* Tukey testi ile ikili karşılaştırmalar yapıldı. Deney grupları arasındaki histolojik skorların farklılığını değerlendirmek için Kruskal-Wallis analizi kullanıldı. Kruskal-Wallis testi önemli farklılaşma gösterirse, hangi grubun diğerinden farklı olduğu Mann-Whitney *u* testi ile araştırıldı. Önemlilik düzeyi  $P < 0,05$  kabul edildi.

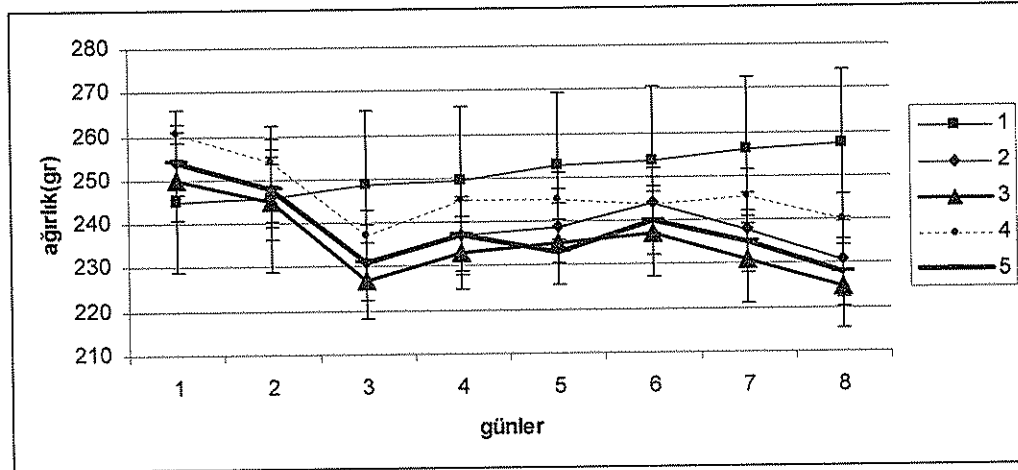
#### 4. BULGULAR (DENEY 1)

##### 4.1. Deneysel 1. Ratların Günlük Ağırlık Değişiklikleri

Ratların çalışma boyunca günlük olarak ağırlıkları ölçüldü. Çalışma süresince, ratların günlük ağırlıkları açısından gruplar arasında anlamlı farklılık saptanmadı. Ratların gruplara göre günlük ağırlık değişiklikleri Tablo 4.1'de, grafik olarak Şekil 4.1'de gösterilmiştir.

**Tablo 4.1:** DSS ile eş zamanlı melatonin verilen ratların gruplara göre günlük ağırlık değişiklikleri

		1.gün	2.gün	3.gün	4.gün	5.gün	6.gün	7.gün	8.gün
1	Kontrol	245,00±16,61	245,70±16,79	248,67±16,90	249,67±16,71	252,67±16,70	253,83±16,89	256,00±16,80	257,33±16,84
2	Model grup	254,00±7,21	248,13±7,36	231,63±8,80	237,13±8,80	239,25±8,59	244,38±8,00	238,38±8,41	231,63±8,80
3	Melatonin 0,5 mg/kg	249,75±8,81	245,25±8,76	226,88±8,72	233,38±8,29	235,00±9,16	237,50±9,75	231,63±9,72	225,63±9,49
4	Melatonin 1mg/kg	260,50±5,68	254,13±5,39	237,13±5,76	245,50±4,99	245,75±6,32	243,75±6,40	245,38±6,24	240,50±5,75
5	Melatonin 2mg/kg	253,87±8,82	248,75±8,83	231,88±8,59	237,88±8,21	233,88±7,34	240,00±7,84	235,38±6,92	228,00±7,58
	P(ANOVA)	(ns)	(ns)	(ns)	(ns)	(ns)	(ns)	(ns)	(ns)



**Şekil 4.1:** DSS ile eş zamanlı melatonin verilen ratların gruplara göre günlük ağırlık değişiklikleri

#### 4.2. Deney 1. Klinik Değerlendirme

Ratların alışma boyunca HAI günlük olarak hesaplandı.

Çalışmanın 2. ve 3. gününde, kontrol grubundaki HAI, model gruba, melatonin 0,5 mg/kg/gün, melatonin 1 mg/kg/gün ve melatonin 2 mg/kg/gün uygulanan gruba göre anlamlı derecede düşük bulundu ( $p < 0,001$ ).

Çalışmanın 5. 6. ve 7. günlerinde, hastalık aktivite indeksi, kontrol grubunda, model gruba göre anlamlı derecede düşük bulundu ( $p = 0,001$ ,  $p = 0,001$ ,  $p < 0,001$ ).

Çalışmanın 4. ve 8. günlerinde, hastalık aktivite indeksi, kontrol grubunda, model gruba ve melatonin 0,5 mg/kg/gün uygulanan gruba göre anlamlı derecede düşük bulundu (4.günde,  $p = 0,001$ , 8.günde  $p < 0,001$ ).

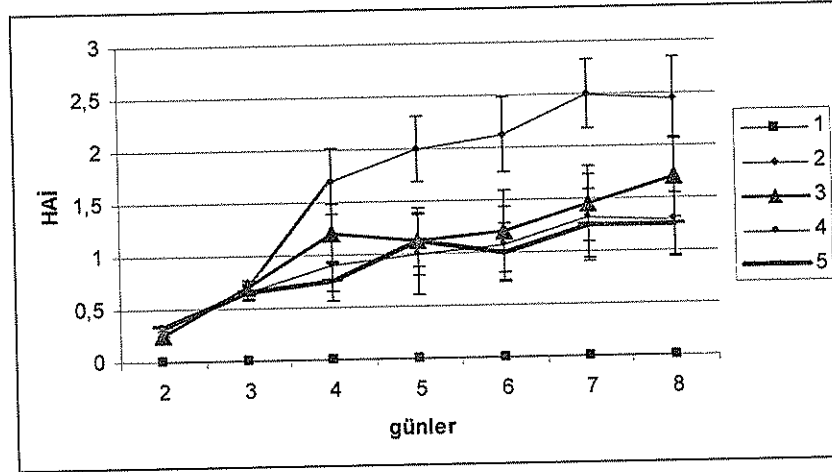
Hastalık aktivite indeksi'nin, 7. günde ve 8. günde model grupta en yüksek değerlerine ulaştığı gözlendi. Hastalık aktivite indeksinin, kontrol grubu dışındaki tüm gruplarda, en yüksek değerine 7. günde ulaştığı gözlendi.

Melatonin uygulanan gruplarda, HAI, 4. günden itibaren, model gruba göre daha düşük seyretmesine rağmen, bu istatistik olarak önemli bulunmadı.

4. günde 1 ve 2 mg/kg/gün melatonin uygulanan, 5, 6 ve 7. günlerde 0,5, 1 ve 2 mg/kg/gün uygulanan sıçanlardaki HAI kontrol grubundan farklı değildi. Ratların gruplara göre çalışma boyunca hastalık aktivite indeksleri Tablo 4.2'de, grafik olarak Şekil 4.2'de gösterilmiştir.

Tablo 4.2: DSS ile eş zamanlı melatonin verilen ratların çalışma boyunca günlük hastalık aktivite indeksleri

		2.gün	3.gün	4.gün	5.gün	6.gün	7.gün	8.gün
1	Kontrol	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
2	Model grup	0,29±0,04	0,71±0,08	1,71±0,31	1,96±0,32	2,13±0,37	2,50±0,34	2,46±0,40
3	Melatonin 0,5 mg/kg	0,25±0,05	0,71±0,04	1,21±0,28	1,13±0,32	1,20±0,39	1,46±0,36	1,71±0,38
4	Melatonin 1mg/kg	0,33±0,00	0,67±0,06	0,92±0,27	1,00±0,39	1,29±0,35	1,42±0,41	1,29±0,36
5	Melatonin 2mg /kg	0,33±0,00	0,67±0,09	0,75±0,20	1,13±0,25	1,00±0,29	1,25±0,35	1,25±0,29
	P(ANOVA)	p<0,001	p<0,001	p =0,001	p=0,001	p=0,001	p<0,001	p<0,001
	P (Post hoc Tukey test)	1-2p<0,001 1-3p<0,001 1-4p<0,001 1-5p<0,001	1-2p<0,001 1-3p<0,001 1-4p<0,001 1-5p<0,001	1-2p=0,001 1-3p<0,05	12p=0,001	1-2p=0,001	1-2p<0,001	1-2p<0,001 1-3p<0,05



Şekil 4.2: DSS ile eş zamanlı melatonin verilen ratların çalışma boyunca günlük hastalık aktivite indeksleri

### 4.3. Deney 1. Kolonun Ağırlık, Boy ve Ağırlık/Boy Ölçümleri Sonucu Elde Edilen Veriler

**Kolon Ağırlığı:** Kolon ağırlığı, model grupta, kontrol gruba göre anlamlı derecede yüksek bulundu ( $p<0,001$ ). Kolon ağırlıkları, melatonin 1 mg/kg/gün uygulanan ve melatonin 2 mg/kg/gün uygulanan grupta, model gruba göre anlamlı derecede düşük bulundu ( $p<0,01$ ,  $p<0,05$ ).

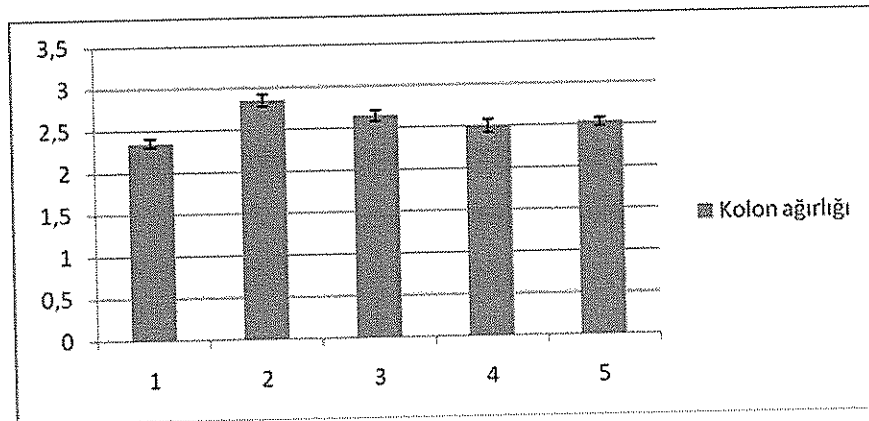
**Kolon uzunluğu:** Kolon uzunluğu, model grupta, kontrol grubuna göre anlamlı derecede kısa bulundu ( $p=0,001$ ). Melatonin 1 mg/kg/gün ve melatonin 2

mg/kg/gün uygulanan grupta, kolon uzunlukları, model gruba göre anlamlı derecede yüksek bulundu ( $p=0,001$ ,  $p<0,01$ ).

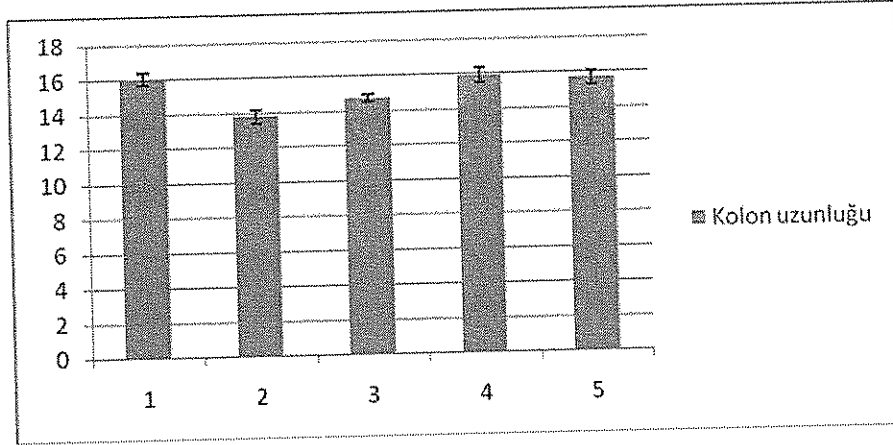
Kolon ağırlık/boy oranı: Kolon ağırlık/boy oranları, kontrol grubunda, model gruba ve melatonin 0,5 mg/kg/gün uygulanan gruba göre anlamlı derecede, düşük bulundu ( $p<0,001$ ,  $p<0,05$ ). Melatonin 0,5, 1 ve 2 mg/kg/gün melatonin uygulanan gruplardaki, ağırlık/boy oranları, model gruba göre anlamlı derecede düşük bulundu ( $p<0,001$ ). Ratların gruplara göre kolon ağırlıkları, kolon boyları, ağırlık/boy oranları Tablo 4.3'de, grafik olarak Şekil 4.3, 4.4 ve 4.5'de gösterilmiştir.

**Tablo 4.3:** DSS ile eş zamanlı melatonin verilen ratlarda, kolonun ağırlık, boy ve ağırlık/boy ölçümleri sonucu elde edilen veriler

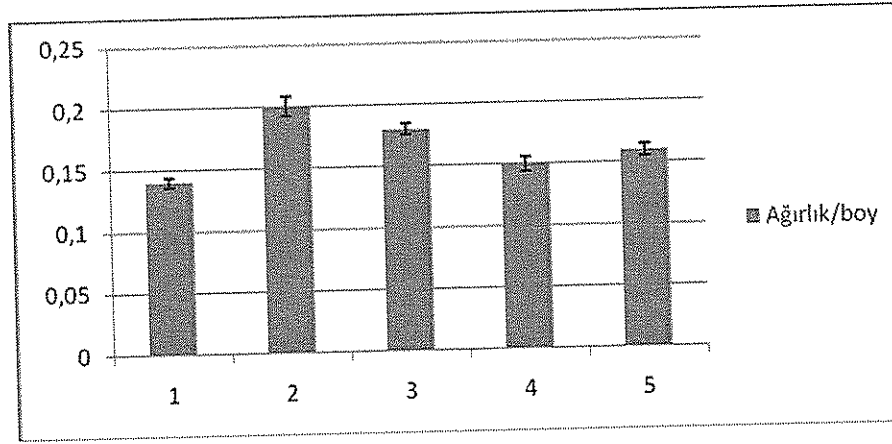
1. Deney Gruplar	Kolon Ağırlığı (gr)	Kolon Boyu (cm)	Ağırlık/Boy Oranı (%)
1.Grup (Kontrol)	2,35±0,05	16,03±0,35	0,14±0,004
2.Grup (Model grup)	2,85±0,07	13,75±0,37	0,20±0,008
3.Grup (Melatonin 0,5mg/kg )	2,64± 0,06	14,71±0,21	0,18±0,004
4.Grup (Melatonin 1mg/kg )	2,50±0,08	15,90±0,41	0,15±0,006
5.Grup (Melatonin 2mg/kg )	2,53± 0,05	15,68±0,38	0,16 ±0,005
P (ANOVA)	$p<0,05$	$p<0,01$	$p<0,001$
(Post hoc Tukey test)	1-2 $p<0,001$ 2-4 $p<0,01$ 2-5 $p<0,05$	1-2 $p=0,001$ 2-4 $p=0,001$ 2-5 $p<0,01$	1-2 $p<0,001$ 1-3 $p<0,05$ 2-3 $p<0,05$ 2-4 $p<0,001$ 2-5 $p<0,001$



**Şekil 4.3:** DSS ile eş zamanlı melatonin verilen ratların gruplara göre kolon ağırlıkları



Şekil 4.4: DSS ile eş zamanlı melatonin verilen ratların gruplara göre kolon uzunlukları



Şekil 4.5: DSS ile eş zamanlı melatonin verilen ratların gruplara göre ağırlık/boy oranları

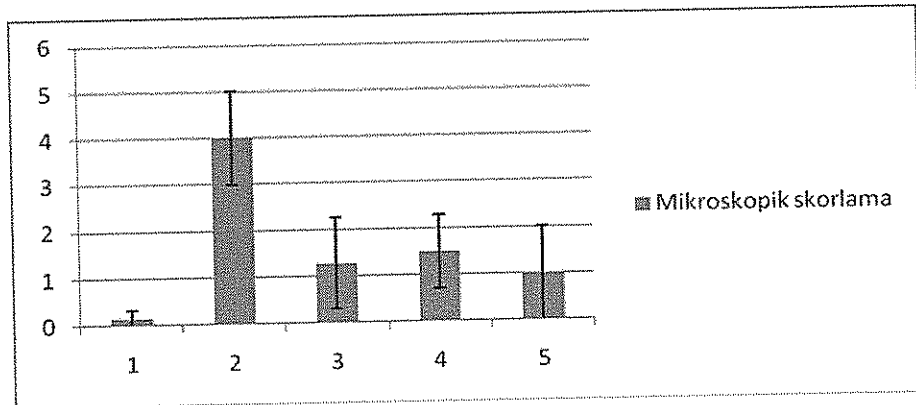
#### 4.4. Deney 1. Kolitin Mikroskopik Skoruması

Mikroskopik kolit skoruması, kontrol grubunda model gruba göre anlamlı derecede düşük bulundu ( $p=0,001$ ). Melatonin 0,5 mg/kg, 1 mg/kg ve 2 mg/kg/ gün uygulanan gruplarda, model gruba göre anlamlı derecede düşük bulundu ( $p<0,05$ ,  $p<0,05$ ,  $p<0,01$ ). Gruplara göre mikroskopik skoruması sonuçları Tablo 4.4'de ve grafik olarak Şekil 4.6'da gösterilmiştir.

**Tablo 4.4:** DSS ile eş zamanlı melatonin verilen ratların kolitin mikroskopik skorlaması

Gruplar	Mikroskopik Skor
1.Grup (Kontrol)	0,16±0,16 0 (0-1)
2.Grup (Model grup)	4,00 ±1,01 4 (1-8)
3.Grup (Melatonin 0,5mg/kg)	1,28±0,99 4 (0-7)
4.Grup (Melatonin 1mg/kg)	1,50±0,80 4 (0-6)
5.Grup (Melatonin 2mg/kg)	1,0±1,00 4 (0-8)
Kruskal –Wallis	p<0,01
Mann-Whitney <i>u</i> Test	1-2p=0,001 2-3p<0,05 2-4p<0,05 2-5p<0,01

Veriler, üstte ortalama ± standart hata, altta ortanca (minimum-maksimum) olarak verilmiştir.



**Şekil 4.6:** DSS ile eş zamanlı melatonin verilen ratların gruplara göre kolitin mikroskopik skorlaması

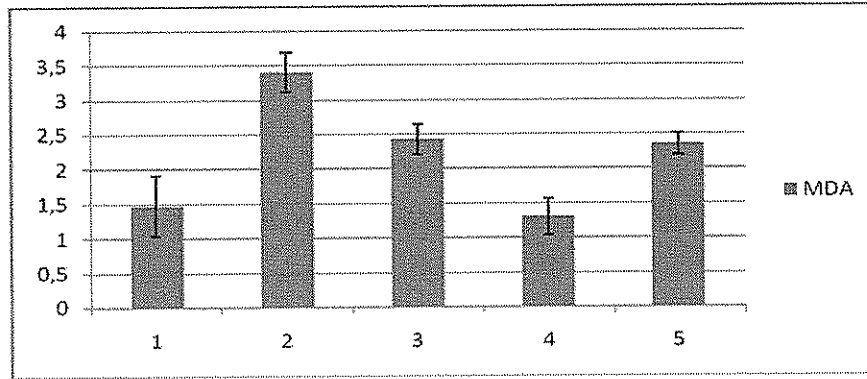
#### 4.5. Deney 1. Biyokimyasal Analizler

##### 4.5.1. Deney 1. Kolon Dokusunda MDA Düzeyi

Melatonin 2 mg/kg/gün uygulanan grupta, 4, 7, ve 8. ratlar, model grupta 4. rat MDA düzeyleri, çok ekstrem olduğu için analiz dışı tutuldu. Kolon dokusunda MDA düzeyleri kontrol grubunda, model gruba göre anlamlı derecede düşük bulundu ( $p=0,001$ ). Melatonin 1 mg/kg/gün uygulanan grupta, model gruba göre anlamlı derecede düşük bulundu ( $p<0,001$ ). Melatonin 1 mg/kg/gün uygulanan grupta, melatonin 0,5 mg/kg/gün uygulanan gruba göre anlamlı derecede düşük bulundu ( $p<0,05$ ). Gruplara göre doku MDA düzeyleri Tablo 4.5'de, grafik olarak Şekil 4.7'de gösterilmiştir.

**Tablo 4.5:** DSS ile eş zamanlı melatonin verilen ratların deney gruplarına göre kolon MDA aktivitesi

Gruplar	MDA (mmol/gr/protein)
1.Grup (Kontrol)	1,47±0,43
2.Grup (Model grup)	3,40±0,28
3.Grup (Melatonin 0,5mg/kg)	2,42±0,22
4.Grup (Melatonin 1mg/kg)	1,30±0,26
5.Grup (Melatonin 2mg/kg)	2,35±0,16
P (ANOVA)	$p<0,001$
P (Post hoc Tukey test)	1-2 $p=0,001$ 2-4 $p<0,001$ 3-4 $p<0,05$



**Şekil 4.7:** DSS ile eş zamanlı melatonin verilen ratların kolon dokusunda MDA düzeyi

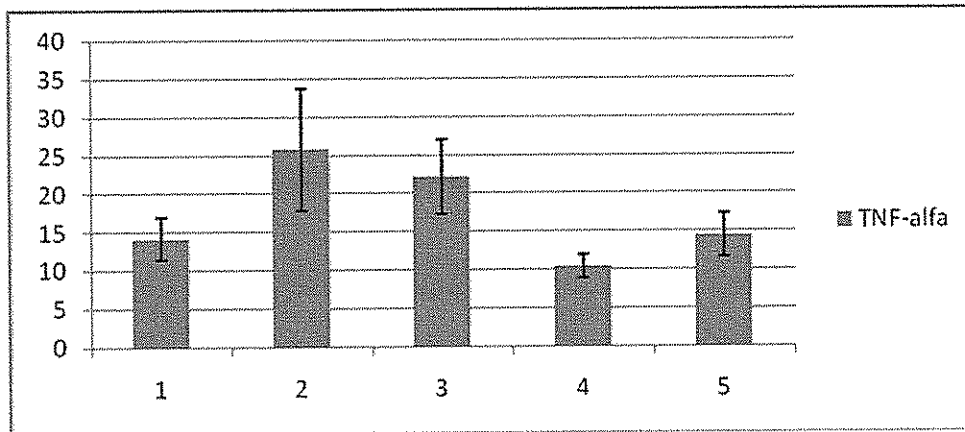


#### 4.5.2. Deney 1. Kolon Dokusunda TNF- $\alpha$ Düzeyleri

Model grupta, 4. rat TNF- $\alpha$  düzeyi, çok ekstrem olduğu için analiz dışı tutuldu. Gruplar arasında kolon dokusunda TNF- $\alpha$  düzeylerinde anlamlı farklılık gözlenmedi. İstatistik olarak anlamlı bulunmasa da, model gruptaki ortalama TNF- $\alpha$  düzeyi, kontrol grubunun yaklaşık 2 katına yakındı. 1 mg/kg ve 2 mg/kg melatonin uygulanan sıçanlardaki TNF- $\alpha$  düzeyi kontrol grubundakine yakındı. Gruplara göre doku TNF- $\alpha$  düzeyleri, Tablo 4.6'da grafik olarak Şekil 4.8'de gösterilmiştir.

**Tablo 4.6:** DSS ile eş zamanlı melatonin verilen ratların deney gruplarına göre kolon TNF- $\alpha$  aktivitesi

Gruplar	TNF- $\alpha$ (pgmg/protein)
1.Grup (Kontrol)	14,09 $\pm$ 2,75
2.Grup (Model grup)	25,73 $\pm$ 7,97
3.Grup (Melatonin 0,5mg/kg)	22,13 $\pm$ 4,91
4.Grup (Melatonin 1mg/kg)	10,43 $\pm$ 1,48
5.Grup (Melatonin 2mg/kg)	14,43 $\pm$ 2,87
P (ANOVA)	( ns )
P (Post hoc Tukey test)	



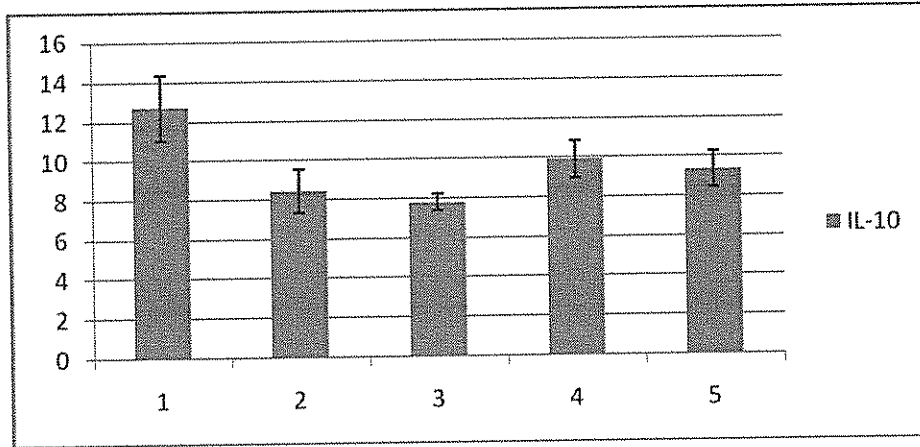
**Şekil 4.8:** DSS ile eş zamanlı melatonin verilen ratların kolon dokusunda TNF- $\alpha$  düzeyleri

#### 4.5.3. Deney 1. Kolon Dokusunda IL-10 Düzeyleri

Kontrol grubunda; melatonin 0,5 mg/kg göre anlamlı derecede yükseklik gözlemlendi (  $p < 0,05$  ). Gruplara göre doku IL-10 düzeyleri, Tablo 4.7’de grafik olarak Şekil 4.9’da gösterilmiştir.

**Tablo 4.7:** DSS ile eş zamanlı melatonin verilen ratların deney gruplarına göre kolon IL- 10 aktivitesi

Gruplar	IL-10 (pg/mg/protein)
1.Grup (Kontrol)	12,67 ± 1,63
2.Grup (Model grup)	8,44 ± 1,11
3.Grup (Melatonin 0,5mg/kg)	7,80 ± 0,41
4.Grup (Melatonin 1mg/kg)	9,90 ± 0,94
5.Grup (Melatonin 2mg/kg)	9,32 ± 0,89
P (ANOVA)	$p < 0,05$
P (Post hoc Tukey test)	1-3: $p < 0,05$



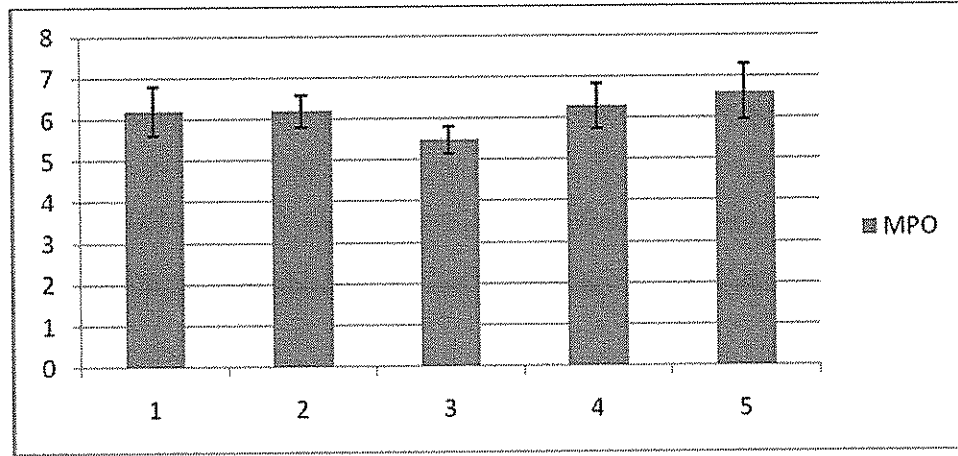
**Şekil 4.9:** DSS ile eş zamanlı melatonin verilen ratların kolon dokusunda IL-10 düzeyleri

#### 4.5.4. Deney 1. Kolon Dokusunda MPO Aktivitesi

Gruplar arasında MPO aktivitesinde anlamlı derecede farklılık gözlenmedi. Gruplara göre doku MPO düzeyleri Tablo 4.8'de grafik olarak Şekil 4.10'da gösterilmiştir.

**Tablo 4.8:** DSS ile eş zamanlı melatonin verilen ratların deney gruplarına göre kolon MPO aktivitesi

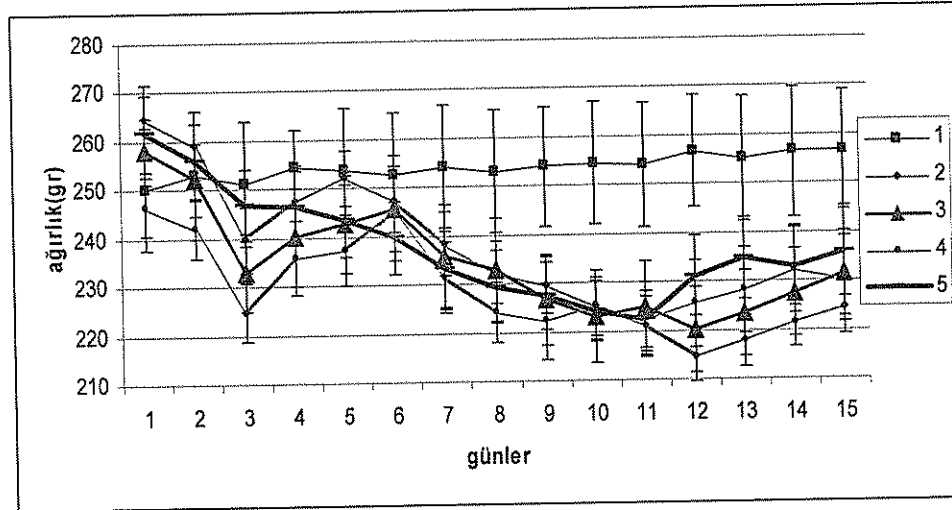
Gruplar	MPO (ng/mg protein)
1.Grup (Kontrol)	6,21 ± 0,59
2.Grup (Model grup)	6,19 ± 0,40
3.Grup (Melatonin 0,5mg/kg)	5,48 ± 0,32
4.Grup (Melatonin 1mg/kg)	6,28 ± 0,55
5.Grup (Melatonin 2mg/kg)	6,62 ± 0,67
P (ANOVA)	(ns)
P (Post hoc Tukey test)	



**Şekil 4.10:** DSS ile eş zamanlı melatonin verilen ratların kolon dokusunda MPO aktivitesi



		9.gün	10.gün	11.gün	12.gün	13.gün	14.gün	15.gün
1	Kontrol	254,00±12,22	254,67±12,55	254,17±12,79	256,83±11,58	255,33±12,80	256,50±13,28	256,83±12,35
2	Model grup	229,71±5,96	225,14±5,90	221,43±5,61	214,86±5,21	217,86±5,28	221,71±5,23	224,57±5,33
3	Melatonin 0,5 mg/kg	226,63±9,36	223,13±9,39	224,88±9,63	220,13±8,81	223,63±8,79	227,63±8,83	231,50±8,87
4	Melatonin 1mg/kg	222,25±7,72	225,38±7,36	222,50±7,63	225,50±8,97	228,25±8,85	232,25±8,73	230,38±8,85
5	Melatonin 2mg /kg	227,50±6,76	224,38±6,10	222,25±5,86	231,25±8,22	234,38±8,33	233,13±8,35	236,00±9,28
	P(ANOVA)	(ns)	(ns)	(ns)	p<0,05	(ns)	(ns)	(ns)
					1-2p<0,05			



Şekil 5.1: DSS sonrası melatonin verilen ratların gruplara göre günlük ağırlık değişiklikleri

## 5.2. Deney 2. Klinik Değerlendirme

Ratların çalışma boyunca HAİ günlük olarak hesaplandı. Çalışmanın 3. gününde, HAİ bakımından gruplar arasında anlamlı fark saptanmadı. 3. gün dışında, çalışmanın 2. gününden 15. gününe kadar, hastalık aktivite indeksi kontrol grubunda, model gruba ve melatonin uygulanan gruplara göre anlamlı derecede düşük bulundu.

13. günde, kanlı dışkılama, model grupta 3 ratda, devam ederken, melatonin 0,5 mg/kg/gün uygulanan grupta, iki ratta, melatonin 1 mg/kg/gün uygulanan grupta bir ratta devam ettiği, melatonin 2 mg/kg/gün uygulanan grupta ise kanlı dışkılama

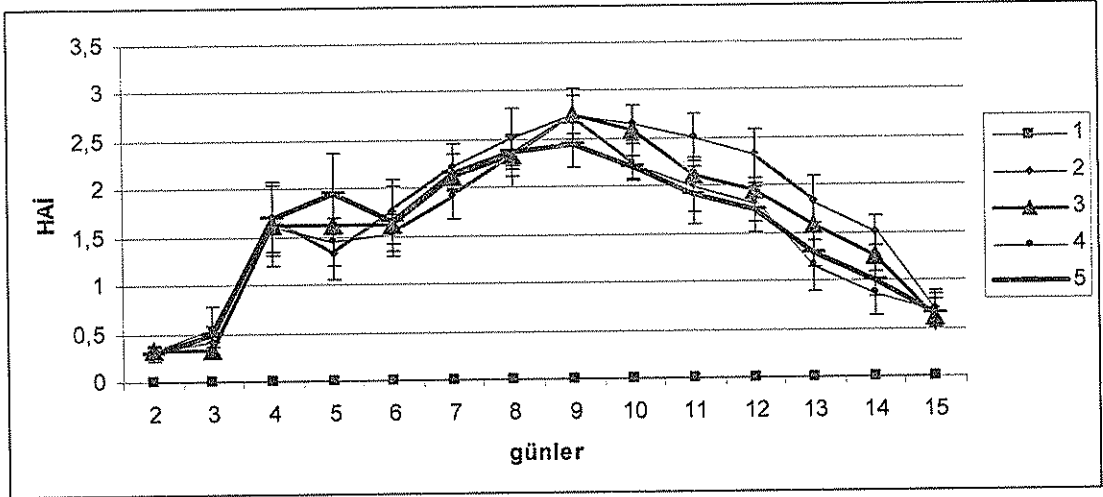
olmadığı gözlemlendi. 14. günde ise hiçbir grupta kanlı dışkılama gözlemlenmedi. Model grupta ve melatonin uygulanan gruplarda, dışkı kıvamında yumuşamanın devam ettiği, ancak dışkı kıvamında gözlenen yumuşamanın sıklığının da melatonin 2 mg/kg/gün uygulanan grupta en az olduğu gözlemlendi.

Model grupta, HAI'nin en yüksek değerine 9. günde ulaştığı, sonrasında da düşmeye başladığı gözlemlendi. 9-14. günlerde, melatonin uygulanan gruplarda, model gruba göre, HAI'inde daha hızlı düşme olduğu gözlemlendi. Ratların gruplara göre günlük HAI değişiklikleri Tablo 5.2'de, grafik olarak Şekil 5.2'de gösterilmiştir.

**Tablo 5.2:** DSS sonrası melatonin verilen ratların çalışma boyunca günlük hastalık aktivite indeksleri

		2.gün	3.gün	4.gün	5.gün	6.gün	7.gün	8.gün
1	Kontrol	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
2	Model grup	0,33±0,00	0,42±0,09	1,71±0,35	1,33±0,23	1,76±0,35	2,23±0,09	2,52±0,20
3	Melatonin 0,5 mg/kg	0,33±0,06	0,33±0,06	1,62±0,37	1,62±0,28	1,62±0,33	2,12±0,24	2,33±0,30
4	Melatonin 1 mg/kg	0,33±0,00	0,54±0,25	1,62±0,42	1,45±0,25	1,54±0,19	1,91±0,23	2,33±0,21
5	Melatonin 2 mg/kg	0,29±0,07	0,50±0,08	1,70±0,38	1,95±0,42	1,66±0,36	2,16±0,19	2,37±0,18
	P(ANOVA)	p<0,001	(ns)	p<0,05	p<0,01	p<0,01	p<0,001	p<0,001
	P (Post hoc Tukey test)	1-2p=0,001 1-3p<0,001 1-4p<0,001 1-5p<0,01		1-2p<0,05 1-3p<0,05 1-4p<0,05 1-5p<0,05	1-2p<0,05 1-3p<0,01 1-4p<0,05 1-5p=0,001	1-2p<0,01 1-3p<0,01 1-4p<0,05 1-5p<0,01	1-2p<0,001 1-3p<0,001 1-4p<0,001 1-5p<0,001	1-2p<0,001 1-3p<0,001 1-4p<0,001 1-5p<0,001

		9.gün	10.gün	11.gün	12.gün	13.gün	14.gün	15.gün
1	Kontrol	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
2	Model grup	2,76±0,22	2,66±0,14	2,52±0,06	2,33±0,23	1,85±0,29	1,52±0,12	0,71±0,08
3	Melatonin 0,5 mg/kg	2,75±0,26	2,58±0,18	2,12±0,23	1,95±0,26	1,58±0,24	1,25±0,16	0,62±0,15
4	Melatonin 1 mg/kg	2,75±0,20	2,25±0,19	2,00±0,26	1,83±0,20	1,16±0,27	0,87±0,23	0,70±0,19
5	Melatonin 2 mg/kg	2,45±0,25	2,20±0,12	1,91±0,30	1,75±0,23	1,29±0,14	1,00±0,17	0,66±0,14
	P(ANOVA)	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,05
	P (Post hoc Tukey test)	1-2p<0,001 1-3p<0,001 1-4p<0,001 1-5p<0,001	1-2p<0,001 1-3p<0,001 1-4p<0,001 1-5p<0,001	1-2p<0,001 1-3p<0,001 1-4p<0,001 1-5p<0,001	1-2p<0,001 1-3p<0,001 1-4p<0,001 1-5p<0,001	1-2p<0,001 1-3p<0,001 1-4p<0,05 1-5p<0,01	1-2p<0,001 1-3p<0,001 1-4p<0,05 1-5p<0,01	1-2p<0,05 1-3p<0,05 1-4p<0,05 1-5p<0,001



Şekil 5.2: DSS sonrası melatonin verilen ratların çalışma boyunca günlük hastalık aktivite indeksleri

### 5.3. Deney 2. Kolonun Ağırlık, Boy ve Ağırlık/Boy Ölçümleri Sonucu Elde Edilen Veriler

Kolon ağırlığı:

Kontrol grubundaki kolon ağırlığı, model gruba ve 0,5 mg/kg melatonin uygulanan gruba göre anlamlı derecede düşük bulundu.

Kolon uzunluğu:

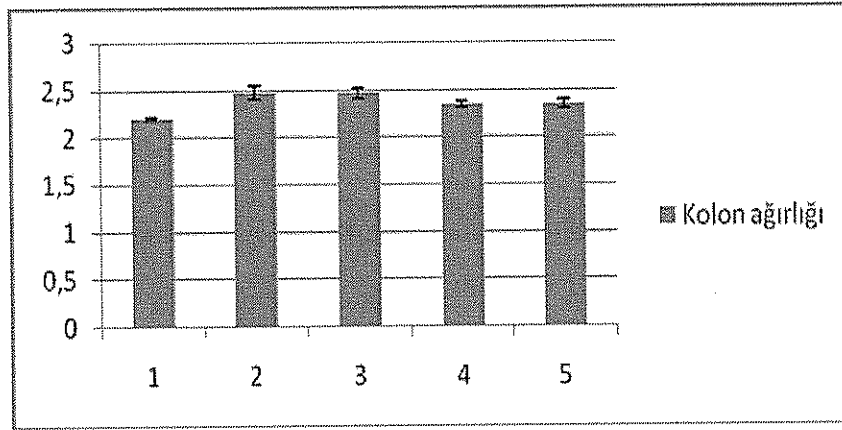
Gruplar arasında, kolon uzunlukları bakımından anlamlı farka rastlanmadı.

Kolon ağırlık/boy oranı:

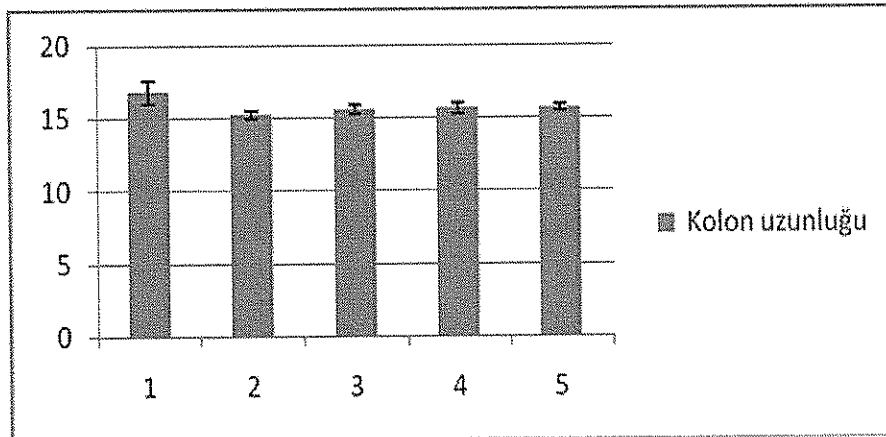
Gruplar arasında, kolon kilo/boy oranı, kontrol grubunda, model gruba ve 0,5 mg/kg melatonin uygulanan gruba göre anlamlı derecede düşük bulundu. Ratların gruplara göre kolon ağırlıkları, kolon boyları, ağırlık/boy oranları Tablo 5.3'de, grafik olarak Şekil 5.3, 5.4 ve 5.5'de gösterilmiştir.

**Tablo 5.3:** DSS sonrası melatonin verilen ratlarda kolonun ağırlık, boy ve kilo/boy ölçümleri sonucu elde edilen veriler

2. Deney Gruplar	Kolon Ağırlığı (gr)	Kolon Boyu (cm)	Ağırlık/Boy Oranı (%)
1.Grup (Kontrol)	2,20±0,02	16,80±0,78	0,13±0,007
2.Grup (Model grup)	2,47±0,07	15,21±0,25	0,16±0,006
3.Grup (Melatonin 0,5mg/kg)	2,46±0,05	15,56±0,29	0,15±0,006
4.Grup (Melatonin 1mg/kg)	2,34±0,03	15,63±0,39	0,15±0,006
5.Grup (Melatonin 2mg/kg)	2,34±0,05	15,68±0,24	0,15±0,005
P (ANOVA)	p<0,05	(ns)	p<0,05
(Post hoc Tukey test)	1-2p<0,05 1-3p<0,05		1-2p<0,05 1-3p<0,05

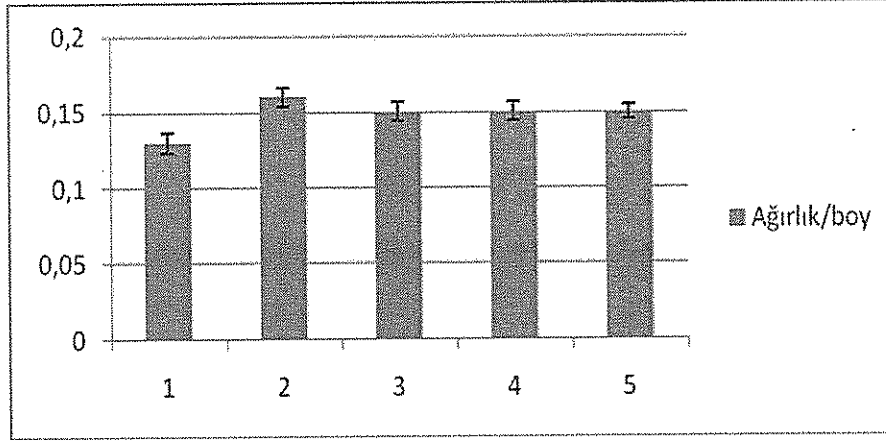


**Şekil 5.3:** DSS sonrası melatonin verilen ratların gruplara göre kolon ağırlıkları



**Şekil 5.4:** DSS sonrası melatonin verilen ratların gruplara göre kolon uzunlukları





**Şekil 5.5:** DSS sonrası melatonin verilen ratların gruplara göre kolon ağırlık/boy oranları

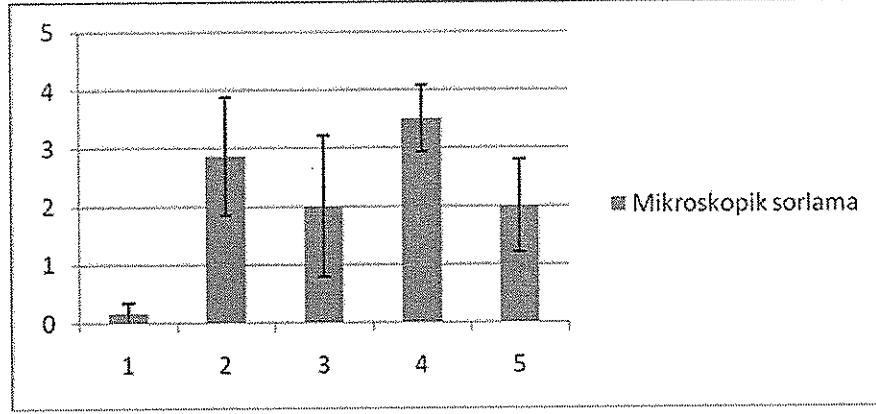
#### 5.4. Deney 2. Kolitin Mikroskopik skorlaması

Gruplar arasında histolojik skorlamada anlamlı farklılık saptanmadı. Gruplara göre mikroskopik skorlama sonuçları Tablo 5.4'de, grafik olarak Şekil 5.6'da gösterilmiştir.

**Tablo 5.4:** DSS sonrası melatonin verilen ratların gruplara göre kolitin mikroskopik skorlaması

Gruplar	Mikroskopik Skor
1.Grup (Kontrol)	0,17±0,17 0 (0-1)
2.Grup (Model grup)	2,86±1,01 5(0-5)
3.Grup (Melatonin 0,5mg/kg)	2,00±1,21 0(0-8)
4.Grup (Melatonin1mg/kg)	3,50±0,57 4(0- 5)
5.Grup (Melatonin2mg/kg )	2,00 ± 0,80 1,5(0 - 5)
Kruskal- Wallis	( ns )
Mann-Whitney <i>u</i>	

Veriler, üstte ortanca ± standart hata, altta ortanca olarak verilmiştir.



**Şekil 5.6:** DSS sonrası melatonin verilen ratların gruplara göre kolitin mikroskopik skorlaması

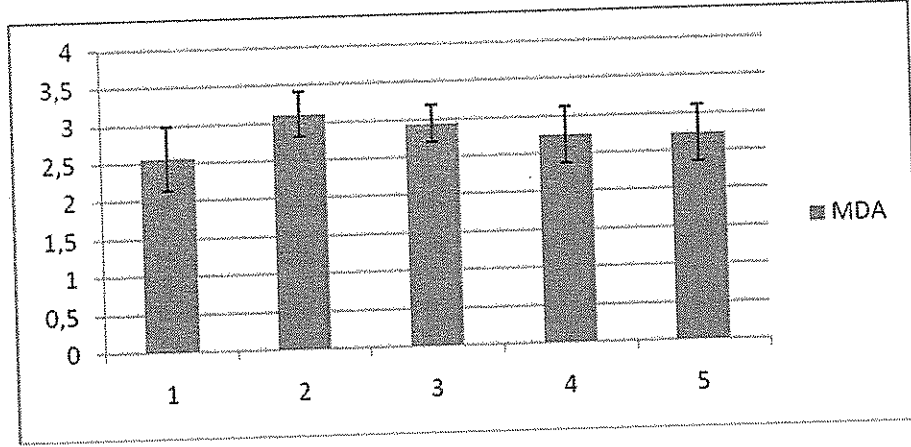
## 5.5. Deney 2. Biyokimyasal Analiz Sonucu Elde Edilen Veriler

### 5.5.1. Deney 2. Kolon Dokusunda MDA Düzeyi

Kontrol grubunda 5. rat, melatonin 0,5 mg/kg uygulanan grupta 4. ve 5. rat, 1 mg/kg melatonin uygulanan grupta, 6. ve 7. rat, 2 mg/kg melatonin uygulanan grupta, 2 ve 6. rat MDA düzeyi çok ekstrem olduğu için analiz dışı tutuldu. Kolon dokusunda gruplar arasında, MDA düzeyi bakımından anlamlı farklılık gözlenmedi. Gruplara göre doku MDA düzeyleri, Tablo 5.5’de grafik olarak 5.7’de gösterilmiştir.

**Tablo 5.5:** DSS sonrası melatonin verilen ratların deney gruplarına göre kolon MDA aktivitesi

Gruplar	MDA (mmol/gr/protein)
<b>1.Grup (Kontrol)</b>	2,56±0,42
<b>2.Grup (Model grup)</b>	3,11±0,29
<b>3.Grup (Melatonin 0,5mg/kg)</b>	2,94±0,25
<b>4.Grup (Melatonin1mg/kg)</b>	2,75±0,37
<b>5.Grup (Melatonin2mg/kg)</b>	2,73±0,38
P (ANOVA)	(ns)
P (Post hoc Tukey test)	



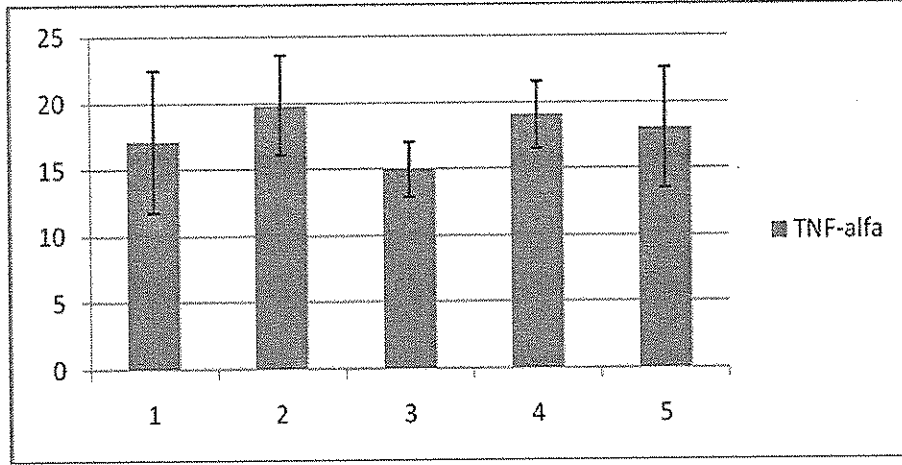
Şekil 5.7: DSS sonrası melatonin verilen ratların kolon dokusunda MDA düzeyi

### 5.5.2. Deney 2. Kolon Dokusunda TNF- $\alpha$ Düzeyleri

Kontrol grubunda 1. 3. ve 4. ratlara ait TNF- $\alpha$  düzeyleri çok ekstrem olduğu için analiz dışı tutuldu. Gruplar arasında, kolon dokusunda TNF- $\alpha$  düzeyi bakımından anlamlı farklılık gözlenmedi. Gruplara göre doku TNF- $\alpha$  düzeyleri Tablo 5.6'da grafik olarak Şekil 5.8'de gösterilmiştir.

Tablo 5.6: DSS sonrası melatonin verilen ratların deney gruplarına göre kolon TNF- $\alpha$  aktivitesi

Gruplar	TNF- $\alpha$ (pg/mg/protein)
1.Grup (Kontrol)	17,13 $\pm$ 5,31
2.Grup (Model grup)	19,82 $\pm$ 3,71
3.Grup (Melatonin 0,5mg/kg)	14,93 $\pm$ 2,05
4.Grup (Melatonin1mg/kg)	19,01 $\pm$ 2,52
5.Grup (Melatonin2mg/kg)	18,03 $\pm$ 4,49
P (ANOVA)	(ns)
P (Post hoc Tukey test)	



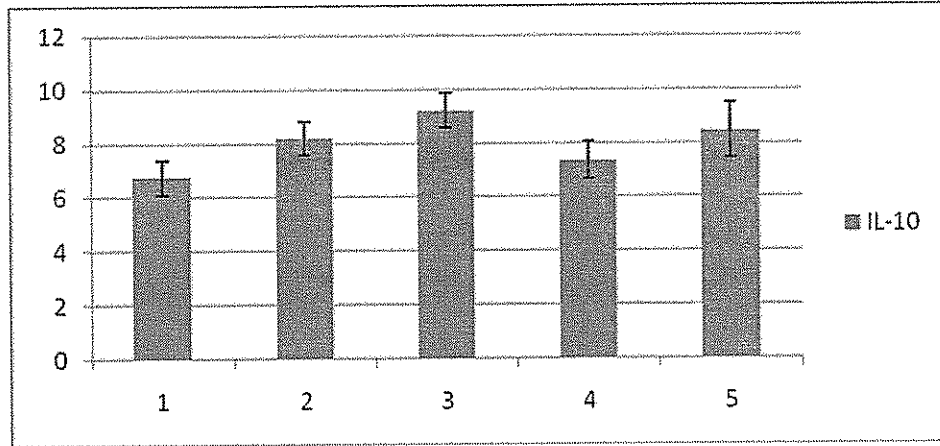
Şekil 5.8: DSS sonrası melatonin verilen ratların kolon dokusunda TNF- $\alpha$  düzeyleri

### 5.5.3. Deney 2. Kolon Dokusunda IL-10 Düzeyleri

Gruplar arasında, kolon dokusunda IL-10 düzeyi bakımından anlamlı farklılık gözlenmedi. Gruplara göre doku IL-10 düzeyleri Tablo 5.7’de grafik olarak Şekil 5.9’da gösterilmiştir.

Tablo 5.7: DSS sonrası melatonin verilen ratların deney gruplarına göre kolon IL- 10 aktivitesi

Gruplar	IL-10 (pg/mg/protein)
1.Grup (Kontrol)	6,74 $\pm$ 0,64
2.Grup (Model grup)	8,19 $\pm$ 0,60
3.Grup (Melatonin 0,5mg/kg)	9,20 $\pm$ 0,65
4.Grup (Melatonin 1mg/kg)	7,34 $\pm$ 0,69
5.Grup (Melatonin 2mg/kg)	8,45 $\pm$ 1,01
P (ANOVA)	( ns )
P (Post hoc Tukey test)	



Şekil 5.9: DSS sonrası melatonin verilen ratların kolon dokusunda IL-10 düzeyleri

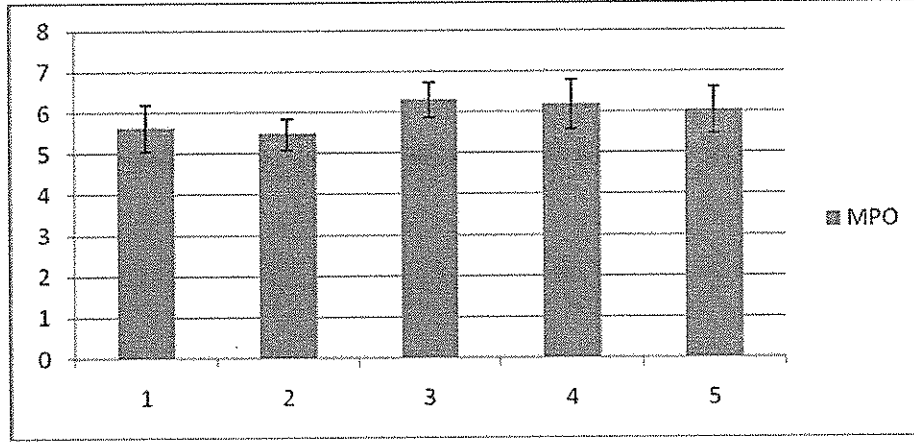
#### 5.5.4. Deney 2. Kolon Dokusunda MPO Düzeyleri

Gruplar arasında; kolonda MPO düzeylerinde anlamlı farklılık saptanmadı. Gruplara göre doku MPO düzeyleri Tablo 5.8'de, grafik olarak Şekil 5.10'da gösterilmiştir.

**Tablo 5.8:** DSS sonrası melatonin verilen ratların deney gruplarına göre kolon MPO aktivitesi

Gruplar	MPO (ng/mg protein)
<b>1.Grup (Kontrol)</b>	5,63 ± 0,57
<b>2.Grup (Model grup)</b>	5,47 ± 0,38
<b>3.Grup (Melatonin 0,5mg/kg)</b>	6,30 ± 0,42
<b>4.Grup (Melatonin 1mg/kg)</b>	6,17 ± 0,60
<b>5.Grup (Melatonin 2mg/kg)</b>	6,03 ± 0,57
P (ANOVA)	ns
P (Post hoc Tukey test)	

Veriler, ortalama ± standart hata olarak verilmiştir.



Şekil 5.10: DSS sonrası melatonin verilen ratların kolon dokusunda MPO aktivitesi

## 6. TARTIŞMA

İBH, iyileşme ve alevlenmeler ile seyreden, bireyleri yaşam boyu etkileyen kronik inflamatuvar bir barsak hastalığıdır (11). İBH prevalansı, kuzey Amerika, kuzey Avrupa ve A.B.D'de en sıktır ve 100.000'de, 100-200 vakaya (160-162) rastlanmaktadır. Avrupalı Amerikalılarda, Afrikalı Amerikalılara göre daha sıktır; en düşük oranlar, Asyalılarda ve İspanyol toplumlarda bildirilmiştir (160).

İBH etiyojisi kesinlik kazanmadığından, etkili bir tedavi yöntemi bugüne kadar geliştirilememiştir. İBH etyojisinin aydınlatmaya yönelik araştırmalar halen devam etmektedir ve özellikle, genetik, infeksiyöz, immünolojik ve inflamatuvar etkenlerin etyopatogenezi önemli olduğu kabul edilmiştir (11, 27). Mukozal immün sistem de, intestinal inflamasyonda ve doku hasarında, merkezi bir rol oynamaktadır ve mukozal immün sistemin anormal ve sürekli uyarılmasına yol açan, etkileşimler karmaşıktır ve çeşitlilik göstermektedir (27).

Yapılan çalışmalarda, barsak mukozasına olan lökosit infiltrasyonunun ve uyarılan lökositlerden SOR salınımıyla gerçekleşen mukozal hasarın, proinflamatuvar sitokin salınımı (TNF- $\alpha$ ) ve lökosit infiltrasyonunu tekrar uyarması, İBH patogenezi bir kısır döngü olarak tanımlanmaktadır (11). Bazı araştırmacılar, SOR artışının NF- $\kappa$ B'yi uyardığı, NF- $\kappa$ B uyarılmasının da TNF- $\alpha$  üretimini artırarak, bu kısır döngüye katkıda bulunduğunu öne sürmektedir (62).

İBH patofizyolojisini anlamaya yönelik yeni çalışmalar, faydalı tedavi yöntemlerinin geliştirilmesine olanak sağlayan kanıtlar sunmaktadır (27). Deneysel kolit modellerinde; Th1 aracılı sitokin yanıtları ile akut transmural ve fokal lezyonlar birliktelik gösterirken, Th2 sitokin aracılı immün yanıtlarda, kriplerde ve mukozada diffüz atrofik değişiklikler olduğu gözlenmiştir. Th1 aracılı immün yanıtla eşlik eden inflamasyon CH ile Th2 aracılı immün yanıtla eşlik eden inflamasyon, ÜK hastalığında gözlenen inflamasyon ile benzer karakterde bulunmuştur (163). Yaygın inflamasyon ile birliktelik gösteren, IL-1 $\beta$ , IL-6 ve TNF- $\alpha$  gibi diğer sitokinler, her iki inflamatuvar barsak hastalığında da dokuda yüksek düzeylerde bulunmuştur (164).

Farelerde yapılan deneysel kolit modellerinde gözlenen intestinal inflamasyon, insan İBH'da gözlenen intestinal inflamasyona benzerlik göstermektedir. İBH modeli oluşturmak üzere uygulanan deneysel kolit

modellerinden biri, DSS'un oral yoldan içme suyu ile uygulanması ile yapılmaktadır (165). DSS aracılığı ile gerçekleştirilen kolit modelinde kilo kaybı, diare, dışkı kıvamında yumuşama ve rektal kanama gelişmektedir (2). DSS ile uyarılan kolitte, barsak mukozasında, lenfoid hiperplazi, inflamatuvar hücre infiltrasyonu, fokal kript hasarı ile epitelyal hasarlanma ve ülserasyon gözlenmektedir (152, 153, 166).

Oral yoldan içme suyu ile uygulanan DSS'nin hücreler tarafından fagosite edilmesi ile epitelyal hücre hasarı gerçekleşmekte ve böylece lamina propriadaki hücreler uyarılmaktadır. Uyarılan hücreler tarafından da proinflamatuvar sitokinlerin salınımı gerçekleşmektedir (166). DSS ile uyarılmış kolitte gözlenen sitokin profili, insan İBH'nda gözlenen sitokin profiline benzer özellikte bulunmuştur. DSS ile uyarılmış deneysel kolit modellerinin, İBH'ndan farklı yönleri de olmakla birlikte, tedavi etkinliklerinin test edilmesine yönelik yaygın olarak kullanılmakta ve kullanılması tavsiye edilmektedir (153, 167). Biz çalışmamızda bu nedenle, kolit modelinde melatoninin etkinliğini araştırmak için, DSS aracılı kolit modeli oluşturmayı seçtik.

DSS aracılığı ile gerçekleştirilen kolit modeli, ilk olarak, Okayasu ve arkadaşları tarafından lökositlerin kolit gelişimindeki rolünü araştırmak üzere kullanılmıştır. %3-%10 konsantrasyonlarında DSS içeren içme suyu uygulamasının, 6-10 gün arasında farelerde kilo kaybı, aşikar rektal kanama ve diare gibi akut kolit belirti ve bulguların gelişmesine neden olduğu gözlenmiştir (152).

30 günlük ratlara, %0,5-%5 arasında değişen oranlarda DSS'li içme suyu verildiğinde; %5 DSS uygulananlarda, şiddetli kolit bulgularının olduğu ve ratların büyük kısmının çalışmanın 5. gününde kaybedildiği; %0,5 DSS uygulanan ratlarda, kolonda daha hafif lezyonların olduğu, %1-%2 oranında uygulananlarda 7. günde şiddetli mukozal lezyonların olduğu gözlenmiştir (158).

Melatonin fizyolojik etkilerinin büyük kısmını, membran MT1 ve MT2 reseptörleri aracılığı ile göstermektedir. MT1 ve MT2 reseptörleri, G protein bağlı reseptörler olup, santral sinir sisteminin değişik bölgelerinde, kan damarları, meme bezi, gastrointestinal kanal, karaciğer, böbrek, safra kesesi, over, testis, prostat, deri ve immün sistem ile ilgili birçok periferik organda bulunmaktadır (129).



Myokardiyumda iskemi-reperfüzyon hasarının fizyopatolojisinde, NO sentezinde değişiklikler, SOR ve iskemik dokuya nötrofil göçü önemli rol oynamaktadır. Bir çalışmada, melatoninin, MPO aktivitesi, doku glutasyon düzeyi, lipid peroksidasyon düzeyleri, hipertansiyonun indüklendiği ratlarda kan basıncı üzerine olan etkileri araştırıldığında, ratlarda kardiyak iskemi sonrasında, doku MDA, MPO düzeylerinde artış ve GSH düzeylerinde düşme olduğu gözlenmiştir. Bu çalışmada, melatonin tedavisi alan ratlarda, doku MPO ve MDA daha düşük düzeylerde bulunmuştur (168).

Bir diğer çalışmada, iskemi sonrası reperfüze olmuş böbrek dokusunda, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 düzeylerindeki değişiklikler izlenmiş ve melatoninin, bu inflamatuvar moleküller üzerindeki etkileri ve böbrek dokusundaki koruyucu etkinliği araştırılmıştır. Böbrek iskemisi ratlarda oluşturulmadan 10 dakika öncesinde melatonin ip olarak uygulandığında reperfüzyon sonrasında, MDA, MPO, total oksidatif stress, kreatinin ve BUN düzeylerinde önemli düzeylerde artış ve total antioksidan kapasitede azalma gözlenirken, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 düzeylerinde değişiklik gözlenmediği bildirilmiştir. Melatonin tedavisi ile biyokimyasal değerlerde ve iskemi reperfüzyon sonrası histolojik değişikliklerde, sitokin düzeylerinde etkilenme olmaksızın, düzelmeye neden olduğu gösterilmiştir. İskemi-reperfüzyon hasarı yapılan böbreklerde melatoninin koruyucu etkinliği, proinflamatuvar sitokinler üzerine etki etmeksizin, antioksidan etkinliğine bağlı olduğu gösterilmiştir (169).

Hücre dışı süperoksid dismutaz'ın (EC-SOD), DSS aracılı kolit üzerine etkisinin araştırıldığı başka bir çalışmada, Balb/c farelerine, %2,5 veya %5 DSS içeren içme suyu 5 gün verildiğinde HAI skorunun, 3. ve 4. günlerden itibaren yükselmeye başladığı ve maksimum 3'e kadar yükseldiği saptanmıştır. EC-SOD gen transferi yapılan grupta ise, HAI skorunun, daha düşük düzeylerde seyrettiği ( $\approx$ 1.0) gözlenmiştir. Bununla birlikte, %2,5 DSS uygulanan grupta, kolon uzunluğu, sadece DSS uygulanan grupta, normal kontrol grubuna ve EC-SOD gen transferi yapılan gruba göre daha kısa bulunmuştur (170).

Farelerde, DSS aracılığı ile gerçekleştirilen başka bir kolit modelinde, çeşitli antioksidan maddeler'in (s-adenozilmethionin, yeşil çay polifenoller, n-

propiltiyazolidin-4R-karboksilik asit) hastalık prognozu üzerine etkisi araştırılmıştır. %4 DSS içeren su verildiğinde, serum GSH seviyesinin düştüğü, kilo kaybı ve rektal kanama gibi şiddetli kolit bulgularının oluştuğu gözlenmiştir. Bununla birlikte, uygulanan antioksidan maddelerin, kolondaki lezyonları iyileştirdiği, diarede gerilemeye neden olduğu ve farelerde kilo alımına neden olduğu gözlenmiştir. DSS uygulanmasına bağlı olarak gözlenen kolon boyundaki kısalmanın da, antioksidan madde uygulanan ratlarda az bulunduğu gözlenmiştir. Sonuç olarak bu çalışmada 3 farklı antioksidan maddenin, DSS aracılı kolite karşı koruyucu etkilerinin olduğu gösterilmiştir (126).

Bir çalışmada, üzümde bulunan bir polifenol molekül olan picettanol'ün, DSS aracılığı ile gerçekleştirilen kolitteki etkisi araştırılmıştır. Farelere 7 gün boyunca % 5 DSS içeren su verilmiş, 10 gün boyunca gözlenmiş ve deneyde klinik kolit değerlendirmesi, HAI skorlama yöntemi ile yapılmıştır. DSS uygulanan ratlarda, kolon boylarında kısalma olduğu ve picettanol uygulanan gruplarda, kolon boyundaki kısaltmada düzelme olduğu gözlenmiştir. DSS uygulanması ile birlikte, 10. günde doku MPO düzeylerinde önemli düzeyde artış olduğu ve picettanol uygulanmasının, MPO düzeylerinde önemli düzeyde düşmeye neden olduğu gözlenmiştir. Bununla birlikte, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  ve IL-6 doku düzeylerinde de DSS uygulanması ile, önemli artış olduğu ve picettanol'ün sitokin düzeylerindeki artışı engellediği gösterilmiştir. Bununla birlikte IL-10 düzeyinde önemli değişiklik gözlenmemiştir (171).

Statinlerin, DSS aracılı kolit üzerine etkilerinin araştırıldığı başka bir çalışmada, % 4 DSS, bir hafta boyunca, Swiss webster cinsi farelere içme suyu ile günlük olarak verildikten sonra, 14 gün boyunca gözlem yapılmıştır. DSS uygulanması kesildikten sonra, farklı gruplardaki farelere simvastatin 20 mg/kg/gün, atorvastatin 60 mg/kg/gün, %0,75 metilselüloz, subkutan anti-TNF- $\alpha$  monoklonal antikoru veya intraperitoneal anti-mouse apolipoprotein A-1 uygulanmış, klinik değerlendirme, HAI'nin günlük olarak hesaplanması ile yapılmıştır. HAI'nin, tüm gruplarda 7. güne kadar, ortalama 3,27'e kadar yükseldiği, DSS kontrol grubunda, 7. günden sonra düşmeye başladığı gözlenmiş ve sadece DSS uygulanan grupta, kolon uzunlukları diğer gruplara göre anlamlı derecede kısa bulunmuştur (172).

Dirençli İBH vakaların üstesinden gelebilmek için de yeni tedavi yöntemleri deneysel araştırmalarda incelenmiştir (12). Bir çalışmada, İBH'da antioksidan savunma mekanizmalarında azalma olduğu ve antioksidan tedavinin İBH'da, faydalı etkileri olduğu gözlenmiştir (12). Temel olarak pineal bezden üretilen melatoninin, immün yanıtta, inflamatuvar yanıtta ve oksidatif strese karşı koruyucu etkinlikte önemli görevleri bulunduğu bilinmektedir (129). Melatonin'in güçlü bir antioksidan ve serbest radikal yakalayıcısı olması, antiinflamatuvar etkinliğinden sorumlu tutulmaktadır (143-150).

Bir çalışmada, melatoninin, inflamatuvar hasar, proinflamatuvar sitokinler ve koliti olan ratlarda NF-κB üzerine olan etkileri araştırılmıştır. Ratlarda kolit modeli TNBS aracılığı ile gerçekteşirilmiş ve koliti olan ratlarda, proinflamatuvar sitokin salgılanmasının ve NF-κB uyarılmasının arttığı, IκB düzeyinin de azaldığı gösterilmiştir. Bu çalışmanın sonucunda da melatoninin kolonik hasarlanmayı, NF-κB inhibisyonu ile azalttığı öne sürülmüştür (173).

Melatoninin, TNBS kolitindeki etkinliğinin araştırıldığı bir başka çalışmada, rektal TNBS verilen model grupta, kolon dokusunda mukozal hasar indeksinin, histolojik skorlamanın, MPO düzeyinin, normal gruba göre daha yüksek olduğu gözlenmiştir. Sıklıkla makrofajlardan salgılanan, IL-1β, TNF-α ve NO düzeylerinin model grupta oldukça artmış olduğu ve melatoninin tüm bu parametreleri düzelittiği gözlenmiştir. Bu nedenle de melatoninin ratlarda makrofaj aktivitesini düzenleyerek, kolon hasarını azalttığı görüşü öne sürülmüştür (174).

Ratlarda yapılan başka bir çalışmada, TNBS aracılı kolit modelinde, melatoninin oksidatif stres ve apoptozis üzerine olan etkisi araştırılmış ve TNBS uygulanan ratlarda, kolonik MPO ve MDA aktivitelerinin önemli oranda arttığı gösterilmiştir. Kolondaki MPO aktivitesi ve MDA aktivitesinin melatonin uygulanan ratlarda ise önemli oranda düşük bulunduğu gösterilmiştir. TNBS uygulanan ratlarda oksidatif hasarın bir göstergesi olarak kullanılan GSH, kolon mukozasında düşük düzeylerde bulunmuştur. Apoptozisin göstergesi olarak, değerlendirilen caspase-3 düzeyinin, TNBS alan ratlarda kolon mukozasında önemli oranda artmış olduğu gözlenmiş, melatonin uygulanan ratlarda, GSH düzeyinde önemli oranda yükselme, kaspaz-3 düzeyinde ise düşme gözlenmiştir. Bu sonuçlar

ile de melatoninin kolonik hasarlanmayı, antiinflamatuvar ve antiapoptotik etkileri ile azalttığı görüşü öne sürülmüştür (175).

Başka bir çalışmada, melatoninin, DSS aracılı kolit şiddetini azalttığı gösterilmiştir. 7 hafta kadar ip günlük 150 microgram/kg melatonin uygulanmasından sonra, rektal kanamanın ve gaitada gizli kanın, bütün farelerde iyileştiği, ek olarak, barsakta fokal lezyonların sıklığının ve şiddetinin, mukozada dramatik olarak azaldığı gösterilmiştir. Bütün tedavi edilen gruplarda, DSS veya melatonin uygulanmasına bağlı olarak goblet hücre dağılımında değişiklikler gözlenmiştir. Şaşırtıcı olarak, serum melatonin düzeyleri, DSS uygulanan farelerde, kontroller ile karşılaştırıldığında on kat kadar yüksek bulunmuş ve DSS uygulanan farelerde, bulunan yüksek serum melatonin düzeylerinin, gastrointestinal sistemden melatonin üretiminin, stres ile uyarılmış olarak artmasına bağlı olabileceği öne sürülmüştür (152).

Biz her ne kadar, DSS ile uyarılan kolit modelinde, DSS'li içme suyu ile birlikte, melatonin verdiğimizde, model grup ile melatonin uygulanan gruplar arasında, HAI'de istatistik önemde bir farklılaşma saptamamış olsak da, melatonin uygulanması, HAI'nin kontrol gruptan farklı olmamasını sağladı. Ayrıca 1 mg/kg ve 2 mg/kg/gün melatonin uygulanan gruplarda kolon ağırlıkları, model gruba göre, anlamlı derecede düşük, kolon boylarının da anlamlı derecede daha uzun olduğu gözlemlendi. Ağırlık/boy oranları ise melatonin verilen bütün gruplarda, model gruba göre anlamlı derecede düşük bulundu. 0,5 mg/kg/gün melatonin uygulanan grupta, istatistiksel olarak anlamlı farklılaşma oluşturmasa da, kolon ağırlıkları, model gruba göre daha düşük, kolon boyu ise daha uzun bulundu, histolojik skorlama melatonin uygulanan gruplarda, model gruba göre anlamlı derecede düşük bulundu, ve melatonin dozu artırıldıkça, skorlamanın düştüğü gözlemlendi. MDA düzeylerine bakıldığında da, 1 mg/kg/gün melatonin uygulanan grupta, 0,5 mg/kg/gün melatonin uygulanan gruba göre ve model gruba göre anlamlı derecede düşük bulundu. Kolon ağırlık ve boyları, histolojik skorlamalar ve doku MDA düzeyleri, birlikte değerlendirildiğinde, melatonin'in antiinflamatuvar ve antioksidan etkiler ile %2,5'lük DSS ile oluşturulan kolitte koruyucu etkinliği olduğunu göstermektedir.

İstatiksel olarak anlamlı farklılaşma olmasa da, TNF- $\alpha$ , ve IL-10 düzeylerine bakıldığında, TNF- $\alpha$  düzeylerinin model grupta, diğer gruplara göre yüksek bulunması, anti-inflamatuar bir sitokin olan IL-10 düzeyinin, de diğer gruplara göre model grupta daha düşük bulunması, melatoninin, %2,5'luk DSS ile oluşturulan kolit modelinde sitokin salınımını etkilediğini göstermektedir. MPO açısından değerlendirildiğinde ise; beklenenin aksine kontrol gruplarında MPO yüksek düzeyde iken model grupta MPO'nun baskılanmış olduğu gözlenmektedir.

Bir haftalık %2,5'luk DSS uygulamasını takiben, 1 hafta farklı dozlarda melatonin verilen sıçanlarda; melatonin uygulanan gruplar ile model gruplar arasında, klinik değerlendirme, kolon ağırlık ve boy oranları, histolojik skorlama ve kolon dokusunda, TNF- $\alpha$ , IL-10, MDA ve MPO düzeyleri açısından, anlamlı farklılaşma saptanmadı. Melatonin uygulanan gruplar ile model grup arasında istatiksel olarak anlamlı farklılaşma bulunmaması, klinik bulguların model grupta, 9. gün sonrasında kendiliğinden gerileme görülmesi ile açıklanabilir. Her ne kadar istatiksel olarak anlamlı farklılaşma olmasa da, melatonin dozu ile doğru orantılı olarak kolon boylarının daha uzun bulunması, kolon ağırlıklarının melatonin uygulanan gruplarda daha düşük bulunması ve melatonin uygulanan gruplarda 9-14. günler arasında HAI değerinde daha hızlı düşme gözlenmesi, melatonin'in %2,5'luk DSS ile oluşturulan kolit modelinde tedavi edici etkinliği olabileceğini düşündürmektedir.

## 7. SONUÇ

%2,5 DSS ile deneysel kolit modelinde, melatoninin 1 ve 2 mg/kg/gün dozlarında eş zamanlı uygulanması; kolon, ağırlık ve boyları, ağırlık/boy oranları ve histopatolojik sonuçlar dikkate alındığında, 1 mg/kg/gün dozunda eş zamanlı olarak uygulandığında, doku MDA düzeylerine bakıldığında anlamlı derecede koruyucu etki gösterdiği ortaya konmaktadır. Sonuç olarak melatonin İBH'da olumlu katkısı olabilir; bulgularımızın başka çalışmalar ile desteklenmesi klinik uygulamalara yol gösterecektir.

## 8. ÖZET

**AMAÇ:** Bu çalışmada, sıçanlarda dekstran sulfat sodyum (DSS) ile uyarılan kolitte melatonin'in hem koruyucu hem de terapötik değerinin araştırılması amaçlanmıştır.

**MATERYAL VE METOD:** Çalışmamızda 76 erkek Wistar-albino rat kullanıldı. Çalışmamız iki deneyden oluştu. Kontrol gruplarında 6, diğer gruplarda 8 rat olacak şekilde, 10 gruba ayrıldı. Birinci deneyde, bir hafta %2,5 oranında DSS içeren su verilen ratlara, eş zamanlı olarak, ikinci deneyde takibeden bir hafta farklı dozlarda (0,5, 1, 2 mg/kg/gün) i.p melatonin uygulandı. Klinik değerlendirme, günlük kilo değişimi, dışkı kıvamı ve dışkıda kan varlığı değerlendirilerek yapıldı. İlk deneyde 8. gün, ikinci deneyde 15. gün sabahı ratların yaşamlarına son verilerek, laparotomi yapıldı ve kolonları çıkarıldı. Kolon uzunlukları ve ağırlıkları ölçüldü, kolon dokusu histolojik olarak değerlendirildi, dokuda malondialdehid (MDA), TNF- $\alpha$ , IL-10 düzeyleri ile, myeloperoksidaz aktiviteleri (MPO) ölçüldü.

**BULGULAR:** %2,5 DSS ile eş zamanlı ve takibeden hafta, melatonin verilen deney kolunda hastalık aktivite indeksi kısmen düşüktü. Eş zamanlı melatonin uygulanan deney kolunda, kolon ağırlıkları, melatonin 1 mg/kg/gün ve 2 mg/kg/gün uygulanan grupta, model gruba göre düşük bulunurken, boyları daha uzun bulundu. Melatonin uygulanan grupların tümünde, histolojik skorlar model gruba göre anlamlı derecede düşük bulundu ve doku MDA düzeyleri, melatonin 1 mg/kg/gün uygulanan grupta, model gruba göre anlamlı derecede düşük bulundu. İkinci deneyde, klinik değerlendirmede, histolojik skorlamada ve biyokimyasal parametrelerin hiçbirinde anlamlı farklılaşma saptanmadı.

**SONUÇ:** %2,5 DSS ile oluşturulan kolit modelinde, melatonin hastalık aktivite indeksinde kısmen koruyucu etki gösterdi. Kolon ağırlık ve boyları, ağırlık/boy oranları, histolojik değerlendirme ve doku MDA düzeyleri dikkate alındığında, melatoninin istatistik önemde koruyucu etkisinin olduğu görülmektedir.

**Anahtar kelimeler:** Deneysel Kolit, Melatonin, İnflamatuvar Barsak Hastalığı, Dekstran sulfat sodyum.

## 8. SUMMARY

**AIM:** We investigated the protective and therapeutic effect of melatonin on the dextran sodium sulphate (DSS)- induced colitis in rats.

**MATERIALS AND METHODS:** Seventy six male Wistar rats were used. Our study composed from two experiments. We have induced daily 2,5% DSS with drinking water first week in each study. Different doses of melatonin (0,5, 1, 2 mg/kg/gün), had been administered intraperitoneally to the DSS treated rats, on first week in the first study and, second week on the second study. Clinical evaluation had been performed by observation of rectal bleeding, weight loss and stool consistency daily. Rats had been killed on the day 8, in the first study, and the day 15. day in the second study, and performed laparotomy then excised colon tissues. Also colon length and weight had been measured. Histological evaluation of colon tissues and tissue MDA, TNF- $\alpha$ , IL-10 levels and MPO activity analysis had been performed.

**RESULTS:** In the first experiment melatonin exerted partial beneficial effects on disease activity index. Colon lengths were longer and colon weights were reduced at melatonin 1 mg/kg/day and 2 mg/kg/day administered rats compared to the model group in the first experiment. The histological scores and tissue MDA levels were lower in melatonin administered rats, than model group. No statistically significant differences had been found on clinical observation, histological scoring and the other biochemical results in the second experimental study.

**CONCLUSION:** Simultaneously melatonin administration caused some beneficial effects on the disease activity index in the 2,5% DSS induced colitis in rats. However, colon weight and length measurements, weight/length ratio, tissue MDA analysis and histological scores were showed significant improvement on colitis and protective effect of melatonin on 2,5 % DSS mediated colitis.

**KEY WORDS:** Experimental colitis, Melathonine, Inflammatory Bowel Disease, Dextrane Sulphate Sodium.



## 9. KAYNAKLAR

1. Kozuch PL, Hanauer SB. Treatment of inflammatory bowel disease: a review of medical therapy. *World J Gastroenterol*. 2008 Jan 21;14(3):354-77.
2. Kawada M, Arihiro A, Mizoguchi E. Insights from advances in research of chemically induced experimental models of human inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol*. 2007 Nov 14;13(42):5581-93. Review.
3. Marquez E, Sánchez-Fidalgo S, Calvo JR, la de Lastra CA, Motilva V. Acutely administered melatonin is beneficial while chronic melatonin treatment aggravates the evolution of TNBS-induced colitis. *J Pineal Res*. 2006 Jan;40(1):48-55.
4. Xiang JY, Wu LG, Huang XL, Zhang M, Pen L, Ouyan Q, Gan HT. Amelioration of murine dextran sulfate sodium-induced colitis by nuclear factor-kappa B decoy oligonucleotides. *Am J Surg*. 2008 Oct 14. [Epub ahead of print]
5. Jian YT, Wang JD, Mai GF, Zhang YL, Lai ZS. Modulation of intestinal mucosal inflammatory factors by curcumin in rats with Colitis, *Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao*. 2004 Dec;24(12):1353-8.
6. May MJ, Ghosh S. Signal transduction through NF-kappa B. *Immunol Today*. 1998 Feb;19(2):80-8.
7. Sendt W, Mansouri E, Schmitt-Graeff A, Wolff-Vorbeck G, Schöffel U. Influence of antiseptic agents on interleukin-8 release and transmigration of polymorphonuclear neutrophils in a human in vitro model of peritonitis. *Surg Infect (Larchmt)*. 2002 Fall;3(3):235-44.
8. Rosman C, Westerveld GJ, van Oeveren W, Kooi K, Bleichrodt RP. Effect of intraperitoneal antimicrobials on the concentration of bacteria, endotoxin, and tumor necrosis factor in abdominal fluid and plasma in rats. *Eur Surg Res*. 1996;28(5):351-60.
9. Rosman C, Westerveld GJ, Kooi K, Bleichrodt RP. Local treatment of generalised peritonitis in rats; effects on bacteria, endotoxin and mortality. *Eur J Surg*. 1999 Nov;165(11):1072-9.
10. Salh B, Assi K, Templeman V, Parhar K, Owen D, Gómez-Muñoz A, Jacobson K. Curcumin attenuates DNB-induced murine colitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2003 Jul;285(1):G235-43. Epub 2003 Mar 13.
11. Podolsky DK. Inflammatory bowel disease. *N Engl J Med*. 2002 Aug 8;347(6):417-29.
12. Lih-Brody L, Powell SR, Collier KP, Reddy GM, Cerchia R, Kahn E, Weissman GS, Katz S, Floyd RA, McKinley MJ, Fisher SE, Mullin GE. Increased oxidative stress and decreased antioxidant defenses in mucosa of inflammatory bowel disease. *Dig Dis Sci*. 1996 Oct;41(10):2078-86.
13. Buffinton GD, Doe WF. Depleted mucosal antioxidant defences in inflammatory bowel disease. *Free Radic Biol Med*. 1995 Dec;19(6):911-8.

14. Roessner A, Kuester D, Malfertheiner P, Schneider-Stock R. Oxidative stress in ulcerative colitis-associated carcinogenesis. *Pathol Res Pract*. 2008;204(7):511-24. Epub 2008 Jun 20.
15. Reiter RJ. The indoleamine melatonin as a free radical scavenger, electron donor, and antioxidant. In vitro and in vivo studies. *Adv Exp Med Biol*. 1996;398:307-13. Department of Cellular and Structural Biology, University of Texas Health Science Center, San Antonio 78294-7762, USA
16. Kirsner JB, ed. Inflammatory Bowel Disease. 5th ed. Philadelphia, Pa: *WB Saunders Co*; 2000.
17. Farmer RG. Study of family history among patients with inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol Suppl*. 1989;170:64-5; discussion 66-8.
18. Tysk C, Lindberg E, Järnerot G, Flodérus-Myrhed B. Ulcerative colitis and Crohn's disease in an unselected population of monozygotic and dizygotic twins. A study of heritability and the influence of smoking. *Gut*. 1988 Jul;29(7):990-6.
19. Subhani J, Montgomery S, Pounder R, Wakefield A. Concordance rates of twins and siblings in inflammatory bowel disease (IBD). *Gut* 1998;42
20. Ahmad T, Satsangi J, McGovern D, Bunce M, Jewell DP. *Aliment Pharmacol Ther*. 2001 Jun;15(6):731-48. Review article: the genetics of inflammatory bowel disease.
21. Sandler R. Epidemiology of inflammatory bowel disease. In: Targan S, Shanahan F, eds. Inflammatory bowel disease: from Bench to Bedside. Roth MP, Petersen GM, McElree C, Feldman E, Rotter JI. Geographic origins of Jewish patients with inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*. 1989 Oct;97(4):900-4.
22. Roth MP, Petersen GM, McElree C, Feldman E, Rotter JI. Geographic origins of Jewish patients with inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*. 1989 Oct;97(4):900-4.
23. Orholm M, Munkholm P, Langholz E, Nielsen OH, Sørensen TI, Binder V. Familial occurrence of inflammatory bowel disease. *N Engl J Med*. 1991 Jan 10;324(2):84-8.
24. Shanahan F. Inflammatory bowel disease: immunodiagnostics, immunotherapeutics, and ecotherapeutics. *Gastroenterology*. 2001 Feb;120(3):622-35.
25. Hugot JP, Chamaillard M, Zouali H, Lesage S, Cézard JP, Belaiche J, Almer S, Tysk C, O'Morain CA, Gassull M, Binder V, Finkel Y, Cortot A, Modigliani R, Laurent-Puig P, Gower-Rousseau C, Macry J, Colombel JF, Sahbatou M, Thomas G. Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature*. 2001 May 31;411(6837):599-603.
26. Ogura Y, Bonen DK, Inohara N, Nicolae DL, Chen FF, Ramos R, Britton H, Moran T, Karaliuskas R, Duerr RH, Achkar JP, Brant SR, Bayless TM, Kirschner BS, Hanauer SB, Nuñez G, Cho JH. A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature*. 2001 May 31;411(6837):603-6.

27. Ardizzone S, Bianchi Porro G. Inflammatory bowel disease: new insights into pathogenesis and treatment. *J Intern Med.* 2002 Dec;252(6):475-96.
28. Van Heel DA, McGovern DP, Jewell DP. Crohn's disease: genetic susceptibility, bacteria, and innate immunity. *Lancet.* 2001 Jun 16;357(9272):1902-4.
29. Mahida YR, Johal S. NF-kappa B may determine whether epithelial cell--microbial interactions in the intestine are hostile or friendly. *Clin Exp Immunol.* 2001 Mar;123(3):347-
30. Satsangi J, Parkes M, Louis E, Hashimoto L, Kato N, Welsh K, Terwilliger JD, Lathrop GM, Bell JI, Jewell DP. Two stage genome-wide search in inflammatory bowel disease provides evidence for susceptibility loci on chromosomes 3, 7 and 12. *Nat Genet.* 1996 Oct;14(2):199-202.
31. Satsangi J, Welsh KI, Bunce M, Julier C, Farrant JM, Bell JI, Jewell DP. Contribution of genes of the major histocompatibility complex to susceptibility and disease phenotype in inflammatory bowel disease. *Lancet.* 1996 May 4;347(9010):1212-7. *Lancet.* 1996 Jul 6;348(9019):68. *Lancet.* 1996 May 4;347(9010):1198.
32. Sellon RK, Tonkonogy S, Schultz M, Dieleman LA, Grenther W, Balish E, Rennick DM, Sartor RB. Resident enteric bacteria are necessary for development of spontaneous colitis and immune system activation in interleukin-10-deficient mice. *Infect Immun.* 1998 Nov;66(11):5224-31.
33. Evans JM, McMahon AD, Murray FE, McDevitt DG, MacDonald TM. Non-steroidal anti-inflammatory drugs are associated with emergency admission to hospital for colitis due to inflammatory bowel disease. *Gut.* 1997 May;40(5):619-22. *Comment in:Gut.* 1998 Jan;42(1):144.
34. Shanahan F. Crohn's disease. *Lancet.* 2002 Jan 5;359(9300):62-9.
35. Hollander D, Vadheim CM, Brettholz E, Petersen GM, Delahunty T, Rotter JI. Increased intestinal permeability in patients with Crohn's disease and their relatives. A possible etiologic factor. *Ann Intern Med.* 1986 Dec;105(6):883-5.
36. Fabia R, Ar'Rajab A, Johansson ML, Andersson R, Willén R, Jeppsson B, Molin G, Bengmark S. Impairment of bacterial flora in human ulcerative colitis and experimental colitis in the rat. *Digestion.* 1993;54(4):248-55.
37. Franceschi S, Panza E, La Vecchia C, Parazzini F, Decarli A, Bianchi Porro G. Nonspecific inflammatory bowel disease and smoking. *Am J Epidemiol.* 1987 Mar;125(3):445-52.
38. Lindberg E, Tysk C, Andersson K, Järnerot G. Smoking and inflammatory bowel disease. A case control study. *Gut.* 1988 Mar;29(3):352-7.
39. McCartney SA, Mitchell JA, Fairclough PD, Farthing MJ, Warner TD. *Aliment Pharmacol Ther.* 1999 Aug;13(8):1115-7. Selective COX-2 inhibitors and human inflammatory bowel disease. McCartney SA, Mitchell JA, Fairclough PD, Farthing MJ, Warner TD.

40. Theis MK, Boyko EJ. Patient perceptions of causes of inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol*. 1994 Oct;89(10):1920. .
41. Rutgeerts P, D'Haens G, Hiele M, Geboes K, Vantrappen G. Appendectomy protects against ulcerative colitis. *Gastroenterology*. 1994 May;106(5):1251-3.
42. Koutroubakis IE, Vlachonikolis IG. Appendectomy and the development of ulcerative colitis: results of a metaanalysis of published case-control studies. *Am J Gastroenterol*. 2000 Jan;95(1):171-6.
43. Lowenfels AB, Maisonneuve P. Appendectomy and protection against ulcerative colitis. *N Engl J Med*. 2001 Jul 19;345(3):223; author reply 223-4. No abstract available.
44. Fiocchi C. Inflammatory bowel disease: etiology and pathogenesis. *Gastroenterology*. 1998 Jul;115(1):182-205. Review. No abstract available.
45. Elson CO. Commensal bacteria as targets in Crohn's disease. *Gastroenterology*. 2000 Jul;119(1):254-7. Review. No abstract available.
46. Powrie F. T cells in inflammatory bowel disease: protective and pathogenic roles. *Immunity*. 1995 Aug;3(2):171-4. Review. No abstract available.
47. Fuss IJ, Neurath M, Boirivant M, Klein JS, de la Motte C, Strong SA, Fiocchi C, Strober W. Disparate CD4+ lamina propria (LP) lymphokine secretion profiles in inflammatory bowel disease. Crohn's disease LP cells manifest increased secretion of IFN-gamma, whereas ulcerative colitis LP cells manifest increased secretion of IL-5. *J Immunol*. 1996 Aug 1;157(3):1261-70.
48. Farrell RJ, Peppercorn MA. Ulcerative colitis. *Lancet*. 2002 Jan 26;359(9303):331-40. Review.
49. Duchmann R, May E, Heike M, Knolle P, Neurath M, Meyer zum Büschenfelde KH. T cell specificity and cross reactivity towards enterobacteria, bacteroides, bifidobacterium, and antigens from resident intestinal flora in humans. *Gut*. 1999 Jun;44(6):812-8. Comment in: *Gut*. 1999 Jun;44(6):774-5.
50. Read S, Malmström V, Powrie F. Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 plays an essential role in the function of CD25(+)CD4(+) regulatory cells that control intestinal inflammation. *J Exp Med*. 2000 Jul 17;192(2):295-302.
51. Schreiber S, Heinig T, Thiele HG, Raedler A. Immunoregulatory role of interleukin 10 in patients with inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*. 1995 May;108(5):1434-44.
52. Ardizzone S, Bollani S, Manzionna G, Bianchi Porro G. Inflammatory bowel disease approaching the 3rd millennium: pathogenesis and therapeutic implications? *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 1999 Jan;11(1):27-32. Review.
53. Sartor RB. Cytokines in intestinal inflammation: pathophysiological and clinical considerations. *Gastroenterology*. 1994 Feb;106(2):533-9.

54. Blam ME, Stein RB, Lichtenstein GR. Integrating anti-tumor necrosis factor therapy in inflammatory bowel disease: current and future perspectives. *Am J Gastroenterol*. 2001 Jul;96(7):1977-97.
55. Lukacs NW, Chensue SW, Strieter RM, Warmington K, Kunkel SL. Inflammatory granuloma formation is mediated by TNF-alpha-inducible intercellular adhesion molecule-1. *J Immunol*. 1994 Jun 15;152(12):5883-9.
56. Neurath MF, Pettersson S, Meyer zum Büschenfelde KH, Strober W. Local administration of antisense phosphorothioate oligonucleotides to the p65 subunit of NF-kappa B abrogates established experimental colitis in mice. *Nat Med*. 1996 Sep;2(9):998-1004.
57. Fichtner-Feigl S, Fuss IJ, Preiss JC, Strober W, Kitani A. Treatment of murine Th1- and Th2-mediated inflammatory bowel disease with NF-kappa B decoy oligonucleotides. *J Clin Invest*. 2005 Nov;115(11):3057-71. *Epub* 2005 Oct 20.
58. Baldwin AS Jr. Series introduction: the transcription factor NF-kappaB and human disease. *J Clin Invest*. 2001 Jan;107(1):3-6.
59. Jobin C, Sartor RB. NF-kappaB signaling proteins as therapeutic targets for inflammatory bowel diseases. *Inflamm Bowel Dis*. 2000 Aug;6(3):206-13.
60. Schreiber S, Nikolaus S, Hampe J. Activation of nuclear factor kappa B inflammatory bowel disease. *Gut*. 1998 Apr;42(4):477-84.
61. Neurath MF, Fuss I, Schürmann G, Pettersson S, Arnold K, Müller-Lobeck H, Strober W, Herfarth C, Büschenfelde KH. Cytokine gene transcription by NF-kappa B family members in patients with inflammatory bowel disease. *Ann N Y Acad Sci*. 1998 Nov 17;859:149-59.
62. Head KA, Jurenka JS. Inflammatory bowel disease Part 1: ulcerative colitis--pathophysiology and conventional and alternative treatment options. *Altern Med Rev*. 2003 Aug;8(3):247-83.
63. Su CG, Wen X, Bailey ST, Jiang W, Rangwala SM, Keilbaugh SA, Flanigan A, Murthy S, Lazar MA, Wu GD. A novel therapy for colitis utilizing PPAR-gamma ligands to inhibit the epithelial inflammatory response. *J Clin Invest*. 1999 Aug;104(4):383-9.
64. Gilbert DL, Colton CA. Reactive Oxygen Species in Biological Systems: An Interdisciplinary Approach. *Kluwer Academic Publishers*, 2002.
65. Freeman BA, Crapo JD. Biology of disease: free radicals and tissue injury. *Lab Invest* 1982; 47: 412-426.
66. Halliwell B, Whiteman M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *Br J Pharmacol* 2004; 142: 231-255.
67. Von Sonntag C. Free-Radical-Induced DNA Damage and Its Repair. *Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York*, 2006.

68. Halliwell B, Gutteridge JM. Lipid peroxidation, oxygen radicals, cell damage, and antioxidant therapy. *Lancet* 1984; 1: 1396-1397.
69. Halliwell B. Tell me about free radicals, doctor: a review. *J R Soc Med* 1989; 82: 747-752.
70. Bulkley GB. The role of oxygen free radicals in human disease process. *Surgery* 1983; 94: 407-411.
71. Parks DA. Oxygen radicals: mediator of gastrointestinal pathophysiology. *Gastroenterology* 1989; 30: 293-298.
72. Thomas MJ. The role of free radicals and antioxidants: How do we know that they are working? *Crit Rev Food Sci Nutr* 1995; 5: 21-29.
73. Cheeseman KH, Slater TF. An introduction to free radical biochemistry. *Br Med Bull* 1993; 49: 481-493
74. Karihtala P, Soini Y. Reactive oxygen species and antioxidant mechanisms in human tissues and their relation to malignancies. *APMIS* 2007; 115: 81-103.
75. Akkuş İ. Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkiler. *Mimoza Yayınları*, Konya.1995; 1-132.
76. Slater TF. Free radical mechanisms in tissue injury. *Biochemistry* 1984; 222: 1-15.
77. Akyol Ö. Beyin tümörlerinde doku superoksit dismutaz, CAT ve glutatyon peroksidaz aktiviteleri. *Uzmanlık Tezi. Ankara Uni. Tıp Fak. Biyokimya A.D.*, 1994
78. Ames BN, Shigenaga MK, Hagen TM. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; 90: 7915-7922.
79. Miquel J, Ramirez-Bosca A, Ramirez-Bosca JV, Alperi JD. Menopause: A review on the role of oxygen stress and favorable effects of dietary antioxidants. *Arch Gerontol Geriatr* 2006; 42: 289-306.
80. Urso ML, Clarkson PM. Oxidative stress, exercise, and antioxidant supplementation. *Toxicology* 2003; 189: 41-54.
81. Erel O. A novel automated method to measure total antioxidant response against potent free radical reactions. *Clin Biochem* 2004; 37: 112-119.
82. Ayçiçek A, Erel O, Koçyiğit A. Increased oxidative stress in infants exposed to passive smoking. *Eur J Pediatr* 2005; 164: 775-778.
83. Misso NL, Brooks-Wildhaber J, Ray S, Vally H, Thompson PJ. Plasma concentrations of dietary and nondietary antioxidants are low in severe asthma. *Eur Respir J* 2005; 26: 257-264.
84. Fedeli D, Falcioni G, Olek RA, Massi M, Cifani C, Polidori C, Gabbianelli R. Protective effect of ethyl pyruvate on msP rat leukocytes damaged by alcohol intake. *J Appl Toxicol* 2007.

85. Wright CE, Tallan HH, Lin YY. Taurine, biological update. *Annu. Rev. Biochem* 1986; 55: 427-453.
86. Hussain SP, Hofseth LJ, Harris CC. Radical causes of cancer. *Nat Rev Cancer*. 2003 Apr;3(4):276-85.
87. Halliwell B. Superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase: solutions to the problem of lung with oxygen. *New Phyto* 1974; 73: 1075-1086.
88. Dat J, Vandenameele S, Vranova E, Van Montagu M, Inze D, Van Breusegem F. Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. *Cell Mol Life Sci* 2000; 57: 779-795.
89. Kılınç K. (1986). Kanserde oksijen radikalleri ve süperoksid dismutaz. *Biyokimya Dergisi*. 3: 59-76.
90. Seven A, Candan G. (1996). Antioksidant defense systems. *Cerrahpasa J Med*. 27: 41-50.
91. Valko M, Izakovic M, Mazur M, Rhodes CJ, Telser J. Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Mol Cell Biochem* 2004; 266: 37-56.
92. Babior BM. Oxygen-dependent microbial killing by phagocytes (first of two parts). *N Engl J Med*. 1978 Mar 23;298(12):659-68.
93. Weitzman SA, Gordon LI. Inflammation and cancer: role of phagocyte-generated oxidants in carcinogenesis. *Blood*. 1990 Aug 15;76(4):655-63.
94. Grisham MB. Oxidants and free radicals in inflammatory bowel disease. *Lancet*. 1994 Sep 24;344(8926):859-61.
95. Campregher C, Luciani MG, Gasche C. Activated neutrophils induce an hMSH2-dependent G2/M checkpoint arrest and replication errors at a (CA)13-repeat in colon epithelial cells. *Gut*. 2008 Jun;57(6):780-7. Epub 2008 Feb 13.
96. Simmonds NJ, Allen RE, Stevens TR, Van Someren RN, Blake DR, Rampton DS. Chemiluminescence assay of mucosal reactive oxygen metabolites in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*. 1992 Jul;103(1):186-96.
97. Keshavarzian A, Sedghi S, Kanofsky J, List T, Robinson C, Ibrahim C, Winship D. Excessive production of reactive oxygen metabolites by inflamed colon: analysis by chemiluminescence probe. *Gastroenterology*. 1992 Jul;103(1):177-85.
98. Holmes EW, Yong SL, Eiznhamer D, Keshavarzian A. Glutathione content of colonic mucosa: evidence for oxidative damage in active ulcerative colitis. *Dig Dis Sci*. 1998 May;43(5):1088-95.
99. Koutroubakis IE, Malliaraki N, Dimoulios PD, Karmiris K, Castanas E, Kouroumalis EA. Decreased total and corrected antioxidant capacity in patients with inflammatory bowel disease. *Dig Dis Sci*. 2004 Sep;49(9):1433-7.

100. Martins NB, Peppercorn MA. Inflammatory bowel disease. *Am J Manag Care*. 2004 Aug;10(8):544-52.
101. Williams H, Walker D, Orchard TR. Extraintestinal manifestations of inflammatory bowel disease. *Curr Gastroenterol Rep*. 2008 Dec;10(6):597-605.
102. Greenstein AJ, Janowitz HD, Sachar DB. The extra-intestinal complications of Crohn's disease and ulcerative colitis: a study of 700 patients. *Medicine (Baltimore)*. 1976 Sep;55(5):401-12.
103. Stebbing JF, Jewell DP, Kettlewell MG, Mortensen NJ. Recurrence and reoperation after stricturoplasty for obstructive Crohn's disease: long-term results [corrected] *Br J Surg*. 1995 Nov;82(11):1471-4. *Erratum in: Br J Surg* 1996 Jan;83(1):131.
104. Fazio VW. Toxic megacolon in ulcerative colitis and Crohn's colitis. *Clin Gastroenterol*. 1980 May;9(2):389-407.
105. Gillen CD, Walmsley RS, Prior P, Andrews HA, Allan RN. Ulcerative colitis and Crohn's disease: a comparison of the colorectal cancer risk in extensive colitis. *Gut*. 1994 Nov;35(11):1590-2. *Comment in: Gut*. 1994 Nov;35(11):1507-8.
106. Sachar DB. Cancer in Crohn's disease: dispelling the myths. *Gut*. 1994 Nov;35(11):1507-8.
107. Blackstone MO, Riddell RH, Rogers BH, Levin B. Dysplasia-associated lesion or mass (DALM) detected by colonoscopy in long-standing ulcerative colitis: an indication for colectomy. *Gastroenterology*. 1981 Feb;80(2):366-74.
108. Peppercorn MA, Goldman P. The role of intestinal bacteria in the metabolism of salicylazosulfapyridine. *J Pharmacol Exp Ther*. 1972 Jun;181(3):555-62. available.
109. Colombel JF, Lémann M, Cassagnou M, Bouhnik Y, Duclos B, Dupas JL, Nottoghem B, Mary JY. *Am J Gastroenterol*. 1999 Mar;94(3):674-8. A controlled trial comparing ciprofloxacin with mesalazine for the treatment of active Crohn's disease. Groupe d'Études Thérapeutiques des Affections Inflammatoires Digestives (GETAID).
110. Prantera C, Cottone M, Pallone F, Annese V, Franzè A, Cerutti R, Bianchi Porro G. Mesalamine in the treatment of mild to moderate active Crohn's ileitis: results of a randomized, multicenter trial. *Gastroenterology*. 1999 Mar;116(3):521-6.
111. Madden MV, McIntyre AS, Nicholls RJ. Double-blind crossover trial of metronidazole versus placebo in chronic unremitting pouchitis. *Dig Dis Sci*. 1994 Jun;39(6):1193-6.
112. Sands BE. Therapy of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*. 2000 Feb;118(2 Suppl 1):S68-82. Review.
113. TRUELOVE SC, WITTS LJ. Cortisone in ulcerative colitis; final report on a therapeutic trial. *Br Med J*. 1955 Oct 29;2(4947):1041-8.



114. Greenberg GR, Feagan BG, Martin F, Sutherland LR, Thomson AB, Williams CN, Nilsson LG, Persson T. Oral budesonide as maintenance treatment for Crohn's disease: a placebo-controlled, dose-ranging study. Canadian Inflammatory Bowel Disease Study Group. *Gastroenterology*. 1996 Jan;110(1):45-51.
115. Thomsen OO, Cortot A, Jewell D, Wright JP, Winter T, Veloso FT, Vatn M, Persson T, Pettersson E. A comparison of budesonide and mesalamine for active Crohn's disease. International Budesonide-Mesalamine Study Group. *N Engl J Med*. 1998 Aug 6;339(6):370-4. *Erratum in: N Engl J Med* 2001 Nov 29;345(22):1652.
116. Schroll S, Sarlette A, Ahrens K, Manns MP, Göke M. Effects of azathioprine and its metabolites on repair mechanisms of the intestinal epithelium in vitro. *Regul Pept*. 2005 Nov;131(1-3):1-11.
117. Tiede I, Fritz G, Strand S, Poppe D, Dvorsky R, Strand D, Lehr HA, Wirtz S, Becker C, Atreya R, Mudter J, Hildner K, Bartsch B, Holtmann M, Blumberg R, Walczak H, Iven H, Galle PR, Ahmadian MR, Neurath MF. CD28-dependent Rac1 activation is the molecular target of azathioprine in primary human CD4+ T lymphocytes. *J Clin Invest*. 2003 Apr;111(8):1133-45.
118. Sandborn W, Sutherland L, Pearson D, May G, Modigliani R, Prantera C. Azathioprine or 6-mercaptopurine for inducing remission of Crohn's disease. *Cochrane Database Syst Rev*. 2000;(2):CD000545. Review.
119. Pearson DC, May GR, Fick G, Sutherland LR. Azathioprine for maintaining remission of Crohn's disease. *Cochrane Database Syst Rev*. 2000; (2):CD000067. Review.
120. Sandborn WJ. A review of immune modifier therapy for inflammatory bowel disease: azathioprine, 6-mercaptopurine, cyclosporine, and methotrexate. *Am J Gastroenterol*. 1996 Mar;91(3):423-33.
121. Feagan BG, Fedorak RN, Irvine EJ, Wild G, Sutherland L, Steinhart AH, Greenberg GR, Koval J, Wong CJ, Hopkins M, Hanauer SB, McDonald JW. A comparison of methotrexate with placebo for the maintenance of remission in Crohn's disease. North American Crohn's Study Group Investigators. *N Engl J Med*. 2000 Jun 1;342(22):1627-32.
122. Cohen RD, Stein R, Hanauer SB. Intravenous cyclosporin in ulcerative colitis: a five-year experience. *Am J Gastroenterol*. 1999 Jun;94(6):1587-92. Comment in: *Am J Gastroenterol*. 2000 Mar;95(3):830.
123. Sandborn WJ, Targan SR. Biologic therapy of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*. 2002 May;122(6):1592-608. Review. *Erratum in: Gastroenterology* 2002 Aug;123(2):656.
124. Colombel JF, Sandborn WJ, Rutgeerts P, Enns R, Hanauer SB, Panaccione R, Schreiber S, Byczkowski D, Li J, Kent JD, Pollack PF. Adalimumab for maintenance of clinical response and remission in patients with Crohn's disease: the CHARM trial. *Gastroenterology*. 2007 Jan;132(1):52-65. Epub 2006 Nov 29.

125. Loguercio C, D'Argenio G, Delle Cave M, Cosenza V, Della Valle N, Mazzacca G, Del Vecchio Blanco C. Glutathione supplementation improves oxidative damage in experimental colitis. *Dig Liver Dis*. 2003 Sep;35(9):635-41.
126. Oz HS, Chen TS, McClain CJ, de Villiers WJ. Antioxidants as novel therapy in a murine model of colitis. *J Nutr Biochem*. 2005 May;16(5):297-304.
127. Chu FF, Esworthy RS, Chu PG, Longmate JA, Huycke MM, Wilczynski S, Doroshow JH. Bacteria-induced intestinal cancer in mice with disrupted Gpx1 and Gpx2 genes. *Cancer Res*. 2004 Feb 1;64(3):962-8.
128. Konturek SJ, Konturek PC, Brzozowska I, Pawlik M, Sliwowski Z, Cześnikiewicz-Guzik M, Kwiecień S, Brzozowski T, Bubenik GA, Pawlik WW. Localization and biological activities of melatonin in intact and diseased gastrointestinal tract (GIT). *J Physiol Pharmacol*. 2007 Sep;58(3):381-405.
129. Pandi-Perumal SR, Trakht I, Srinivasan V, Spence DW, Maestroni GJ, Zisapel N, Cardinali DP. Physiological effects of melatonin: role of melatonin receptors and signal transduction pathways. *Prog Neurobiol*. 2008 Jul;85(3):335-53. Epub 2008 Apr 16.
130. Ma X, Idle JR, Krausz KW, Gonzalez FJ. Metabolism of melatonin by human cytochromes p450. *Drug Metab Dispos*. 2005 Apr;33(4):489-94. Epub 2004 Dec 22.
131. Tan DX, Manchester LC, Reiter RJ, Plummer BF, Hardies LJ, Weintraub ST, Vijayalaxmi, Shepherd AM. A novel melatonin metabolite, cyclic 3-hydroxymelatonin: a biomarker of in vivo hydroxyl radical generation. *Biochem Biophys Res Commun*. 1998 Dec 30;253(3):614-20.
132. Mayo JC, Sainz RM, Tan DX, Hardeland R, Leon J, Rodriguez C, Reiter RJ. Anti-inflammatory actions of melatonin and its metabolites, N1-acetyl-N2-formyl-5-methoxykynuramine (AFMK) and N1-acetyl-5-methoxykynuramine (AMK), in macrophages. *J Neuroimmunol*. 2005 Aug;165(1-2):139-49.
133. Ressmeyer AR, Mayo JC, Zelosko V, Sáinz RM, Tan DX, Poeggeler B, Antolín I, Zsizsik BK, Reiter RJ, Hardeland R. Antioxidant properties of the melatonin metabolite N1-acetyl-5-methoxykynuramine (AMK): scavenging of free radicals and prevention of protein destruction. *Redox Rep*. 2003;8(4):205-13.
134. Pandi-Perumal SR, Srinivasan V, Maestroni GJ, Cardinali DP, Poeggeler B, Hardeland R. Melatonin: Nature's most versatile biological signal? *FEBS J*. 2006 Jul;273(13):2813-38.
135. Reppert SM, Weaver DR, Ebisawa T. Cloning and characterization of a mammalian melatonin receptor that mediates reproductive and circadian responses. *Neuron*. 1994 Nov;13(5):1177-85.
136. Lee PP, Pang SF. Melatonin and its receptors in the gastrointestinal tract. *Biol Signals*. 1993 Jul-Aug;2(4):181-93.

137. Bubenik GA, Hacker RR, Brown GM, Bartos L. Melatonin concentrations in the luminal fluid, mucosa, and muscularis of the bovine and porcine gastrointestinal tract. *J Pineal Res.* 1999 Jan;26(1):56
138. Bubenik GA. Thirty four years since the discovery of gastrointestinal melatonin. *J Physiol Pharmacol.* 2008 Aug;59 Suppl 2:33-51.
139. Huether G, Poeggeler B, Reimer A, George A. Effect of tryptophan administration on circulating melatonin levels in chicks and rats: evidence for stimulation of melatonin synthesis and release in the gastrointestinal tract. *Life Sci.* 1992;51(12):945-53.
140. Huether G. The contribution of extrapineal sites of melatonin synthesis to circulating melatonin levels in higher vertebrates. *Experientia.* 1993 Aug 15;49(8):665-70.
141. Tan DX, Manchester LC, Hardeland R, Lopez-Burillo S, Mayo JC, Sainz RM, Reiter RJ. Melatonin: a hormone, a tissue factor, an autocoid, a paracoid, and an antioxidant vitamin. *J Pineal Res.* 2003 Jan;34(1):75-8.
142. Pieri C, Marra M, Moroni F, Recchioni R, Marcheselli F. Melatonin: a peroxy radical scavenger more effective than vitamin E. *Life Sci.* 1994;55(15):PL271-6.
143. Poeggeler B, Reiter RJ, Tan DX, Chen LD, Manchester LC. Melatonin, hydroxyl radical-mediated oxidative damage, and aging: a hypothesis. *J Pineal Res.* 1993 May;14(4):151-68. Review. PMID: 8102180
144. Reiter RJ. Melatonin: clinical relevance. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2003 Jun;17(2):273-85. Review. PMID: 12787552
145. Konturek PC, Konturek SJ, Brzozowski T, Dembinski A, Zembala M, Mytar B, Hahn EG. Gastroprotective activity of melatonin and its precursor, L-tryptophan, against stress-induced and ischaemia-induced lesions is mediated by scavenging of oxygen radicals. *Scand J Gastroenterol.* 1997 May;32(5):433-8.
146. Anisimov VN, Popovich IG, Zabezhinski MA, Anisimov SV, Vesnushkin GM, Vinogradova IA. Melatonin as antioxidant, geroprotector and anticarcinogen. *Biochim Biophys Acta.* 2006 May-Jun;1757(5-6):573-89. Epub 2006 Apr 17.
147. Konturek PC, Konturek SJ, Majka J, Zembala M, Hahn EG. Melatonin affords protection against gastric lesions induced by ischemia-reperfusion possibly due to its antioxidant and mucosal microcirculatory effects. *Eur J Pharmacol.* 1997 Mar 12;322(1):73-7.
148. Hardeland R, Pandi-Perumal SR. Melatonin, a potent agent in antioxidative defense: actions as a natural food constituent, gastrointestinal factor, drug and prodrug. *Nutr Metab (Lond).* 2005 Sep 10;2:22.
149. Maestroni GJ. The immunoneuroendocrine role of melatonin. *J Pineal Res.* 1993 Jan;14(1):1-10.
150. Yanagisawa M, Kachi T. Effects of pineal hormone on the Payer's patches in the small intestine. *Acta Anat Nippon* 1993; 69: 522-527

151. Pentney PT, Bubenik GA. J Melatonin reduces the severity of dextran-induced colitis in mice. *Pineal Res.* 1995 Aug;19(1):31-9.
152. Okayasu I, Hatakeyama S, Yamada M, Ohkusa T, Inagaki Y, Nakaya R. A novel method in the induction of reliable experimental acute and chronic ulcerative colitis in mice. *Gastroenterology.* 1990 Mar;98(3):694-702.
153. Cooper HS, Murthy SN, Shah RS, Sedergran DJ. Clinicopathologic study of dextran sulfate sodium experimental murine colitis. *Lab Invest.* 1993 Aug;69(2):238-49.
154. Reifen R, Nur T, Ghebermeskel K, Zaiger G, Urizky R, Pines M. Vitamin A deficiency exacerbates inflammation in a rat model of colitis through activation of nuclear factor-kappaB and collagen formation. *J Nutr.* 2002 Sep;132(9):2743-7.
155. Obermeier F, Kojouharoff G, Hans W, Schölmerich J, Gross V, Falk W. Interferon-gamma(IFN- $\gamma$ )- and tumour necrosis factor (TNF)-induced nitric oxide as toxic effector molecule in chronic dextran sulphate sodium (DSS)-induced colitis in mice. *Clin Exp Immunol* 1999; 116: 238-245.
156. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Biol Chem* 1951; 193: 265-275.
157. Krawisz JE, Sharon P, Stenson WF. Quantitative assay for acute intestinal inflammation based on myeloperoxidase activity. Assessment of inflammation in rat and hamster models. *Gastroenterology.* 1984 Dec;87(6):1344-50.
158. Vicario M, Crespí M, Franch A, Amat C, Pelegrí C, Moretó M. Induction of colitis in young rats by dextran sulfate sodium. *Dig Dis Sci.* 2005 Jan;50(1):143-50.
159. Fiorentino DF, Bond MW, Mosmann TR. Two types of mouse T helper cells. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. *J Exp Med* 1989;170:2081-2095.
160. Cho JH. Inflammatory bowel disease: genetic and epidemiologic considerations. *World J Gastroenterol.* 2008 Jan 21;14(3):338-47. Review.
161. Loftus EV Jr. Clinical epidemiology of inflammatory bowel disease: Incidence, prevalence, and environmental influences. *Gastroenterology.* 2004 May;126(6):1504-17.
162. Bernstein CN, Blanchard JF, Rawsthorne P, Wajda A. Epidemiology of Crohn's disease and ulcerative colitis in a central Canadian province: a population-based study. *Am J Epidemiol.* 1999 May 15;149(10):916-24.
163. Dohi T, Fujihashi K, Kiyono H, Elson CO, McGhee JR. Mice deficient in Th1- and Th2-type cytokines develop distinct forms of hapten-induced colitis. *Gastroenterology.* 2000 Sep;119(3):724-33.
164. MacDonald TT, Murch SH. Aetiology and pathogenesis of chronic inflammatory bowel disease. *Baillieres Clin Gastroenterol.* 1994 Mar;8(1):1-34.

165. Egger B, Bajaj-Elliott M, MacDonald TT, Inglin R, Eysselein VE, Büchler MW. Characterisation of acute murine dextran sodium sulphate colitis: cytokine profile and dose dependency. *Digestion*. 2000;62(4):240-8.
166. Dieleman LA, Palmén MJ, Akol H, Bloemena E, Peña AS, Meuwissen SG, Van Rees EP. Chronic experimental colitis induced by dextran sulphate sodium (DSS) is characterized by Th1 and Th2 cytokines. *Clin Exp Immunol*. 1998 Dec;114(3):385-91.
167. Bennett CF, Kornbrust D, Henry S, Stecker K, Howard R, Cooper S, Dutson S, Hall W, Jacoby HI. An ICAM-1 antisense oligonucleotide prevents and reverses dextran sulfate sodium-induced colitis in mice. *J Pharmacol Exp Ther*. 1997 Feb;280(2):988-1000.
168. Sahná E, Deniz E, Bay-Karabulut A, Burma O. Melatonin protects myocardium from ischemia-reperfusion injury in hypertensive rats: role of myeloperoxidase activity. *Clin Exp Hypertens*. 2008 Oct;30(7):673-81.
169. Kurcer Z, Oguz E, Ozbilge H, Baba F, Aksoy N, Celik H, Cakir H, Gezen MR. Melatonin protects from ischemia/reperfusion-induced renal injury in rats: this effect is not mediated by proinflammatory cytokines. *J Pineal Res*. 2007 Sep;43(2):172-8.
170. Oku T, Iyama S, Sato T, Sato Y, Tanaka M, Sagawa T, Kuribayashi K, Sumiyosi T, Murase K, Machida T, Okamoto T, Matsunaga T, Takayama T, Takahashi M, Kato J, Hamada H, Niitsu Y. Amelioration of murine dextran sulfate sodium-induced colitis by ex vivo extracellular superoxide dismutase gene transfer. *Inflamm Bowel Dis*. 2006 Jul;12(7):630-40.
171. Kim YH, Kwon HS, Kim DH, Cho HJ, Lee HS, Jun JG, Park JH, Kim JK. Piceatannol, a stilbene present in grapes, attenuates dextran sulfate sodium-induced colitis. *Int Immunopharmacol*. 2008 Dec 10;8(12):1695-702. *Epub* 2008 Sep 4.
172. Kanagarajan N, Nam JH, Noah ZA, Murthy S. Disease modifying effect of statins in dextran sulfate sodium model of mouse colitis. *Inflamm Res*. 2008 Jan;57(1):34-8.
173. Li JH, Yu JP, Yu HG, Xu XM, Yu LL, Liu J, Luo HS. Melatonin reduces inflammatory injury through inhibiting NF-kappaB activation in rats with colitis. *Mediators Inflamm*. 2005 Aug 31;2005(4):185-93.
174. Mei Q, Yu JP, Xu JM, Wei W, Xiang L, Yue L. Melatonin reduces colon immunological injury in rats by regulating activity of macrophages. *Acta Pharmacol Sin*. 2002 Oct;23(10):882-6.
175. Necefli A, Tulumoğlu B, Giriş M, Barbaros U, Gündüz M, Olgaç V, Güloğlu R, Toker G. The effect of melatonin on TNBS-induced colitis. *Dig Dis Sci*. 2006 Sep;51(9):1538-45. *Epub* 2006 Aug 22.