



**T.C.  
GAZİ ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI**

**RİVAROKSABANIN  
2-4-6 TRİNİTROBENZENESULFONİK  
ASİT İLE OLUŞTURULAN DENEYSEL KOLİT MODELİNDE  
İNFLAMASYON VE FİBROZİS BELİRTEÇLERİNE ETKİSİ**

**UZMANLIK TEZİ  
Dr. ÖZLEM GÜL UTKU**

**TEZ DANIŞMANI  
Prof. Dr. SELAHATTİN ÜNAL**

**ANKARA  
MART 2014**

## KABUL VE ONAY

### GAZİ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ TEZ TUTANAĞI

Adı Soyadı	ÖZLEM GÜL UTKU
Baba Adı	TUNCER
Doğum yeri/ Tarihi	ZİLE/1977
Diploma tarihi/Diploma No	2001/0601101
Mezun Olduğu Fakülte	Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi
İhtisas Yaptığı Ana Bilim Dalı/ Bilim Dalı	İç Hastalıkları A.D. / Gastroenteroloji B.D.
İhtisas Süresi	3 yıl 6 ay
Sınav Yapılmasını İsteyen Makam	Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi

**UZMANLIK TEZİNİN ADI:** Rivaroksabanın 2-4-6 Trinitrobenzenosulfonik Asit ile Oluşturulan Deneysel Kolit Modelinde İnflamasyon ve Fibrozis Belirteçlerine Etkisi

**TEZ SAVUNMA TARİHİ:** 17/03/2014

**JÜRİ KARARI:** “Rivaroksabanın 2-4-6 Trinitrobenzenosulfonik Asit ile Oluşturulan Deneysel Kolit Modelinde İnflamasyon ve Fibrozis Belirteçlerine Etkisi” konulu tez başarılı bulunmuştur.

### JÜRİ ÜYELERİ

**TEZ DANIŞMANI**  
Prof. Dr. Selahattin ÜNAL  
Gastroenteroloji B.D.

**ÜYE**  
Prof. Dr. İbrahim DOĞAN  
Gastroenteroloji B.D.

**ÜYE**  
Doç. Dr. Mehmet ARHAN  
Gastroenteroloji B.D.

## ÖNSÖZ

Eğitimim ve tez çalışmam süresince desteğini esirgemeyen tez danışmanım Prof. Dr. Selahattin ÜNAL hocama saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

İhtisas sürem boyunca bilgi ve deneyimlerinden faydalandığım tüm hocalarıma, birlikte çalıştığım uzman arkadaşlarıma ve yardımcı sağlık personeli ekibine ve ayrıca tezimin hazırlanmasında bana yardımcı olan Doç.Dr. Mehmet ARHAN, Uzm. Dr. Eylem KARATAY'a teşekkür ederim.

Her zaman yanımda olan, hiçbir zaman desteklerini esirgemeyen ve beni bugünlere getiren, evlatları olmaktan gurur duyduğum fedakâr anneme, babama, kardeşlerime, eşime ve çocuklarım Batuhan ve Melek'e saygı ve sevgilerimi sunarım.

Uzm. Dr. Özlem GÜL UTKU

Ankara, 2014

# İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
KABUL VE ONAY .....	i
ÖNSÖZ.....	ii
İÇİNDEKİLER.....	iii
KISALTMALAR .....	v
ŞEKİL LİSTESİ .....	vii
RESİM LİSTESİ .....	viii
TABLO LİSTESİ .....	ix
GRAFİK LİSTESİ.....	x
1. GİRİŞ VE AMAÇ .....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. İnflamatuar Bağırsak Hastalıkları.....	4
2.2. İntestinal Mikrosirkülasyon Pıhtılaşma ve IBH Patogenezi.....	5
2.2.1. İntestinal Mikrosirkülasyon.....	5
2.2.2. Pıhtılaşma Sistemi ve İnflamatuar Barsak Hastalıkları.....	8
2.2.2.1. Pıhtılaşma Fizyolojisi .....	9
2.2.2.2. Fibrinolitik Sistem .....	14
2.2.2.3. Pıhtılaşma Sisteminin Hücresel Elemanları ve İnflamasyonla İlişkisi .....	15
2.2.3. Faktör Xa İnflamasyon, Fibrozis İlişkisi.....	18
2.2.3.1. Proteazca Uyarılan Reseptörler .....	20
2.2.3.2. Proteazca Uyarılan Reseptörlerin Gastrointestinal Sistemde Önemi.....	21
2.2.3.4. F X Aracılı Endotel, Epitel, Mezenkimal Hücre Uyarılması ve Etkileri.....	24
2.3. İntestinal Fibrozis .....	26
2.3.1. Fibrozis öncesi (Pre-Fibrotik) Süreç .....	26
2.3.2. Fibrozisin Moleküler Aracıları .....	30
2.3.2.1. Ekstraselüler Matriksin Bileşenleri .....	30

2.3.2.2. Sitokinler ve Büyüme Faktörleri .....	30
2.3.2.3. Metalloproteinazlar (MMP) ve Doku inhibitörleri (TIMP) .....	32
2.3.3. F Xa Aracılı Fibrozis .....	33
2.4. Rivaroksaban .....	34
2.5. Trinitrobenzenosulfonik Asit (TNBS) ile Kolit Modeli .....	35
3. GEREÇ VE YÖNTEM .....	36
3.1. Gereç .....	36
3.1.1. Deney Hayvanları .....	36
3.1.2. Rivaroksaban ve Prednizolonun Hazırlanması .....	36
3.2. Yöntem .....	36
3.2.1. Sıçanların Beslenme Modeli .....	36
3.2.2. Kolit İndüksiyonu .....	38
3.2.5. Patolojik Değerlendirme .....	41
3.2.5.1 Makroskopik Değerlendirme .....	41
3.2.5.2. Mikroskopik Değerlendirme .....	42
3.2.6.1. Doku MPO Aktivitesi için Dokuların Hazırlanması ve MPO ölçümü .....	44
3.2.6.2. MDA, TGF $\beta$ -1, MMP 3 ve TIMP 1 Düzeyi, SOD Aktivitesi İçin Doku Örneklerinin Homojenize Edilmesi .....	44
3.2.7. İstatistiksel Analiz .....	45
4. BULGULAR .....	47
5. TARTIŞMA .....	58
7. KAYNAKLAR .....	83
9. SUMMARY .....	117

## KISALTMALAR

Kısaltma	: Açıklama
aPTT	: Parsiyel tromboblastin zamanı
AT	: Antitrombin
AT-III	: Antitrombin III
CAM	: Hücre adezyon molekülleri
CD40L	: CD40-ligand
CH	: Crohn hastalığında
CTGF	: Connective Tissue Growth Factor
ECM	: Ekstraselüler matrix proteinleri
EMT	: Epitelial-mezenşimal transformasyon
Endo MT	: Endotelial-Mezenşimal dönüşüm
EPCR	: Endotelial protein C resöptörünü
ERK	: ekstraselüler sinyal ilişkili kinaz
F FXII	: Faktör FXII
F IX	: Faktör IX
F V	: Faktör V
F VII	: Faktör VII
F VIII	: Faktör VIII
F X	: Faktör X
F XI	: Faktör XI
GİS	: Gastrointestinal sistem
GPIb/IX/V	: Glikoprotein transmembran kompleks
GPIb <sub>α</sub>	: glikoprotein 1 beta alfa
GPIIb/IIIa	: Glikoprotein IIb/IIIa
H2O2	: H2O2
HMWK	: Yüksek molekül ağırlıklı kinojen (high-molecular weight-kininogen)
ICAM	: İntraselüler adezyon molekülü
ICAM-1	: İntraselüler adezyon molekülü-1
IL-6	: İnterlökin-6
IL-8	: İnterlökin-8

İBH	: İnflamatuvar barsak hastalıkları
JNK	: c-Jun N terminal kinaz
MAPKs	: Mitojen aktifleştirici protein kinaz
MCP-1	: Monosit kemotaktik protein 1
MMP	: Matriks metalloproteinaz
NADPH	: nikotinamid adenindinucleotide phoshate
NF- $\kappa$ B	: Nükleer faktör $\kappa$ B
NO	: Nitrik oksid
PA	: Plazminojen aktivatörü
PAI-1	: Plazminojen aktivatör inhibitör 1
PAI-2	: Plazminojen aktivatör inhibitör 2
PAI-3	: Plazminojen aktivatör inhibitör 3
PARs	: Proteazca uyarılan reseptörler
PSGL-1	: P-selektin glikoprotein ligand
PT	: Protrombin zamanı
SOD	: Süperoksit dismutaz H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
sP-Selektin	: Çözünür P-selektin
TAFI	: Trombin ile aktive edilen fibrinolizis inhibitörü
TF	: Doku faktörü
TFPI	: Doku faktör inhibitorü
TGF- $\beta$	: Transformin growth faktör
TIMP	: Doku metalloproteinaz inhibitörü
TM	: trombomodülin
TNF $_{\alpha}$	: Tümör nekroz faktör
tPA	: doku plazminojen aktivatörü
ÜK	: Ülseratif kolitte
VCAM-1	: Vasküler hücre adezyon molekülü-1
VEGF	: Vasküler endotelial büyüme faktörü
VSMCs	: Vasküler düz kas hücreleri
vWF	: von Willebrand faktör
$\alpha$ -SMA	: $\alpha$ -düz kas antikorü

## ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No:

- Şekil 1.** Pıhtılaşma yolları ..... 13
- Şekil 2.** FXa sinyallerinin hastalık ve sağlık durumunda pelotropik etkileri..... 23
- Şekil 3.** F Xa Aracılı Endotelial, Epitelial ve Mezenkimal Hücre uyarıları..... 25



## RESİM LİSTESİ

	<b>Sayfa No:</b>
<b>Resim 1.</b> TNBS ile kolit indüksiyonu .....	37
<b>Resim 2.</b> Şıçanlarınbir dakika baş aşağı bekletilmesi.....	37
<b>Resim 3.</b> Gavajla rivaroksaban verilmesi .....	37
<b>Resim 4.</b> Grup A Normal Kolon .....	39
<b>Resim 5.</b> Grup A Normal Kolon .....	39
<b>Resim 7.</b> Grup B pankreas hiperemik, normalden küçük.....	39
<b>Resim 6.</b> Grup B 4cm nekroz.....	39
<b>Resim 9.</b> Grup B Uterus kolona yapışmış.....	39
<b>Resim 8.</b> Grup B Uterus kolona yapışmış (resim 8'in diseke edilmiş görünümü).....	39
<b>Resim 10.</b> Grup D 1,5 cm nekroz .....	40
<b>Resim 13.</b> Grup C kolon duvarı kalın ve rijit görünümde .....	40
<b>Resim 12.</b> Grup C kolon duvarında kalınlaşma .....	40
<b>Resim 11.</b> Grup C 3,5cm Nekroz.....	40
<b>Resim 14.</b> Patolojik Bulgular .....	43

## TABLO LİSTESİ

	<b>Sayfa No:</b>
<b>Tablo 1.</b> Kolit Grupları ve Uygulama .....	41
<b>Tablo 2.</b> Makroskopik Kolit Değerlendirilmesi (Millar Skalası).....	42
<b>Tablo 3.</b> Mikroskopik Kolit Değerlendirmesi (Ackerman skalası).....	42
<b>Tablo 4.</b> İnflamasyon ve Fibrozis Markerlerine Ait Ölçümler ile Mikroskopi Skorları Arasındaki Korelasyon Katsayıları ve Önemlilik Düzeyleri.....	57

## GRAFİK LİSTESİ

Sayfa No:

<b>Grafik 1.</b> Grupların 1. ve 8. gün kilo değişimleri.....	47
<b>Grafik 2.</b> Grupların makroskopi skorlarının değerlendirilmesi.....	48
<b>Grafik 3.</b> Grupların Mikroskopi skorlarının değerlendirilmesi.....	49
<b>Grafik 4.</b> Kontrol grubu ve Tedavi Gruplarında Doku MPO Düzeylerinin Kıyaslanması.....	50
<b>Grafik 5.</b> Kontrol grubu ve Tedavi Gruplarında Doku MDA Düzeylerinin Kıyaslanması.....	51
<b>Grafik 6.</b> Kontrol grubu ve Tedavi Gruplarında Doku SOD Düzeylerinin Kıyaslanması.....	52
<b>Grafik 7.</b> Kontrol grubu ve Tedavi Gruplarında Doku MMP -3 Düzeylerinin Kıyaslanması.....	54
<b>Grafik 8.</b> Kontrol grubu ve Tedavi Gruplarında Doku TIMP-1 Düzeylerinin Kıyaslanması.....	55
<b>Grafik 9.</b> Kontrol grubu ve Tedavi Gruplarında TGF $\beta$ 1 Doku Düzeylerinin Kıyaslanması .....	56

## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

İnflamatuvar barsak hastalıkları (İBH), sebebi bilinmeyen, remisyon ve alevlenme dönemleri ile seyreden, dominant olarak gastrointestinal sistemi etkileyen, sistemik kronik inflamasyon ile karakterli hastalıklardır. Ülseratif kolitte (ÜK) hastalık kolonda sınırlı iken, Crohn hastalığında (CH) sıklıkla terminal ileum, çekum ve çıkan kolon olmak üzere tüm gastrointestinal kanal, transmural ve atlamalı bir biçimde tutulabilir. Crohn hastalığında fibrozise bağlı obstrüksiyon ve striktür komplikasyonları gelişebilir. Ülseratif kolitte ise inflamasyon ve fibrozis daha yüzeyseldir (1).

İnflamatuvar barsak hastalıklarının patogeneğinde, genetik yatkınlık ve kazanılmış faktörlerin etkileşimi sonucunda aşırı inflamatuvar cevap oluşumu anahtar rolü oynamaktadır. İBH'da protrombotik durum ve hiperkoagulabilitenin varlığı klinik tecrübeler ve araştırmalarda açık olarak gösterilmiştir. Yakın zamanda yapılan çalışmalarda, İBH'lı hastaların, pıhtılaşma sistemi hücrel ve moleküler elemanlarının fizyolojik fonksiyonlarında bozulma tespit edilmiştir. Pıhtılaşma sisteminin aktivasyonunun hastalık patogene, aktivasyon ve progresyonunda rol oynadığı düşünülmektedir (2) Ayrıca antikoagulan sistem ise inflamasyonun baskılanmasına etki eder (3). Pıhtılaşma faktörlerinden thrombin ve faktör Xa (F Xa), fibrin; mononükleer hücreler ve endotelial hücreleri direk aktive edebilir ve interlökin-6 (IL-6), interlökin-8 (IL-8) salınımına neden olabilir (4). Pıhtılaşma faktörleri bir çok hücrede yer alan proteazca uyarılan reseptörler (PAR'ler) aracılığı ile değişik stokin, büyüme faktörleri ve adezyon

moleküllerinin salınımını uyayarak, inflamasyon ve fibrozisi aktive ederler (5). İBH'lı hastalarda endotel fonksiyonlarındaki değişiklik sonucunda mikrovasküler disfonksiyon gelişmekte, nitrojen ve reaktif oksijen türleri arasındaki dengede değişmektedir. Reaktif oksijen türlerindeki birikme platelet agregasyon ve adhezyonunu artırarak mikrovasküler tromboza yatkınlığı artırmaktadır (6).

İnflamatuvar barsak hastalıklarının seyri sırasında gelişen önemli komplikasyonlardan birisi fibrozistir. Fibrozis kronik bir süreçtir ve bu süreçte hücreler, ekstraselüler matriks, sitokinler ve büyüme faktörleri rol oynar. Büyüme faktörlerinden en önemli olanı ve literatürde en çok adı geçenini TGF- $\beta$  (transformin growth faktör)'dür. TGF- $\beta$ , aktivin ailesinin bir üyesi olup hücre proliferasyonu, yara iyileşmesi ve ekstraselüler matriks yapımından sorumludur (7). TGF- $\beta$ 'nın fibrozis sürecinde myofibroblastların proliferasyonunu sağlamak, kollojen ve  $\alpha$ -SMA ( $\alpha$ -düz kas antikoru) yapımını arttırmak, epitel-mezenşimal hücre transformasyonunu sağlamak, kollojenolizisi inhibe etmek gibi önemli görevleri mevcuttur (8).

Metalloproteinazlar ise kalsiyum ve çinko içeren endoproteinazlardır. Yapılan çalışmalarda, ratlarda oluşturulmuş kolit modellerinde inflamasyon ile birlikte doku metalloproteinazlarının (MMP) arttığı ve mukozal hasarın doku inhibitörleri verilerek geri çevrilebileceği gösterilmiştir. Fibrozis için de yine MMP/TIMP (doku metalloproteinaz inhibitörü)'ler arasındaki hassas dengenin sorumlu olduğu savunulmuştur (9).

Biz bu çalışmada; deneysel kronik kolit modelinde, rivaroksaban ile F  
Xa'nın direk inhibisyonunun inflamatuvar barsak hastalıklarında inflamasyonun  
engellenmesi ve fibrozisi önlemede etkinliğini araştırmayı amaçladık.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. İnflamatuvar Bağırsak Hastalıkları

İnflamatuvar barsak hastalığı, gastrointestinal sistemin (GİS) hayat boyu devam eden, mortalite ile ilişkili kronik tekrarlayıcı, hasarlayıcı ve ilerleyici kronik inflamasyonuyla karakterizedir. Etiyolojisi ve patogenezi kısmen açıklanmıştır. Ülseratif kolit, Crohn hastalığı iki majör formunu oluşturmaktadır. Her iki hastalıkta da inflamasyonun lokalizasyonu ve yapısı farklıdır. CH GİS herhangi bir yerini etikleyebilirken, ÜK kolon ve rektum ile sınırlandırılmış GİS tutulum ile karakterizedir. Diğer önemli farklılık ise ÜK’de sadece mukozal hasar gözlenirken, CH’de intestinal mukoza, musküler tabaka ve serozayı kapsayan transmural hasar izlenir. İBH’li hastaların %25 kadarında hastalığın ekstraintestinal tutulumu gelişebilir. Ekstraintestinal bulgular tromboembolik olaylar, üveit, plörit, myokardit, primer sklerozan kolanjit, nefrolitiazis, pankreatit gibi hastalıkları kapsar. Malignite gelişme riskide normal popülasyona göre artmıştır (10, 11). İBH patogenezinde son çalışmalarda immun hücrelerin neden olduğu 2 farklı hipotez öne sürülmüştür. Birincisi normal flora varlığında mukozal immun sistemin primer regülasyonunda bozulmanın yol açtığı artmış immun cevap. İkincisi ise barsak mikroflorasındaki tüketim ve/veya bozulmuş epitelial bariyer fonksiyonlarına karşı normal immun sistem yanıtının patolojik olarak ortaya çıkması. İBH’da genetik, çevresel (coğrafya, hayat tarzı, sigara) faktörler, enterik mikroflora, doku cevabı ve son zamanlarda artan çalışmalar ile nonimmun hücreler (platelet, endotel, epitel, mezenkimal hücreler) ve sistemlerin (pıhtılaşma

sitemi) patogeneizde önemli rol aldığı tespit edilmiştir (12). Mikrovasküler ve makrovasküler tutulum gözlenebilir. Normal popülasyonun sağlıklı damarları ile karşılaştırıldığında İBH'li hastaların kronik inflame küçük damarlarının fizyoloji ve fonksiyonlarının anlamlı şekilde değiştiği gösterilmiştir. Mikrovasküler disfonksiyon sonucunda zayıf mukozal iyileşme, refraktör inflamatuvar ülserler ve hasar, doku hipoperfüzyonu ve bozulmuş damar vazodilatasyonu oluşur. İntestinal endotel aktivasyonu, İBH patogenezinde, inflamasyonun sürdürülmesi ve kuvvetlendirilmesinde önemli role sahiptir (6).

Çok yönlü sitemlerin etkileşimi ile ortaya çıkan ve kompleks iletişimlerle ilişkili olan, İBH patogenezindeki hücresel iletişim ağı ve bu iletişimde etkin olan moleküler mekanizmaların anlaşılması şu anda sınırlıdır (12).

## **2.2. İntestinal Mikrosirkülasyon Pıhtılaşma ve İBH Patogenezi**

### **2.2.1. İntestinal Mikrosirkülasyon**

İnflamatuvar barsak hastalıklarında bozulmuş vazodilatasyon kapasitesi ve doku hipoperfüzyonu ile sonuçlanan mikrovasküler disfonksiyona bağlı olarak yetersiz iyileşen, dirençli ülserasyonlar ve intestinal hasar gelişir (13).

İntestinal mikrosirkülasyon arteriol, kapillerler ve venüllerin dallanarak, sirküler tüp ağına incelmelerinden oluşur. Kapillerler, düz kas hücrelerinden yoksun ve mikrosirkülasyonun inflamasyona en duyarlı segmenti olan postkapiller ven olarak adlandırılan büyük damarlara direne olur. Bu venüller dolaşımdan kaçan lökositlerin ve plazma proteinlerin geçişine izin veren endotelial bağlantı noktaları içerirler (6).



Aktif hastalık süresince etkilenen ince ve kalın barsak segmentlerinde vasodilatasyon, venöz konjesyon, büyük inflamatuvar hücre infiltrasyonu, erezyonlar ve ülserasyonlar izlenir (14). Bu tablo sürekli anormal sitokin üretimi ile sonuçlanan kontrol edilemeyen inflamasyonun sonucudur. Salınan sitokinler sürekli olarak endoteli uyarırlar ve ardışık olarak, etkilenen segmente lökosit geçişine neden olurlar. Endotelden ayrıca hücre adezyon molekülleri salgılanır. (selektinlerin, vasküler hücre adezyon molekülü (VCAM-1) ve interselüler adezyon molekül-1 (ICAM-1). Lökositler bu adezyon molekülleri ile birleşip aktive olurlar. Bu kontrol edilemeyen inflamatuvar cevap, İBH'de gözlenen inflamatuvar cevabın sürdürülmesine büyük oranda katkıda bulunan mikrovasküler fonksiyonlardaki değişikliğin ürünüdür (15).

Nitrik oksid (NO) endotel tarafından üretilen güçlü bir vasodilatör ve antiagregan ajandır. Süperoksit anyonları yükseldiğinde salınımı artar. Nitrojen ve reaktif oksijen türleri arasındaki dengenin değişmesi mikrovasküler disfonksiyona neden olur (16). NO ve siklooksijenaz bağımlı mekanizmaları kullanan intestinal küçük damarlar asetil koline cevap olarak vazodilate olurlar. Kronik inflamasyonlu İBH hastalarının arteriollerinde asetil kolinin vazodilatör kapasitesinde bozulma tespit edilmiştir. Vazodilatör kapasitenin bozulması NO-bağımlı fonksiyonların kaybı ile direk olarak ilişkilidir. Bu damarlarda vasküler tonus korunması ağırlıklı olarak siklooksijenaza bağımlıdır (16). Mikrovasküler endotelial disfonksiyon, oksitativ stresin aşırı artışı ile ilişkili bulunmuştur (17). Vasküler hasar erken patolojik bulgudur ve mukozal ülserasyon oluşumunun ön belirteçidir. Muskularis propria boyunca penetre olmuş damarlar ve mukozanın

distal dolaşım alanlarında yeni damar oluşumları daha ciddi hastalıkta ortaya çıkan bulgulardır. Multifokal gastrointestinal infraktların kronik inflamatuvar sürecin patolojisinde önemli role sahip olduğu tespit edilmiştir (13).

İnflamatuvar barsak hastalarında, intestinal mikrovasküler endotel hücrelerinin lökosit adezyon kapasiteleri anormal olarak artmıştır (6). Ayrıca bu endotel hücrelerinde hücre adezyon moleküllerinin üretimi de artmıştır (18). Endotel hücreleri geniş bir dizi sitokin, kemokin ve büyüme faktörü üreterek İBH patogenezinde katkıda bulunur (12).

İnflamatuvar barsak hastalarında NO salınımı azalmıştır. Antioksidan ve oksidan sistem arasındaki dengenin bozulması sonucunda oluşan serbest radikaller, özellikle hücre duvarındaki proteinler, lipidler, karbohidratlar ve nükleik asitler olmak üzere birçok organik ve inorganik madde ile reaksiyona girerler. Serbest radikaller mitokondrial reaksiyonlar, ksantin oksidaz metabolizması, endotel hücreleri, prostoglandinler ve aktive olmuş nötrofillerin ürünü olarak ortaya çıkar (19). Süperoksit radikali, oksijen molekülüne bir elektron ilavesi ile oluşur ve serbest radikal hasarına karşı koruyucu antioksidan bir enzim olan ve oksidan hasar oluşumu ile birlikte artan süperoksit dismutaz (SOD) aracılığı ile hidrojen peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)'e indirgenir (20). Hidroksil radikali oldukça reaktif ve toksik bir radikaldir. Hidroksil radikali büyük molekül yapısı ve elektronegativitesi nedeni ile DNA, protein, karbohidrat ve lipitler gibi makromoleküllerle reaksiyona girerek bu yapılarda oksidatif hasara neden olur. Hidroksil radikalleri hücre duvarından lipid peroksidasyonuna ve granülositlerin de aktivasyonuna neden olurlar (21).

Myeloperoksidaz (MPO) enzimi, dokularda polimorfonükleer lökositlere spesifik bir enzimdir. Doku lökosit düzeyini göstermede yol göstericidir. Aktive nötrofiller myeloperoksidaz, elastaz, proteaz, kollegenaz, laktoferrin ve katyonik proteinler gibi birçok proteini ortama salıp prostoglandin ve serbest radikalleri oluşturarak mikrovasküler hasarı başlatırlar (22).

Hücre membranındaki yağ asitleri, fosfolipidler, glikolipidler ve steroller serbest radikallerin hedefleri arasındadır. Bu radikaller hücre membranında bulunan proteinler ve lipidleri oksidasyona uğratarak membran akışkanlığının ve iyonik gradiyentin bozulmasına neden olurlar. Lipid peroksidasyonun en son ürünü malondialdehitdir (MDA). Membran iyon transportunu, akışkanlığını, enzim aktivasyonun ve deformasyon kabiliyetini bozar, böylece sitotoksiteteye, mutajen oluşumuna ve membran yıkımına yol açar. Aynı zamanda MDA düzeyi oksidatif hasara bağlı lipid peroksidasyonunu belirlemede kullanılır (23).

#### 2.2.2. Pıhtılaşma Sistemi ve İnflamatuar Barsak Hastalıkları

İnflamasyon ve koagülasyon iki önemli konak savunma sistemidir. Sürekli birbirlerini etkilerler ve denge halindedirler. İnflamatuar olaylar koagülasyon sistemini aktive edebilir aynı zamanda koagülasyon sisteminin aktivasyonunda inflamasyonun devam etmesini sağlayabilir. İnflamasyon, koagülan enzimlerin aktivasyonuna, doğal antikoagülanların sentezinin azalmasına ve fibrinolizisin baskılanmasına neden olur (24). Doğal antikoagulanların kazanılmış ya da herediter eksikliklerinde inflamatuvar hastalıklardaki artış iki sistem arasındaki etkileşimi doğrulamaktadır (25-28)

İnflamatuvar barsak hastalıkları önceden tahmin edilemeyen relaps ve remisyonlarla seyreden hastalıklardır. İdiopatik hastalıklar olmalarına rağmen genetik komponentleri mevcuttur ve immunolojik mediatörler aracılığı ile immun sistem ve proteolitik kaskadın aktive olduğu bilinmektedir (10, 29). İBH'lı hastalarda sitokinler, eikasanoidler, lizozomal enzimlerin hem intestinal lezyonlarda hemde sistemik dolaşımında artığı gösterilmiştir. Pıhtılaşma sistemi aktivasyonu hem CH, hemde ÜK' de inflamatuvar cevabın önemli bir komponentini oluşturmaktadır. Bu hastalıkların olası patogenez ve progresyonlarının önemli bir parçasıdır (2).

#### 2.2.2.1. Pıhtılaşma Fizyolojisi

Hemostaz damarlardaki kan akımını sağlar ve damar hasarı sonrasında kan akışını korur. Önceden pıhtılaşma reaksiyonlarının zimojen pıhtılaşma faktörlerinin aktive olmalarının ardından sırası ile diğer faktörleri aktive etmeleri ile gelişen bir zincir sistemi olduğu kabul edilirken, son zamanlarda enzim olduğu sanılan pıhtılaşma faktörlerinin aslında kofaktörler olduğunun anlaşılması ile bu görüş değiştirildi. Örneğin Faktör VIII (F VIII)'in Faktör IX (F IX)'un kofaktörü olduğu, Faktör V (F V)'in de Faktör X (F X)'un kofaktörü olduğu bulundu. İn vivo koagülasyon için yeni modellerde pıhtılaşma reaksiyonlarının başlatıcısı olarak doku faktörü "tissue faktör" (TF) vurgulanmaktadır. TF, pıhtılaşma faktörlerinin kan hücreleri ve endotelial hücreler ile etkileşimini sağlar (30). Aktive hücreler özellikle de plateletler pıhtılaşmanın genişlemesi ve yayılmasında kritik öneme sahiptirler. Plateletlerin negatif yüklü fosfolipid yüzeyleri pıhtılaşma

reaksiyonları için yüzey sağlar. Kan pıhtılaşma zincirinin başlangıç modu tam olarak anlaşılammış olmasına rağmen, birçok yaklaşım tarafından, ekstresek ve intrinsek yolak aktivasyonu olarak tanımlanan klasik model kabul edilmektedir (31). Pıhtılaşma şematik olarak intrinsek, ekstresek yolaklar ve ortak yoldan oluşan kompleks bir sistemdir. İntrinsek sistem tamamen kan dolaşımında bulunan faktörlerden oluşurken, ekstresek sistemde dolaşım dışında bulunan ve Faktör VII (F VII) için reseptör görevi gören TF bulunmaktadır. TF/VIIa kompleksinin hem F IX hem de F X'u aktive edebildiği yani intrinsek ve ekstresek sistem görüşününün in vivo hemostaza uyarlanamayacağı fark edildi. Ancak bu görüş şimdilerde teşhise yönelik değerli bir çizelge oluşturduğu için en azından eğitim amaçlı olarak kullanılmaktadır. F VIII'in dolaşımında von Willebrand faktörle (vWF) kompleks halde dolaştığı bilinmektedir. vWF faktör VIII'i bağlayarak bu faktörü trombosit yüzeyine taşıyan bir taşıyıcı proteindir aynı zamanda trombositlerin damar duvarına adezyonunda da rol oynar (32). Hemostazda önemli rol oynayan diğer sistemler pıhtının çözülmesinden sorumlu olan fibrinolitik sistem ve koagülasyon enzimlerini inhibe eden serin proteaz inhibitörlerleridir (33).

**i. Ekstresek Yol:** Doku hasarı ile ortaya çıkan TF'ün kan ile teması, dolaşımında düşük oranlarda bulunan faktör VIIa (F VIIa) ile TF/F VIIa kompleksinin oluşmasıyla sonuçlanır. TF/F VIIa/Ca<sup>++</sup> kompleksi faktör X (F X) ve faktör IX'u (F IX) aktive eder. Ekstresek ve intrinsek yol bu evreden sonra ortak yol olarak devam eder (12). Faktör Xa bu nedenle ekstresek ve intrinsek yol arasında birleşim noktasında yer alarak koagülasyon zincirinin santral

noktasını oluşturmaktadır (Şekil 1) (12). Ekstresek yolağın laboratuvar değerlendirmesinde protrombin zamanı (PT) kullanılmaktadır (34). Aktif İBH'lı hastalar ile sağlıklı kontrol grupları karşılaştırıldığında F VIIa seviyesi kontrol grubuna göre aktif İBH'lı hastalarda daha yüksek oranda bulunmuştur (2, 35, 36)

**ii. İntrensek Yol:** Kan dolaşımında mevcut olan pıhtılaşma faktörleri aktivasyonu ile olur. İntrensek yolun aktivasyonunda faktör XII'nin (F XII) yüksek molekül ağırlıklı kininojen (HMWK: high-molecular weight-kininogen) ve prekallikrein ile teması ana rolü oynar. F XII aktive olduktan sonra F XIIa, Faktör XI (F XI)'i aktive eder. F XIa, F IX'u aktive eder. F IXa faktör VIII (F VIII)'i aktive eder. Endotelial hücreler tarafından aktive edilen agregre olmuş trombosit yüzeyine,  $Ca^{++}$  aracılığı ile F Xa-F VIIa kompleksi bağlanır ve F X'u aktive ederler. F IXa ise, F VIII, trombosit fosfolipidleri ve  $PF_3$  ile birlikte  $Ca^{++}$  varlığında FX'u FXa'ya dönüştürür. F Xa da, aynen ekstresek yolun son aşamasındaki gibi, trombosit ve doku fosfolipidleriyle birleşerek F V'e  $Ca^{++}$  varlığında bağlanır ve "protrombin aktivatörü"nü oluşturur (Şekil 1) (37). Damar hasarından sonra pıhtılaşma ekstresek ve intrensek yolların aynı anda aktivasyonu ile başlatılır. Ekstresek ve intrensek yollar arasındaki en önemli farklardan biri ekstresek yolun etkilerinin bir kez başlatıldıktan sonra devamının yalnızca travmatize dokulardan salınan doku faktörü ile kanda bulunan F X, F VII ve F V miktarları ile sınırlandırılabilmesidir. İntrensek yolun laboratuvar değerlendirmesinde parsiyel tromboblastin zamanı (aPTT) kullanılır (37, 38)

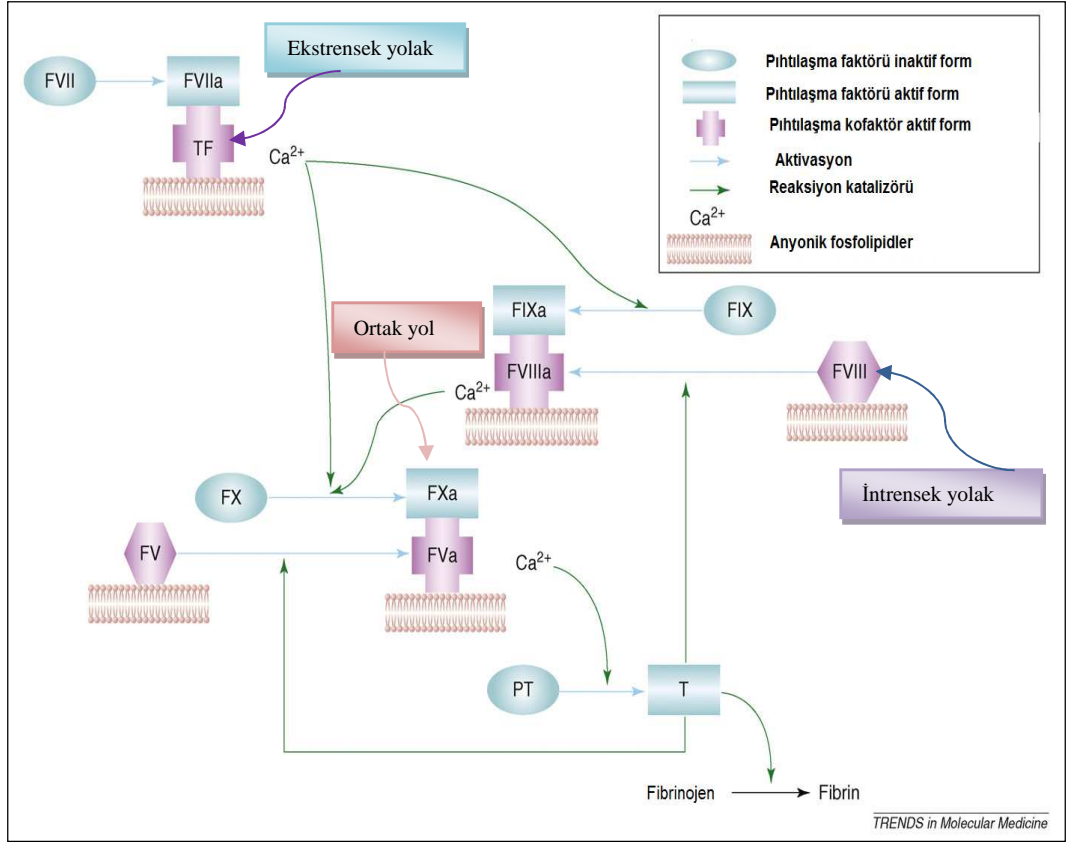
**iii. Ortak Yol:** İntrensek ve ekstresek sistemle pıhtılaşma yolu aktif F X oluşumundan sonra ortak bir yol kullanır. F Xa,  $Ca^{++}$  F Va ve zedelenen

dokulardan ve bölgede biriken trombositlerden açığa çıkan fosfolipidler yardımıyla protrombini trombine çevirir. Trombin fibrinojenden iki küçük peptid ayırarak (fibrinopeptid A ve B) fibrinojeni fibrin monomerlerine çevirir. Fibrin monomerleri kendiliğinden polimerize olarak çözünür fibrin polimerlerine dönüşür. Bu fibrin sağlam bir pıhtı değildir. Fibrin stabilizasyonu için, trombin tarafından aktive edilen F XIII, Ca<sup>++</sup> ile birlikte fibrin monomerlerini çapraz bağlarla bağlayarak pıhtıyı sağlamlaştırır (Şekil 1) (32). Ortak yolun laboratuvar değerlendirmesinde PT ve PTT değerleri birlikte kullanılır (33, 39). Aktif İBH'lı hastalar, remisyonadaki hastalar ile karşılaştırıldığında F Xa ve trombin seviyeleri önemli derecede yüksek bulunmuştur (2, 39, 40).

Trombin aktive olduğunda pıhtıyı güçlendirip iskemiye neden olarak veya PAR'leri aktive ederek inflamasyonu uyarabilir. Trombin tarafından aktive edilen PAR'ler ile İBH arasında ilişki tespit edilmiştir. Trombin PAR-1, PAR-3, PAR-4'ü, TF/F VIIa PAR-2 ve F Xa PAR-1, PAR-2 aktivasyonunda rol alır.

#### **iv. Doğal Pıhtılaşma İnhibitörleri**

Pıhtılaşma inhibitör sistemi küresel olarak serpin olarak adlandırılan protein ailesinden oluşur. Bu sistem, antitrombin (AT), proteini C ve S gibi farklı proteinlerden oluşan Protein C yolağı, membran reseptörlerinden trombomodülin (TM), Endojen heparin ve endotelial protein C reseptörünü (EPCR) kapsar. Doğal antikoagülanlar aktive pıhtılaşma faktörlerini inaktive ederler.



**Şekil 1.** Pıhtılaşma yolları (41)

Tanımlanmış 6 tane antitrombin vardır. En önemlileri glikoprotein yapıya sahip olan ve alfa 2 globülin olarak bilinen antitrombin III (AT-III), alfa 1 antitripsin ve alfa 2 makroglobülinidir. Plazma antitrombin aktivitesinin % 70'i AT-III'e, % 25'i alfa 2 makroglobüline ve % 5'i de alfa 1 antitripsine aittir. AT III, trombin, F Xa, F IXa, F XIa ve F XIIIa' nın fizyolojik inhibitörüdür. Son çalışmalar AT sadece kan pıhtılaşma inhibitörü olmadığını aynı zamanda endotelial ve diğer hücrelerde inflamatuvar cevabı azalttığını göstermiştir (42-44). AT ilişkili inflamatuvar cevapta azalma, endotelial prostosiklin üretimi, lökosit inhibisyonu ve endotelial hücrelerden salınan proinflamatuvar mediatörlerin



nükleer faktör  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) aktivasyonunu süprese etmesi ile bağlantılı olabilir (42, 44, 45).

Protein C: F Va ve F VIIIa'yı inhibe eder.

Protein S: Protein C'nin F Va ve F VIIIa'yı inhibe ettiği reaksiyonların kofaktörüdür.

Doku faktör yolu inhibitörü (TFPI): Doku faktörü ile F VIIa kompleksini inhibe eder. Endotel hücrelerinde yapılıır ve çoğu bu hücrelerin yüzeylerinde heparin benzeri proteoglikanlara bağlı olarak bulunur. Heparin verildikten sonra plazmadaki TFPI ilk olarak membran yüzeyine bağlı TF/F VIIa/F Xa kompleksindeki F Xa'ya bağlanarak inaktive eder, sonra TF/F VIIa kompleksine bağlanır (46).

#### 2.2.2.2. Fibrinolitik Sistem

Normal hemostazda, fibrinolitik sistem, hasarlanmış damar duvarı eski haline getirildiğinde organize fibrin pıhtının eritilmesinden sorumludur. Fibrinolizisin aktive edilmesi ve düzenlenmesi çok sayıda protein tarafından sağlanır ve plazmin oluşumu ile sonuçlanır. Bu sistemde plazminojeni plazmine çeviren aktivatörler, idrardan elde edilen ürokinaz, damar duvarı endotelinden salgılanan vasküler plazminojen aktivatörü (PA) ve doku plazminojen aktivatörleri (tPAs) yer alır. tPA plazmadaki en potent plazminojen aktivatörüdür ve fibrinolizisin ana düzenleyici molekülüdür. Fibrinolizisi sağlayan madde plazmindir. Plazmin vücutta plazminojen olarak bulunur. tPA ve ürokinaz plazminojeni aktif bir proteinaz olan plazmine çevirir (47, 48). Fibrinolizisi

sınırlayan majör plazminojen aktivatör inhibitörü trombositlerden salgılanan plazminojen aktivatör inhibitörü 1 (PAI-1)'dir. PAI-1, t-PA ve ürokinaz ile kompleks yapar ve fibrinolizin kontrolsüz bir şekilde oluşmasını engeller. PAI-1'den başka plasentada PAI-2 ve idrarda PAI-3 bulunmaktadır (49). Plazmadaki PAI-1 seviyesi genellikle tPA'dan daha yüksektir bu yüzden plazmadaki tPA aktif değildir (50). PAI-1 plazminojen aktivasyonunu inhibe ederken oluşan plazmin ise alfa 2 anti-plazmin tarafından inhibe edilir. Alfa 2 anti-plazmin karaciğerde sentez edilir ve plazminin birinci fizyolojik inhibitörüdür. Plazmadaki plazmini oldukça hızlı inhibe eder (50). Plazmin ile kompleks yapar ve plazminin fibrine bağlanmasını engeller. Fibrinolitik sistemde önemli rol oynayan diğer bir molekül, trombin ile aktive edilen fibrinolizis inhibitörüdür (TAFI). TAFI pıhtılaşma ve fibrinolizis ile direk olarak ilişkilidir. Aktivasyonu trombin tarafından sağlanır fakat trombin –trombomodülin kompleksi 1000 kattan daha fazla aktivasyonu sağlar. Aktive TAFI kısmen bozulmuş fibrinden karboksil-terminal lizin rezüdülerini çıkarır. Sonuç olarak fibrin pıhtısına tPA ve plazminojenin bağlanması azaltılır ve fibrinolizis hafifletilir (51). IBH'de fibrinolitik sistem aktivatörlerinde azalma (örneğin tPA) ve fibrinolitik sistem inhibitörlerinde (PAI1 ve TAFI) artış tespit edilmiştir (52-56).

### 2.2.2.3. Pıhtılaşma Sisteminin Hücresel Elemanları ve İnflamasyonla İlişkisi

Hemostatik sistemde sadece çözünür protein ve enzimler değil, farklı tipte hücreler de görev alır. Trombosit ve endotelial hücreler, pro-koagülan ve anti-

koagulan sistemler arasındaki dengenin sağlanmasında santral rol oynarlar. Artan kanıtlar trombosit ve endotelial hücrelerin iyi bilinen hemostatik fonksiyonları dışında, inflamasyonda da önemli rol oynadıklarını göstermektedir (56).

**i.Trombositler:** IL 6 gibi inflamatuvar araçlar, platelet üretimini artırır. Yeni üretilen trombositler oldukça fazla trombojeniktir ve trombinin düşük konsantrasyonlarını bile aktive edebilir. Platelet yanıtında proinflamatuvar araçlar ile inflamasyonu uyarmaktadır (24).

Trombositler, sitokin, kemokin, nitrik oksit (NO) ve eiksanoidler gibi inflamatuvar cevapta rol olan birçok aracıyı dolaşıma sunabilirler. Polimorfonükleer lökositler (PMNL) ve monositler ile etkileşim halindedirler. Onların inflamasyon alanına göç etmelerini ve damar dışına çıkmalarını düzenlerler. Trombositler pro-anti inflamatuvar eiksanoidlerin sentezi için enzimatik mekanizmalara sahiptir. Örneğin antiinflamatuvar özellikleri olan araşidonik asit metabolitlerinden lipoksinin (LX<sub>s</sub>) sentezinde anahtar rol oynayan 2-lipoksijenazı ihtiva eder (57).

Trombosit integrini olan glikoprotein 1 beta alfa (GPIb<sub>α</sub>) , endotelial hücrelerden transmembran adezyon molekülü olarak sunulan P-selektin için bağlanma noktasıdır ve trombositlerin endotelial hücreler üzerinde hareketini destekler. P- selektin bağlayan, P-selektin Glikoprotein ligand (PSGL-1) lökositler tarafından kendi yüzeyinde doku faktörü taşıyan mikropartiküllerin salınımını uyarır (58). P-selektinden ayrılan çözünür formdaki (sP-Selektin) monosit yüzeyindeki ilave doku faktörlerinin açığa çıkmasını ve salınmasını sağlar (59).

Mikropartiküller ile birlikte sP-selektinin inflamasyonda yüksek prokoagulan durumdan sorumlu olduğu düşünülmektedir (60).

Endotele adezyon süresince trombositlerden, CD 40-ligand (CD 40L) (CD 154gp39) olarak bilinen proinflamatuvar sitokinler salınır. Bu sitokinler endoteli stimüle edebilir, trombosit kümelerini stabilize edebilir, kan hücreleri ve vasküler duvar hücrelerine bağlanarak trombus oluşumunu destekleyebilirler (61). CD 40L transmembran proteinidir ve tümör nekroz faktör (TNF $\alpha$ ) ile ilişkilidir. CD 40L aktive trombositler ve inflamasyon süresince immun sistem hücreleri (aktive CD4+ T lenfositler, bazofil ve monositler) tarafından sunulur (62). Platelet üzerindeki uyarılabilir CD 40L, endotelial hücreler, monosit, makrofaj, düz kas hücreleri üzerindeki CD40 reseptörüne bağlanır. CD 40/CD 40L iletişimi inflamasyon ve trombozda önemli rol oynar. CD40 sitokinden bağımsız olarak inflamasyonu uyarır. CD40L'dın proinflamatuvar aktivitesi, kemokinler (Monosit kemotaktik protein 1 (MCP-1)), interlökinler (IL6-8), proinflamatuvar adezyon molekülleri (vasküler hücre adezyon molekül-1 (VCAM-1)), intraselüler adezyon molekülleri (ICAM-1,CD54) ve P-/E- selektinlerin salınımının sitümülasyonuna neden olur (2). CD40L TF salınımını uyarır, TM salınımını süprese eder (63).

Trombosit-trombosit, trombosit-lökosit kümeleşmesi hem pıhtılaşmanın hemde inflamasyonun aktivasyonunu sağlayan hücre yüzeyinde oluşur. Bu durum farklı hücreler arasında kompleks etkileşimler sonucunda oluşan kronik inflmasyon için yeni bir mekanizma olarak öngörülmektedir (64).

**ii. Endotel:** Endotel; vasküler hasara cevapta, lökosit adhezyonun aktivasyonunda, trombosit aktivasyon ve adezyonunda, kanın pıhtılaşmasında

anahtar rol oynar. Endotel, hücre adezyon molekülleri, sitokinler, kemokinler gibi birden fazla aktif maddeye cevap verilmesinde ve bu maddelerin üretiminde görev alır (65, 66). Kan damarı hasarı inflamasyon ve pıhtılaşma olaylarının tetiklenmesi ve yayılması ile sonuçlanır. Hücre adezyon molekülleri (CAM), aktive endotelial hücrelerden hücre yüzeyine sunulur, lökosit ve trombositlere bağlanma noktası oluştururlar. Adezyon moleküllerinin 3 tipi vardır. Selektinler, immunglobolin üst familyasından CAM ve integrinler (34).

P selectin lectin içeren N terminalinden monosit, nötrofil ve plateletlerin yüzeyindeki PSGL-1'e bağlanır. Lökosit adezyon ve hareketinde, plateletlerin kümeleşmesini ve stabilizasyonunu sağlar (67, 68). E selektin mekanik injüri ve IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , bakteriyel toksinler, oksidanlar gibi inflamatuvar araçlar ile endotelial hücre yüzeyinden salınır (66).

Hücrelere lökosit adezyonu ICAM-1 ve VCAM-1 salınımının upregülasyonu ile sağlanır. Trombosit adezyonu vWF tarafından kontrol edilir. vWF faktör VIII ve platelet integrinlerinden glikoprotein transmembran kompleks GPIb/IX/ V, GPIIb/IIIa ve aynı zamanda da kollajene bağlanır (69).

### 2.2.3. Faktör Xa İnflamasyon, Fibrozis İlişkisi

Aktive F Xa geleneksel olarak trombin oluşumu ile sonuçlanan, pıhtılaşma sisteminin kavşak noktasında önemli role sahip faktör olarak bilinmektedir. Yeni kanıtlar, F Xa'nın PAR-1 ve PAR2 olarak bilinen iki önemli reseptör aracılığı ile değişik hücre tiplerini direk olarak etkilediğini göstermiştir (41). PAR-1 trombinin ana reseptörüdür. PAR-2 birçok pıhtılaşma faktöründen etkilenebilir. F Xa ve

trombin PAR-1'i zincirleme reaksiyon hücresele reseptör olarak paylaşirlar (70). PAR-2 vasküler hasar sonrası doku iyileşmesinden sorumludur. PAR-2 sinyalleri ve koagülasyon zinciri arasındaki ilişki birçok hastalığın patogeneğinde, fibrozis ve kanser etiopatogeneğinde rol oynamaktadır (71-74).

F Xa'nın ekstrasvasküler hücrelerde önemli etkilerinin olması, F Xa'nın dokulardaki ekstrasvasküler hücrelerde de bulunabileceği sorusunu akla getirmiştir. Bunun için üç teori öne sürülmüştür.

1- Vasküler hasar sonucunda ekstraselüler matrix proteinleri (ECM) altında yer alan ve esas olarak TF üreten fibroblast ve SMCs'ler dolaşımında ki kana maruz kalır. Pıhtılaşma zincirinin uyarılması ile F Xa ve pıhtı formasyonu oluşur. F Xa ve trombin enzimatik olarak aktif şekilde pıhtıya bağlanır. Dokuda mevcut olan, pıhtıda aktif olan ya da vasküler kaçak sonucunda oluşan F Xa bağ dokusu hücre sinyallerini uyarabilir (75).

2- F Xa lokal makrofajlar tarafından üretilebilir. Sirkülasyondaki beyaz kan hücreleri F Xa'nın bağlanabileceği F Xa reseptörü ihtiva ederler. Makrofajların dokuya sızması ile inflamasyon alanına salınan F Xa direk sinyal aktarımının oluşmasına izin verir (75).

3- Kan dolaşımını dışında F Xa'nın bulunabileceğini açıklayan son mekanizma F Xa'nın ektopik sentezinin olabileceğidir. Ektopik F X ekspresyonu mikrogliya, nöronlar, burun epitel hücreleri, bronş, duodenum, böbrek, akciğer, kalp, gibi değişik doku hücrelerinde ve makrofajlarda fizyolojik olarak oluşabilir (76-78).

Patofizyolojik durumlarda F Xa ektopik olarak sentez edilir ve hastalık progresyonunun önemli bir parçası olabilir. Akciğer, kolon, melanom, laringeal, renal, pankreatik malignitelerde ekstrasvasküler kan pıhtılaşması gösterilmiştir (79-81).

#### 2.2.3.1. Proteazca Uyarılan Reseptörler

Pıhtılaşma faktörleri ile endotel arasındaki temel bağlantı proteazca uyarılan reseptörler (PAR'ler) aracılığıyla sağlanmaktadır (82)). PAR'ler özellikle PAR-1, PAR-2 pıhtılaşma faktörlerinin proteolitik parçalanması sonrasında aktive edilen hücresel reseptörlerdir. Trombin ve F X PAR'ler reseptörleri ile etkileşen başlıca pıhtılaşma faktörleridir. Trombin aktive olduğunda pıhtıyı güçlendirip iskemiye neden olarak veya PAR'leri aktive ederek inflamasyonu uyarabilir. Trombin tarafından aktive edilen PAR'ler ile İBH arasında ilişki tespit edilmiştir. Trombin PAR-1, PAR-3, PAR-4'ün, TF/F VIIa kompleksi PAR-2'nin ve F Xa PAR-1, PAR-2'nin aktivasyonunda rol alır (83).

Çok fazla çalışma F Xa aracılı intraselüler sinyallerin PAR-1, PAR-2 aktivasyonu yoluyla olduğunu desteklemektedir. PAR'ler birçok dokuda tespit edilmiştir. Solunum sistemi, osteoblastlar, kardiovasküler sistem (vasküler düz kas hücreleri (VSMCs) ve endotelde her iki reseptör bulunurken, kardiyak miyozitlerde yalnızca PAR-2 bulunur), epidermis, immun sistem, intestinal sistem, mide, böbrek, kanser ve sinir sistemi hücrelerinde bulunmaktadır. PAR-2 ayrıca üreter ve pankreasta bulunur (84).

F Xa, TF-F VIIa-F Xa ile kompleks oluşturmak üzere bağlandığında PAR-2 aktive olurken, çözünür F Xa PAR-1 ve PAR-2'nin her ikisini birden aktive eder (85, 86).

F Xa ile uyarılmış PAR1 ve PAR2 N terminal ucunun proteolitik ayrılması ile aktive olur. Sonrasında G proteinleri transmembran sinyali ile aktive edilir. G proteinleri aktive olduktan sonra birçok hücrel reaksiyon ardışık olarak uyarılır. Fosfotidil inositol hidrolizi ile hücre içinde kalsiyum birikimi olur. Mitojen aktifleştirici protein kinaz (MAPK'lar), ekstraselüler sinyal ilişkili kinaz (ERK) ve c-Jun N terminal kinaz (JNK) F Xa uyarısı ile aktive olur. Bu aktivasyon hücre içinde farklı transkripsiyonel etkilerin başlamasına yol açar. Bu etkiler hücre büyümesi, göçü ve farklılaşmasını destekler. Ayrıca gen kodlayan sitokinler (IL-6, IL-8, monosit kemotaktik protein-1 (MCP-1)), reseptörler (TF, İntraselüler adezyon molekülü (ICAM)), ekstraselüler matrix proteinlerinin (ECM; bağ dokusu büyüme faktörü (CTGF), kollajen ve fibronektin) indüksiyonunu sağlar. F Xa sinyali hücre tiplerine göre çok spesifiktir. Örneğin, F Xa sinyali VSMCs, fibroblast, mezengial hücrelerde proliferasyonu uyarırken, lökosit ve endotel hücrelerinde proliferasyonu uyarılmamaktadır (Şekil 2) (41).

Hemostaz, inflamatuvar cevap, yara iyileşmesi ve fibrozis, nörojenik inflamasyon sonucu ağrının iletilmesi ile sonuçlanabilir (12, 34).

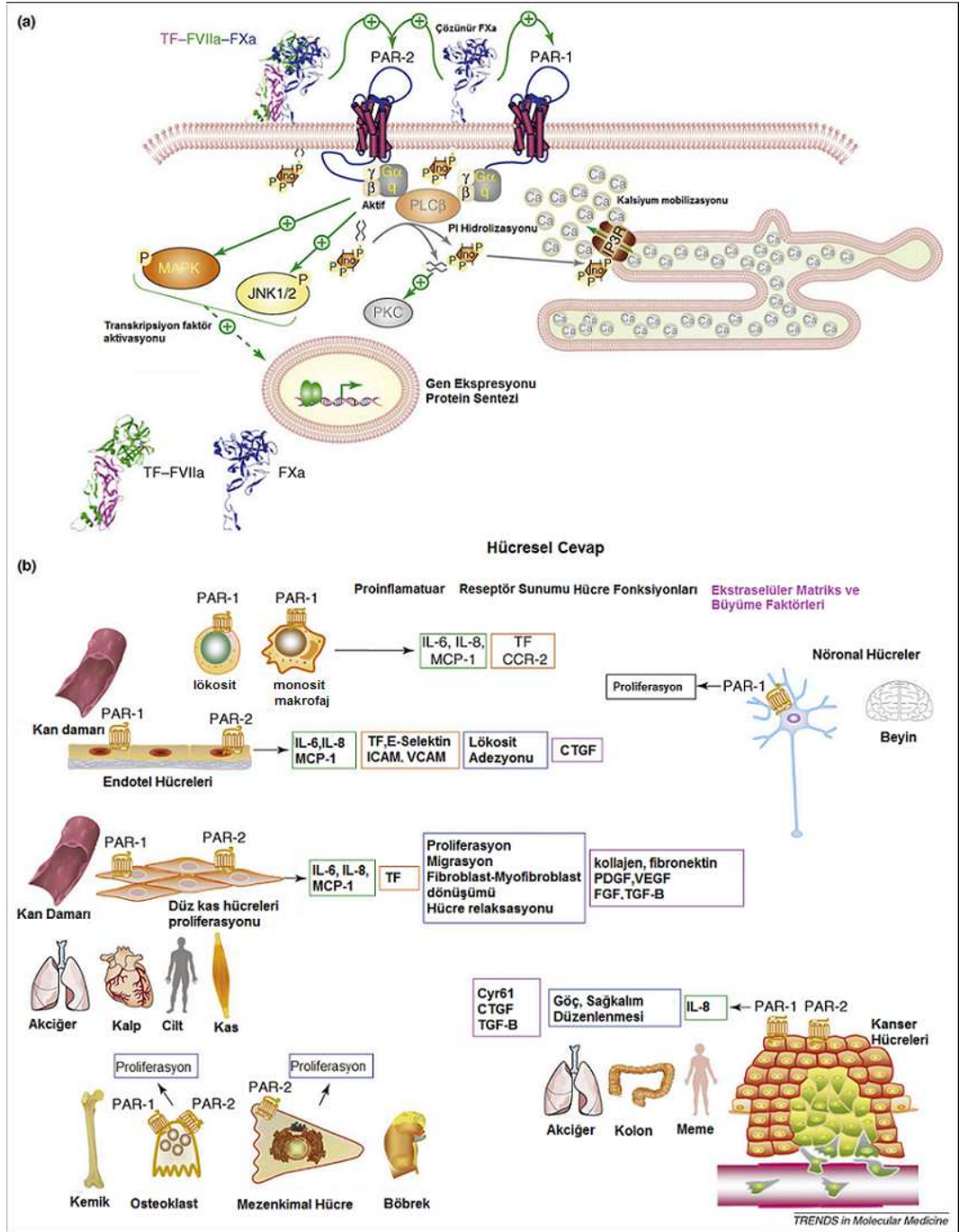
#### 2.2.3.2. Proteazca Uyarılan Reseptörlerin Gastrointestinal Sistemde Önemi

Gastrointestinal sistem (GİS) epiteli dış çevre ve konakçı arasında geniş bir arayüzey oluşturur. Luminal epitel yalnızca sindirim, absorpsiyon, sekretuar



fonksiyonların kontrolünden sorumlu değildir aynı zamanda mukozal immün sistem, vasküler sistem ve sinir sistemi arasında bilgi geçişinden sorumludur (12).

Tükürük bezleri, mide, barsaklar, pankreas, karaciğeri de kapsayan geniş bir alanda PAR-1 ve PAR-2 bol miktarda tespit edilir (87). Bu reseptörlerin, barsaktaki bağ dokusu hücrelerinde (fibroblast ve myofibroblast), düz kas hücrelerinde, epitelial enterositlerde, goblet hücrelerinde, endotelial hücrelerde ve sinir sistemi hücrelerinde üretimi kolayca tespit edilebilir (88-91). GİS sürekli olarak serin proteazlara maruz kalır. PAR'ler, pıhtılaşma reaksiyonunun luminal ve mukozal serin proteinazlarına yanıt vererek pıhtılaşma, inflamasyon, fibrozis, intestinal mikrovasküler çevre, oksidan-antiokisan sistemler arasında etkileşim ve kısır döngüye neden olur. PAR-2 aktivasyonu, kolonik permeabilite artışı, granülosit infiltrasyonu, duvar kalınlığında artış, doku hasarı ve yardımcı T hücrelerinden tip I sitokin üretimi ile karakterize inflamasyon artışı ile sonuçlanır (12). PAR'ler intestinal inflamasyona nörojenik mekanizmalar ile sebep olabileceği için, enterik nöronlardaki PAR ekspresyonu İBH ile yüksek oranda ilişkili olabilir. Hayvan modellerinde myenterik ve submukozal nöronlarda PAR aktivasyonunun ciddi ödeme sebep olduğu gösterilmiştir (92). Granülosit, monosit, T lenfosit gibi immün hücrelerdeki PAR aktivasyonu, İBH patogenezinde önem taşımaktadır. Immün olmayan hücrelerde F Xa aracılı PAR aktivasyonu İBH'nin progresyonunda rol alır (12).



**Şekil 2.** FXa sinyallerinin hastalık ve sağlıkta etkileri

(a) F Xa aracılı PAR-1aktivasyonu, çözümlü F Xa ve TF-VIIa-F Xa aracılığı ile PAR-1 ve PAR-2 aktivasyonu. indirek etkileri kırık oklarla, direkt etkileri düz oklarla gösterilmiştir. (b) F Xa sinyallerinin ECM, büyüme faktörlerinin üretimi, reseptör sunumu, hücre adezyon molekülleri, mitojen aktive eden protein kinazların sentezi üzerine etkisi (41).

#### 2.2.3.4. F X Aracılı Endotel, Epitel, Mezenkimal Hücre Uyarılması ve Etkileri

**i. Endotel:** Endotelial hücre disfonksiyonu İBH patagonezinde önemli rol oynamaktadır. F Xa, endotelden önemli inflamatuvar mediatörlerin aktivasyonunu sağlar (Şekil 3) (12).

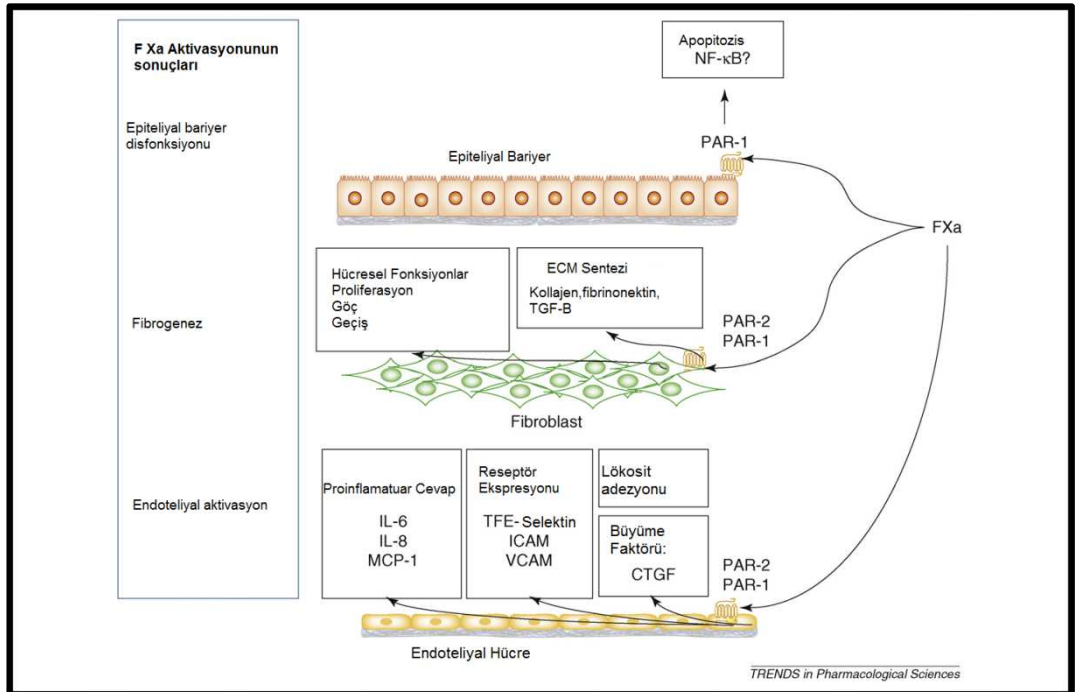
F Xa sinyalleri endotelial hücrelerde proinflamatuvar cevabı ve bağ dokusu büyüme faktörlerinin birikimini aktive eder (93). Bu uyarıda lökosit takviyesine katkıda bulunan NF-κB, IL-6, IL-8, MCP-1 salınımına yol açar (85, 94, 95). Lökosit adezyonunu artıran ICAM-1, VCAMs-1, ve E-selektin üretimi artar (12). F Xa ve TNFα arasındaki birliktelik TF'ün negatif regülatörlerinin inhibisyonuna neden olan mediatörlerin üretimini artırır (94). Bu cevapların çoğunda PAR-2 aktivasyonu etkilidir. PAR-1 aktivasyonunun çok az etkisi vardır (94, 96)

**ii Epitel:** F Xa'nın intestinal epitel hücreleri üzerine etkisi henüz açıklanmamıştır (97). F Xa PAR-1 aktivasyonu ile ince barsak epitel hücrelerinde ve kolon kanser hücrelerinde apoptozisi uyarmaktadır (98). İBH gelişiminde epitelial apoptozis katkıda bulunur. İBH'lı hastaların akut inflamatuvar bölgelerinde bulunan tüm kript villus eksenlerinde apoptozis gösterilmiştir (Şekil 3) (99). F Xa sinyalleri kesin olmamakla birlikte epitel bütünlük ve fonksiyonlarını apoptozisi aktive ederek etkileyebilir. İnflamatuvar etkileri ile mukozal hasarı artırarak hastalığın alevlenmesine sebep olabilir (12).

**iii. Mezenkimal Hücreler:** Mukozal mezenkimal hücreler İBH patogenezinde önemli rol oynarlar. F Xa'nın mukozal mezenkimal hücrelere proinflamatuvar etkisini gösteren direk kanıt mevcut değildir. F Xa'nın SMCs ve

fibroblastlarda inflamatuvar cevabı PAR-2 aktivasyonu ile ortaya çıkardığı iyi bilinmektedir (100). Mezenkimal hücrelerde PAR-2 ekspresyonu mevcuttur. Buna dayanarak intestinal mezenkimal hücrelerde de aynı yolla inflamatuvar cevap ortaya çıkabileceği düşünülebilir (12).

İntestinal mezenkimal hücreler crohn hastalığında fibrogenezise katkıda bulunurlar. İntestinal fibrozisten sorumlu majör hücre tipi myofibroblast ve fibroblastlardır. F Xa aracılığı ile PAR-2 aktivasyonu fibroblastlar için güçlü kemoatraktan etki gösterir ve düz-kas  $\alpha$  aktinin (SMA- $\alpha$  aktinin) üretimini artırarak fibroblastların myofibroblasta dönüşmesine katkıda bulunur. Sonuçta F Xa fibroblastlardan fibronektin, kollajen, TGF- $\beta$  sekresyonunu artırır (Şekil 3) (101, 102).



Şekil 3. F Xa Aracılı Endotelial, Epitelial ve Mezenkimal Hücre uyarıları (41)

## 2.3. İntestinal Fibrozis

### 2.3.1. Fibrozis öncesi (Pre-Fibrotik) Süreç

En son araştırmalara göre fibrozis, reaktif bir olaydır. İntestinal fibrozisin var olabilmesi için kronik veya tekrarlayan inflamasyon olması gerekmektedir. Bu bakış açısına göre fibrozis; inflamasyona ikincil mukozal doku hasarına karşı oluşan abartılı bir iyileşme cevabıdır. Ancak bu cevabın neden bazı hastalarda görölüp diğerlerinde görölmediği halen net değildir. Mezenşimal hücreler olan fibroblastlar, myofibroblastlar ve düz kas hücreleri fibrozis sürecinde ekstrasellüler matriksin temel bileşeni olan kollojeni üretirler, bu nedenle intestinal fibroziste başrol oyuncularını olduklarını söylemek yanlış olmaz (1).

Doku hasarından monosit, intestinal makrofajlar ve granüositlerden salgılanan enzimler sorumludur. Devam eden inflamasyon ve doku yıkımı fibrozis ve striktür oluşumu ile sonlanır (1)

Oksidan maddeler mukozal, submukozal hasarın ve hücre yıkımının sorumlularından bir diğeridir. Oksijen metabolitleri örneğin oksijen veya hidrokisit radikalleri inflame mukozadaki lökositler tarafından fazla miktarda üretilmektedir. Normal bir barsak duvarında çok az miktarlarda antioksidan enzim bulunmaktadır (103) .Süperoksit ve diğer reaktif oksijen ürünlerinin oluşmasından membran bağımlı nikotinamid adenindinuclotide phoshate (NADPH) oksidaz enzimi sorumludur. Süperoksit oluşmasından sorumlu enzim sistemi küçük bir elektron taşıma sisteminden oluşmuştur. Böylece; sitoplazmik yüzeyde NADPH oksitlenirken, membranın daha dıştaki yüzeyinde süperoksit oluşur. Enzim normalde hücrelerde inaktif halde bulunur ancak uyarı ile aktif hale geçebilir.

İnflamatuvar barsak hastalıklarında, intestinal makrofaj hücrelerinde NADPH oksidaz enzim ekspresyonunun arttığı son çalışmalar ile gösterilmiştir (104). Radikal oluşturmanın yanı sıra lamina propriayı infiltre eden veya bölgesel olarak aktive olmuş olan hücreler, ekstraselüller matriks yapan ve yıkan enzimler salgılayarak, intestinal inflamasyona cevap verirler. Sonunda miyofibroblastların bölgeye akını başlar. Proteinazların iki majör grubu salgılanır. Elastaz ve kollajenaz gibi serin proteazları ve matriks metalloproteinazlar (MMP). İnaktif proform yani zimojen olarak salgılanan metalloproteinazların aksine elastazlar hücre içinde aktif formda salgılanmak üzere depo edilirler. MMP ailesinin en az 23 üyesi mevcut olup bunlardan dokuz tanesi lökositler tarafından eksprese edilirler. Tüm MMP'ler ekstrasellüler matriksi yıkarlar. Bu enzimlerin aktiviteleri TIMP adı verilen metalloproteinazların doku inhibitörleri tarafından regüle edilir.

Metalloproteinazlar ve inhibitörleri arasındaki denge inflamasyon sırasında meydana gelen barsak duvarı hasarının derecesini belirlemede son derece önemlidir (105). Fizyolojik şartlar altında akut inflamasyon sonrası gelişen doku hasarı kendini sınırlar ve bu noktada yara iyileşmesi başlar. Eğer zarar görmüş epitel tabakanın altında yer alan bazal membran sağlam ise yaranın yakınındaki epitel hücreleri hareket etmeye başlar, bazal membran boyunca hareket ederek yakındaki hücreler ile birleşirler bu olaya yeniden yapılanma (restütüsyon) adı verilir. Restütüsyon; mezenşimal ve epitel hücrelerden salgılanan büyüme faktörleri ile desteklenir. Bu büyüme faktörleri hepatosit growth faktör, keratinosit growth faktör, epidermal growth faktör, transforming growth faktör beta, asidik ve bazik fibroblast growth faktörlerdir (106).

İntestinal fibrozisde rol oynayan başlıca hücreler fibroblastlardır. Bu hücreler mezenşim orijinli olup, ekstraselüler matriks proteinlerinin yapımından özellikle de kollojen sentezinden sorumludurlar. İnflame barsakta lokal mezenşimal hücreler birbiriyle ilişkili üç hücre fenotipi arasında diferansiye ve de-diferansiye olurlar. Bu fenotipler içlerinde  $\alpha$ -SMA olup olmamasına ve diğer yapısal proteinler ile karakterizelerdir. Bu üç fenotip: fibroblast (SMA-), myofibroblast (SMA+) ve düz kas (desmin+, SMA+) hücreleridir (107). İnflamatuvar barsak hastalığı olan kişilerde bu hücre tiplerinin aktive olması ve çoğalması ekstrasellüler matrikste artışa sebep olur. Lokal fibroblastlar, inflamatuvar sinyallere cevap olarak aktive olur ve çoğalarak bir mezenşimal hücre havuzu oluştururlar. Bu hücrelerin kaynağı fibrosit, perisit, endotel ve epitel hücrelerdir.

Fibrositler; kemik iliği kökenli hücrelerdir. Üzerlerinde hem hematopoetik (CD14,CD25) hem de mezenşimal (CD34) hücre belirleyicilerini eksprese ederler. Bu hücreler tip 1 kollojen üretebilir, in vivo ve in vitro şartlarda fibroblastlara dönüşebilirler. İnflamasyon sırasında, çok sayıda fibrosit direk olarak hasarlı bölgeye gelir, burada farklılaşır, SMA ve kollojenin ekspresyonu artar. Fibrositlerin inflamatuvar barsak hastalığındaki yeri henüz tam olarak anlaşılamamıştır. Perisitler, damar duvarlarında bulunan, endotel hücre farklılaşmasını ve anjiyogenezi kontrol eden mezenşim kaynaklı hücrelerdir. Perisitler de tıpkı fibrositler gibi inflamasyon varlığında fibroblastlara farklılaşarak fibrozis sürecine katkıda bulunurlar. Kutanöz yara iyileşmesinde, perisitler kılcal damar duvarından ayrılır, çevre dokuya göç eder, kollojen üreten fibroblast

benzeri hücelere dönüşürler (108-110). Vücutta fibroblastlar, mezenşimal kökenli olmayan hücrelerin bir takım değişiklikler geçirmesi ile de ortaya çıkabilir. Bunun bir örneği, epiteliyal-mezenşimal transformasyondur (EMT). Bu dönüşüm embriyonel, inflamatuvar veya tümör oluşumu süreçlerinde olur, hücrenin fenotip ve fonksiyonlarındaki dramatik değişiklikler sayesinde gerçekleşir. Bu dönüşüm sırasında epitel hücreleri içsi bir yapı oluşturur yüzeylerindeki klasik epitel hücre belirleyicilerini kaybettikten sonra, fibroblast spesifik protein-1,  $\alpha$ -SMA, vimentin gibi fibroblastlara özgün belirleyiciler geliştirirler böylece kollojen ve fibronektin üretimine hazır hale gelirler. Ayrıca bu hücrelerin göç etme kapasiteleri artar ve apoptoza daha dirençli hale gelirler. EMT, birçok organda fibrozis sürecinin önemli unsurudur. Örneğin, karaciğerde hepatositlerin EMT sayesinde fibroblastlara dönüştüğü ve bu olayın TGF- $\beta$  sinyal iletiminin bloke edilmesi ile durdurulabildiği gösterilmiştir (110). Endotelial-Mezenşimal dönüşüm (Endo MT), fibrozis sürecinde endotel hücrelerin fibroblastlara dönüşümü anlamına gelmektedir. Çalışmalar göstermiştir ki, in vitro ortamlarda endotel hücreler düz kas hücrelerine dönüşebilir (111).

İnflamatuvar barsak hastalıklarındaki hücre dönüşümleri ile ilgili yeterli çalışma ve veri bulunmasa da diğer organlardaki fibrozis sürecine benzer olduğu düşünülmektedir. Yakın zamanda yapılmış bir çalışmada Crohn hastalığında fistül gelişmesindeki mekanizmalardan birinin EMT olduğu öne sürülmüştür (112). Kültüre edilmiş fibroblastlar ile yapılan çalışmalarda, fibroblastların çoğalmasının Crohn, ülseratif kolit gibi tüm inflamatuvar durumlarda benzer şekilde olduğu görülmüştür. İnflamatuvar medyatörler olan



IGF, FGF, PDGF ve proinflamatuvar sitokinler olan IL-1, TNF  $\alpha$ 'ya cevap olarak fibroblastların proliferasyonunda artış olur ancak normal hücre ve inflamatuvar barsak hastalığındaki hücrelerde bu artış aynı düzeyde değildir (112).

### 2.3.2. Fibrozisin Moleküler Aracıları

#### 2.3.2.1. Ekstraselüler Matriksin Bileşenleri

Ekstraselüler matriksin temel yapı taşı kollojendir. Tip I kollojen, normal ileumda en çok bulunan kollojendir ve total kollojenin yaklaşık %68'ini oluşturur. Geri kalan %20'sini tip III, yaklaşık %12'sini ise tip V kollojen oluşturur. Büyüme faktörleri, yara iyileşmesini, ekstraselüler matriks sentezini stimüle ederek hızlandırırlar. İnflamatuvar barsak hastalıklarında striktür gelişmiş bölgelerden alınan biyopsi örneklerinde majör intestinal kollojen olan tip 1 kollojene ilave olarak tip 3 kollojen ve fibronektinin ekspresyonunda belirgin artış saptanmıştır. Bu artışlardan TGF- $\beta$ 'nın sorumlu olduğu ileri sürülmüştür. Bunlara ek olarak, mast hücreleri tarafından üretilen laminin, fibronektin ve diğer kollojen tiplerinden kollojen tip IV ve tip VI da, İBH'da ekstraselüler matriksin yapı taşlarındandır (113).

#### 2.3.2.2. Sitokinler ve Büyüme Faktörleri

İBH'da barsak mukozasındaki fibroblastlar oldukça karmaşık bir mikro çevre içerisinde dirler. Bu çevrede biyolojik araçlar mevcuttur. Bu araçlar, vazoaktif aminler, peptidler, kompleman bileşenleri, lipidler, proteolitik enzimler, sitokinler, büyüme faktörleri, kemokinlerdir. inflamasyonun başlangıç aşamasında

tip1 yardımcı T hücrelerinin salgıladığı sitokinler ön plandadır ve bunların antifibrotik etkinliği mevcuttur. İnflamasyonun geç döneminde ise Th-2 hücrelerinin salgıladığı IL-13 ve TGF- $\beta$  baskın hale geçerek fibrozis sürecini başlatır ve ilerletir (114).

Barsak da dahil tüm organlarda da, fibrozisin en önemli başlatıcısı TGF- $\beta$ 'dir. TGF- $\beta$ ; aktivin ailesinin bir üyesidir. Proliferasyon, yara iyileşmesi, ekstrasellüler matriks yapımından sorumludur. TGF- $\beta$ 'nın üç adet izotipi (TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2, TGF- $\beta$ 3) mevcut olup, bunlardan en çok çalışılmış olanı TGF- $\beta$ 1'dir. Tüm hücreler bu sitokini gerektiğinde salgılayabilecek yeteneğe sahipse de asıl kaynağı makrofaj ve fibroblastlardır. Normal bir barsak mukozasında makul miktarlarda üretilen bu molekül, mukozanın karşı karşıya kaldığı bakteriyel ve aşırı antijen yüküne karşı immünsüpresif etki gösterir (7).

İntestinal inflamasyonda aktive olan fibroblastlar bölünmenin yanı sıra kimyasal sinyaller doğrultusunda inflame bölgeye doğru göç ederler. İnflamasyon yatıştığında ve bu maddelerin konsantrasyonları azaldığında kemotaksis durur. İnflamatuvar barsak hastalığında migrasyonu aktive eden maddeler; fibronektin ki bilinen en potent kemotatik ajandır, PDGF, IGF-1, EGF, TGF- $\beta$ ' dir. TGF- $\beta$  kemotaksisi ancak fibronektin varlığında uyarabilir. Bu maddelerin aksine TNF- $\alpha$  ve IFN $\gamma$  in vitro şartlarda migrasyonu azaltır (115).

TGF- $\beta$  ayrıca epitel-mezenşimal transformasyonun (EMT) hızlandırıcısı olarak görev yapar. Daha önce de bahsedildiği gibi bu hücre dönüşümü sayesinde epitel hücreler mezenşimal bir fenotipe bürünür ve kollojen sentezine hazır hale

gelir. Aktive olmuş hücrelerden kollojen, fibronektin, glikozaminoglikanlar, metalloproteinazlar ve onların doku inhibitörleri salınır.

### 2.3.2.3. Metalloproteinazlar (MMP) ve Doku inhibitörleri (TIMP)

Birçok immün ve immün olmayan hücreler inflamasyona proteolitik enzimler salgılayarak cevap verirler. Bu enzimler serine proteazlar ve metalloproteinazlardır. Metalloproteinazlar çinko ve kalsiyum içeren endoproteazlardır. Bugüne kadar, 23'ten fazla çeşidi tanımlanmış olup, yeni üyeleri de tanımlanmaya devam edilmektedir. Yapısal olarak tüm MMP' lerde ekstrasellüler matriksin çok çeşitli bileşenlerini yıkabilecek katalitik aktivesi olan bir peptid zinciri mevcuttur. Yapılarına ve substratlarına göre isimlendirilirler. MMP1, MMP8 ve MMP13 kollejenaz olarak bilinir ve tip I, II, III ve X kollojenin üçlü heliks yapısını yıkar. Jelatinaz olarak bilinen MMP2 ve MMP4, daha çok denatüre olmuş kollojenin veya tip IV kollojenin yıkımından sorumludur ve hücrel invazyonda görev alır. Sitromelisin olarak bilinen MMP3 ve MMP10 ise geniş bir substrat çeşitliliğine sahip olup proteoglikanları, kollojeni, laminin, elastin ve fibronektini yıkabilir. Ayrıca bu enzimler proteolitik aktiviteleri sayesinde diğer kollojenazları da aktive edebilme özelliğine sahiptirler. MMP'ler genellikle inaktif formda sekrete edilirler, aktive olmaları için proteolitik aktivite gereklidir. Aktif metalloproteinazlar, doku inhibitörleriyle (TIMP1,TIMP2,TIMP3,TIMP4) ile birebir bağlanarak stabil kompleksler oluştururlar. İnflamasyon sırasında T lenfositlerden salgılanan TNF $\alpha$ , metalloproteinaz ve doku inhibitörlerinin salgılanmasını stimüle eder, ancak

TIMP'ler için majör uyarıcı TGF- $\beta$ 'dır. Bu iki molekül arasındaki denge, organ gelişimi ve büyümesi için olduğu gibi romatoid artrit, osteoartrit, ateroskleroz, tümör hücre invazyonu ve metastazın patofizyolojisinde de önemli bir rol üstlenmektedir. MMP/TIMP dengesinin, hücre yüzeyinden ve ekstrasellüler matriksten sitokin ve büyüme faktörlerinin salınımını kontrol ettiği, bu moleküllerin öncüllerini proteolizis yolu ile aktive ederek, ekstrasellüler matriks üzerindeki direk etkilerinin yanında, fibrojenik moleküllerin lokal mikro çevresini ve mezenşimal hücre proliferasyonunu düzenlediği bilinmektedir. Büyüme faktörleri ekstrasellüler matriks yıkımını, yara iyileşmesini MMP'ler ve TIMP'ler arasındaki dengeyi kontrol ederek sağlarlar. TGF- $\beta$ , metalloproteinazları inhibe ederken, doku inhibitörlerini (TIMP) aktive eder böylece ekstrasellüler matriks yıkımı yavaşlar, kollojen miktarında artış olur ve striktür gelişir (66,67,68).

### 2.3.3. F Xa Aracılı Fibrozis

Birçok fibrotik hastalık pıhtılaşma zincirinin aktivasyonu ile ilişkilidir. Fibrozis anormal yara iyileşmesi cevabı olarak düşünülmektedir. ECM proteinlerinde aşırı artış, organlarda hasarlı iyileşme ve fibrotik lezyonlara progresyonla sonuçlanır (102). F Xa sinyalleri ile stimüle olan fibroblastlar vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF), latent matrix metalloproteinazlarını (MMPs) sekrete eder. F Xa aracılı aktive MMPs'lerde fibrozis ve yara iyileşmesi sürecinde anjogenezisi artırır (116).

## 2.4. Rivaroksaban

Rivaroksaban F Xa'yı güçlü, selektif ve doza bağımlı olarak inhibe eder. Arteriel ve venöz trombuslerin önlenmesinde ve tedavisinde kullanılmaktadır (117). Faktör X'un, faktör Xa'ya (F Xa) intrinsek ve ekstrinsek yollarla aktivasyonu, kan koagülasyonda basamaklarında merkezi rol oynar. Koagülasyon basamaklarının amplifikasyon özelliğine bağılı olarak, FXa'nın bir molekülü 1000'den fazla trombin molekülü üretebilir. Ek olarak, protrombinaza (FVa-Ca-fofolipid katman) bağılı F Xa'nın reaksiyon oranı serbest F Xa ile karşılaştırıldığında 300.000 kat artar ve trombin üretiminin aşırı artmasına neden olur. Protrombin zamanında (PT) uzama gözlenir. PT'deki uzama plazma rivaroksaban konsantrasyonu ile korele olarak uzamaktadır. Oral absorpsiyonu hızlıdır, biyoyararlanımı %80, Maksimum plazma konsantrasyonuna 4-5 saatte ulaşır. Sirkülasyonda aktif metaboliti yoktur. İlacın 2/3'si böbrekler ile 1/3'i karaciğerde metabolize olur. Uluslararası Normalizasyon Oranı (INR) sadece kumarinler için kalibre edildiği ve onaylandığından ve herhangi diğeri bir antikoagülan için kullanılamamaktadır. Aktive edilmiş parsiyel tromboplastin zamanını da (aPTT) doza bağımlı olarak uzatır; ancak bu da rivaroksabanın farmakodinamik etkisinin değerlendirmek için önerilmez. Anti-faktör Xa aktivitesi de rivaroksabandan etkilenir; ancak, kalibrasyon için hiçbir standart mevcut değildir. Tedavi sırasında koagülasyon parameterlerinin takibine gerek yoktur. Yiyeceklerle birlikte alınması önerilir. Plazmada albümine bağılı olarak taşınır. Dolaşımında majör ya da aktif metaboliti bulunmaz. (118).

## 2.5. Trinitrobenzenosulfonik Asit (TNBS) ile Kolit Modeli

İBH etiopatogenezini ve yeni antiinflamatuvar stratejileri geliştirmek amacıyla en sık kullanılan kolit modeli, TNBS ile kolit oluşturulma yöntemidir. TNBS etanol çözeltisi içinde verilir, çünkü etanol epitel tabakasını kırarak alttaki lamina proprianın bakteriyel komponentlere maruz kalmasını sağlar. Burada kolonik hasar, bariyer kırıcı etanol ve hapten karışımının intrarektal (IR) verilmesi ile oluşturulur. Uygulamada kolit oluşturmak için TNBS'nin (%30 etanolün 0,25 ml'sinde 5-30 mg TNBS olacak şekilde) IR verilmesi gereklidir (119). TNBS ile oluşturulan kolit T lenfosit bağımlıdır ve transmural inflamasyon gözlenir. Kolonik fibrozis modellerinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Erken ve geç hastalıkta farklı sitokin salınımına neden olur. Th1-Th2 aracılı sitokinler ile makrofaj ve monositlerden TGF- $\beta$ 1 salınımını artırır. TGF- $\beta$ 1'de IL13'ü aktive ederek fibrozisi uyarır. MMPs'lerin birikimine neden olur (120, 121). Mukozal inflamasyon proinflamatuvar sitokinlerin üretimine cevap olarak ortaya çıkar. Doz bağımlı kronik ülserasyon ve inflamasyona neden olur. TNBS'nin 30 mg uygulanması ülserasyon indüksiyonuna ve en az 8 hafta sürecek barsak duvar kalınlaşmasına yol açar. Histolojik inflamatuvar yanıt mukozal ve submukozal PMNL'leri, makrofajları, lenfositleri, bağdoku mast hücrelerini ve fibroblastları içerir. Yapılan çalışmalarda inflamasyon indüksiyonundan 3 hafta sonra öldürülen ratların %57'sinde granülomlar, langhans tipi dev hücreler, segmental ülserasyon ve inflamasyon olduğu bildirilmiştir (122).

### **3. GEREÇ VE YÖNTEM**

Bu çalışma Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Etik Kurulu onayı (03/07/20013;G.Ü.ET-13.049) alındıktan sonra Gazi Üniversitesi Deney Hayvanları Laboratuvarında yapılmıştır. Patolojik incelemeler Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'nda gerçekleştirilmiştir, Biyokimyasal değerlendirmeler Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı'nda gerçekleştirilmiştir.

#### **3.1. Gereç**

##### **3.1.1. Deney Hayvanları**

Bu çalışmada toplam 24 adet 200-250 gram ağırlığında Wistar-albino dişi sıçan grubu kullanıldı. Deney öncesi tüm hayvanlar standart yem ve su ile beslendi. Her grupta 6 sıçan olacak şekilde 4 farklı grup oluşturuldu.

##### **3.1.2. Rivaroksaban ve Prednizolonun Hazırlanması**

Rivaroksaban 10 mg tabletler toz haline getirildi ve 20 ml distile suda eritildi. 3mg/kg olacak şekilde gavaj yolu ile verildi. Metilprednizolon 8mg tabletler 20 ml suda eritilerek 2mg/kg gavaj yolu ile verildi (resim 6).

#### **3.2. Yöntem**

##### **3.2.1. Sıçanların Beslenme Modeli**

Hayvanlar deney süresince standart nem, ışık (12 saat gün ışığı/12 saat karanlık) ve ısı koşullarında (22-24 0C) bulunduruldu ve standart sıçan yemi ile

beslendi. Kaprofajiyi önlemek için kafes içine tel altlıklar yerleştirildi. Her bir sıçanın yediği yem ve içtiği sıvı miktarının belirlenmesi için sıçanlar numaralandırıldı.



**Resim 1.** TNBS ile kolit induksiyonu



**Resim 2.** Şıçanların bir dakika baş aşağı bekletilmesi



**Resim 3.** Gavajla rivaroksaban verilmesi



Ağırlık değişimlerinin belirlenmesi amacıyla çalışma boyunca 1.gün ve sakrifikasyondan önce 8.gün sıçanların ağırlıkları kaydedildi.

### 3.2.2. Kolit İndüksiyonu

Sıçanlara anestezi, intramusküler Ketamine hydrochloride (Ketalar, Parke Davis ve Eczacıbaşı, İstanbul) 50mg/kg dozunda+Xylazine hydrochloride (Rompun, Bayer HealthCare ) 5mg/kg enjekte edilerek sağlandı. Deneysel kolit oluşturmak için 30mg (80 mg/kg) TNBS (92823, picrylsulfonic acid solution) +%50 etanol karışımı kullanıldı. 2-4-6 Trinitro-benzen sülfonik asit (TNBS) Sigma'dan (Sigma, La Verpaille- re, Fransa) satın alınmıştır. Rivaroxaban dozu 3 mg/kg oral olarak belirlendi (123), prednizolon dozu 2mg/kg oral olarak verildi. İlacın uygulama sırasında oda ısısında olmasına dikkat edildi. Tüm İR uygulamalar, anestezi altındaki sıçanlara 8 French gavaj rektal yoldan 8 cm içeri itildi, bu kanülden 30 mg/0,15 ml/rat (TNBS+ %50) etanol yavaşça içeri verilerek kolit oluşturuldu. Daha sonra, 0.5ml hava enjekte edilerek TNBS-etanol solüsyonunun kanülden tamamen temizlenmesi sağlandı (Resim 4). Daha sonra sıçanlara, verilen maddenin geri kaçmasını engellemek için 1 dk saniye süre ile kuyruktan kaldırılarak baş aşağı tutuldu, sonrasında trandelenburg pozisyonunda anesteziden çıkana kadar bekletildi (yaklaşık 30 dakika) (Resim 5) (124).



**Resim 4.** Grup A Normal Kolon

**Grup A:  
Kolon mukozası  
şeffaf vasküler  
yapılar belirgin**



**Resim 5.** Grup A Normal Kolon



**Resim 6.** Grup B 4cm nekroz



**Resim 7.** Grup B pankreas hiperemik, normalden küçük



**Resim 8.** Grup B Uterus kolona yapışmış ( resim 8'in diseke edilmiş görünümü)



**Resim 9.** Grup B Uterus kolona yapışmış



**Resim 10.** Grup D 1,5 cm nekroz



**Resim 11.** Grup C 3,5cm Nekroz



**Resim 12.** Grup C kolon duvarında kalınlaşma



**Resim 13.** Grup C kolon duvarı kalın ve rijit görünümde

**Tablo 1.** Kolit Grupları ve Uygulama

Gruplar	Sıçan Sayısı	Tanım	Kolit Modeli	Tedavi 2-7.günler
Grup A	6	Sham	Yok	Oral salin
Grup B	6	Kontrol	1.gün	Yok
Grup C	6	Standart grup	1.gün	Metilprednizolon2mg/gün
Grup D	6	Test grubu	1.gün	Rivaroksaban 3mg/kg/gün (Resim4)

Ortasından diseke edilip, rektum distalde mümkün olan en aşağı seviyeden transekte edildi ve yaklaşık 8-10 cm'lik kolon segmenti çıkarıldı. Çıkarılan kolon dokusu longitudinal olarak iki eşit parçaya ayrıldı. Makroskopik değerlendirilmesi yapıldı (Resim 5). Kolon örneğinin bir parçası %10 formaldehit içinde tespit edildi. Diğer yarısı işlem gününe kadar -80 C° derin dondurucuda (Sanyo MDF-U70V) saklandı. Derin anestezi altında (ketamin 45 mg/kg +xylasin 5mg/kg IM intrakardiak) kan alınarak sıçanlar kurban edildi.

### 3.2.5. Patolojik Değerlendirme

#### 3.2.5.1 Makroskopik Değerlendirme

Çıkarılan bağırsak bölümlerinin longitudinal biçimde açılmasını takiben, hızla serum fizyolojik ile yıkanarak, gruplara ve tedaviye kör bir patoloji uzmanı tarafından (Ö.E.) Millar ve arkadaşlarının (125) tariflediği şekilde makroskopik skorlamaları her bir denek için ayrı ayrı yapıldı ve grup ortalamaları hesaplandı (tablo.2).

**Tablo 2.** Makroskopik Kolit Değerlendirilmesi (Millar Skalası) (125)

Özellik	Skor
Normal mukoza	0
Sadece mukozal eritem	1
Hafif mukozal ödem, az oranda kanama, küçük erozyonlar	2
Orta derecede ödem, kanayan ülser yada erozyon	3
Ciddi ülser, erozyon, ödem ve doku nekrozunun	4

### 3.2.5.2. Mikroskopik Değerlendirme

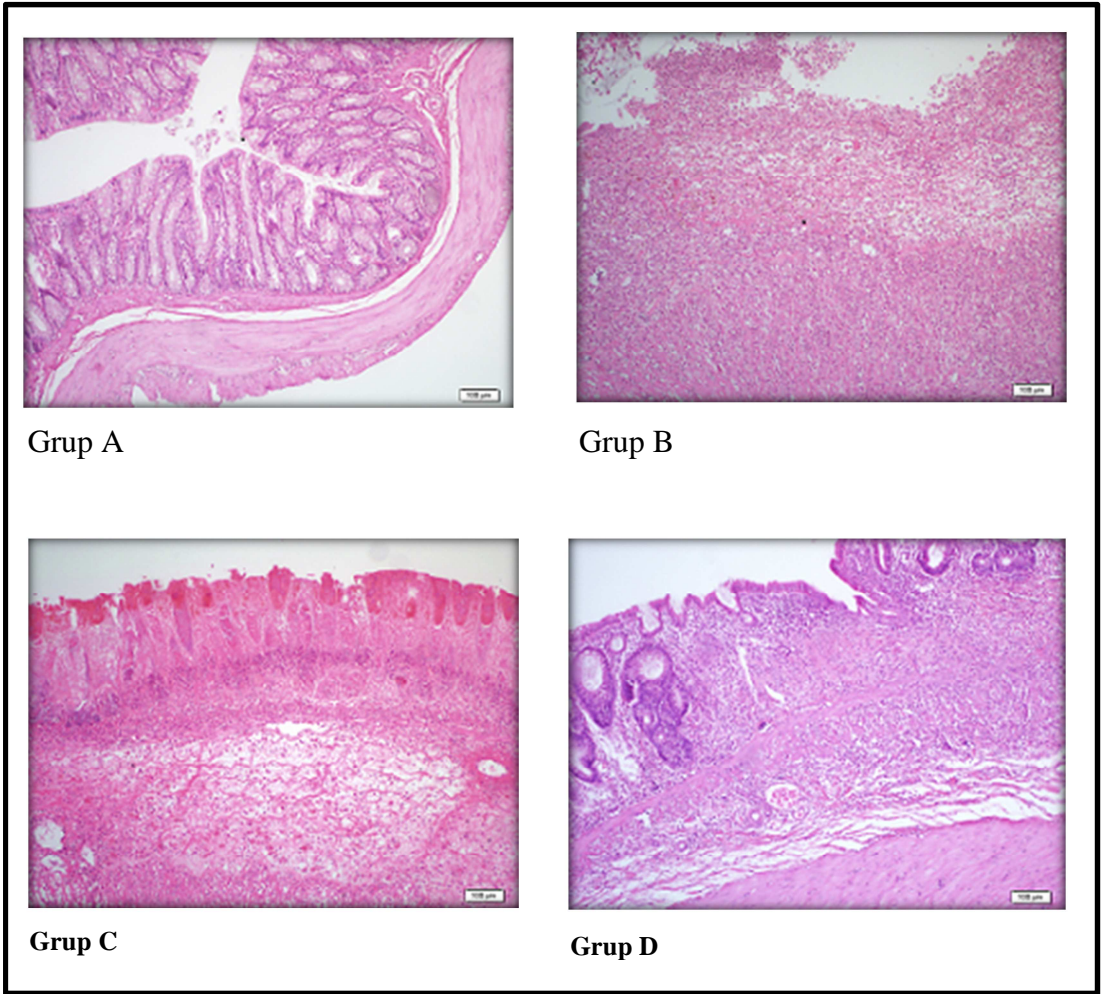
%10 formalin içinde tespit edilmiş kolon segmentleri, parafin bloklara gömüldü. Bu bloklardan 5µ kalınlığında alınan kesitler hematoksilin-eosin boyasıyla boyandı (resim 6). Hazırlanan preparatlar gruplar için gruplara kör bir patoloji uzmanı tarafından (Ö.E.) ışık mikroskopu altında incelenerek mikroskopik skorlama yapıldı. Skorlama için Ackerman ve arkadaşlarının (126) kullandığı skorlama sistemi modifiye edilerek her hayvan için ayrı ayrı hesaplandı ve her grubun ortalama skoru elde edildi.

**Tablo 3.** Mikroskopik Kolit Değerlendirmesi (Ackerman skalası) (126)

Nekroz	Yok =0	M=1	M+SM=2	M+SM+MP=3	TM=4
	Yok =0	Küçük =1	Orta=2	Büyük =3	Yaygın =4
İnflamasyon	Yok =0	M=1	M+SM=2	M+SM+MP=3	TM=4
	Yok= 0	Minimal=1	İlımlı =2	Orta derece=3	Ciddi=4

M:Mukoza SM: Submukoza MP: Muskularis Propria TM: Transmural Tutulum

Herbir + bulgu için puanlandırma



**Resim 14.** Patolojik Bulgular

Grup A: Tümüyle normal görünümde kolon duvarı. X25, hematoxilen&eozin  
Grup B: transmural nekroz ve yüzeyde geniş ülserasyon. X 25, hematoxilen&eozin  
Grup C: Mukoza ve submukozayı etkileyen orta derinlikte ve genişlikte aktif kolit. Mukozadaki görünüm akut iskemik zedelenme ile uyumlu. X 25, hematoxilen&eozin  
Grup D: Mukoza ve submukozayı etkileyen orta derinlikte ve genişlikte aktif kolit. Resmin sol tarafında kronik kript zedelenmesini kanıtlayan kript distorsiyonu mevcut. X 25, hematoxilen&eozin

### 3.2.6. Biyokimyasal Değerlendirme

#### 3.2.6.1. Doku MPO Aktivitesi için Dokuların Hazırlanması ve MPO ölçümü

Prensip:  $H_2O_2$ 'nin homogenat tarafından oksitlenerek O-dianisidinin redüklenmesi ve redükte O-dianisidinin 410 nm'de ölçülmesi esasına dayanır. 130 mg barsak mukozası 1.3ml soğuk 20mM lık EDTA ile homojenize edilir. Homojenattan 1'er ml alınıp ependorf tüplerine konulur ve 20 000 g de 15 dk. +4 derecede santrifüj edilir. Süpernatant atılıp Pellet, 1.3 ml 50mM lık tampon (pH 6) ile 60 sn sonike edilir, sonra 20.000 g de 15 dk. +4 derecede tekrar santrifüj edilir. Süpernatant yeni ependorflara aktarılır. Bu süpernatandan MPO düzeyi çalışılır. 410 nm'de optik dansite köre karşı okundu. 1 Ünite (Ü)= 37°C'de dk. oluşan optik dansite değişimi olarak kabul edilir. Spesifik aktivite= U/g doku olarak değerlendirildi (127).

#### 3.2.6.2. MDA, TGF $\beta$ -1, MMP 3 ve TIMP 1 Düzeyi, SOD Aktivitesi İçin Doku Örneklerinin Homojenize Edilmesi

Doku örnekleri 1/10 oranında fosfat buffer salin (pH:7,4) ile buz içinde, soğukta homojenize edilmiştir. Homojenatlar soğutmalı santrifüjde 15.000 rpm'de 15 dakika santrifüj edilip, süpernatantlardan doku malondialdehit düzeyi ve doku SOD aktivitesi tayini yapılmıştır.

**i. Barsak Dokusu MDA Analizi:** Doku MDA düzeyleri Ohkawa ve arkadaşlarının tarif ettiği yöntemle göre tayin edildi. Bu yöntemin ilkesi; homojenattaki proteinlerin sodyum dodesil sülfat (SDS) ile bağlanmasından sonra

örnekte bulunan MDA'nın ortam pH'sı 3,5 olduğu koşullarda tiobarbitürik asit (TBA) ile oluşturduğu komplekse bağlı kırmızı rengin spektrofotometrik ölçümüne dayanır (128).

**ii. Barsak Dokusu SOD Analizi:** SOD aktivitesi, Yi-Sun'un tanımladığı, ksantin oksidaz ile  $O_2^{\cdot-}$  oluşturması ve bunun da NBT ile renkli bir bileşik oluşturarak bu renk şiddetinin spektrofotometrik olarak ölçülmesi esasına dayanır. Ortamdaki SOD aktivitesi ne kadar fazla ise  $O_2^{\cdot-}$ 'yi ortadan kaldıracığı için oluşan rengin şiddeti o kadar az olacaktır (129).

**iii. Barsak Dokusu TGF Beta 1, MMP 3 ve TIMP 1 düzeyi tayini:** Doku TGF $\beta$ -1 (Eastbiopharm, China, Lot No: 20131022), MMP 3 (Eastbiopharm, China, LotNo:20131022), TIMP 1 (Eastbiopharm, China, Lot NO:20131022) düzeyleri ise ELISA (sandviç enzim immunoassay) prensibi ile tayin edilmiştir. Sandviç enzim immunoassay prensibinde monoklonal antikorlarla kaplı reaksiyon plağına numunelerdeki ölçülecek madde bağlanır. Bu maddeye de enzim (HRP) işaretli ikinci bir monoklonal antikor bağlanır. Eklenen kromojenik solüsyon ile enzim etkileşimi sonucu oluşan rengin şiddeti ile ölçülmek istenen maddenin konsantrasyonu doğru orantılıdır. Doku TGF  $\beta$ -1, MMP 3 ve TIMP 1 seviyeleri ng/g doku olarak verilmiştir.

### 3.2.7. İstatistiksel Analiz

Verilerin analizi SPSS for Windows 11.5 paket programında yapıldı. Kesikli ve sürekli sayısal değişkenlerin dağılımının normale yakın olup olmadığı



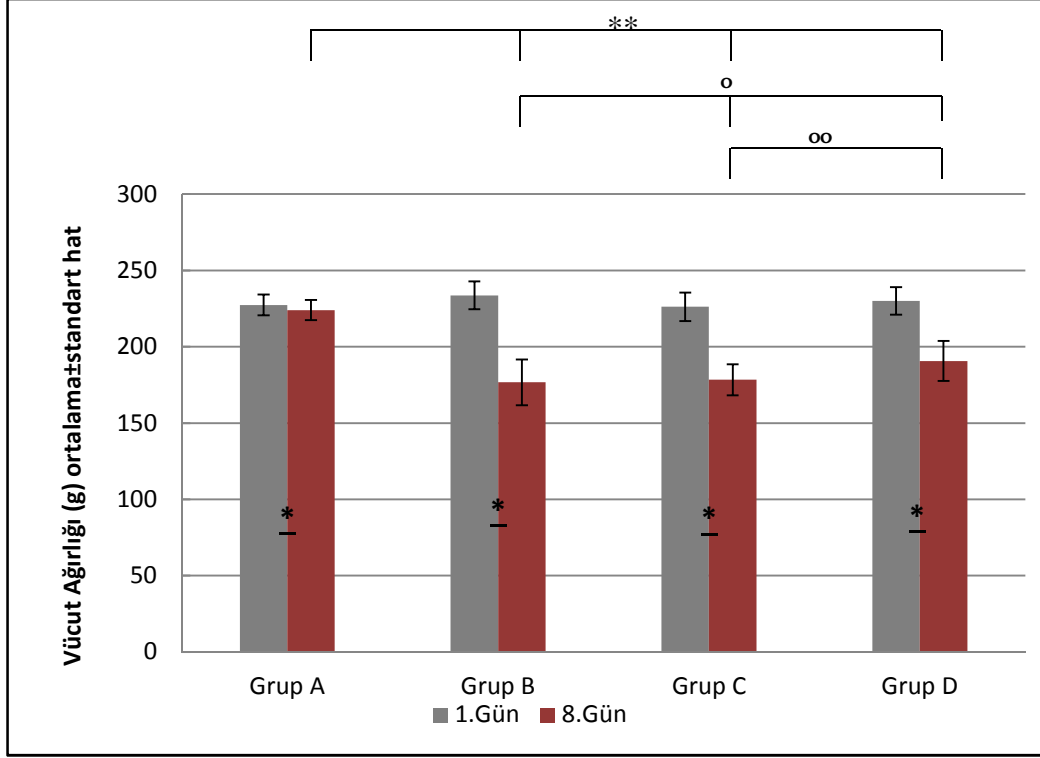
Shapiro Wilk testi ile varyansların homojenliği ise Levene testiyle araştırıldı. Tanımlayıcı istatistikler ortalama  $\pm$  standart hata olarak verildi (130).

Gruplar arasında ortalamalar yönünden farkın önemliliği Tek Yönlü Varyans Analizi (One-Way ANOVA) ile ortalama değerler yönünden farkın önemliliği ise Kruskal Wallis testiyle araştırıldı. Tek Yönlü Varyans Analizi veya Kruskal Wallis test istatistiği sonuçlarının önemli bulunması halinde post hoc Tukey HSD veya Conover'in parametrik olmayan çoklu karşılaştırma testi kullanılarak farka neden olan durum (lar) tespit edildi (131, 132).

Gruplar içerisinde 1.gün ve 8.gün vücut ağırlığı ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık olup olmadığı Bağımlı t-testi kullanılarak değerlendirildi. İnflamasyon ve fibrozis markerlerinin hem birbirleri arasında hem de mikroskopi skorları arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişkinin olup olmadığı ise Spearman'ın Korelasyon testi kullanılarak araştırıldı (133, 134).

$p < 0,05$  için sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

#### 4. BULGULAR

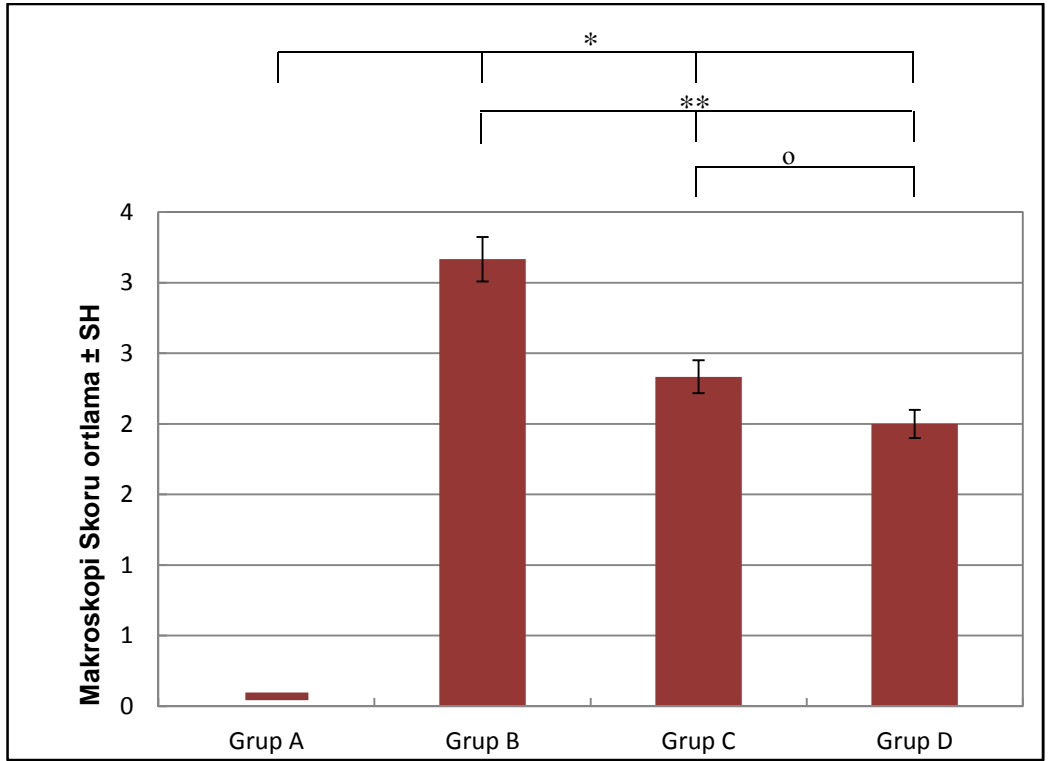


**Grafik 1.** Grupların 1. ve 8. gün kilo değişimleri

(\*p<0,001, \*\*p <0,001, ° p>0,05, °° p>0,05)

Gruplar içerisinde 1.gün ve 8.gün vücut ağırlıkları arasında yapılan karşılaştırmalar; Grup A içerisinde 1.güne göre 8.gün vücut ağırlığında istatistiksel olarak anlamlı azalma görüldü (\*p<0,001). Grup B içerisinde 1.güne göre 8. gün vücut ağırlığında istatistiksel olarak anlamlı azalma görüldü (\*p<0,001). Grup C içerisinde 1.güne göre 8.gün vücut ağırlığında istatistiksel olarak anlamlı azalma görüldü (\*p<0,001). Grup D içerisinde 1.güne göre 8.gün vücut ağırlığında istatistiksel olarak anlamlı azalma görüldü (\*p<0,001).

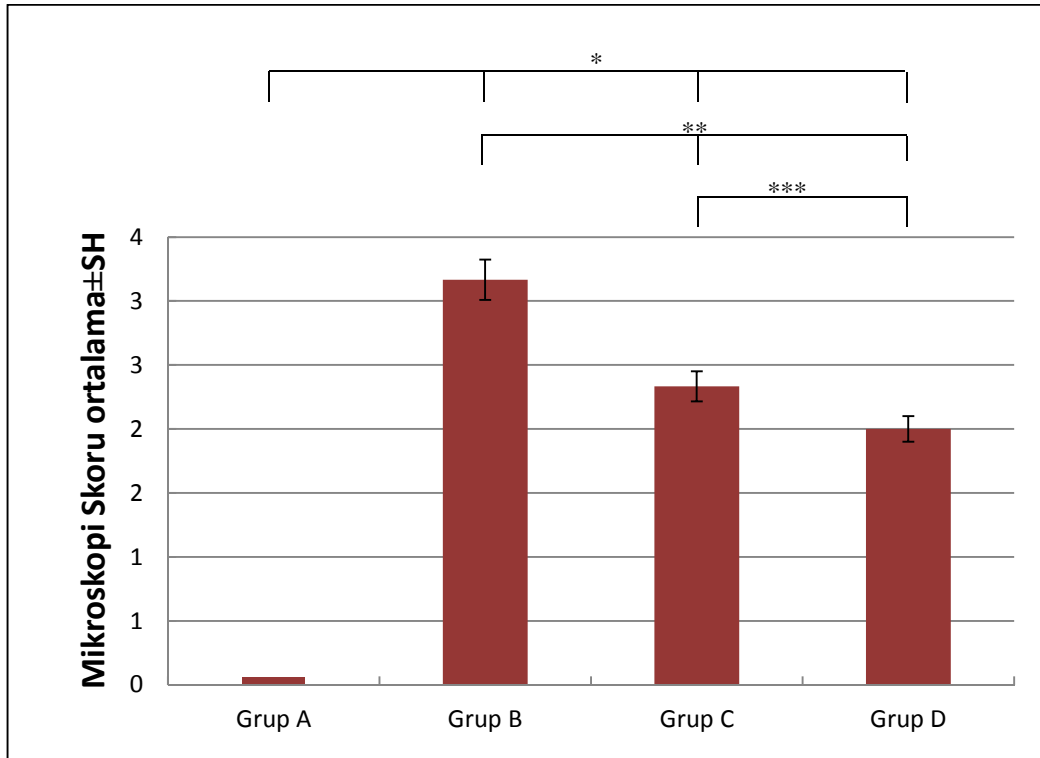
Gruplar arasında 1.güne göre 8.günde vücut ağırlığında meydana gelen değişimler yönünden yapılan karşılaştırmalar; Gruplar arasında kilo kaybı yönünden istatistiksel olarak anlamlı fark olup (\*\*p<0,001) söz konusu farka neden olan durumlar incelendiğinde Grup A'ya göre sırasıyla; Grup B, C ve D'de ortalama kilo kaybı istatistiksel anlamlı olarak daha yüksekti (\*\*p<0,001). Grup B ile Grup C arasında, Grup B ile Grup D arasında, Grup C ile Grup D arasında kilo kaybı ortalamaları istatistiksel olarak benzer bulundu (p=0,550; p=0,077 ve p=0,608 °p>0,05). Ayrıca, kilo kaybı arttıkça makroskopi skorları da artmaktaydı (r=0,665 ve p<0,001).



**Grafik 2.** Grupların makroskopi skorlarının değerlendirilmesi

(\* p<0,001, \*\*p<0,001, °p>0,05)

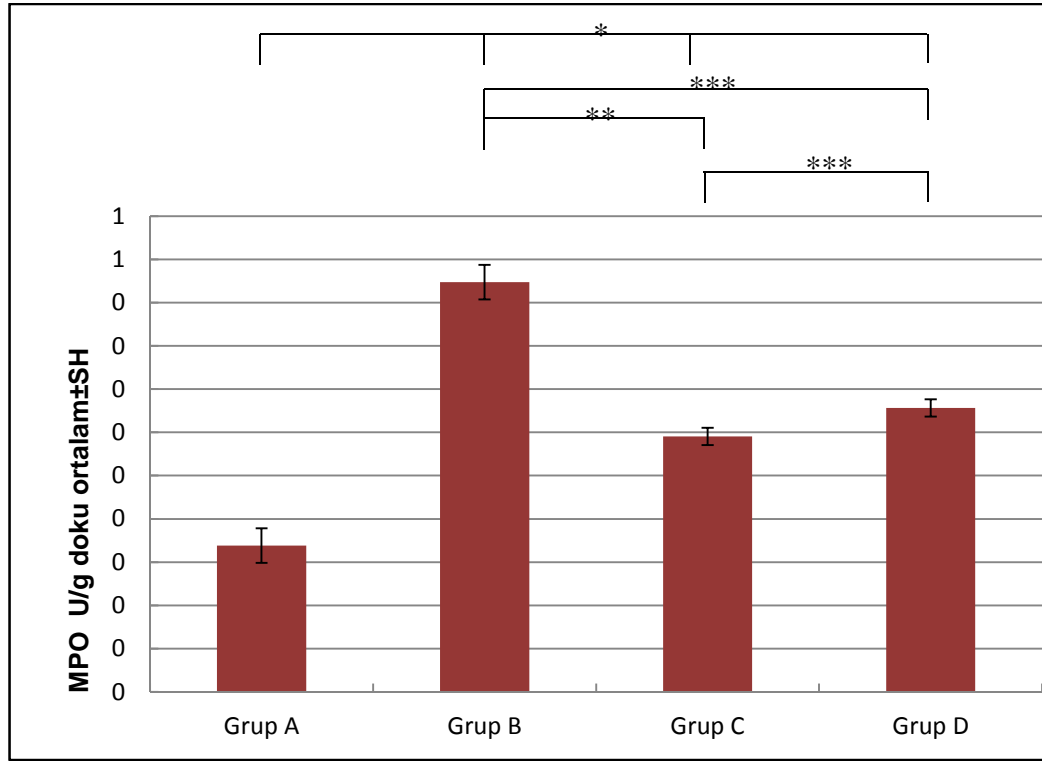
Gruplar arasında medyan makroskopi skorları; Grup A: 0 (0-0), Grup B: 3,5 (2-4), Grup C: 2 (2-3), Grup D: 2 (1-3). Gruplar arasında medyan makroskopi skorları yönünden istatistiksel olarak anlamlı fark olup ( $p<0,001$ ) söz konusu farka neden olan durumlar incelendiğinde Grup A'ya göre sırasıyla; Grup B, C ve D'nin medyan makroskopi skoru istatistiksel anlamlı olarak daha yüksekti ( $*p<0,001$ ). Aynı zamanda Grup C ve Grup D'ye göre Grup B'nin medyan makroskopi skoru istatistiksel anlamlı olarak daha yüksekti ( $p=0,002$  ve  $**p<0,001$ ). Grup C ve Grup D arasında ise medyan makroskopi skorları istatistiksel olarak benzer bulundu ( $^{\circ} p>0,05p=0,093$ ) (Grafik 2).



**Grafik 3.** Grupların Mikroskopi skorlarının değerlendirilmesi

(\*  $p<0,001$ , \*\*  $p<0,001$ ,\*\*\*  $p<0,001$ )

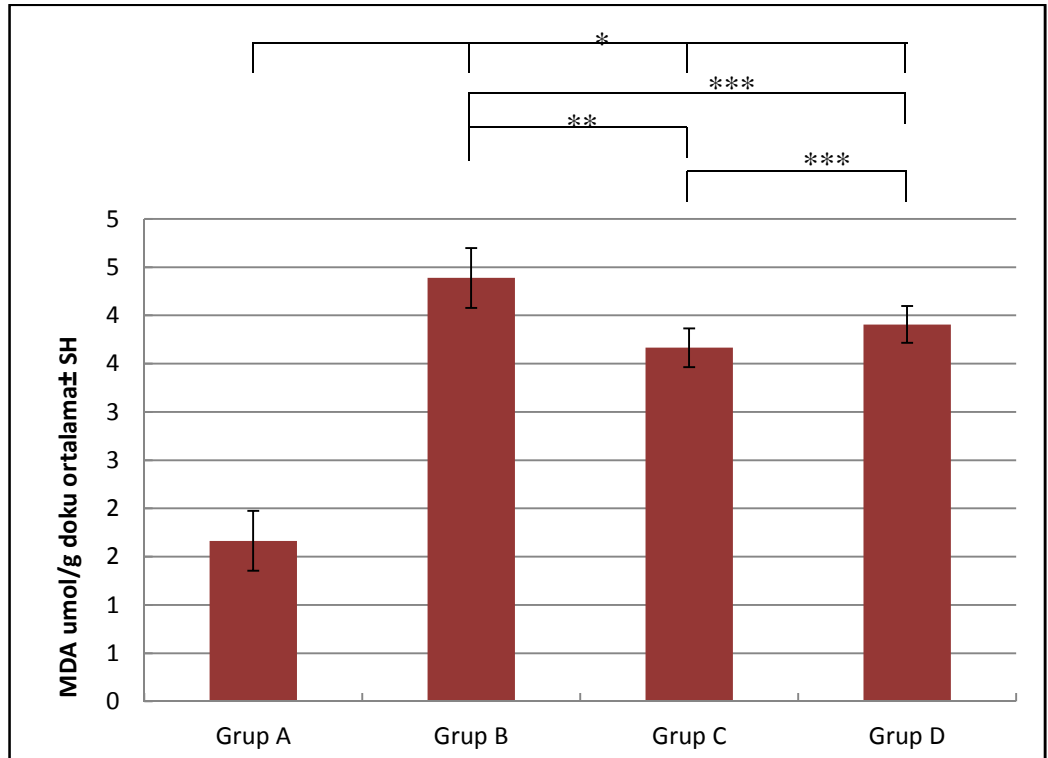
Gruplar arasında medyan mikroskopi skorları; Grup A: 0 (0-0), Grup B: 13 (10-16), Grup C: 9 (9-9), Grup D: 8 (4-8).Gruplar arasında medyan mikroskopi skorları yönünden istatistiksel olarak anlamlı fark olup ( $p<0,001$ ) söz konusu farka neden olan durumlar incelendiğinde Grup A'ya göre sırasıyla; Grup B, C ve D'nin medyan mikroskopi skoru istatistiksel anlamlı olarak daha yüksekti ( $*p<0,001$ ). Aynı zamanda Grup C ve Grup D'ye göre Grup B'nin medyan mikroskopi skoru istatistiksel anlamlı olarak daha yüksekti ( $**p<0,001$ ). Grup D'ye göre Grup C'nin medyan mikroskopi skoru da istatistiksel anlamlı olarak daha yüksekti ( $***p<0,001$ ) (Grafik 3).



**Grafik 4.** Kontrol grubu ve Tedavi Gruplarında Doku MPO Düzeylerinin Kıyaslanması

(\* $p<0,001$ , \*\* $p<0,001$ , \*\*\* $p<0,05$ )

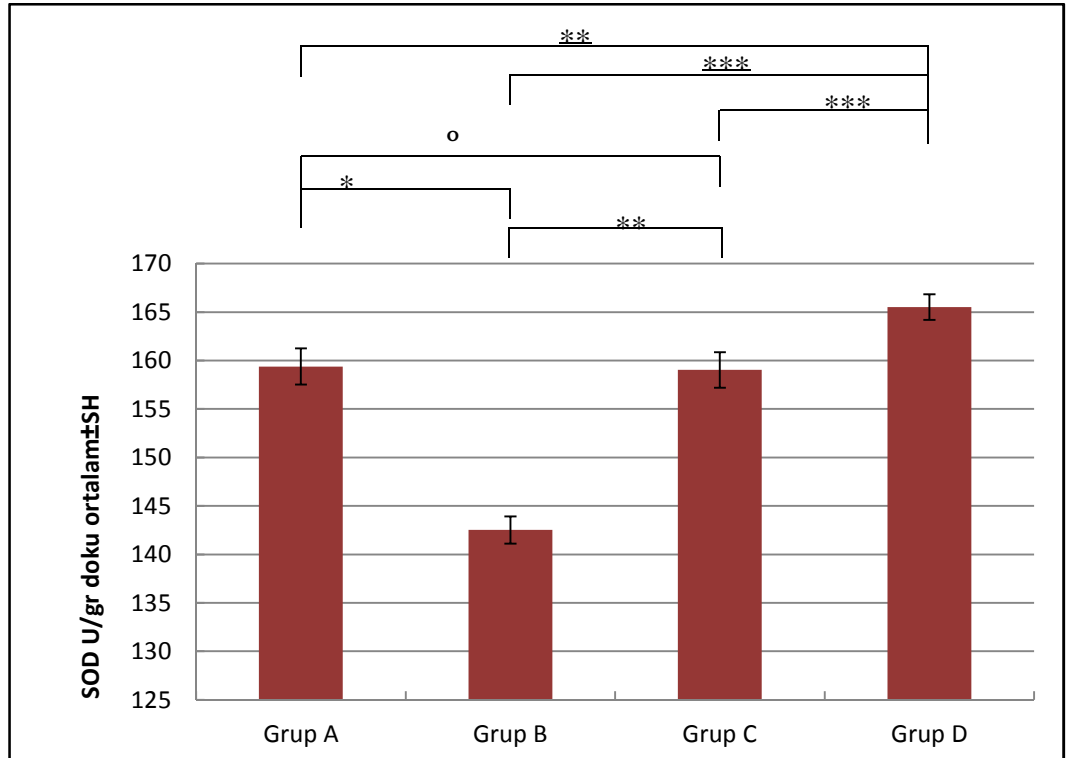
Gruplar arasında medyan MPO değerleri; Grup A: 0,17 (0,1-0,21) , Grup B: 0,47 (0,31-0,61), Grup C: 0,29 (0,25-0,42), Grup D: 0,33 (0,25-0,37) Gruplar arasında medyan MPO düzeyleri yönünden istatistiksel olarak anlamlı fark olup ( $p=0,002$ ) söz konusu farka neden olan durumlar incelendiğinde Grup A'ya göre sırasıyla; Grup B, C ve D'nin medyan MPO düzeyi istatistiksel anlamlı olarak daha yüksekti ( $*p<0,001$ ). Aynı zamanda Grup B'ye göre Grup C'nin medyan MPO düzeyi istatistiksel anlamlı olarak daha düşüktü ( $**p<0,001$ ). Grup B'ye göre Grup D'nin medyan MPO düzeyi istatistiksel anlamlı olarak daha düşüktü ( $***P<0,05$   $p=0,047$ ). Grup C'ye göre D'nin de medyan MPO düzeyi istatistiksel anlamlı olarak daha yüksekti ( $***P<0,05$   $p=0,047$ ) (Grafik 4).



**Grafik 5.** Kontrol grubu ve Tedavi Gruplarında Doku MDA Düzeylerinin Kıyaslanması

(\*  $p<0,001$ , \*\*  $p<0,001$ , \*\*\*  $p<0,05$ )

Gruplar arasında medyan MDA değerleri; Grup A: 1,6 (1,0-2,8), Grup B: 4,3 (3,1-5,5), Grup C: 3,6 (3,1-4,3), Grup D: 3,9 (3,1-4,4). Gruplar arasında medyan MDA düzeyleri yönünden istatistiksel olarak anlamlı fark olup ( $p=0,002$ ) söz konusu farka neden olan durumlar incelendiğinde Grup A'ya göre sırasıyla; Grup B, C ve D'nin medyan MDA düzeyi istatistiksel anlamlı olarak daha yüksekti ( $*p<0,001$ ). Aynı zamanda Grup B'ye göre Grup C'nin ( $**p<0,001$ ) ve D'nin ( $***p<0,05$ ), medyan MDA düzeyi istatistiksel anlamlı olarak daha düşüktü ( $p<0,001$  ve  $p=0,047$ ). Grup D'ye göre C'nin de medyan MDA düzeyi istatistiksel anlamlı olarak daha düşüktü ( $^{\circ}p<0,05$ ,  $p=0,047$ ).

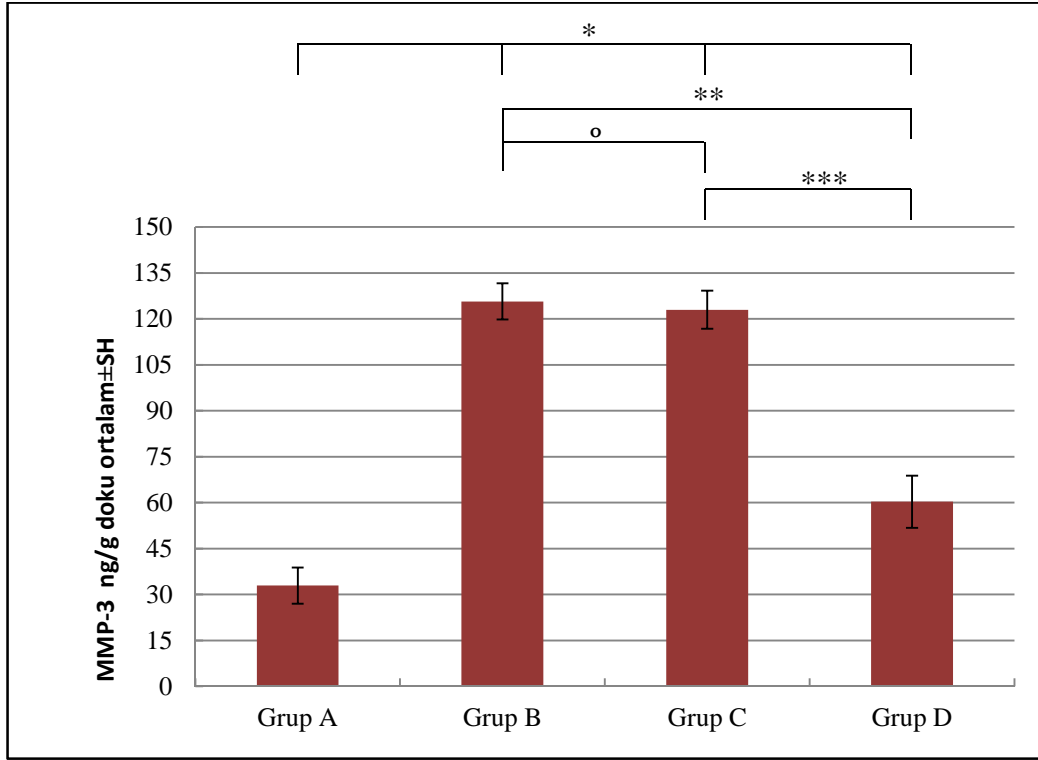


**Grafik 6.** Kontrol grubu ve Tedavi Gruplarında Doku SOD Düzeylerinin Kıyaslanması

( $^{\circ}p>0,05$ ,  $*p<0,001$ ,  $**p<0,001$ ,  $***p<0,001$ ,  $****p<0,001$ )

Gruplar arasında medyan SOD değerleri; Grup A: 159,5 (150,1-162,7), Grup B: 142,5 (137,9-147,3), Grup C: 158,6 (155,2-168,7), Grup D: 165,7 (160,3-169,3). Gruplar arasında medyan SOD düzeyleri yönünden istatistiksel olarak anlamlı fark olup ( $*p < 0,001$ ) söz konusu farka neden olan durumlar incelendiğinde Grup A'ya göre Grup B'nin medyan SOD düzeyi istatistiksel anlamlı olarak daha düşük ( $*p < 0,001$ ). Grup D'nin medyan SOD düzeyi grup A ya göre istatistiksel anlamlı olarak daha yüksekti ( $**p < 0,001$ ). Aynı zamanda Grup B'ye göre Grup C'nin medyan SOD düzeyi istatistiksel anlamlı olarak daha yüksekti ( $*p < 0,001$ ). Grup B'ye göre Grup D'nin medyan SOD düzeyi istatistiksel anlamlı olarak daha yüksekti ( $***p < 0,001$ ). Grup C'ye göre D'nin de medyan SOD düzeyi istatistiksel anlamlı olarak daha yüksekti ( $***p < 0,001$ ). Grup A ile Grup C arasında ise medyan SOD düzeyleri istatistiksel olarak benzerdi ( $^{\circ}p = 0,106$ ).



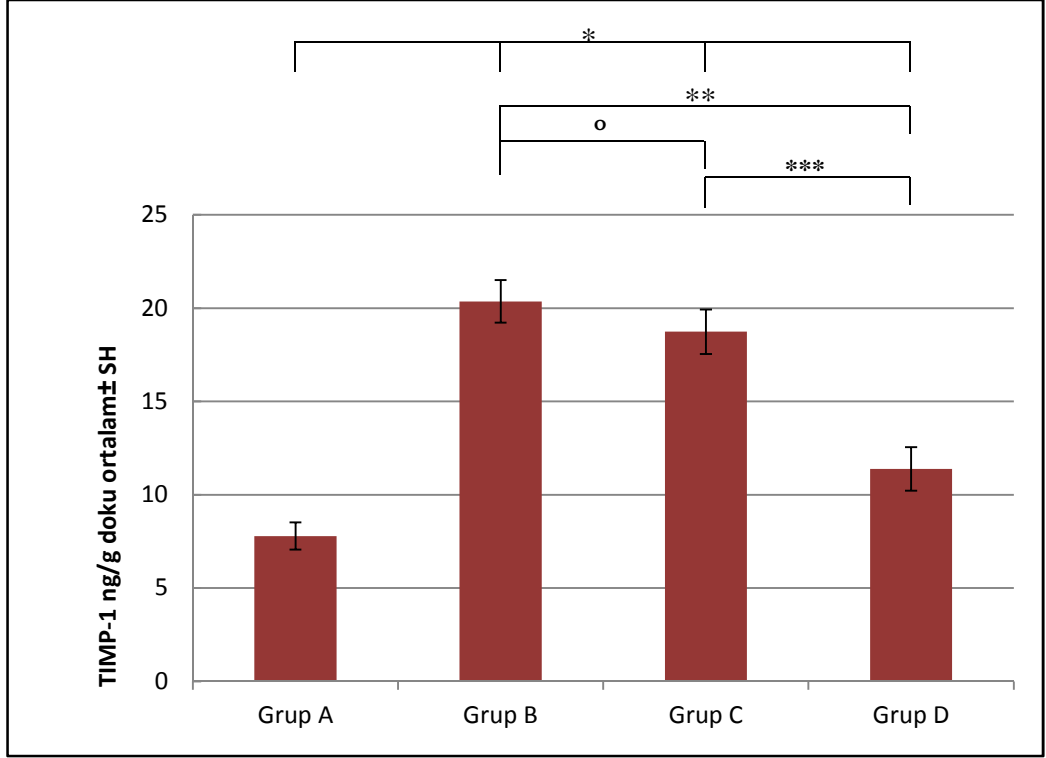


**Grafik 7.** Kontrol grubu ve Tedavi Gruplarında Doku MMP -3 Düzeylerinin Kıyaslanması

(\*p<0,001, \*\*p<0,001, \*\*\*p<0,001, °p>0,05)

Gruplar arasında medyan MMP-3 değerleri; Grup A: 32,5 (14,5-52,2), Grup B: 124,3 (109,9-144,5), Grup C: 127,8 (103,4-138,2), Grup D: 66,7 (28,3-86,4). Gruplar arasında medyan MMP-3 düzeyleri yönünden istatistiksel olarak anlamlı fark olup (p<0,001) söz konusu farka neden olan durumlar incelendiğinde Grup A'ya göre sırasıyla; Grup B, C ve D'nin medyan MMP-3 düzeyi istatistiksel anlamlı olarak daha yüksekti (\*p<0,001; \*p<0,001 ve p=0,002). Grup B'ye göre Grup C'nin medyan MMP-3 düzeyi istatistiksel anlamlı olarak daha düşüktü (\*\*p<0,001). Aynı zamanda Grup B'ye göre Grup D'nin medyan MMP-3 düzeyi istatistiksel anlamlı olarak daha düşüktü (\*\*\*p<0,001). Grup B ve Grup C

arasında ise medyan MMP-3 düzeyi istatistiksel olarak benzer bulundu ( $p=0,407$ ).

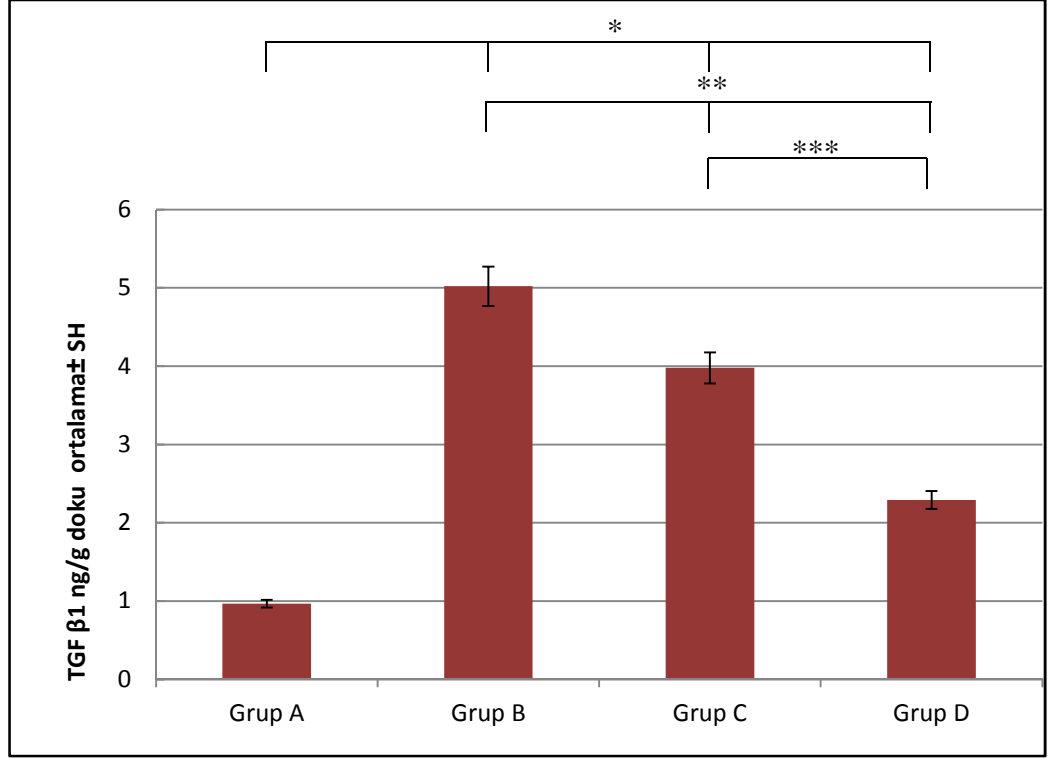


**Grafik 8.** Kontrol grubu ve Tedavi Gruplarında Doku TIMP-1 Düzeylerinin Kıyaslanması

(\* $p<0,001$ , \*\* $p<0,001$ , \*\*\* $p<0,001$ , ° $p>0,05$ )

Gruplar arasında medyan TIMP-1 değerleri; Grup A: 7,8 (6,5-10,9), Grup B: 20,4 (17,1-24,4), Grup C: 18,7 (10,5-28,2), Grup D: 11,3 (7,2-15,3). Gruplar arasında medyan TIMP-1 düzeyleri yönünden istatistiksel olarak anlamlı fark olup ( $p<0,001$ ) söz konusu farka neden olan durumlar incelendiğinde Grup A'ya göre sırasıyla; Grup B, C ve D'nin medyan TIMP-1 düzeyi istatistiksel anlamlı olarak daha yüksekti (\* $p<0,001$ ). Aynı zamanda Grup B'ye göre Grup D'nin medyan TIMP-1 düzeyi istatistiksel anlamlı olarak daha düşüktü (\*\*\*) $p<0,001$ ). Grup B ve

Grup C arasında ise medyan TIMP-1 düzeyi istatistiksel olarak benzer bulundu ( $p=0,407$ ).



**Grafik 9.** Kontrol grubu ve Tedavi Gruplarında TGF beta 1 Doku Düzeylerinin Kıyaslanması  
(\* $p<0,001$ , \*\*  $p<0,001$ , \*\*\*  $p<0,001$ )

Gruplar arasında medyan TGF- $\beta$ 1 değerleri; Grup A: 0,97 (0,60-1,53), Grup B: 5,02 (3,87-6,35), Grup C: 3,98 (3,01-5,45), Grup D: 2,29 (1,04-2,91). Gruplar arasında TGF beta 1 ortalamaları yönünden istatistiksel olarak anlamlı fark olup ( $p<0,001$ ) söz konusu farka neden olan durumlar incelendiğinde Grup A'ya göre sırasıyla; Grup B, C ve D'nin TGF beta 1 ortalaması istatistiksel anlamlı olarak daha yüksekti (\* $p<0,001$ ;  $p<0,001$  ve  $p=0,002$ ). Aynı zamanda Grup B ve Grup C'ye göre Grup D'nin medyan TGF beta 1 düzeyi istatistiksel anlamlı olarak daha

düşüktü (\*\*p<0,001). Grup C'ye göre D'nin ise medyan TGF  $\beta$ 1 düzeyi istatistiksel olarak daha düşüktü (\*\*p<0,001).

MPO, TIMP-1, MMP-3, TGF  $\beta$ 1 ve MDA ile mikroskopi skoru arasında istatistiksel olarak anlamlı ve aynı yönlü korelasyon saptanırken, SOD ile mikroskopi skoru arasında ise istatistiksel olarak anlamlı ve ters yönlü korelasyon saptandı (p<0,05).

**Tablo 4.** İnflamasyon ve Fibrozis Markerlerine Ait Ölçümler ile Mikroskopi Skorları Arasındaki Korelasyon Katsayıları ve Önemlilik Düzeyleri

<b>Değişkenler</b>	<b>Korelasyon Katsayısı</b>	<b>p-değeri&lt;0,05</b>
<b>SOD</b>	-0,622	<0,001
<b>MPO</b>	0,427	□0,038
<b>TIMP-1</b>	0,806	<0,001
<b>MMP-3</b>	0,866	<0,001
<b>TGF <math>\beta</math> 1</b>	0,675	<0,001
<b>MDA</b>	0,620	<0,001

## 5. TARTIŞMA

İnflamatuvar barsak hastalıklarının iki majör formu olan ÜK ve CH'lığı, sistemik inflamasyon, intestinal fibrozis, mortalitenin eşlik ettiği, gastrointestinal sistemin; kronik, tekrarlayıcı, progresif inflamasyonu ile karakterize kronik inflamatuvar hastalıklarıdır (12).

İBH patogenezi oldukça merak uyandırıcı ve karmaşık bir bulmacadır. Son birkaç dekaddır anlaşılmıştır ki; hastaların yalnızca klinik durumları değil altta yatan patogenetik mekanizmaları da karmaşıktır (2). Çevresel, genetik, immun, nonimmun ve mikrobial faktörler arasında gözlenen kompleks etkileşimlerin sonucunda oluşan İBH hipotezi; immun cevabın hedefi olarak genetik faktörlerin rolünün tespiti, inflamasyonun hücrel ve moleküler mekanizmalarının anlaşılması, doku hassarı ve iyileşmesi, enterik floranın yenilenmesinin kabulü ile sağlamlaştırılmıştır. İBH patogenezi inceleyen son çalışmalara, mukozal immun olayların araştırılması hakim olmuştur. Çalışmalarda üzerinde durulan en önemli nokta genetik, intestinal mikrobial çevre ve doku cevabıdır. İBH'nın kesin sebep ve mekanizmaları açıklanmadıkça detayların peşine düşülmelidir (2).

Pıhtılaşma sistemin, barsak inflamasyonunun devamında ki etkisine özellikle dikkat edilmelidir. İBH patogenezinin parçası olarak, pıhtılaşma sistemi önceleri önemsense de, son çalışmalar kronik intestinal sistem inflamasyonunun çok yönlü sürecinin dinamik bir katılımcısı ve önemli bir temsilcisi olduğunu desteklemektedir (2). Kronik inflamatuvar hastalıklarda inflamasyon, pıhtılaşma ve fibrinolizis sistemleri birbirleri ile ilişkili rol oynamaktadır. ÜK ve CH koagülasyon anormalliklerinin eşlik ettiği

hiperkoagulan ve protrombotik durumlar ile karakterize kronik inflamatuvar hastalıklardır. Kronik inflamasyon inflamatuvar aracilar ile platelet sayısında ve platelet aktivitesinde artışa, antikoagulan mekanizmaların inhibisyonuna, koagülasyonun başlatılması ve yayılmasına, fibrinolizisin bozulmasına neden olduğu sonuçta; prokoagulan ve protrombotik etki oluşturduğu bilinmektedir. Son zamanlarda pıhtılaşma sisteminin; plateletlerden proinflamatuvar mediatörleri salınımını artırarak, inflamatuvar cevabı artıran hücresele etkileşimleri uyararak ve pıhtılaşma faktörlerinin hücreleri direk uyarısı ile inflamasyon aktivasyonu ve inflamasyonun devamına neden olduğu anlaşılmıştır. Bu çift yönlü etkileşim kronik inflamatuvar hastalıklarda kısır bir döngüye sebep olup hastalığın aktivasyon ve progresyonuna neden olmaktadır (24).

İBH hastalarında pıhtılaşma sistemi hastalığın patogenezi ve/veya progresyonunda aktif role sahiptir (3). Koagülasyon anormallikleri ve tromboembolik komplikasyonlar klinik olarak İBH ile ilişkili olaylardır. Tromboembolik (TE) olaylar oldukça sık görülmektedir. TE insidansı klinik çalışmalarda %1-7,7 (135, 136), postmortem çalışmalarda %39-41 (137) oranında tespit edilmiştir. İBH hastalarının derin ven trombozu ve pulmoner emboli riski normal popülasyona göre 3 kat daha fazladır (138). Tromboembolik olayların sık görülmesine zıt olarak vasküler trombozun İBH patogenezinde etken olduğunun indirek kanıtı olarak Hemofilili ve vWF eksikliği olan hastalarda yapılan toplum kökenli epidemiyolojik çalışmada İBH insidansının umulduğundan daha düşük olduğu gözlenmiştir. Bu çalışmada herediter koagülasyon bozukluklarının İBH'dan koruyucu olabileceği öne sürülmüştür (139).

İBH patogenezinde mikrovasküler olaylar önemli role sahiptir. Kontrol edilemeyen inflamasyon, İBH'de gözlenen inflamatuvar hasarın büyük ölçüde devam etmesine katkıda bulunan önemli mikrovasküler değişikliklere neden olur (6). Koagülasyon faktörleride mukozal immunitenin önemli bir parçası olan mikrovasküler endotel ile etkileşim halindedir. Endolet ve koagülasyon faktörleri arasındaki ilişki PARs reseptör ailesi aracılığı ile sağlanır (82). İBH'de PAR-1 ekspresyonunun arttığını gösteren tek bir çalışma vardır (140). CD ve ÜK'de PAR-2 üretimini oldukça yüksektir, hayvan modellerinde de gösterilmiştir (141, 142). CH intestinal mukozaları incelediğinde PAR-2'nin aşırı üretimi tespit edilmiştir (143). PARs'ler fizyolojik ve patolojik durumlarda GİS dokularında diğer dokulara oranla daha yüksek oranda tespit edilmiştir ve bu tespitten sonra araştırmalar bu yönde ilerlemiştir (144). PAR reseptörlerinin majör agonistleri *trombin*, *tripsin*, *mast hücre tiriptazi*, *F Xa'dır* (145). Hyun ve arkadaşları PAR2<sup>+/+</sup> fareler ile, PAR2<sup>-/-</sup> fareler de Dextran sülfat (Th1-2 tip kolit), TNBS (Th1 tip kolit), oksazolon (Th 2 tip kolit) ile oluşturdukları kolit modellerinde PAR2<sup>-/-</sup> grublarda makroskopik skor, mikroskopik skor ve doku MPO aktiviteleri ile adezyon moleküllerinden ICAM, VCAM, ve alfa-M'i düşük bulmuşlar. PAR2 eksikliğinin lökosit göçünü, adezyonunu ve adezyon moleküllerinin sentezini azalttığını göstermişler. Çalışma sonuçları PAR2'nin kronik inflamatuvar olaylarda endojen proinflamatuvar olarak etkin olduğunu desteklemektedir (146).

Pıhtılaşma sistemi intrinsek, ekstrinsek ve ortak yol olarak farklı yollara şematik şekilde ayrılmış kompleks bir sistemdir. Diğer önemli sistemde birçok pıhtılaşma faktörünü inhibe eden serin proteaz ailesi ve pıhtı kontrolünü sağlayan

fibrinolitik sistemdir (2). F Xa vitamin K'ya bağlı, pıhtılaşma sisteminde önemli role sahip, protrombini trombine çeviren plazma proteindir. F Xa intrinsek ve ekstrinsek yolların birleşme noktasında yani pıhtılaşma zincirinin santral noktasında yer alır. Aktif İBH hastalarında F X ve F Va düzeyleri remisyon dönemleriyle karşılaştırıldığında anlamlı olarak yüksek bulunmuştur (39, 147). F Xa PAR-2 aracılığı ile endotel hücrelerinde proinflamatuvar cevabın ve bağ dokusu büyüme faktörlerinin birikimini uyarır. Fibroblastlardan ve endotelial hücrelerden IL-6, IL-8 ve MCP-1 salınımını uyarır (85, 95). NF-κB aktivasyonunu sağlar. Lökosit adezyonuna neden olan E-selectin, ICAM-1, VCAM-1 sunumunu uyarır (12, 148). F Xa PAR-1, PAR-2 aracılığı ile reaktif oksijen radikallerinde artışa, myofibroblast farklılaşmasına, intimal kalınlaşma ve aterosklerozise, anjiogenezisin uyarılmasına ve apoptosise neden olur (2). F Xa'nın fibrozis üzerine en önemli etkisi fibronektin, kollajen üretimi aktive etmesi ve oldukça güçlü profibrotik sitokin olan TGF-β üretiminin uyarılmasıdır.

Birçok fibrotik hastalık koagülasyon sisteminin aktivasyonu ile ilişkilidir. Akciğer fibrozisli hastalarda fibrin birikimine F X ve trombin seviyelerinin artışının eşlik ettiği gözlenmiştir (149-151). Bleomisin ile uyarılan akciğer fibrozis mürin modelinde, antikoagülan tedavinin faydalı olduğu gösterilmiştir (152). İdiopatik pulmoner fibrozisli hastaların tedavisinde, prednizolona düşük moleköl ağırlıklı heparin (DMAH) veya varfarinin eklenmesinin yaşam süresini uzattığı gözlemlenmiştir (153). Akut ve kronik akciğer hasarı olan hastalarda PAR-2'nin aşırı üretimi tespit edilmiştir. Akciğer fibrozisli hastalarda F Xa aracılı PAR-2 inflamasyonu ve fibrozisi uyarmaktadır (154). Deneysel glomerulonefrit



oluşturulan ratlarda PAR-2'nin aşırı ekspresyonu tespit edilmiştir. Renal fibrozisli hastalarda F Xa inhibisyonu renal fibrin birikimini azalttığı için, hastalık progresyonunu azalttığı gösterilmiştir (155). İn vitro çalışmalarda; Proksimal tubul hücrelerinde F Xa PAR-2 aracılığı ile PAI-1 ve TGF- $\beta$  üretimine yol açtığı, PAR-1, PAR-2 aracılığı ile fibroblastlar için mitojenik cevabı aktive ettiği gösterilmiştir (101, 156).

Günümüzde uygulanmakta olan antiinflamatuvar, immünsüpresif ve immünmodülatör tedaviler ile hastalığın remisyona girmesi ve idamesinde başarı sağlansa da hastaların önemli bir kısmı bu tedavilere yanıt vermez veya tedaviye bağlı ciddi yan etkiler oluşur (157). Hastaların büyük bir kısmında stenoz, obstrüksiyon, fistül gibi komplikasyonlar gelişmekte ve bu nedenle hastaların üçte birinde hastalık seyri süresince cerrahi operasyona gereksinim duyulmaktadır (158). Biz bu nedenle; son zamanlarda patogeneizde önemi fark edilen, F Xa'nın; PAR -2'nin direk F Xa aracılı aktivasyonu ya da trombin üzerinden indirek aktivasyonu ile oluşan proinflamatuvar ve profibrotik etkisinin rivaroksabanla inhibisyonunun İBH hastalarında gözlenen inflamasyon ve fibrozis üzerine etkisini araştırmayı planladık.

İBH araştırmalarında kullanılacak bir hayvan modelinde, insan barsağına benzer morfolojik değişiklikler ortaya çıkmalı, patofizyoloji ile klinik semptom ve bulgular insandaki İBH'ya benzer olmalıdır. Ayrıca kullanılan hayvanların genetik geçmişleri ve immünolojik sistemleri ile kullanılacak kimyasal maddelerin etkileri iyi tanımlanmış olmalıdır. TNBS ile oluşturulan kolit modeli haptan ile indüklenmiş gecikmiş tip hipersensitivite sonrası oluşan kronik bir

inflamasyon ve ülserasyon modelidir. Mukozal bariyer kırılarak doza bağımlı olarak ülserasyon ve inflamasyon gelişir. Ülserasyon ve barsak duvarında kalınlaşma yaklaşık 8 hafta kadar devam ettiğinden bu model kronik kolit oluşması istendiğinde tercih edilmektedir. Histolojik olarak mukoza ve submukozada PMNL, makrofaj, lenfosit, bağ dokusu mast hücreleri ve fibroblastlardan oluşmuş inflamatuvar cevap mevcuttur. Segmenter ülserasyon ve inflamasyon sıktır. İnflamasyon ve ülserasyonun uzun süre devam etmesi nedeniyle kolonik İBH'nın patofizyolojisinin ve yeni tedavi yöntemlerinin araştırılmasında uygun bir modeldir. Yapılan çalışmalarda etonolde çözülmüş TNBS ile oluşturulmuş kolitteki mukozal lezyonlar anüler ya da longitudinal ülserler, lenfosit infiltrasyonu, granülomlardan oluştuğundan bu modelin insandaki CH'nın makroskopik ve mikroskopik bulgularına benzer olduğu tespit edilmiştir (121, 122).

Bu çalışmada kronik inflamasyon oluşması, çalışma sonuna kadar spontan remisyona gelişmemesi, patogenezin benzer olması, histopatolojik ve klinik bulguların benzerlik göstermesi nedeni ile TNBS ile oluşturulmuş kolit modelini tercih ettik. Takiben, sıçanlardan alınan kolon örneklerini mikroskopik ve makroskopik olarak inceledik. Ek olarak, SOD, MPO, MDA doku düzeylerini spektrofotometrik yöntemlerle, MMP3, TIMP1 ve TGF $\beta$ 'nin doku düzeylerini ELISA ile belirledik ve grupları bu moleküllerin doku düzeyleri açısından birbirleri ile karşılaştırdık. Bu şekilde inflamasyonun çok erken döneminde mukozada var olması beklenen inflamatuvar ve profibrotik sitokinler üzerinde direkt F Xa inhibitörü rivaroksabanın etkilerini araştırdık.

Literatürde rivaroksabanın, İBH hastalarında ve deneysel kolit modelinde etkisini araştıran yayınlanmış bir çalışma bulamadık. Ancak antikoagülan olarak heparin ve DMAH'lar ile yapılmış çalışmalar mevcuttur. Heparinin antikoagülan, antiinflamatuvar ve mikrovasküler olaylar üzerine etkileri nedeniyle İBH tedavisinde kullanılabileceği bildirilmiştir (159-161). Aktif İBH olgularında heparin kullanılarak yapılan bir çalışmada heparinin etkileri kortikosteroidlerle karşılaştırılmıştır. Klinik olarak her iki gruptan da benzer sonuçlar elde edilmiştir ve heparinin aktif hastalıkta ilk tedavi seçeneği olabileceği öne sürülmüştür (162) Başka bir çalışmada ise heparin, steroid dirençli ÜK vakalarında kullanılmış ve klinik olarak olumlu sonuçlar elde edilmiştir (163). Ancak heparinin olumlu etkilerini ortaya koyan çalışmaların aksine heparinin akut hastalıkta herhangi bir etkisinin olmadığını bildiren çalışmalarda mevcuttur (164).

Sham grubu (GrupA), kontrol grubu (grupB), standart grup (grup C) test grupları (grupD) 1.ve 8.gün kilo farkı yönünden karşılaştırıldığında grupların kendi içerisinde 1. ve 8.gün kilo ölçümlerinde istatistiksel olarak anlamlı farklılık mevcuttu. Gruplar kendi arasında karşılaştırıldığında sham grubu ile kolit oluşturulan gruplar arasında kilo kaybı açısından anlamlı farklılık mevcut iken, kontrol grubu, standart grup ve test grubu arasında kilo kaybı istatistiki olarak benzer bulundu. Buda deneklerin homojen seçildiğini desteklemekteydi. Bu durum kolit indüksiyonunun 24 saat öncesinden itibaren sıçanlara yem verilmemesi, ayrıca İR TNBS verilmesi dolayısıyla anestezi alan sıçanların oral alımlarının azalmasına bağlı olabilir.

Kolit oluşturulmuş gruplar, sham grubu ile karşılaştırıldığında, kolonun makroskopik görünümü belirgin farklılık göstermekte idi. Kolit oluşturulmuş gruplarda kolon nekroze, ödemli, rijit görünümde idi ve duvar kalınlıkları artmıştı. Kolit oluşturulmuş gruplarda uterus kolona yapışmış, dalak boyutları küçük ve pankreas hiperemik görünümdeydi (Resim 5 GrupB, C). Sham grubunda kolon makroskopik ve mikroskobik olarak tamamen normal görünümdeydi, uterus, dalak ve pankreasta kolit oluşturulan gruplarda izlenen patolojik özellikler izlenmedi. Kolit gruplarında mikroskobik olarak belirgin kolonik inflamasyon, erezyon, ülserasyon, nekroz mevcutken, sham grubuna ait preparatlarda herhangi bir patolojik bulguya rastlanmadı. Bu farklılık bize TNBS'nin kronik kolit modeli oluşturmakta etkin bir kimyasal ajan olduğunu doğrulamıştır.

Deneysel kolit modelinde DMAH'ler ile yapılan çalışmalarda da DMAH'lerin olumlu sonuçlarına dair veriler elde edilmiştir. Dotan ve arkadaşları deneysel kolit modelinde heparin ve enoksaparinin; makroskopik hasar, mikroskopik hasar, MPO, nitrik oksid sentetaz aktiviteleri, mukozal PGE2 düzeyleri ve kanda TNF- $\alpha$  düzeyleri üzerine olumlu etkileri olduğunu göstermişlerdir (165, 166). Wan ve arkadaşları ile Levine ve arkadaşları'nın yaptığı benzer çalışmalarda da DMAH'ların deneysel kolit modelinde makroskopik ve mikroskopik hasarı anlamlı ölçüde etkilediği ve MPO düzeylerini düşürdüğü tespit edilmiştir (167, 168). Çalışmamızda da kolonun makroskopik ve mikroskobik skoru değerlendirildiğinde sham grubu ile kolit grupları arasında istatistiki olarak anlamlı farklılık izlendi. Kolit oluşturulup tedavi verilmeyen grubun, Rivaroksaban ve steroid ile tedavi verilen gruplara göre makroskopik ve

mikroskopik skoru anlamlı yüksek bulundu. Steroid alan grup ile rivaroksaban alan grup karşılaştırıldığında makroskopik skorlar benzer bulunurken steroid alan grubun mikroskopik skoru rivaroksaban alan gruptan yüksekti. MPO, TIMP-1, MMP-3, TGF  $\beta$ 1 ve MDA ile mikroskopi skoru arasında istatistiksel olarak anlamlı ve aynı yönlü korelasyon saptanırken, SOD ile mikroskopi skoru arasında ise istatistiksel olarak anlamlı ve ters yönlü korelasyon saptandı ( $p<0,05$ ). Bu sonuçlar Hyun ve arkadaşlarının yaptığı çalışmayı (146) desteklemekte, Rivaroksabanın FXa'yı inhibe ederek, PAR-2 reseptör aktivasyonunu engelleyip, antiinflamatuvar etki ile mukozal hasarı geriletmediğini düşündürmekteydi. Çalışmamızda, literatürde heparin ve DMAH'lar ile yapılan çalışmalarla uyumlu olarak; rivaroksaban verilen grupta diğer gruplara oranla makroskopik ve mikroskopik düzelmenin istatistiksel olarak anlamlı olması ve bu düzelmenin proinflamatuvar, inflamatuvar ve antioksidan markerlar ile uyumlu korelasyon göstermesi Rivaroksabanın IBH tedavisinde etkin bir ajan olabileceğini, mukozal iyileşmeyi olumlu etkileyebileceğini, en azından standart tedaviye destek olarak kullanılabileceğini düşündürdü.

İBH'da ve deneysel kolitte inflamatuvar süreç; nötrofil, monosit ve lenfosit gibi lökositlerin kolon mukozasına infiltrasyonu ile oluşur. Pıhtılaşma faktörlerinden thrombin, faktör Xa (F Xa), fibrin mononükleer hücreleri ve endotelial hücreleri direkt aktive edebilir ve IL-6, IL-8 salınımına neden olabilir (4). Pıhtılaşma faktörleri bir çok hücrede yer alan proteaz aktive edici reseptörler (PARs) aracılığı ile değişik stokin, büyüme faktörleri ve adezyon moleküllerinin salınımını uyuyarak, inflamasyon ve fibrozisi aktive ederler ve dokuya lökosit

göçüne neden olurlar (5). Lökositler serbest oksijen radikallerinin ana kaynağıdır. Reaktif oksijen radikalleri, lipid membranların peroksidasyonu, protein denaturasyonu ve DNA hasarı yaparak hücre ve doku düzeyinde hasara yol açarlar. İnflamasyonlu dokuda nötrofil infiltrasyonu, MPO enzimi aracılığıyla, güçlü sitotoksik oksidanların ortaya çıkmasını kolaylaştırır (169). Yapılan çalışmalarda MPO aktivitesinin, TNBS kolitindeki doku hasarının ciddiyeti ile korele olduğu ve kolit gruplarında kontrol gruplarına göre daha fazla yükseldiği ayrıca nötrofil infiltrasyonunun bir belirteci olduğu gösterilmiştir (169, 170). Kamei ve arkadaşları kolit modeli oluşturdukları sıçanlarda kolit gruplarına göre tedavi gruplarında MPO aktivitelerini araştırmışlar ve nötrofil infiltrasyon ve aktivasyonunun önemli rol oynadığını bunun da dokudaki MPO düzeyi ile belirlediğini öne sürmüşlerdir (171). Karmeli ve arkadaşları tarafından sıçanlardaki kolit modelinde COX-2 inhibitörlerinin etkileri karşılaştırılmış ve tedaviyle MPO aktivitelerinin kolit modelindeki deneklere göre % 61 azaldığını belirtmişlerdir (172). DMAH ve heparin ile yapılan çalışmalarda MPO düzeylerinin tedavi alan gruplarda düşük olduğu izlenmiş (165-168). Çalışmamızda literatürle uyumlu olarak gruplar arasında medyan MPO düzeyleri yönünden istatistiksel olarak anlamlı fark izlendi. Sham grubuna göre kolit gruplarında MPO düzeyi anlamlı olarak daha yüksekti. Kolit oluşturulan ve tedavi almayan gruba göre steroid grubu ve rivaroksaban alan grubun MPO düzeyi anlamlı olarak daha düşüktü. Steroid grubuna göre rivaroksaban alan grubun MPO düzeyi istatistiksel anlamlı olarak daha yüksekti. Bu sonuçlara göre Rivaroksaban inflamasyon üzerine etkin bir ajan olmakla birlikte etkinliği steroide

üstün değildi. Ancak MPO üzerine anlamlı etkisi göze alındığında hastalık aktivasyonundan koruma ve tedavi etme amacı ile Rivaroksobanın mevcut tedavilere eklenebileceği veya aktivasyon döneminde kullanılabileceği düşünülebilir.

MDA artışı dokularda lipit peroksidasyonun klinik ve deneysel çalışmalarda en önemli laboratuvar göstergesidir (173). Aktive nötrofiller dolaşımdan ayrılarak akut inflamasyonda barsağın mukoza ve submukozasına girer, barsağın hasarlanmasına katkıda bulunabilen lipit mediatörlerin, laktoferrin, proteazlar, reaktif oksijen ve nitrojen türevlerinin aşırı üretimine neden olur (174). Erman A. ve arkadaşları Asetik asit ile oluşturdukları kolit modelinde ilioprostun doku MDA düzeylerini anlamlı şekilde düşürdüğünü gösterdiler (175). Xiaochun MA ve arkadaşları, deneysel sepsis modelinde akciğer hasarının göstergesi olarak dokuda MDA çalışmışlar heparin tedavisi alan grupta MDA düzeyleri anlamlı olarak düşük bulmuş ve antikoagülan tedavinin doku hasarını düzeltmede etkin olabileceğini savunmuşlardır. (176). Yalnız ve arkadaşları, deneysel kolit modelinde nadroparin sodyum uygulanan grup ile kontrol grubu karşılaştırıldığında; MDA düzeylerini tedavi grubunda istatistiki olarak anlamlı düşük bulmuş ve ilacın inflamasyonu tedavi edici ve koruyucu özelliği olduğunu savunmuştur (177). Çalışmamızda gruplar arasında MDA düzeyleri yönünden istatistiksel olarak anlamlı fark mevcuttu. Sham grubuna göre kolit gruplarında MDA düzeyi anlamlı olarak daha yüksekti. Kolit oluşturulan ve tedavi almayan gruba göre steroid grubu ve rivaroksaban alan grubun MDA düzeyi anlamlı olarak daha düşüktü. Steroid grubuna göre rivaroksaban alan grubun medyan MDA

düzeyi istatistiksel anlamlı olarak daha yüksekti. Çalışmamızda Rivaroksaban literatür ile uyumlu olarak lipid peroksidasyonunu anlamlı olarak inhibe ettiği gözlemlendi. MDA üzerine anlamlı etkisi dikkate alındığında hastalık aktivasyonundan koruma ve tedavi etme amacı ile rivaroksabanın mevcut tedavilere eklenebileceği, lipid peroksidasyonuna bağlı platelet aktivasyon ve agregasyonunu, endotel aktivasyonunu inhibe edebileceği ve lipid peroksidasyonunun bu etkileri ile oluşabilen protrombotik yatkınlığı azaltarak trombozdan koruyucu olabileceği düşünüldü.

Süperoksid dismutaz (SOD), süperoksit anyonlara karşı majör defans sistemidir. SOD süperoksidin hidrojen perokside dönüşümünü katalizler ve oksiradikallere karşı primer koruyucudur. Üç tür SOD tespit edilmiştir. Mitokondride bulunan (Mn-SOD), sitozolde bulunan (Cu, Zn-SOD), ekstraselüler matrikste bulunan (EC-SOD). EC-SOD endotel ve stromal hücrelerden salınır IBH hastalarında düşme eğilimindedir. Cu, Zn-SOD dominant olarak epitelden salınır ve inflamasyonda düşer. IBH hastalarında plazma ve doku seviyesi düşüktür. Normal barsak mukozasında SOD aktivitesi karaciğer ve akciğere oranla düşük oranlarda bulunmaktadır. Bu seviye inflamatuvar durumlarda daha da düşer (178). Kuralay ve arkadaşları, deneysel kolit modelinde oksidatif strese cevap olarak SOD seviyelerinin azaldığını ve bu artışın antioksidan ajanlarla arttığını göstermişlerdir (179). Yamada ve arkadaşları TNBS ile oluşturdukları kolit modelinde SOD aktivitesini düşük bulmuşlardır (180). Chen JH. ve arkadaşlarının yaptığı klinik bir çalışmada 40 sepsis hastası ikiye ayrılmış gruplardan birine standart sepsis tedavisi diğerine de standart tedavi ve DMAH



tedavisi uygulanmış. Tedavinin 7. gününde DMAH alan grupta SOD aktivitesi oldukça yüksek bulunmuş ve antikoagülan tedavinin bu hastalarda antioksidan olarak etkin olduğu savunulmuş (181). Patel ve arkadaşlarının yaptığı deneysel çalışmada PAR-2 agonisti tripsin TNBS ile uyarılan kolit modelinde İR olarak 500mg/kg, 1mg/kg, 5mg/kg olarak 3 gruba verilmiş sham grubu ve yalnızca TNBs verilen gruplar karşılaştırılarak MPO, MDA, SOD düzeylerine bakılmış 5mg/kg uygulanan grupta oksidatif enzimler, makroskopik skor ve mikroskopik skor yüksek bulunurken, antioksidan enzim düzeyleri düşük bulunmuş (182). Çalışmamızda gruplar arasında SOD düzeyleri yönünden istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edildi. Sham grubuna göre, kolit oluşturulan tedavi almayan grubun medyan SOD düzeyi istatistiksel anlamlı olarak daha düşük, Rivaroksaban alan grubunun medyan SOD düzeyi ise istatistiksel anlamlı olarak daha yüksekti. Kolit oluşturulan ve tedavi almayan ve steroid verilen gruba göre rivaroksaban alan grubun SOD düzeyinin anlamlı yüksek olduğu gözlemlendi. Ayrıca dikkat çekici olarak SOD düzeyi rivaroksaban alan grupta sham grubuna oranla bile daha yüksekti. Bulgularımız, antioksidan ve oksidan sistemler arasındaki dengenin koagülasyon inflamasyon etkileşimi, microvasküler düzeyde pıhtılaşma aktivasyonu ile oluşan iskemi ve inflamatuvar sitokinlerce uyarılan endotel disfonksiyonu sonucunda bozulduğunu destekler nitelikteydi. Grupların SOD düzeyleri arasındaki bu farklılıklar rivaroksabanın pıhtılaşma yolaklarını inhibe edip doku düzeyinde iskemi azaltıp ayrıca endotel ve microvasküler çevrede F<sub>Xa</sub> aracılı etkileri inhibe ederek antioksidan etki gösterdiğini düşündürdü.

Fibrozisin ilerlemesi ve yara iyileşmesinde F Xa sinyallerinin potansiyel rolü vardır. Fibroblastlar vasküler hasar sonrasında pıhtılaşma faktörleri ile etkileşime maruz kalırlar, pıhtılaşma faktörlerinin aktivasyonu birçok patolojik durumun ortaya çıkmasına neden olur. Idell ve arkadaşları akciğer fibrozisli hastalarda artmış fibrin depositleri, trombin ve zimojen F X seviyelerinde yükselme tespit ettiler (151). Leadley ve arkadaşları alternatif olarak uzamış ve sürekli endotelial hasarın etkisiyle, pıhtılaşma sisteminin kronik aktivasyonu sonucunda F Xa'nın infalamasyon alanındaki makrofajlardan salınabileceğini veya F Xa'nın vasküler alandan bağ dokusuna kaçak olabileceğini savunmuşlardır (75). F Xa hem prokoagülan etkisi ile hemde fibroblastlardan PAR-2 aracılığı ile VEGF salınımını uyarır böylece indirek olarak endoteli aktive eder ve anjiogenezi uyarır (41).

F Xa aynı zamanda fibroblast, myofibroblast dönüşümünü aktive ederek fibroproliferatif cevabı uyarmaktadır (100). F Xa PAR-2 aracılığı ile fibroblastlardan, yara iyileşmesi ve fibroziste görev alan  $\alpha$ -aktin, TGF- $\beta$ , fibronektin üretimini ve IL-6 ve MCP- 1 salınımının artmasına neden olur (183). IL-6 ve MCP-1 karaciğer (184), cilt (185) ve akciğerde (186). F Xa aracılı fibrozisi uyarmaktadır. TGF- $\beta$ 'da fibroblast proliferasyon ve diferansiyasyonunu uyarır ve fibronektin birikimine neden olur. Fibronektin ECM majör komponentidir (187). ECM'nin bozulmuş birikimi, iyileşme süresince organ fonksiyonlarında azalma ve yapısal bozukluklara neden olur. Borensztajn ve arkadaşları in-vitro çalışmalarında F Xa'nın PAR-2 aracılığı ile TGF- $\beta$ ,  $\alpha$ -aktin,

MCP-1,IL-6 üretimini artırarak, fibroblast proliferasyonuna, migrasyonuna ve myofibroblasta diferansiasyonununa neden olduğunu rapor ettiler (100).

Knight ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada PAR-2 (-/-) fareler ile PAR-2 (+/+) farelerde CCl4-ile uyarılan karaciğer fibrozisini değerlendirmişler ve PAR-2 eksikliği olan farelerde karaciğer fibrozisi, karaciğer kolajen gen ekspresyonunu, ve hidrokisprolin içeriği düşük bulunmuşlardır. Fibroziste azalma TGF- $\beta$  geni, protein geni, MMP-2, TIMP-1 genlerinin ekspresyonunda azalma tespit etmişlerdir. PAR-2 aracılığı ile profibrojenik sitokin, kollagen, TGF- $\beta$ , ve metalloproteinazların sentezindeki artışın fare karaciğerinde fibrozisi artırdığını göstermişlerdir (188).

Metalloproteinazlar çinko içeren endopeptidazlardır. Bağ dokusu hücreleri, endotelial hücreler ve makrofajlar tarafından üretilirler. Bu enzimler, ekstrasellüler matriksin homeostazından birinci derecede sorumludur. Kollojen, elastin, proteoglikanlar, fibronektin gibi matriks bileşenlerinin yıkımının yanı sıra hücrelerin büyüme ve bölünme gibi fonksiyonlarının regülasyonunda da görev alırlar (189, 190).

MMP-3, tüm metalloproteinazlar içinde en geniş substrat çeşitliğine sahip metalloproteinazdır. Fibroblast ve epitel hücrelerden salgılanır; laminin, kollojen tip IV, V, IX ve X, proteoglikanlar ve fibronektini yıkar (189, 191, 192). MMP3 ve MMP9, İBH'nın hayvan modellerinde en çok araştırılmış iki metalloproteinazdır. İBH'da MMP3'ün, ülsere bölgelerde lamina propriadaki stromal hücrelerde ve fistüllerdeki makrofaj benzeri mononükleer hücrelerde ekspresyonu artmıştır (193-195). Mckaig ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada

ülseratif kolitte, ülserasyonun başlangıç aşamalarında ve yeni damar oluşumunda metalloproteinazların önemli rolü olduğu öne sürülmüştür (196). Başka bir çalışmada ise ülseratif kolitli hastaların kolon mukozasında MMP3 düzeyleri, hasta olmayan bireylerden alınan kolonik mukoza örneklerine göre 230 kat daha yüksek bulunmuştur (197). Dekstran sülfat sodyum ile oluşturulmuş ülseratif koliti taklit eden hayvan modellerinde kolon mukozasında MMP3 mRNA düzeyinin arttığı PCR yöntemi ile gösterilmiştir. Naito ve arkadaşlarının dekstran sülfat sodyum ile oluşturduğu başka bir kolit modelinde, sıçanlara sentetik bir metalloproteinaz inhibitörü olan ONO-4847 verildiğinde, metalloproteinaz aktivitesinin nötralizasyonu ile birlikte, klinik hastalık aktivite indeksinin anlamlı derecede düştüğü ve histolojik incelemelerde mukozal nötrofil infiltrasyonu ve buna bağlı gelişmiş doku hasarının azaldığı görülmüştür (198).

Bir kısım çalışmalarda, İBH'sı olan hastalarda, MMP1, MMP2, MMP3 düzeyleri artmış bulunurken (9), diğerlerinde ise metalloproteinaz düzeyinin değişmeden kaldığı ancak TIMP ekspresyonu ve aktivitesinin arttığı ileri sürülmüştür (196). Bir çalışmada, ülseratif kolitli barsak mukozasında MMP3 ve TIMP1 düzeyleri, kolonun ülserli ve aktif inflamasyonlu bölgelerinde, inflame olmayan bölgeler ile karşılaştırıldığında belirgin olarak artmış bulunmuştur. Bu sonuçlar, ülseratif kolitte MMP ve onların doku üzerindeki destrüktif etkilerini bir nebze de olsa nötralize etmek üzere salgılanan TIMP düzeylerinin hastalık aktivitesi ile korele olduğunu düşündürmektedir (199). Yine farklı iki çalışmada, metalloproteinazların ülseratif kolitte ülserasyonun başlangıç aşamalarında önemli rol oynadığı (200) ve ülseratif kolitli hastaların kolon mukozasında MMP'lerin

doku düzeyinin normal mukozalardan daha yüksek olduğu bulunmuştur. MMP3 immün sistemin regülasyonu açısından da önemlidir. Patojenik bakteri gibi uyarılara cevap olarak bu sitokin, CD4 T lenfositlerin intestinal mukozaya gelişini sağlar (197). Kirkegaard ve arkadaşları, 2004'te yaptıkları bir çalışmada, Crohn hastalığında fistül oluşma sürecinde, MMP3'ün belirgin rolü olduğunu doğrulamıştır. Bu çalışmada, intestinal fistüllerden alınan mukoza örneklerinde, mononükleer hücrelerde ve fibroblastlarda artmış MMP3 ve TIMP1 transkripsiyonu gösterilmiştir. Ayrıca, MMP3 genindeki 5A/6A polimorfizmi, MMP3 transkripsiyonu için aktive edici bir özelliğe sahip olup, Crohn hastalığına yatkınlık ile ilişkilendirilmiştir (201). Arihiro ve arkadaşlarının çalışmasında ise aktif inflamasyonun olduğu ülser tabanlarından alınan mukoza örneklerindeki artmış MMP ve TIMP düzeylerinin kaynağının fibroblastlar ile birlikte damar duvarındaki düz kas hücrelerinin olduğu ileri sürülmüştür (200). Hayvan modellerinde ise, ortama nanomolar miktarlarda rekombinant MMP3 ilavesinin ciddi doku hasarı ile sonuçlandığı, bu hasarın sentetik MMP inhibitörleri verilerek engellenebildiği gösterilmiştir. Dekstran sülfat sodyum ile oluşturulmuş aktif kolitli ülseratif koliti temsil eden hayvan modellerinde yine, barsak mukozasında MMP3 ve TIMP1 mRNA düzeylerinin arttığı tespit edilmiştir (202).

MMP3, barsak mukozasında immün cevabın oluşmasında da etkilidir. Örneğin MMP3, yardımcı tip (CD4+)T lenfositlerin intestinal mukozaya migrasyonunu sağlayarak patojen bakterilere karşı immün yanıtın başlatılmasına katkıda bulunur. Bir çalışmada, MMP3 defektif farelere oral yoldan *Citrobacter rodentium* inoküle edilmesinin ardından bakterinin klerensinin kontrol grubuna

göre belirgin geciktiği ve lamina propria da yardımcı T lenfosit sayısının kontrol grubuna göre belirgin derecede düşük olduğu görülmüştür (195). Metalloproteinazların sentetik inhibitörleri, kolon dışı organların inflamasyonunda da bölgeye inflamatuvar hücre akınını ve sitokin salınımını azaltarak doku hasarını önleyebilmektedir (203-205). Metalloproteinazların, biyolojik olarak aktif moleküller olan TNF $\alpha$ , IL1 ve IL6 'nın, makrofaj yüzeyinden salınımını arttırdığını savunan çalışmalar literatürde mevcuttur (198). TNF $\alpha$  ise karşılığında IL1 $\beta$  ve TGF- $\beta$  ile birlikte, MMP sentezini artırır (190, 194). Bizim çalışmamızda da MMP3'ün doku düzeyinin, Kolit oluşturulup tedavi almayan grupta, sham grubuna göre anlamlı derecede yüksek olduğu saptandı. Rivaroksaban ile tedavi edilen grubun MMP-3 düzeyi steroid alan grup ve kolit oluşturulup tedavi verilmeyen gruba göre düşüktü. Bu veri literatürdeki çalışmalarını doğrular nitelikte idi. MMP3 düzeyinin şiddetli inflamasyonun bir göstergesi olması ve çalışmamızda Rivaroksabanın MMP-3 doku düzeyini belirgin olarak baskılanmış olması ve diğer verilerde diakkate alındığında rivaroksaban salisilatlar ile birlikte antiinflamatuvar tedavide yer alabilir mi? Sorusunu tekrar akla getirmektedir. Metalloproteinazların, İBH'da şiddetli inflamasyonun yanı sıra fistül oluşumu ile de primer ilişkili olduğunu savunan çalışmalar mevcuttur. Kirkegaard ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, fistülüzen tip Crohn Hastalığı olan bireylerden alınan kolonik mukoza örneklerinde MMP3 düzeyinin TIMP1 ile birlikte, inflamatuvar aktivitenin şiddetinden bağımsız olarak, kontrol grubuna göre belirgin yüksek olduğu gösterilmiştir (201). İnflamatuvar tipte Crohn hastalığının uzun vadede fistülüzen ve/veya stenoizan hastalığa dönüşebileceği ve

cerrahi gereksinimin doğabileceği gerçeği doğrultusunda, kronik aktif seyirli Crohn hastalığında bahsi geçen komplikasyonları geciktirmek veya azaltmak amacı ile Rivaroksobanın mevcut tedavilere eklenebileceği düşünülebilir.

Metalloproteinaz aktivitesi, iki çeşit majör molekül tarafından regüle edilir. Bu iki inhibitör TIMP ve  $\alpha$ 2-mikroglobulindir. İnsanlarda 4 çeşit TIMP bulunur (TIMP1, TIMP2, TIMP3, TIMP4) (107). TIMP'ler MMP'lere non kovalent olarak bağlanarak bir kompleks oluştururlar. Bu kompleks proteolitik enzimlere ve ısıya dayanıklıdır (206). Ülseratif kolitin patogeneğinde, doku yıkımından artmış MMP/TIMP oranının sorumlu olduğunu savunan çalışmalar mevcuttur (196, 199, 207). Ying-De Wang ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada ülseratif kolitli hastaların intestinal mukoza örneklerinde TIMP1 mRNA'sı kontrol grubuna göre anlamlı derecede fazla bulunmuştur. İnflamasyon sırasında MMP düzeyinin artması ile TIMP1 sentezi de artmaktadır ancak yine de bu doğal inhibitörlerin metalloproteinazların aktivitelerini tümüyle nötralize edemedikleri ve bozulmuş MMP/TIMP dengesinin ekstrasellüler matriks yıkımı ve doku hasarı ile sonuçlandığı düşünülmektedir (208). Yine aynı çalışmada MMP ve TIMP'lerin kaynağının aynı hücreler olduğu, her iki molekülün de myofibroblast ve damar duvarındaki düz kas hücrelerinin endoplazmik retikulumunda üretildiği, elektron mikroskop ile inceleme sonucu açığa çıkarılmıştır (208). Çalışmamızda da kolit oluşturulmuş ratların intestinal örneklerindeki TIMP1 düzeyleri kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek bulundu. Bu sonuç, daha önce bahsedilen çalışmalar da olduğu gibi TIMP'in tıpkı MMP3 gibi bir inflamasyon belirteci olduğu hipotezini doğrular nitelikte idi. TIMP1 için majör uyarıcı TGF- $\beta$ 'dir.

TGF- $\beta$ , metalloproteinazları inhibe ederken, TIMP1'i aktive eder. Böylelikle ekstrasellüler matriks yıkımı yavaşlar ve kollojen birikmeye başlar ki bu durum fibrozis ve striktür oluşumuna yol açar (206, 209, 210)

Wiercinsca–Drapalo ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada TIMP1 düzeyi, ülseratif kolitli hastalarda mukozal hasar, hastalık aktivite indeksi, klinik aktivite indeksi, serum CRP düzeyi ile korele bulunmuştur. Bu veriler ışığında TIMP1 düzeyinin hastalık aktivitesinin belirlenmesinde bir biyomarker olabileceği ileri sürülmüştür. (105).

TIMP1 dokularda büyümeyi sağlar (211-213) ve son verilere göre TIMP1 apoptozisi inhibe etmekte ve bu nedenle tümörlerin de gelişme ve büyümesine katkıda bulunmaktadır (214, 215). Pellegrini ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, kolorektal kanserli hastalarda bcl geni ve TIMP1 ilişkili bulunmuş ve TIMP1'in tümör hücrelerinin ölümünü engelleyerek tümör patogenezinde rol oynadığı gösterilmiştir (216). Ancak bu çalışma az sayıda hasta ile yapılmış ve bu veriler başka klinik çalışmalara ile doğrulanmamıştır.

Holten-Andersen ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada TIMP1 düzeyinin kolorektal kanserin tanısında %63 duyarlılığa ve %73 özgüllüğe sahip olduğu bildirilmiştir (217).Yine aynı yazarın başka bir çalışmasında, TIMP1 düzeyinin kolorektal kanser için prognostik bir gösterge olabileceği görüşü savunulmuştur (218). Kolorektal kanser dışında birçok farklı malignitenin patogenezinde de yine TIMP 1'in yeri ile ilgili çalışmalar mevcuttur. Bu kanserlerden bazıları, meme kanseri, prostat kanseri ve over kanserdir (217, 219-221).



Çalışmamızda Rivaroksaban ile tedavi edilen grubun TIMP-1 Standart düzeyi kolit oluşturulan tedavi verilmeyen ve kolit oluşturulan steroid verilen diğer 2 gruba oranla anlamlı derecede düşüktü. Buna göre Rivaroksaban, hem inflamatuvar hem de prefibrotik molekül olan TIMP1 düzeyini belirgin olarak baskılamakta idi. Rivaroksabanın bu molekül üzerindeki etkisi ile ilgili literatürde yapılmış başka bir çalışmaya rastlanılmadı. TIMP1 düzeyinin dokuda azalmasının, Rivaroksabanın TGF- $\beta$  sentezini baskılaması ile ilgili olabileceği düşünüldü. Ancak bu hipotezin doğruluğunu araştırarak yeni çalışmalara ihtiyaç vardır. Ayrıca artmış TIMP1 düzeyinin kolorektal kanser patogenezinde rolü olduğu bilgisi göz önüne alınacak olur ise rivaroksabanın kullanımının bu molekülü süprese ederek İBH hastalarında gelişebilecek malignite riskini azaltabileceği düşünülebilir. Bu da Rivaroksabanın salisilatlar yanında primer tedavi de yer alması için başka bir sebep olarak gösterilebilir. Bu hipotezi doğrulamak ve ilaç yan etkilerinin değerlendirilmesi açısından yeni çalışmalara ihtiyaç olabilir.

İBH patofizyolojisinde TGF- $\beta$ , epidermal growth factor (EGF) ile birlikte önemli bir rol oynar. TGF- $\beta$ , dokuda büyümeyi, farklılaşmayı ve immün hücrelerin regülasyonunu sağlar. Bu molekül yardımcı T hücrelerini inhibe eder. Daha da önemlisi normal bir kolon mukozasında inflamasyonu süprese eder ve yara iyileşmesinde görev alır (222). TGF- $\beta$ , in vivo anjiogenezi uyarır ve bu etki TGF- $\beta$  reseptör inhibitörleri verilerek geri çevrilebilir (223). TGF- $\beta$ 'nın üç tipi olmakla beraber İBH'da bağırsakta en çok sentezlenen TGF- $\beta$ 1'dir (106). Bu molekülün üretiminin artması skar oluşumuna yol açar. TGF- $\beta$ 'nın

transkripsiyonu ve sentezi, segmental glomerülonefrit, lupus nefriti, diabetik nefropati, sistemik skleroz gibi diğer fibrozis ile seyreden hastalıklarda da artmıştır (224). Yakın zamanda yapılmış çalışmalarda TGF- $\beta$ 'nın, Crohn hastalığında stenoz ve obstrüksüyon gibi komplikasyonların gelişmesinden birinci derecede sorumlu olduğu öne sürülmüştür (225, 226). Bu molekülün ülseratif kolit patogenezindeki rolü ile yapılmış fazla çalışma yoktur. Chowdury ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, tedaviye dirençli ülseratif kolitli hastalarda TGF- $\beta$  mRNA düzeyi düşük bulunmuştur (227). Babyatski ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada ise Northern Blot tekniği ile kullanılarak ölçülen mukozal TGF- $\beta$  mRNA düzeyi aktif ülseratif kolitli hastalarda kontrol grubuna göre artmış bulunmuştur (228).

Çalışmamızda kolit oluşturulan gruplarda sham grubuna göre TGF- $\beta$ 1 ortalaması istatistiksel anlamlı olarak daha yüksekti Rivaroksaban alan grupta ise diğer iki gruba oranla TGF- $\beta$ 1 düzeyi anlamlı olarak düşüktü. Bulgularımız Babyatski ve arkadaşlarının çalışmasını doğrular nitelikte idi. Wiercinska-Drapalo ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada ülseratif kolit hastalarında hastalığın şiddeti ve doku TGF- $\beta$  düzeyi korele bulunmuştur (229). Çalışmamızda kolit gruplarının bir kısmına verilen Riavaroksabanın TGF- $\beta$  doku düzeyini belirgin olarak düşürdüğü saptandı.

Bu bilgiler ışığında rivaroksabanın şiddetli seyirli hastalıkta MMP 3 ve TIMP 1 yanında TGF- $\beta$ 1'i de baskılayarak inflamasyonun yatışmasını sağlayabileceği, ileride oluşabilecek fibrozis ilişkili komplikasyonları önleyebileceği, apoptozis ve hücrel malign transformasyonu engelleyerek

maligniteden koruyucu olabileceği, protrombotik durum ve trombozu engelleyebileceği ve tüm bunların sonucunda komplikasyon ve hastalık ilişkili cerrahi gereksinimleri azaltabileceği düşünülebilir. Bu hipotezimizi doğrulayacak yeni randomize prospektif çalışmalara ihtiyaç vardır.

## 6. SONUÇLAR

1. Kolit oluşturulmuş gruplarda kolon makroskopik olarak nekroze, ödemli, rijit görünümde idi ve duvar kalınlıkları artmıştı ve uterus kolona yapışmış, dalak boyutları küçülmüş ve pankreas hiperemik görünümdeydi. Bu farklılıklar bize TNBS'nin kronik kolit modeli oluşturmakta etkin bir kimyasal ajan olduğunu literatür ile uyumlu olarak destekledi.
2. Rivaroksaban ile tedavi edilen grupta makroskopik ve mikroskopik skorlardaki düzelme ilacın mukozal iyileşmede etkin bir ajan olabileceğini düşündürdü.
3. Rivaroksaban alan grupta MPO, MDA değerleri düşük, SOD düzeyi ise yüksek bulunmuştur. Bu durum rivaroksabanın antikoagülan etkinin yanında antioksidan ve antiinflamatuvar etkinlik gösterdiğini desteklemiştir.
4. Rivaroksaban tedavisi alan grupta proinflamatuvar ve profibrotik belirteçlerden TIMP-1, MMP-3, TGF  $\beta$ 1 medyan değerleri istatistiki olarak düşük bulundu. Bu sonuç bize rivaroksabanın antikoagülan etkinliği yanında, antifibrotik ve antiinflamatuvar etkinliği olduğunu göstermiştir.
5. Çalışmamız IBH'da rivaroksabanla yapılmış ilk deneysel çalışmadır. Rivaroksaban oral etkili direk FXa inhibitörüdür. FXa pıhtılaşma sistemindeki fizyolojik etkinliği yanında, GİS hücrelerinde PAR-2 aracılığı ile proinflamatuvar, profibrotik ve oksidan etkinlik

göstermektedir. Tüm verileri birlikte değerlendirdiğimizde rivaroksaban ile F Xa inhibisyonu, makroskopik ve mikroskopik skorları, dokudaki inflamatuvar ve profibrotik belirteç seviyelerini olumlu yönde etkiliyordu.

6. Sonuç olarak çalışmamız rivaroksabanın gelecekte İBH tedavisinde yeri olabileceğini desteklemektedir. Bu konuda yapılmış insan çalışması henüz yoktur ve daha ileri deneysel araştırmaların yapılması gereklidir. Bu çalışmalar sonunda yeterli kanıt sağlanabilir ise rivaroksabanın İBH tedavisinde yeri olabilecektir.

## 7. KAYNAKLAR

1. Shih DQ, Targan SR. Immunopathogenesis of inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 2008;14:390-400.
2. Danese S, Papa A, Saibeni S, Repici A, Malesci A, Vecchi M. Inflammation and coagulation in inflammatory bowel disease: The clot thickens. *Am J Gastroenterol* 2007;102:174-186.
3. Stadnicki A. Involvement of coagulation and hemostasis in inflammatory bowel diseases. *Curr Vasc Pharmacol* 2012;10:659-669.
4. van der Poll T, de Jonge E, Levi M. Regulatory role of cytokines in disseminated intravascular coagulation. *Semin Thromb Hemost* 2001;27:639-651.
5. Levi M, van der Poll T. Two-way interactions between inflammation and coagulation. *Trends Cardiovasc Med* 2005;15:254-259.
6. Papa A, Scaldaferrri F, Danese S, Guglielmo S, Roberto I, Bonizzi M, Mocci G, et al. Vascular involvement in inflammatory bowel disease: pathogenesis and clinical aspects. *Dig Dis* 2008;26:149-155.
7. Blobel GC, Schiemann WP, Lodish HF. Role of transforming growth factor beta in human disease. *N Engl J Med* 2000;342:1350-1358.
8. Gauldie J, Bonniaud P, Sime P, Ask K, Kolb M. TGF-beta, Smad3 and the process of progressive fibrosis. *Biochem Soc Trans* 2007;35:661-664.

9. Schuppan D, Hahn EG. MMPs in the gut: inflammation hits the matrix. *Gut* 2000;47:12-14.
10. Baumgart DC, Carding SR. Inflammatory bowel disease: cause and immunobiology. *Lancet* 2007;369:1627-1640.
11. Strober W, Fuss I, Mannon P. The fundamental basis of inflammatory bowel disease. *J Clin Invest* 2007;117:514-521.
12. Borensztajn K, Peppelenbosch MP, Spek CA. Coagulation factor Xa signaling: the link between coagulation and inflammatory bowel disease? *Trends Pharmacol Sci* 2009;30:8-16.
13. Hatoum OA, Binion DG. The vasculature and inflammatory bowel disease: contribution to pathogenesis and clinical pathology. *Inflamm Bowel Dis* 2005;11:304-313.
14. Kimbro KS, Saavedra RA. The Puerap motif in the promoter of the mouse osteopontin gene. *Ann N Y Acad Sci* 1995;760:319-320.
15. Laroux FS, Grisham MB. Immunological basis of inflammatory bowel disease: role of the microcirculation. *Microcirculation* 2001;8:283-301.
16. Hatoum OA, Binion DG, Otterson MF, Gutterman DD. Acquired microvascular dysfunction in inflammatory bowel disease: Loss of nitric oxide-mediated vasodilation. *Gastroenterology* 2003;125:58-69.
17. Wakefield AJ, Sankey EA, Dhillon AP, Sawyerr AM, More L, Sim R, Pittilo RM, et al. Granulomatous vasculitis in Crohn's disease. *Gastroenterology* 1991;100:1279-1287.

18. Koizumi M, King N, Lobb R, Benjamin C, Podolsky DK. Expression of vascular adhesion molecules in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 1992;103:840-847.
19. Cuzzocrea S, Chatterjee PK, Mazzon E, Dugo L, De Sarro A, Van de Loo FA, Caputi AP, et al. Role of induced nitric oxide in the initiation of the inflammatory response after postischemic injury. *Shock* 2002;18:169-176.
20. Davies SJ, Reichardt-Pascal SY, Vaughan D, Russell GI. Differential effect of ischaemia-reperfusion injury on anti-oxidant enzyme activity in the rat kidney. *Exp Nephrol* 1995;3:348-354.
21. Reiter RJ, Acuna-Castroviejo D, Tan DX, Burkhardt S. Free radical-mediated molecular damage. Mechanisms for the protective actions of melatonin in the central nervous system. *Ann N Y Acad Sci* 2001;939:200-215.
22. Hansson M, Olsson I, Nauseef WM. Biosynthesis, processing, and sorting of human myeloperoxidase. *Arch Biochem Biophys* 2006;445:214-224.
23. Girotti AW. Lipid hydroperoxide generation, turnover, and effector action in biological systems. *J Lipid Res* 1998;39:1529-1542.
24. Esmon CT. The interactions between inflammation and coagulation. *Br J Haematol* 2005;131:417-430.
25. Saibeni S, Vecchi M, Valsecchi C, Faioni EM, Razzari C, de Franchis R. Reduced free protein S levels in patients with inflammatory bowel disease: prevalence, clinical relevance, and role of anti-protein S antibodies. *Dig Dis Sci* 2001;46:637-643.



26. Payzin B, Adakan FY, Yalcin HC, Cetinkaya GS, Berkmen S, Eraslan S, Unsal B. Natural coagulation inhibitory proteins and activated protein C resistance in Turkish patients with inflammatory bowel disease. *Turk J Gastroenterol* 2006;17:183-190.
27. Zezos P, Papaioannou G, Nikolaidis N, Vasiliadis T, Giouleme O, Evgenidis N. Thrombophilic abnormalities of natural anticoagulants in patients with ulcerative colitis. *Hepato-gastroenterology* 2007;54:1417-1421.
28. Cakal B, Gokmen A, Yalinkilic M, Cakal E, Ayaz S, Nadir I, Ozin Y, et al. Natural anticoagulant protein levels in Turkish patients with inflammatory bowel disease. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2010;21:118-121.
29. Gallinaro L, Sartorello F, Pontara E, Cattini MG, Bertomoro A, Bartoloni L, Pagnan A, et al. Combined partial exon skipping and cryptic splice site activation as a new molecular mechanism for recessive type 1 von Willebrand disease. *Thromb Haemost* 2006;96:711-716.
30. Hoffman M, Monroe DM. Coagulation 2006: a modern view of hemostasis. *Hematol Oncol Clin North Am* 2007;21:1-11.
31. Colman RW. Are hemostasis and thrombosis two sides of the same coin? *J Exp Med* 2006;203:493-495.
32. McMichael M. New models of hemostasis. *Top Companion Anim Med* 2012;27:40-45.
33. Esmon CT. Regulation of blood coagulation. *Biochim Biophys Acta* 2000;1477:349-360.

34. Scaldaferri F, Lancellotti S, Pizzoferrato M, De Cristofaro R. Haemostatic system in inflammatory bowel diseases: new players in gut inflammation. *World J Gastroenterol* 2011;17:594-608.
35. Hudson M, Chitolie A, Hutton RA, Smith MS, Pounder RE, Wakefield AJ. Thrombotic vascular risk factors in inflammatory bowel disease. *Gut* 1996;38:733-737.
36. Appleyard CB, Williams JL, Hathaway CA, Percy WH. Temporal patterns of colonic blood flow and tissue damage in an animal model of colitis. *Dig Dis Sci* 1999;44:431-438.
37. Schambeck CM, Grossmann R, Zonnur S, Berger M, Teuchert K, Spahn A, Walter U. High factor VIII (FVIII) levels in venous thromboembolism: role of unbound FVIII. *Thromb Haemost* 2004;92:42-46.
38. Yurekli BP, Aksoy DY, Aybar M, Egesel T, Gurgey A, Hascelik G, Kirazli S, et al. The search for a common thrombophilic state during the active state of inflammatory bowel disease. *J Clin Gastroenterol* 2006;40:809-813.
39. Zezos P, Papaioannou G, Nikolaidis N, Vasiliadis T, Giouleme O, Evgenidis N. Elevated plasma von Willebrand factor levels in patients with active ulcerative colitis reflect endothelial perturbation due to systemic inflammation. *World Journal of Gastroenterology* 2005;11:7639-7645.
40. Kume K, Yamasaki M, Tashiro M, Yoshikawa I, Otsuki M. Activations of coagulation and fibrinolysis secondary to bowel inflammation in patients with ulcerative colitis. *Intern Med* 2007;46:1323-1329.

41. Borensztajn K, Peppelenbosch MP, Spek CA. Factor Xa: at the crossroads between coagulation and signaling in physiology and disease. *Trends Mol Med* 2008;14:429-440.
42. Uchiba M, Okajima K, Murakami K. Effects of various doses of antithrombin III on endotoxin-induced endothelial cell injury and coagulation abnormalities in rats. *Thromb Res* 1998;89:233-241.
43. Warren BL, Eid A, Singer P, Pillay SS, Carl P, Novak I, Chalupa P, et al. Caring for the critically ill patient. High-dose antithrombin III in severe sepsis: a randomized controlled trial. *JAMA* 2001;286:1869-1878.
44. Uchiba M, Okajima K, Kaun C, Wojta J, Binder BR. Inhibition of the endothelial cell activation by antithrombin in vitro. *Thromb Haemost* 2004;92:1420-1427.
45. Oelschlager C, Romisch J, Staubitz A, Stauss H, Leithauser B, Tillmanns H, Holschermann H. Antithrombin III inhibits nuclear factor kappaB activation in human monocytes and vascular endothelial cells. *Blood* 2002;99:4015-4020.
46. Levi M, van der Poll T. The role of natural anticoagulants in the pathogenesis and management of systemic activation of coagulation and inflammation in critically ill patients. *Semin Thromb Hemost* 2008;34:459-468.
47. Lijnen HR. Plasmin and matrix metalloproteinases in vascular remodeling. *Thromb Haemost* 2001;86:324-333.

48. Hoylaerts M, Rijken DC, Lijnen HR, Collen D. Kinetics of the activation of plasminogen by human tissue plasminogen activator. Role of fibrin. *J Biol Chem* 1982;257:2912-2919.
49. Chmielewska J, Ranby M, Wiman B. Kinetics of the inhibition of plasminogen activators by the plasminogen-activator inhibitor. Evidence for 'second-site' interactions. *Biochem J* 1988;251:327-332.
50. Rijken DC, Lijnen HR. New insights into the molecular mechanisms of the fibrinolytic system. *J Thromb Haemost* 2009;7:4-13.
51. Mosnier LO, Bouma BN. Regulation of fibrinolysis by thrombin activatable fibrinolysis inhibitor, an unstable carboxypeptidase B that unites the pathways of coagulation and fibrinolysis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006;26:2445-2453.
52. Weber P, Husemann S, Vielhaber H, Zimmer KP, Nowak-Gottl U. Coagulation and fibrinolysis in children, adolescents, and young adults with inflammatory bowel disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1999;28:418-422.
53. Saibeni S, Bottasso B, Spina L, Bajetta M, Danese S, Gasbarrini A, de Franchis R, et al. Assessment of thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI) plasma levels in inflammatory bowel diseases. *Am J Gastroenterol* 2004;99:1966-1970.
54. Gris JC, Schved JF, Raffanel C, Dubois A, Aguilar-Martinez P, Arnaud A, Sanchez N, et al. Impaired fibrinolytic capacity in patients with inflammatory bowel disease. *Thromb Haemost* 1990;63:472-475.

55. Koutroubakis IE, Sfridakis A, Tsiolakidou G, Coucousi C, Theodoropoulou A, Kouroumalis EA. Plasma thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor and plasminogen activator inhibitor-1 levels in inflammatory bowel disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2008;20:912-916.
56. von Hundelshausen P, Weber C. Platelets as immune cells: bridging inflammation and cardiovascular disease. *Circ Res* 2007;100:27-40.
57. Fiore S, Serhan CN. Formation of lipoxins and leukotrienes during receptor-mediated interactions of human platelets and recombinant human granulocyte/macrophage colony-stimulating factor-primed neutrophils. *J Exp Med* 1990;172:1451-1457.
58. Breitenstein A, Camici GG, Tanner FC. Tissue factor: beyond coagulation in the cardiovascular system. *Clin Sci (Lond)* 2010;118:159-172.
59. Celi A, Pellegrini G, Lorenzet R, De Blasi A, Ready N, Furie BC, Furie B. P-selectin induces the expression of tissue factor on monocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91:8767-8771.
60. Cambien B, Wagner DD. A new role in hemostasis for the adhesion receptor P-selectin. *Trends Mol Med* 2004;10:179-186.
61. Davi G, Patrono C. Platelet activation and atherothrombosis. *N Engl J Med* 2007;357:2482-2494.
62. Andre P, Prasad KS, Denis CV, He M, Papalia JM, Hynes RO, Phillips DR, et al. CD40L stabilizes arterial thrombi by a beta3 integrin--dependent mechanism. *Nat Med* 2002;8:247-252.

63. Schonbeck U, Libby P. The CD40/CD154 receptor/ligand dyad. *Cell Mol Life Sci* 2001;58:4-43.
64. Danese S, Scaldaferrri F, Papa A, Pola R, Gasbarrini A, Sgambato A, Cittadini A. CD40L-positive platelets induce CD40L expression de novo in endothelial cells: adding a loop to microvascular inflammation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004;24:e162.
65. Ruggeri ZM. Platelets in atherothrombosis. *Nat Med* 2002;8:1227-1234.
66. Davis C, Fischer J, Ley K, Sarembock IJ. The role of inflammation in vascular injury and repair. *J Thromb Haemost* 2003;1:1699-1709.
67. Vestweber D, Blanks JE. Mechanisms that regulate the function of the selectins and their ligands. *Physiol Rev* 1999;79:181-213.
68. Berndt MC, Shen Y, Dopheide SM, Gardiner EE, Andrews RK. The vascular biology of the glycoprotein Ib-IX-V complex. *Thromb Haemost* 2001;86:178-188.
69. Sadler JE. Biochemistry and genetics of von Willebrand factor. *Annu Rev Biochem* 1998;67:395-424.
70. Rao LV, Pendurthi UR. Tissue factor-factor VIIa signaling. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005;25:47-56.
71. Napoli C, de Nigris F, Wallace JL, Hollenberg MD, Tajana G, De Rosa G, Sica V, et al. Evidence that protease activated receptor 2 expression is enhanced in human coronary atherosclerotic lesions. *J Clin Pathol* 2004;57:513-516.

72. Tennant GM, Wadsworth RM, Kennedy S. PAR-2 mediates increased inflammatory cell adhesion and neointima formation following vascular injury in the mouse. *Atherosclerosis* 2008;198:57-64.
73. Vesey DA, Hooper JD, Gobe GC, Johnson DW. Potential physiological and pathophysiological roles for protease-activated receptor-2 in the kidney. *Nephrology (Carlton)* 2007;12:36-43.
74. Nishibori M, Mori S, Takahashi HK. Physiology and pathophysiology of proteinase-activated receptors (PARs): PAR-2-mediated proliferation of colon cancer cell. *J Pharmacol Sci* 2005;97:25-30.
75. Leadley RJ, Jr., Chi L, Porcari AR. Non-hemostatic activity of coagulation factor Xa: potential implications for various diseases. *Curr Opin Pharmacol* 2001;1:169-175.
76. Yamada T, Nagai Y. Immunohistochemical studies of human tissues with antibody to factor Xa. *Histochem J* 1996;28:73-77.
77. Shikamoto Y, Morita T. Expression of factor X in both the rat brain and cells of the central nervous system. *FEBS Lett* 1999;463:387-389.
78. Pejler G, Lunderius C, Tomasini-Johansson B. Macrophages synthesize factor X and secrete factor X/Xa-containing prothrombinase activity into the surrounding medium. *Thromb Haemost* 2000;84:429-435.
79. Wojtukiewicz MZ, Rucinska M, Zacharski LR, Kozlowski L, Zimnoch L, Piotrowski Z, Kudryk BJ, et al. Localization of blood coagulation factors in situ in pancreatic carcinoma. *Thromb Haemost* 2001;86:1416-1420.

80. Wojtukiewicz MZ, Rucinska M, Zimnoch L, Jaromin J, Piotrowski Z, Rozanska-Kudelska M, Kisiel W, et al. Expression of prothrombin fragment 1+2 in cancer tissue as an indicator of local activation of blood coagulation. *Thromb Res* 2000;97:335-342.
81. Koizume S, Jin MS, Miyagi E, Hirahara F, Nakamura Y, Piao JH, Asai A, et al. Activation of cancer cell migration and invasion by ectopic synthesis of coagulation factor VII. *Cancer Res* 2006;66:9453-9460.
82. Cunningham MA, Rondeau E, Chen X, Coughlin SR, Holdsworth SR, Tipping PG. Protease-activated receptor 1 mediates thrombin-dependent, cell-mediated renal inflammation in crescentic glomerulonephritis. *J Exp Med* 2000;191:455-462.
83. Howell DC, Laurent GJ, Chambers RC. Role of thrombin and its major cellular receptor, protease-activated receptor-1, in pulmonary fibrosis. *Biochem Soc Trans* 2002;30:211-216.
84. Ossovskaya VS, Bunnett NW. Protease-activated receptors: contribution to physiology and disease. *Physiol Rev* 2004;84:579-621.
85. Ruf W, Dorfleutner A, Riewald M. Specificity of coagulation factor signaling. *J Thromb Haemost* 2003;1:1495-1503.
86. Feistritzer C, Lenta R, Riewald M. Protease-activated receptors-1 and -2 can mediate endothelial barrier protection: role in factor Xa signaling. *J Thromb Haemost* 2005;3:2798-2805.



87. Kawabata A, Matsunami M, Sekiguchi F. Gastrointestinal roles for proteinase-activated receptors in health and disease. *Br J Pharmacol* 2008;153 Suppl 1:S230-240.
88. Kong W, McConalogue K, Khitin LM, Hollenberg MD, Payan DG, Bohm SK, Bunnett NW. Luminal trypsin may regulate enterocytes through proteinase-activated receptor 2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94:8884-8889.
89. Seymour ML, Zaidi NF, Hollenberg MD, MacNaughton WK. PAR1-dependent and independent increases in COX-2 and PGE2 in human colonic myofibroblasts stimulated by thrombin. *Am J Physiol Cell Physiol* 2003;284:C1185-1192.
90. Jarry A, Dorso L, Gratio V, Forgue-Lafitte ME, Laburthe M, Laboisie CL, Darmoul D. PAR-2 activation increases human intestinal mucin secretion through EGFR transactivation. *Biochem Biophys Res Commun* 2007;364:689-694.
91. Buresi MC, Vergnolle N, Sharkey KA, Keenan CM, Andrade-Gordon P, Cirino G, Cirillo D, et al. Activation of proteinase-activated receptor-1 inhibits neurally evoked chloride secretion in the mouse colon in vitro. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2005;288:G337-345.
92. Steinhoff M, Vergnolle N, Young SH, Tognetto M, Amadesi S, Ennes HS, Trevisani M, et al. Agonists of proteinase-activated receptor 2 induce inflammation by a neurogenic mechanism. *Nat Med* 2000;6:151-158.

93. Riewald M, Ruf W. Mechanistic coupling of protease signaling and initiation of coagulation by tissue factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:7742-7747.
94. Hezi-Yamit A, Wong PW, Bien-Ly N, Komuves LG, Prasad KS, Phillips DR, Sinha U. Synergistic induction of tissue factor by coagulation factor Xa and TNF: evidence for involvement of negative regulatory signaling cascades. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102:12077-12082.
95. Daubie V, Cauwenberghs S, Senden NH, Pochet R, Lindhout T, Buurman WA, Heemskerk JW. Factor Xa and thrombin evoke additive calcium and proinflammatory responses in endothelial cells subjected to coagulation. *Biochim Biophys Acta* 2006;1763:860-869.
96. McLean K, Schirm S, Johns A, Morser J, Light DR. FXa-induced responses in vascular wall cells are PAR-mediated and inhibited by ZK-807834. *Thromb Res* 2001;103:281-297.
97. Riewald M, Kravchenko VV, Petrovan RJ, O'Brien PJ, Brass LF, Ulevitch RJ, Ruf W. Gene induction by coagulation factor Xa is mediated by activation of protease-activated receptor 1. *Blood* 2001;97:3109-3116.
98. Suzuki T, Moraes TJ, Vachon E, Ginzberg HH, Huang TT, Matthay MA, Hollenberg MD, et al. Proteinase-activated receptor-1 mediates elastase-induced apoptosis of human lung epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2005;33:231-247.

99. Edelblum KL, Yan F, Yamaoka T, Polk DB. Regulation of apoptosis during homeostasis and disease in the intestinal epithelium. *Inflamm Bowel Dis* 2006;12:413-424.
100. Borensztajn K, Stiekema J, Nijmeijer S, Reitsma PH, Peppelenbosch MP, Spek CA. Factor Xa stimulates proinflammatory and profibrotic responses in fibroblasts via protease-activated receptor-2 activation. *Am J Pathol* 2008;172:309-320.
101. Blanc-Brude OP, Archer F, Leoni P, Derian C, Bolsover S, Laurent GJ, Chambers RC. Factor Xa stimulates fibroblast procollagen production, proliferation, and calcium signaling via PAR1 activation. *Exp Cell Res* 2005;304:16-27.
102. Tomasek JJ, Gabbiani G, Hinz B, Chaponnier C, Brown RA. Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002;3:349-363.
103. Kruidenier L, Kuiper I, Van Duijn W, Mieremet-Ooms MA, van Hogezaand RA, Lamers CB, Verspaget HW. Imbalanced secondary mucosal antioxidant response in inflammatory bowel disease. *J Pathol* 2003;201:17-27.
104. Hausmann M, Spottl T, Andus T, Rothe G, Falk W, Scholmerich J, Herfarth H, et al. Subtractive screening reveals up-regulation of NADPH oxidase expression in Crohn's disease intestinal macrophages. *Clin Exp Immunol* 2001;125:48-55.

105. Wiercinska-Drapalo A, Jaroszewicz J, Flisiak R, Prokopowicz D. Plasma matrix metalloproteinase-1 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 as biomarkers of ulcerative colitis activity. *World J Gastroenterol* 2003;9:2843-2845.
106. Sturm A, Dignass AU. Epithelial restitution and wound healing in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 2008;14:348-353.
107. Sappino AP, Schurch W, Gabbiani G. Differentiation repertoire of fibroblastic cells: expression of cytoskeletal proteins as marker of phenotypic modulations. *Lab Invest* 1990;63:144-161.
108. Aiba S, Tagami H. Inverse correlation between CD34 expression and proline-4-hydroxylase immunoreactivity on spindle cells noted in hypertrophic scars and keloids. *J Cutan Pathol* 1997;24:65-69.
109. Sundberg C, Ivarsson M, Gerdin B, Rubin K. Pericytes as collagen-producing cells in excessive dermal scarring. *Lab Invest* 1996;74:452-466.
110. Zeisberg M, Yang C, Martino M, Duncan MB, Rieder F, Tanjore H, Kalluri R. Fibroblasts derive from hepatocytes in liver fibrosis via epithelial to mesenchymal transition. *J Biol Chem* 2007;282:23337-23347.
111. Frid MG, Kale VA, Stenmark KR. Mature vascular endothelium can give rise to smooth muscle cells via endothelial-mesenchymal transdifferentiation: in vitro analysis. *Circ Res* 2002;90:1189-1196.
112. Burke JP, Mulsow JJ, O'Keane C, Docherty NG, Watson RW, O'Connell PR. Fibrogenesis in Crohn's disease. *Am J Gastroenterol* 2007;102:439-448.

113. Lang M, Schlechtweg M, Kellermeier S, Brenmoehl J, Falk W, Scholmerich J, Herfarth H, et al. Gene expression profiles of mucosal fibroblasts from strictured and nonstrictured areas of patients with Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* 2009;15:212-223.
114. Wynn TA. Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. *J Pathol* 2008;214:199-210.
115. Leeb SN, Vogl D, Grossmann J, Falk W, Scholmerich J, Rogler G, Gelbmann CM. Autocrine fibronectin-induced migration of human colonic fibroblasts. *Am J Gastroenterol* 2004;99:335-340.
116. Rauch BH, Bretschneider E, Braun M, Schror K. Factor Xa releases matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) from human vascular smooth muscle cells and stimulates the conversion of pro-MMP-2 to MMP-2: role of MMP-2 in factor Xa-induced DNA synthesis and matrix invasion. *Circ Res* 2002;90:1122-1127.
117. Piccini JP, Patel MR, Mahaffey KW, Fox KA, Califf RM. Rivaroxaban, an oral direct factor Xa inhibitor. *Expert Opin Investig Drugs* 2008;17:925-937.
118. Perzborn E, Roehrig S, Straub A, Kubitza D, Mueck W, Laux V. Rivaroxaban: a new oral factor Xa inhibitor. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2010;30:376-381.
119. Lawrance IC, Wu F, Leite AZ, Willis J, West GA, Fiocchi C, Chakravarti S. A murine model of chronic inflammation-induced intestinal fibrosis down-regulated by antisense NF-kappa B. *Gastroenterology* 2003;125:1750-1761.

120. Fichtner-Feigl S, Fuss IJ, Young CA, Watanabe T, Geissler EK, Schlitt HJ, Kitani A, et al. Induction of IL-13 triggers TGF-beta1-dependent tissue fibrosis in chronic 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid colitis. *J Immunol* 2007;178:5859-5870.
121. Rieder F, Kessler S, Sans M, Fiocchi C. Animal models of intestinal fibrosis: new tools for the understanding of pathogenesis and therapy of human disease. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2012;303:G786-801.
122. te Velde AA, Verstege MI, Hommes DW. Critical appraisal of the current practice in murine TNBS-induced colitis. *Inflamm Bowel Dis* 2006;12:995-999.
123. Weinz C, Schwarz T, Kubitza D, Mueck W, Lang D. Metabolism and excretion of rivaroxaban, an oral, direct factor Xa inhibitor, in rats, dogs, and humans. *Drug Metab Dispos* 2009;37:1056-1064.
124. Morris GP, Beck PL, Herridge MS, Depew WT, Szewczuk MR, Wallace JL. Hapten-induced model of chronic inflammation and ulceration in the rat colon. *Gastroenterology* 1989;96:795-803.
125. Millar AD, Rampton DS, Chander CL, Claxson AW, Blades S, Coumbe A, Panetta J, et al. Evaluating the antioxidant potential of new treatments for inflammatory bowel disease using a rat model of colitis. *Gut* 1996;39:407-415.

126. Ackerman Z, Karmeli F, Cohen P, Rachmilewitz D. Experimental colitis in rats with portal hypertension and liver disease. *Inflamm Bowel Dis* 2003;9:18-24.
127. Zhang T, Zhang X, Shao Z, Ding R, Yang S, Ruan J, Sun X, et al. The prophylactic and therapeutic effects of cholinolytics on perfluoroisobutylene inhalation induced acute lung injury. *J Occup Health* 2005;47:277-285.
128. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 1979;95:351-358.
129. Sun Y, Oberley LW, Li Y. A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clin Chem* 1988;34:497-500.
130. Sanli K, Karlsson FH, Nookaew I, Nielsen J. FANTOM: Functional and taxonomic analysis of metagenomes. *BMC Bioinformatics* 2013;14:38.
131. Xing J, You C, Dong K, Sun J, You H, Dong Y, Sun J. Ameliorative effects of 3,4-oxo-isopropylidene-shikimic acid on experimental colitis and their mechanisms in rats. *Int Immunopharmacol* 2013;15:524-531.
132. Al-Tamimi M, Grigoriadis G, Tran H, Paul E, Servadei P, Berndt MC, Gardiner EE, et al. Coagulation-induced shedding of platelet glycoprotein VI mediated by factor Xa. *Blood* 2011;117:3912-3920.
133. Funakoshi T, Yamashita K, Ichikawa N, Fukai M, Suzuki T, Goto R, Oura T, et al. A novel NF-kappaB inhibitor, dehydroxymethylepoxyquinomicin, ameliorates inflammatory colonic injury in mice. *J Crohns Colitis* 2012;6:215-225.

134. Tasaki H, Yamashita K, Tsutsui M, Kamezaki F, Kubara T, Tanaka S, Sasaguri Y, et al. Heparin-released extracellular superoxide dismutase is reduced in patients with coronary artery atherosclerosis. *Atherosclerosis* 2006;187:131-138.
135. Talbot RW, Heppell J, Dozois RR, Beart RW, Jr. Vascular complications of inflammatory bowel disease. *Mayo Clin Proc* 1986;61:140-145.
136. Webberley MJ, Hart MT, Melikian V. Thromboembolism in inflammatory bowel disease: role of platelets. *Gut* 1993;34:247-251.
137. Sloan WP, Jr., Bagen JA, Gage RB. Life histories of patients with chronic ulcerative colitis: a review of 2,000 cases. *Gastroenterology* 1968;54:Suppl:819-822.
138. Bernstein CN, Blanchard JF, Houston DS, Wajda A. The incidence of deep venous thrombosis and pulmonary embolism among patients with inflammatory bowel disease: a population-based cohort study. *Thromb Haemost* 2001;85:430-434.
139. Thompson NP, Wakefield AJ, Pounder RE. Inherited Disorders of Coagulation Appear to Protect against Inflammatory Bowel-Disease. *Gastroenterology* 1995;108:1011-1015.
140. Cenac N, Cellars L, Steinhoff M, Andrade-Gordon P, Hollenberg MD, Wallace JL, Fiorucci S, et al. Proteinase-activated receptor-1 is an anti-inflammatory signal for colitis mediated by a type 2 immune response. *Inflamm Bowel Dis* 2005;11:792-798.



141. Vergnolle N, Cellars L, Mencarelli A, Rizzo G, Swaminathan S, Beck P, Steinhoff M, et al. A role for proteinase-activated receptor-1 in inflammatory bowel diseases. *J Clin Invest* 2004;114:1444-1456.
142. Kim JA, Choi SC, Yun KJ, Kim DK, Han MK, Seo GS, Yeom JJ, et al. Expression of protease-activated receptor 2 in ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis* 2003;9:224-229.
143. Pucilowska JB, McNaughton KK, Mohapatra NK, Hoyt EC, Zimmermann EM, Sartor RB, Lund PK. IGF-I and procollagen alpha1 (I) are coexpressed in a subset of mesenchymal cells in active Crohn's disease. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2000;279:G1307-1322.
144. al-Ani B, Saifeddine M, Hollenberg MD. Detection of functional receptors for the proteinase-activated-receptor-2-activating polypeptide, SLIGRL-NH<sub>2</sub>, in rat vascular and gastric smooth muscle. *Can J Physiol Pharmacol* 1995;73:1203-1207.
145. Kelso EB, Lockhart JC, Hembrough T, Dunning L, Plevin R, Hollenberg MD, Sommerhoff CP, et al. Therapeutic promise of proteinase-activated receptor-2 antagonism in joint inflammation. *J Pharmacol Exp Ther* 2006;316:1017-1024.
146. Hyun E, Andrade-Gordon P, Steinhoff M, Vergnolle N. Protease-activated receptor-2 activation: a major actor in intestinal inflammation. *Gut* 2008;57:1222-1229.

147. Yamashita A, Nishihira K, Kitazawa T, Yoshihashi K, Soeda T, Esaki K, Imamura T, et al. Factor XI contributes to thrombus propagation on injured neointima of the rabbit iliac artery. *J Thromb Haemost* 2006;4:1496-1501.
148. Seymour ML, Binion DG, Compton SJ, Hollenberg MD, MacNaughton WK. Expression of proteinase-activated receptor 2 on human primary gastrointestinal myofibroblasts and stimulation of prostaglandin synthesis. *Can J Physiol Pharmacol* 2005;83:605-616.
149. Geiser T. Idiopathic pulmonary fibrosis--a disorder of alveolar wound repair? *Swiss Med Wkly* 2003;133:405-411.
150. Chambers RC. Role of coagulation cascade proteases in lung repair and fibrosis. *Eur Respir J Suppl* 2003;44:33s-35s.
151. Idell S. Coagulation, fibrinolysis, and fibrin deposition in acute lung injury. *Crit Care Med* 2003;31:S213-220.
152. Howell DC, Goldsack NR, Marshall RP, McAnulty RJ, Starke R, Purdy G, Laurent GJ, et al. Direct thrombin inhibition reduces lung collagen, accumulation, and connective tissue growth factor mRNA levels in bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Am J Pathol* 2001;159:1383-1395.
153. Kubo H, Nakayama K, Yanai M, Suzuki T, Yamaya M, Watanabe M, Sasaki H. Anticoagulant therapy for idiopathic pulmonary fibrosis. *Chest* 2005;128:1475-1482.
154. Cederqvist K, Haglund C, Heikkila P, Hollenberg MD, Karikoski R, Andersson S. High expression of pulmonary proteinase-activated receptor 2

- in acute and chronic lung injury in preterm infants. *Pediatr Res* 2005;57:831-836.
155. Nomura K, Liu N, Nagai K, Hasegawa T, Kobayashi I, Nogaki F, Tanaka M, et al. Roles of coagulation pathway and factor Xa in rat mesangioproliferative glomerulonephritis. *Lab Invest* 2007;87:150-160.
156. Vallance BA, Gunawan MI, Hewlett B, Bercik P, Van Kampen C, Galeazzi F, Sime PJ, et al. TGF-beta1 gene transfer to the mouse colon leads to intestinal fibrosis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2005;289:G116-128.
157. Rutgeerts P, Vermeire S, Van Assche G. Biological therapies for inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology* 2009;136:1182-1197.
158. Thirlby RC, Land JC, Fenster LF, Lonborg R. Effect of surgery on health-related quality of life in patients with inflammatory bowel disease: a prospective study. *Arch Surg* 1998;133:826-832.
159. Michell NP, Lalor P, Langman MJS. Heparin therapy for ulcerative colitis? Effects and mechanisms. *European Journal of Gastroenterology & Hepatology* 2001;13:449-456.
160. Papa A, Danese S, Gasbarrini A, Gasbarrini G. Review article: potential therapeutic applications and mechanisms of action of heparin in inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2000;14:1403-1409.
161. Folwaczny C. [Coagulation system and inflammatory bowel disease: therapeutic and pathophysiologic implications]. *Z Gastroenterol* 2002;40:991-998.

162. Ang YS, Mahmud N, White B, Byrne M, Kelly A, Lawler M, McDonald GS, et al. Randomized comparison of unfractionated heparin with corticosteroids in severe active inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2000;14:1015-1022.
163. Evans RC, Wong VS, Morris AI, Rhodes JM. Treatment of corticosteroid-resistant ulcerative colitis with heparin--a report of 16 cases. *Aliment Pharmacol Ther* 1997;11:1037-1040.
164. Panes J, Esteve M, Cabre E, Hinojosa J, Andreu M, Sans M, Fernandez-Banares F, et al. Comparison of heparin and steroids in the treatment of moderate and severe ulcerative colitis. *Gastroenterology* 2000;119:903-908.
165. Dotan I, Hallak A, Arber N, Santo M, Alexandrowitz A, Knaani Y, Hershkoviz R, et al. Low-dose low-molecular weight heparin (enoxaparin) is effective as adjuvant treatment in active ulcerative colitis: an open trial. *Dig Dis Sci* 2001;46:2239-2244.
166. Dotan I, Hershkoviz R, Karmeli F, Brazowski E, Peled Y, Rachmilewitz D, Halpern Z. Heparin and low-molecular-weight heparin (enoxaparin) significantly ameliorate experimental colitis in rats. *Aliment Pharmacol Ther* 2001;15:1687-1697.
167. Levine A, Kenet G, Bruck R, Avni Y, Avinoach I, Aeed H, Matas Z, et al. Effect of heparin on tissue binding activity of fibroblast growth factor and heparin-binding epidermal growth factor in experimental colitis in rats. *Pediatr Res* 2002;51:635-640.

168. Wan MX, Liu Q, Wang Y, Thorlacius H. Protective effect of low molecular weight heparin on experimental colitis: role of neutrophil recruitment and TNF-alpha production. *Inflamm Res* 2002;51:182-187.
169. Girgin F, Karaoglu O, Erkus M, Tuzun S, Ozutemiz O, Dincer C, Batur Y, et al. Effects of trimetazidine on oxidant/antioxidant status in trinitrobenzenesulfonic acid-induced chronic colitis. *J Toxicol Environ Health A* 2000;59:641-652.
170. Peran L, Camuesco D, Comalada M, Nieto A, Concha A, Adrio JL, Olivares M, et al. *Lactobacillus fermentum*, a probiotic capable to release glutathione, prevents colonic inflammation in the TNBS model of rat colitis. *Int J Colorectal Dis* 2006;21:737-746.
171. Domek MJ, Iwata F, Blackman EI, Kao J, Baker M, Vidrich A, Leung FW. Anti-neutrophil serum attenuates dextran sulfate sodium-induced colonic damage in the rat. *Scand J Gastroenterol* 1995;30:1089-1094.
172. Karmeli F, Cohen P, Rachmilewitz D. Cyclo-oxygenase-2 inhibitors ameliorate the severity of experimental colitis in rats. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2000;12:223-231.
173. Draper HH, Hadley M. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Methods Enzymol* 1990;186:421-431.
174. Wyllie AH. Apoptosis: an overview. *Br Med Bull* 1997;53:451-465.
175. Aytac E, Teksoz S, Saygili S, Tortum OB, Yavuz N, Sozer V, Goksel S, et al. Iloprost reduces colitis induced oxidative stress: An experimental study in rats. *Turk J Gastroenterol* 2013;24:224-229.

176. Zhao D, Ding R, Mao Y, Wang L, Zhang Z, Ma X. Heparin rescues sepsis-associated acute lung injury and lethality through the suppression of inflammatory responses. *Inflammation* 2012;35:1825-1832.
177. Yalniz M, Demirel U, Orhan C, Bahcecioglu IH, Ozercan IH, Aygun C, Tuzcu M, et al. Nadroparin sodium activates Nrf2/HO-1 pathway in acetic acid-induced colitis in rats. *Inflammation* 2012;35:1213-1221.
178. Kruidenier L, Kuiper I, van Duijn W, Marklund SL, van Hogezaand RA, Lamers CB, Verspaget HW. Differential mucosal expression of three superoxide dismutase isoforms in inflammatory bowel disease. *J Pathol* 2003;201:7-16.
179. Kuralay F, Yildiz C, Ozutemiz O, Islekel H, Caliskan S, Bingol B, Ozkal S. Effects of trimetazidine on acetic acid-induced colitis in female Swiss rats. *J Toxicol Environ Health A* 2003;66:169-179.
180. Grisham MB, Volkmer C, Tso P, Yamada T. Metabolism of trinitrobenzene sulfonic acid by the rat colon produces reactive oxygen species. *Gastroenterology* 1991;101:540-547.
181. Ai YH, Zhang LN, Gong H, Xu DM, Zhao SP, Chen JH. [Clinical study of low molecular weight heparin therapy for sepsis]. *Zhongguo Wei Zhong Bing Ji Jiu Yi Xue* 2005;17:736-739.
182. Patel M, Patel M, Shah G. Investigation of Possible Role of the PAR-2 Receptor in Intestinal Inflammation. *J Young Pharm* 2010;2:54-58.

183. Bachli EB, Pech CM, Johnson KM, Johnson DJ, Tuddenham EG, McVey JH. Factor Xa and thrombin, but not factor VIIa, elicit specific cellular responses in dermal fibroblasts. *J Thromb Haemost* 2003;1:1935-1944.
184. Kayano K, Okita K. Does IL-6 regulate liver fibrosis/cirrhosis directly and indirectly? *J Gastroenterol* 2000;35:250-251.
185. Sato S, Hasegawa M, Takehara K. Serum levels of interleukin-6 and interleukin-10 correlate with total skin thickness score in patients with systemic sclerosis. *J Dermatol Sci* 2001;27:140-146.
186. Fries KM, Felch ME, Phipps RP. Interleukin-6 is an autocrine growth factor for murine lung fibroblast subsets. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1994;11:552-560.
187. Dang Y, Cole AA, Homandberg GA. Comparison of the catabolic effects of fibronectin fragments in human knee and ankle cartilages. *Osteoarthritis Cartilage* 2003;11:538-547.
188. Knight V, Tchongue J, Lourensz D, Tipping P, Sievert W. Protease-activated receptor 2 promotes experimental liver fibrosis in mice and activates human hepatic stellate cells. *Hepatology* 2012;55:879-887.
189. Overall CM. Molecular determinants of metalloproteinase substrate specificity: matrix metalloproteinase substrate binding domains, modules, and exosites. *Mol Biotechnol* 2002;22:51-86.
190. Egeblad M, Werb Z. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat Rev Cancer* 2002;2:161-174.

191. Birkedal-Hansen H, Moore WG, Bodden MK, Windsor LJ, Birkedal-Hansen B, DeCarlo A, Engler JA. Matrix metalloproteinases: a review. *Crit Rev Oral Biol Med* 1993;4:197-250.
192. Murphy G, Cockett MI, Ward RV, Docherty AJ. Matrix metalloproteinase degradation of elastin, type IV collagen and proteoglycan. A quantitative comparison of the activities of 95 kDa and 72 kDa gelatinases, stromelysins-1 and -2 and punctuated metalloproteinase (PUMP). *Biochem J* 1991;277 ( Pt 1):277-279.
193. Vaalamo M, Karjalainen-Lindsberg ML, Puolakkainen P, Kere J, Saarialho-Kere U. Distinct expression profiles of stromelysin-2 (MMP-10), collagenase-3 (MMP-13), macrophage metalloelastase (MMP-12), and tissue inhibitor of metalloproteinases-3 (TIMP-3) in intestinal ulcerations. *Am J Pathol* 1998;152:1005-1014.
194. Daum S, Bauer U, Foss HD, Schuppan D, Stein H, Riecken EO, Ullrich R. Increased expression of mRNA for matrix metalloproteinases-1 and -3 and tissue inhibitor of metalloproteinases-1 in intestinal biopsy specimens from patients with coeliac disease. *Gut* 1999;44:17-25.
195. Li CK, Pender SL, Pickard KM, Chance V, Holloway JA, Huett A, Goncalves NS, et al. Impaired immunity to intestinal bacterial infection in stromelysin-1 (matrix metalloproteinase-3)-deficient mice. *J Immunol* 2004;173:5171-5179.
196. McKaig BC, McWilliams D, Watson SA, Mahida YR. Expression and regulation of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 and matrix



- metalloproteinases by intestinal myofibroblasts in inflammatory bowel disease. *Am J Pathol* 2003;162:1355-1360.
197. von Lampe B, Barthel B, Coupland SE, Riecken EO, Rosewicz S. Differential expression of matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in colon mucosa of patients with inflammatory bowel disease. *Gut* 2000;47:63-73.
198. Naito Y, Takagi T, Kuroda M, Katada K, Ichikawa H, Kokura S, Yoshida N, et al. An orally active matrix metalloproteinase inhibitor, ONO-4817, reduces dextran sulfate sodium-induced colitis in mice. *Inflamm Res* 2004;53:462-468.
199. Qiu F, Gao XM, Luo GL, Yang KX, Wang H, Liu H, Wen Y. [Expression of matrix metalloproteinase and tissue inhibitor of metalloproteinase in adenomyosis]. *Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban* 2006;37:118-122.
200. Arihiro S, Ohtani H, Hiwatashi N, Torii A, Sorsa T, Nagura H. Vascular smooth muscle cells and pericytes express MMP-1, MMP-9, TIMP-1 and type I procollagen in inflammatory bowel disease. *Histopathology* 2001;39:50-59.
201. Kirkegaard T, Hansen A, Bruun E, Brynskov J. Expression and localisation of matrix metalloproteinases and their natural inhibitors in fistulae of patients with Crohn's disease. *Gut* 2004;53:701-709.
202. Pender SL, Tickle SP, Docherty AJ, Howie D, Wathen NC, MacDonald TT. A major role for matrix metalloproteinases in T cell injury in the gut. *J Immunol* 1997;158:1582-1590.

203. Warner RL, Beltran L, Younkin EM, Lewis CS, Weiss SJ, Varani J, Johnson KJ. Role of stromelysin 1 and gelatinase B in experimental acute lung injury. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2001;24:537-544.
204. Warner RL, Lewis CS, Beltran L, Younkin EM, Varani J, Johnson KJ. The role of metalloelastase in immune complex-induced acute lung injury. *Am J Pathol* 2001;158:2139-2144.
205. Louis E, Ribbens C, Godon A, Franchimont D, De Groote D, Hardy N, Boniver J, et al. Increased production of matrix metalloproteinase-3 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 by inflamed mucosa in inflammatory bowel disease. *Clin Exp Immunol* 2000;120:241-246.
206. Gomez DE, Alonso DF, Yoshiji H, Thorgeirsson UP. Tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation and biological functions. *Eur J Cell Biol* 1997;74:111-122.
207. Medina C, Videla S, Radomski A, Radomski MW, Antolin M, Guarner F, Vilaseca J, et al. Increased activity and expression of matrix metalloproteinase-9 in a rat model of distal colitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2003;284:G116-122.
208. Wang YD, Yan PY. Expression of matrix metalloproteinase-1 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in ulcerative colitis. *World J Gastroenterol* 2006;12:6050-6053.
209. Brew K, Dinakarpanthian D, Nagase H. Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function. *Biochim Biophys Acta* 2000;1477:267-283.

210. Overall CM, Wrana JL, Sodek J. Transcriptional and post-transcriptional regulation of 72-kDa gelatinase/type IV collagenase by transforming growth factor-beta 1 in human fibroblasts. Comparisons with collagenase and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase gene expression. *J Biol Chem* 1991;266:14064-14071.
211. Docherty AJ, Lyons A, Smith BJ, Wright EM, Stephens PE, Harris TJ, Murphy G, et al. Sequence of human tissue inhibitor of metalloproteinases and its identity to erythroid-potentiating activity. *Nature* 1985;318:66-69.
212. Welgus HG, Stricklin GP. Human skin fibroblast collagenase inhibitor. Comparative studies in human connective tissues, serum, and amniotic fluid. *J Biol Chem* 1983;258:12259-12264.
213. Luparello C, Avanzato G, Carella C, Pucci-Minafra I. Tissue inhibitor of metalloprotease (TIMP)-1 and proliferative behaviour of clonal breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat* 1999;54:235-244.
214. Guedez L, Stetler-Stevenson WG, Wolff L, Wang J, Fukushima P, Mansoor A, Stetler-Stevenson M. In vitro suppression of programmed cell death of B cells by tissue inhibitor of metalloproteinases-1. *J Clin Invest* 1998;102:2002-2010.
215. Li G, Fridman R, Kim HR. Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 inhibits apoptosis of human breast epithelial cells. *Cancer Res* 1999;59:6267-6275.
216. Pellegrini P, Contasta I, Berghella AM, Gargano E, Mammarella C, Adorno D. Simultaneous measurement of soluble carcinoembryonic antigen and the tissue inhibitor of metalloproteinase TIMP1 serum levels for use as markers

- of pre-invasive to invasive colorectal cancer. *Cancer Immunol Immunother* 2000;49:388-394.
217. Holten-Andersen MN, Christensen IJ, Nielsen HJ, Stephens RW, Jensen V, Nielsen OH, Sorensen S, et al. Total levels of tissue inhibitor of metalloproteinases 1 in plasma yield high diagnostic sensitivity and specificity in patients with colon cancer. *Clin Cancer Res* 2002;8:156-164.
218. Holten-Andersen MN, Stephens RW, Nielsen HJ, Murphy G, Christensen IJ, Stetler-Stevenson W, Brunner N. High preoperative plasma tissue inhibitor of metalloproteinase-1 levels are associated with short survival of patients with colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 2000;6:4292-4299.
219. Schrohl AS, Christensen IJ, Pedersen AN, Jensen V, Mouridsen H, Murphy G, Foekens JA, et al. Tumor tissue concentrations of the proteinase inhibitors tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) and plasminogen activator inhibitor type 1 (PAI-1) are complementary in determining prognosis in primary breast cancer. *Mol Cell Proteomics* 2003;2:164-172.
220. Remacle A, McCarthy K, Noel A, Maguire T, McDermott E, O'Higgins N, Foidart JM, et al. High levels of TIMP-2 correlate with adverse prognosis in breast cancer. *Int J Cancer* 2000;89:118-121.
221. Clark JC, Thomas DM, Choong PF, Dass CR. RECK--a newly discovered inhibitor of metastasis with prognostic significance in multiple forms of cancer. *Cancer Metastasis Rev* 2007;26:675-683.

222. Clavel T, Haller D. Bacteria- and host-derived mechanisms to control intestinal epithelial cell homeostasis: implications for chronic inflammation. *Inflamm Bowel Dis* 2007;13:1153-1164.
223. Pepper MS. Transforming growth factor-beta: vasculogenesis, angiogenesis, and vessel wall integrity. *Cytokine Growth Factor Rev* 1997;8:21-43.
224. Sanderson N, Factor V, Nagy P, Kopp J, Kondaiah P, Wakefield L, Roberts AB, et al. Hepatic expression of mature transforming growth factor beta 1 in transgenic mice results in multiple tissue lesions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92:2572-2576.
225. Lawrance IC, Maxwell L, Doe W. Inflammation location, but not type, determines the increase in TGF-beta1 and IGF-1 expression and collagen deposition in IBD intestine. *Inflamm Bowel Dis* 2001;7:16-26.
226. di Mola FF, Friess H, Scheuren A, Di Sebastiano P, Graber H, Egger B, Zimmermann A, et al. Transforming growth factor-betas and their signaling receptors are coexpressed in Crohn's disease. *Ann Surg* 1999;229:67-75.
227. Chowdhury A, Fukuda R, Fukumoto S. Growth factor mRNA expression in normal colorectal mucosa and in uninvolved mucosa from ulcerative colitis patients. *J Gastroenterol* 1996;31:353-360.
228. Babyatsky MW, Rossiter G, Podolsky DK. Expression of transforming growth factors alpha and beta in colonic mucosa in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 1996;110:975-984.

229. Wiercinska-Drapalo A, Flisiak R, Prokopowicz D. Effect of ulcerative colitis activity on plasma concentration of transforming growth factor beta1. *Cytokine* 2001;14:343-346.

## 8. ÖZET

**Amaç:** İnflamasyon ve koagülasyon iki önemli konak savunma sistemidir İnflamatuvar barsak hastalıkları (İBH) etiyopatogenezinde; genetik, çevresel faktörler, enterik mikroflora ve doku cevabı yanında pıhtılaşma sistemi, platelet, endotel, epitel ve mezankimal hücreler gibi nonimmün hücreler ve sistemler de önemli rol oynamaktadır. FXa prokoagulan etki ile trombin oluşumunu sağlayıp indirek olarak, ayrıca direk PAR -2 aktivasyonuna neden olarak inflamasyon ve fibrozisi uyarmaktadır. Çalışmamızda FXa'nın rivaroksabanla inhibisyonunun İBH hastalarında gözlenen inflamasyon ve fibrozis üzerine etkisini araştırmayı planladık.

**Gereç ve Yöntem:** 24 adet Wistar-albino dişi rat ve kolit indüksiyonu için %50 etanol içinde 30 mg 0,5 ml trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS) kullanıldı Hayvanlar sağlıklı kontrol (Sham: Grup A), hastalık kontrol (kontrol: Grup B) ve metilprednizolon (standart grup: Grup C), rivaroksaban (test grubu: Grup D) alan grup olarak 4 dört gruba ayrıldı. TNBS indüksiyonun 8. gününde hayvanlar sakrifiye edildi. Grupların makroskopik ve mikroskopik kolit skorları, doku myeloperoksidaz (MPO), Malondialdehit (MDA), süperoksit dismutaz (SOD), Metalloproteinaz-3 (MMP-3), doku metalloproteinaz inhibitörü-1 (TIMP-1), TGF-β1 düzeyleri değerlendirildi.

**Bulgular:** Grup B, C, D ile Grup A karşılaştırıldığında; Makroskopik ve mikroskopik skor değerleri Grup A'da istatistiki olarak anlamlı düşük bulundu, Grup D ile yalnızca Grup B karşılaştırıldığında makroskopik ve mikroskopik skor değerleri Grup D'de istatistiki olarak anlamlı düşük bulundu. Grup D ve C arasında makroskopik skorlar istatistiki olarak benzer bulunurken, mikroskopik skorlar C grubunda daha yüksekti. Medyan MPO değerleri Grup A: 0,17 (0,31-0,61), Grup B: 0,47 (0,31-0,61), Grup C: 0,29 (0,25-0,41), Grup D: 0,30 (0,25-0,37), Medyan MDA Grup A: 1,1 (1,0-2,8), Grup B: 4,3 (3,1-5,5), Grup C: 3,8 (3,1-4,3), Grup D: 3,9 (3,1-4,4) gruplar arasında MPO ve MDA değerleri yönünden istatistiki anlamlılık mevcuttu Grup A'ya göre Grup B, C, D'nin değerleri istatistiki olarak anlamlı yüksek olduğu gözlemlendi. Grup D ve Grup C'nin MPO ve MDA değerleri istatistiki yönden benzerlik göstermesine rağmen grup D ve C, Grup B ile karşılaştırıldıklarında Grup B'nin MPO ve MDA değerleri istatistiki olarak anlamlı yüksek bulundu ( $p<0,001$  ve  $p=0,047$ ). MMP-3 (ng/g doku) medyan değerleri; Grup A: 32,5 (14,5-52,2) Grup B: 124,3 (109,9-144,5) Grup C: 127,8 (103,4-138,2), Grup D: 66,7 (28,3-86,4) gruplar arasında karşılaştırıldığında Grup A'ya göre Grup B, C, D'nin değerleri istatistiki olarak anlamlı yüksek bulunurken, Grup B ve C'nin değerleri istatistiki olarak benzer bulundu, Grup D'nin değerleri, Grup B ve Grup C'ye göre istatistiki olarak anlamlı düşük olduğu gözlemlendi. TGF-β1 (ng/g doku) medyan değerleri; Grup A: 0,97 (0,60-1,53), Grup B: 5,02 (3,87-6,35) Grup C: 3,98 (3,01-5,45), Grup D: 2,29 (1,04-2,91), TIMP-1 (ng/gdoku) medyan değerleri; Grup A: 6,8 (6,5-10,9) Grup B: 20,0 (17,1-24,4) Grup C: 17,3 (10,5-28,2), Grup D: 12,7 (7,2-15,3), TGF-β1, TIMP-1 değerleri gruplar arasında karşılaştırıldığında Grup A'ya göre Grup B, C, D'nin değerleri istatistiki olarak anlamlı yüksek bulunurken, Grup B ye göre Grup C ve Grup D'nin değerleri, Grup C'ye göre ve Grup D'nin değeri istatistiki olarak anlamlı düşük bulundu ( $p<0,001$ ;  $p<0,001$  ve  $p=0,002$ ).

**Sonuç:** Bu sonuçlara göre FXa'nın, rivaroksaban ile inhibisyonu antinflamatuvar, antifibrotik ve antioksidan etki ile sonuçlanmaktadır. Bu durum bize antikoagulan olan rivaroksabanın İBH tedavisinde mevcut tedaviye ek olarak veya tek başına; aktif hastalık döneminde inflamasyonu baskılayabileceğini, prokoagulan aktiviteyi engelleyip tromboza yatkınlığı azaltabileceğini ve antifibrotik etki ile stenoz ve striktür gibi komplikasyonları engelleyebileceğini düşündürdü.

**Anahtar Kelimeler:** Faktör Xa, IBD, Rivaroksaban, TGF-β1, MMPs

## 9. SUMMARY

**AIM:** Inflammation and coagulation are two important host defense systems. Nonimmun cells and systems such as coagulation system, platelet, epithelium and mesenchimal cells play important role in the ethiopathogenesis of inflammatory bowel disease (IBD), besides genetic factors, environmental factors, enteric microflora and tissue response. FXa has a indirectly procoagulant effect for generating thrombin, as also directly cause activation of PAR-2 which induces inflammation and fibrosis.

In our study, we planned to investigate the impact of FXa inhibition with Rivaroxaban on inflammation and fibrosis seen in patients with IBD

**MATERIAL AND METHODS:** Twenty-four female Wistar-Albino rats and 30 mg 0.5 ml trinitrobenzene sulphonic acid (TNBS) dissolved in 50% ethanol which induces colitis by intrarectal installation. Rats divided into four groups; healty control (Sham: Group A), colitis control (Control: Group B), metilprednisolone (standart group: Group C) and rivaroxaban (test group: Group D). The rats were sacrificed on 8th day. Macroscopic and microscopic scores, tissue myeloperoxidase (MPO), Malondialdehit (MDA), superoxide dismutase (SOD), Methalloproteinase-3 (MMP-3), tissue methalloproteinase inhibitor-1 (TIMP-1) and TGF-B1 levels were measured.

### FINDINGS

Macroscopic and microscopic scores levels in Group A were significantly lower than Group B,C and D. Macroscopic and microscopic scores levels in Group D were significantly lower than Group B. Macroscopic scores were statistically similar between Group C and D. Microscopic scores were higher in Group C.

Median MPO levels were in Group A: 0,17 (0,31-0,61), Group B: 0,47 (0,31-0,61), Group C: 0,29 (0,25-0,41), Group D: 0,30 (0,25-0,37), Median MDA Group A: 1,1 (1,0-2,8), Group B: 4,3 (3,1-5,5), Group C: 3,8 (3,1-4,3), Group D: 3,9 (3,1-4,4).

MPO and MDA levels were statistically significant difference between each group. These levels in Group B,C and D were significantly higher than Group A; in Group C and D were statistically similar; in Group B were statistically higher than Group C and D ( $p < 0,001$  &  $p = 0,047$ ).

MMP-3 (ng/g tissue) median levels; Group A: 32,5 (14,5-52,2) Group B: 124,3 (109,9-144,5) Group C: 127,8 (103,4-138,2), Group D: 66,7 (28,3-86,4).

MMP-3 levels in Group B,C and D were significantly higher than Group A; in Group C and D were statistically similar; in Group D were significantly lower than Group C and D.

TGF- $\beta$ 1 (ng/g tissue) median levels were in Group A: 0,97 (0,60-1,53), Group B: 5,02 (3,87-6,35) Group C: 3,98 (3,01-5,45) and Group D: 2,29 (1,04-2,91). TIMP-1 (ng/g tissue) median levels were in Group A: 6,8 (6,5-10,9), Group B: 20,0 (17,1-24,4), Group C: 17,3 (10,5-28,2) and Group D: 12,7 (7,2-15,3).

TGF- $\beta$ 1 and TIMP-1 levels in Group B,C and D were significantly higher than Group A; in Group C and D were significantly lower than Group B and in Group D were significantly lower than Group C ( $p < 0,001$ ;  $p < 0,001$  and  $p = 0,002$ , respectively).

### RESULT

As a result;FXa inhibition with Rivaroxaban is resulted with anti-inflammatory, anti-fibrotic and anti-oxidant effect. Therefore, we thought that Rivaroxaban supresses inflammation during active disease of IBD by addition to current treatment or alone, decreases thrombophilia by inhibition of procoagulant activity and prevents from complication such as stenosis and stricture by antifibrotic effect. Our study is first study which evaluate the efficiency of FXa inhibiton with Rivaroxaban in experimental colitis model. There is no clinical and experimental trials with Rivaroxaban in IBD. Further trials about efficiency and clinical use is required.

**Key Words:** Factor Xa, IBD, Rivaroxaban, TGF- $\beta$ 1, MMPs