

**T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
GENEL CERRAHİ
ANABİLİM DALI**

Tez Yöneticisi
Doç. Dr. Tamer SAĞIROĞLU

**ASETİK ASİT İLE DENEYSEL KOLİT
OLUŞTURULAN SIÇANLARDA SİROLİMUS
KULLANIMININ İNFLAMATUVAR SÜRECE
ETKİSİ**

(Uzmanlık Tezi)

Dr. Eyüp KAHYA

EDİRNE – 2013

TEŐEKKÜR

Genel Cerrahi Anabilim Dalı'ndaki uzmanlık eğitimim boyunca katkılarından dolayı tez danışmanım Doç. Dr. Tamer SAĞIROĞLU'na, Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. Aydın ALTAN'a, tecrübe ve bilgileri ile yetişmemde emeği geçen Prof. Dr. Zeki HOŐCOŐKUN'a, Prof. Dr. İrfan COŐKUN'a, Doç. Dr. Ahmet Rahmi HATIPOĞLU'na, Doç. Dr. A. Cem İBIŐ'e, Doç. Dr. Y. Atakan SEZER'e, Doç. Dr. Serhat Oğuz'a, Yrd. Doç. Dr. Doğan ALBAYRAK'a, araŐtırmam süresince yardımlarını esirgemeyen Doç. Dr. Turan KARACA'ya ve beraber çalıŐtıđım tüm mesai arkadaşlarıma teŐekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

| | |
|---|----|
| GİRİŞ VE AMAÇ | 1 |
| GENEL BİLGİLER | 3 |
| İNFLAMATUVAR BARSAK HASTALIKLARI | 3 |
| PROLİFERE HÜCRE NÜKLEER ANTİJENİ | 14 |
| SİROLİMUS | 14 |
| GEREÇ VE YÖNTEMLER | 18 |
| BULGULAR | 23 |
| TARTIŞMA | 45 |
| SONUÇLAR | 48 |
| ÖZET | 49 |
| SUMMARY | 50 |
| KAYNAKLAR | 52 |
| EKLER | |

KISALTMALAR

| | |
|--------------------------------|--|
| 5-ASA | : 5 Aminosalisilik Asit |
| CD | : Cluster of Differentiation |
| CH | : Crohn Hastalığı |
| CRP | : C-Reaktif Protein |
| CSA | : Siklosporin |
| CTLA-4 | : Sitotoksik T Lenfosit İlişkili Antijen 4 |
| FKBP-12 | : Faktör Bağlayıcı Protein-12 |
| HE | : Hematoksilin - Eozin |
| HLA | : Human Leukocyte Antigens |
| IBD | : Inflammatory Bowel Disease |
| IFN γ | : İnterferon γ |
| IL | : İnterlökin |
| İBH | : İnflamatuvar Barsak Hastalıkları |
| MPO | : Myeloperoksidaz |
| P- ANCA | : Anti Nötrofil Cytoplazmic Antikor P alt tipi |
| Th | : T Helper |
| TL1A | : TNF-Like Factor 1A |
| TNF-α | : Tümör Nekroz Faktör- α |
| TOR | : Target of Rapamisin |
| ÜK | : Ülseratif Kolit |

GİRİŞ VE AMAÇ

İnflamatuvar barsak hastalıkları (İBH) gastrointestinal kanalın kronik inflamatuvar patolojileridir. Ülseratif Kolit (ÜK) ve Crohn Hastalığı (CH), İBH'nin en önemli iki örneği olup tanısı; klinik, endoskopik ve histolojik bulguların değerlendirilmesi sonucu konur. Yaklaşık bir asırdır bilinmesine rağmen, İBH'nin etyopatogenezi tam olarak ortaya konulamamıştır. İBH'de genetik yük, çevresel faktörler ve mukozal immün yanıtın karmaşık bir etkileşimi söz konusudur. İBH, hem doğal hem de edinsel immün sistemin aktif olarak olaya katıldığı, inflamasyonla sonlanan bir süreçtir. Bu süreç başladıktan sonra kronik, tekrarlayıcı bir karakter kazanır, denetlenemez, kontrol edilemez, hafifletilemez ve doku hasarı ile sonuçlanır. İnflamasyon sadece gastrointestinal kanalda sınırlı olmayıp, birçok sistem ve organı da ilgilendiren zengin klinik tablolara neden olabilir (1).

Altta yatan neden ne olursa olsun kolonda ortaya çıkan hasarda, dokunun yanıtı hemen hemen aynı şekilde olmaktadır. Bu yanıt sonucu oluşan nonspesifik inflamatuvar kolitin akut döneminde; çeşitli derecelerde mukozal ülserasyon ve erozyon, kolon bezlerinin distorsiyonu, goblet hücrelerinin azalması, mukozal ve submukozal ödem ve buna eşlik eden inflamatuvar hücre infiltrasyonu görülmektedir (1).

İBH'de inflamatuvar yanıt bilinmeyen bir patojene karşı geliştirilmiş normal bir yanıt olabileceği gibi bilinen bir ajana karşı verilen sıra dışı bir yanıt da olabilir. Barsak epitelinin iltihabi olayları başlatmaktaki rolü; bir taraftan antijen sunan hücre olarak antijeni major histokompatibilite kompleksi aracılığıyla T hücrelerine sunmak, diğer taraftan da antijenler aracılığıyla uyarılan sitokin, kemokin ve diğer proinflamatuvar maddelerin meydana getirdiği inflamasyonu yaymaktır. İBH'de barsak epitel hücresi antijen sunan hücre olarak görev yaptığında normal insanlardakinin aksine T hücre toleransı yerine T hücre aktivasyonu

meydana gelmektedir. Bu bozukluk bazı Human Leukocyte Antigens Class 2 (HLA-2) haplotipleri ile ilişkilidir. Sonuç olarak T lenfosit alt gruplarında tekrarlayan bir aktivasyon oluşur. İBH'deki inflamatuvar süreci tam olarak anlamak ve çeşitli aşamalarına müdahale etmek hastalığın tedavisinde yeni ufuklar açacaktır (1).

Sirolimus diğer immunosupresanlardan farklı bir mekanizma ile antijen ve sitokin uyarılmasına cevap olarak oluşan T-lenfosit aktivasyonunu ve çoğalmasını önlediği gibi antikor oluşumunu da önler. Sirolimus immunosupresif kompleks oluşturmak üzere hücrelerde immunofilin, faktör bağlayıcı protein-12'ye (FKBP-12) bağlanır. Bu kompleks memelilerde düzenleyici bir kinaz olan "Target of Rapamisin" (TOR)' a bağlanarak aktif hale gelmesini önler. TOR'nin aktif hale gelmesinin önlenmesi ile hücre siklusunun G1 fazından S fazına geçmesi önlenerek sitokine bağlı T-hücre çoğalması baskılanır (2).

Çalışmamızda, asetik asit ile deneysel kolit oluşturulan ratlarda, oral sirolimus uygulamasının inflamatuvar sürece ve kolon mukozasındaki makroskopik, mikroskopik ve immüno histokimyasal değişikliklere etkisi incelenecektir.

GENEL BİLGİLER

İNFLAMATUVAR BARSAK HASTALIKLARI

Tanım

İnflamatuvar barsak hastalıkları, intestinal inflamasyon ve mukozal doku hasarıyla başlayan, intestinal ve ekstra intestinal belirtilere sebep olan, bozulmuş immün cevapla karakterize, sık görülen kronik bir gastrointestinal sistem hastalığıdır. İBH başlığı altında birbiriyle ilişkili ancak iki farklı hastalık olarak tanımlanan ÜK ve CH yer almaktadır. ÜK, rektumdan proksimale doğru değişik uzunluklardaki (arada sağlam kısım bırakmaksızın) kolon mukozasını tutan, remisyon ve alevlenmelerle seyreden kronik bir hastalıktır. CH ise ağızdan anüse kadar tüm sindirim kanalını segmenter tarzda ve transmural olarak tutan, remisyon ve alevlenmelerle seyreden bir hastalıktır. Her ikisi de sadece sindirim kanalına özgü hastalıklar olmayıp, barsak dışı tutulumları da olabilen sistemik hastalıklardır (3).

Epidemiyoloji

Rastlanma sıklığı coğrafik bölgelere göre büyük farklılıklar gösteren ÜK ve CH, Kuzey Avrupa ülkelerinde, Kafkas ırkında ve Yahudilerde daha fazla görülmektedir (4). Her iki hastalık da her yaşta görülebilmeye karşın en sık 2 - 3. dekada başlar, 55 - 65 yaşlarında ikinci kez pik yapar. Kadınlarda, erkeklere nazaran daha fazla görülür. ÜK olgularının % 5'inde ailevi bir yatkınlık bulunur. Hastalığın prevalansı tüm popülasyonda 20-130/100000 iken insidansı 1.3-15.1/100000/yıl'dır. CH, beyaz ırkta daha sık görülür. Hastalığın prevalansı tüm popülasyonda 10-70/100000 iken insidansı 0.5 - 6.3/100000/yıl'dır (5).

Etyopatogenez

Genetik faktörler: Batı Avrupa, Kuzey Amerika, Yahudi, Japon topluluklarında ve beyaz ırkta sık görülmektedir (6). İBH'de en önemli risk faktörü pozitif aile öyküsüdür (7). % 15 hastanın birinci derece akrabalarında İBH vardır (8). Aile öyküsü CH'de ÜK olgularına göre daha belirgindir. ÜK olgularının birinci derece akrabalarında ÜK olasılığı % 5.7 – 15.5, CH olasılığı % 6.6 – 15.8 olarak belirlenmiştir. Akrabalar arasında hastalığın tipi, davranış paterni ve ekstraintestinal semptomlar büyük ölçüde benzerlik göstermektedir (9). Bazı genlerde genetik yatkınlığın saklandığı ve çevresel faktörlerin bunları aktive ettiği ileri sürülmektedir. ÜK olguları ile HLA-2 ile ilişkisi araştırılmış; HLA-DRB1*1502 ve HLA-DRB1*0103 ile bağlantı bulunmuştur. HLA sistemi yanısıra proinflamatuvar ve reglatuvar sitokinleri kodlayan genlerdeki polimorfizmin de etkili olabileceği yönünde araştırmalar mevcuttur. İnsidans monozigot ikizlerde artmıştır. Hastalığa yatkınlığı belirleyen ve hastalık spesifitesini etkileyen genler, hastalığın yaygınlığı ve şiddeti ile medikal tedaviye cevabı gibi klinik fenotipi belirleyen genlerden farklıdır (10). Kromozom 16, 12, 6, 14, 5, 19, 1 ve 3 ile İBH arasında bağlantılar saptanmış, bunlar Inflammatory Bowel Disease (IBD) 1–9 genleri olarak isimlendirilmiştir (11).

Çevresel faktörler: İBH patogenezinde çevresel faktörlerin rolü en az bilinmektedir. Bu rolün önemi, geçen 50 yıl içinde az gelişmiş ülkelerde ilerleyen endüstrileşme ile hastalığın artması ve gelişmiş dünyada CH'nin sıklığındaki göze çarpan artışla desteklenmiştir. Gastrointestinal kanal vücudun en çok antijenle karşılaşan bölümlerindedir. Bu antijenli gıdalar, gıdalardaki katkı maddeleri, dışarıdan alınan bakteriler ve flora bakterileri mukozal immün yanıtı başlatabilir. İnsan organizması sağlıklı şartlarda bile proksimal ince barsaklardan kolona doğru artan şekilde büyük oranda bakteri barındırmaktadır. İBH'nin patogenezinde mukozal düzeyde flora bakterileri ve bunlara yönelik immün yanıt arasında dinamik dengenin önemli rol oynadığı düşünülmektedir (12).

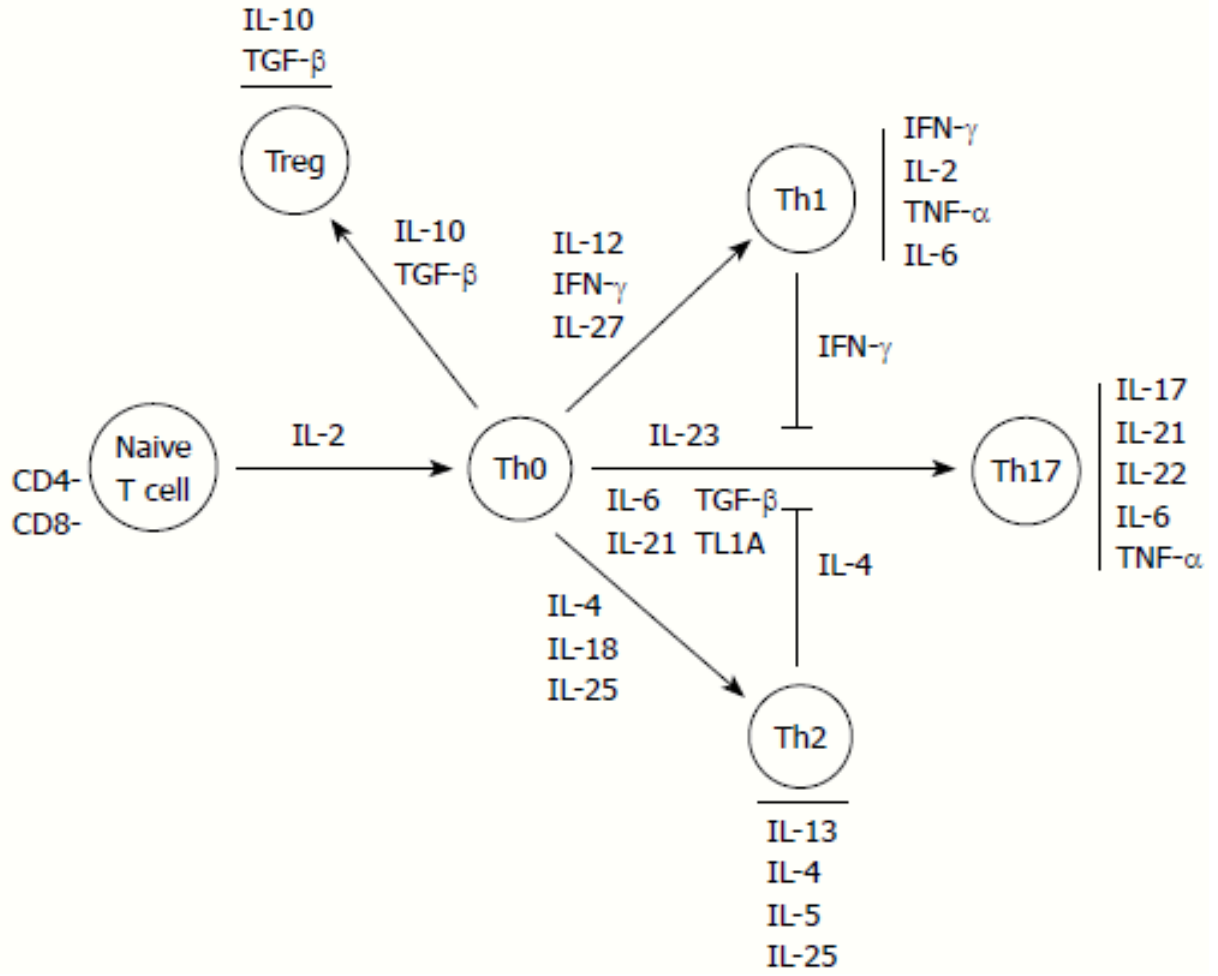
Mikrobiyal ajanlar İBH patogenezi ile sıkı ilişkili görünmektedir. Geçtiğimiz 40 yıl boyunca organizmalar üzerinde yoğun araştırmalar yapılmasına rağmen tek bir spesifik enfeksiyonun İBH'nin patogenezinde rolü olduğu açıkça gösterilememiştir. İBH olgularda Bacteroides, Eubacterium ve Lactobasillus gibi normal kolon florası azalmış olup, Pectinatus, Sutterella, Clostridia, Fusobacterium, M. paratuberculosis, Verrucomicrobium, Helicobacter Hepaticus gibi patojenler artmıştır (13). Genetik olarak duyarlı bireylerde mukozal

geçirgenliğin artması, patojen bakterilere verilen yanıtın artmasına, normal flora bakterilerine toleransı azaltarak immün yanıtı başlatmaktadır (14).

Sigaranın, ÜK'ye karşı koruyucu, CH'de ise uyarıcı ve alevlendirici etkisi bulunmaktadır. Apendektominin, ÜK'e karşı koruyucu etkisi olduğu ileri sürülmüştür. Diyetle bulunan karbonhidrat, nişasta ve rafine sebze kullanımı, aşırı yağ alımı, meyve ve sebze lifli gıda alımı, fast food tipi beslenme, kahve, alkol, tahıl, hububat ve anne sütünün etiyojideki rolüne ait çelişkili yayınlar mevcuttur. Yüksek sosyoekonomik düzey ve hijyeni olan kişilerde ÜK insidansının arttığı görülmüştür. Nonsteroid antiinflamatuvar ilaç kullanımı, ÜK'yi ağırlaştırmakta ve inaktif ülseratif proktokoliti presipite ederek tekrarlamasına neden olmaktadır. ÜK'nin ilkbahar ve sonbaharda, CH'nin ise kış ve sonbaharda nüks ettiği bilinmektedir. Hastaların psikolojik durumu ve stres, hastalığı alevlendirmektedir (14).

Mukozal immün yanıt: İBH'deki defektlerden biri ve belki de en önemlisi; barsak epitelyum geçirgenliğinin artması ve normalde bu bariyeri geçemeyen besin antijenleri, bakteriyel toksinler ve mikroorganizmalar ile nonspesifik intestinal inflamasyonun tetiklenmesidir. Barsak epitelinin iltihabi olayı başlatmadaki rolü, bir taraftan antijen sunan hücreler olarak majör histokompatibilite kompleksi aracılığıyla T hücrelerine antijeni sunmak, diğer taraftan da antijenler aracılığıyla uyarılan sitokin, kemokin ve diğer proinflamatuvar maddelerin meydana getirdiği inflamasyonu dalga dalga yaymaktır. Musin yapısındaki değişiklikler de bu olaya katkıda bulunur (15).

Her iki hastalıkta da $CD4^+$ T hücreleri mukozada, bunların sekrete ettikleri sitokinler ise hem mukozada hem de periferik kanda artmıştır. $CD4^+$ T hücreleri özgül immün yanıtın kritik yönlerini düzenlerler. $CD4^+$ T hücreleri fonksiyonları ve özgül sitokinleri işleme yeteneklerine göre Th1 veya Th2 olarak sınıflandırılmıştır. Th1 hücreleri hücre aracılı immün cevabı düzenler ve IL-2, IL-12 ve INF- γ salgılama yetenekleri ile karakterizedirler. Aksine Th2 hücreleri salgısal cevaplara aracılık ederler ve IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 ve IL-13 salgırlar. Bu alt gruplar anahtar sitokinler arasında karşılıklı olarak bir diğerini düzenlerler. INF- γ , Th1 hücreleri tarafından üretilir ve Th2'nin gelişmesini baskılar halbuki IL-4, IL-10 ve IL-13, Th2 hücreleri tarafından salgılanır ve Th1 cevaplarını inhibe eder (16). T hücre diferansiyasyonu ve interlökin yolları Şekil 1'de gösterilmiştir.



IL: İnterlökin; **IFN:** İnterferon; **TGF:** Transforming Growth Factor; **TNF:** Tumor Necrosis Factor; **TL1A:** TNF-Like Factor 1A; **Th:** T helper; **CD:** Cluster of Differentiation.

Şekil 1. T hücre diferansiyasyonu ve interlökin yolları

ÜK'de sitokin yapıları tam olarak açıklanamazken, CH ise Th1 sitokinlerle ilişkilidir; ÜK'de Th1/Th2 oranı tam olarak uymaz ancak en azından oturmuş hastalıkta sitokin salgılanması Th2 cevabına daha çok benzer (16). Böylece CD4⁺ T hücreleri immün cevabın şekillenmesinde açıkça önemli bir rol oynar ve Th1 cevapların inhibisyonu İBH'nin, özellikle de Th1 etkilerinin kanıtlarının en güçlü olduğu CH'nin tedavisinde önemli bir hedef oluşturur. Hatta günümüzde inflamasyona yol açan esas anormalliğin kommensal bakterilere karşı mukozal aşırı cevaplılığa neden olan abartılı T hücre cevabının olduğu bilinmektedir (17). CH ve ÜK'li hastalardaki endojen florayla periferel kan ve kolonik lamina propria CD4⁺ T

hücrelerinin çapraz reaksiyonu, bu hastalıkların patogeneğinde konak florasına karşı anormal T hücre özgül immün cevabının önemini destekler (18).

Sağlıklı mukozada inflamatuvar cevap oluşumunda efektör ve regülatör T hücre alt toplulukları önemli görev üstlenir. Efektör T hücreleri intestinal inflamasyona neden olma yeteneğine sahiptir ve regülatör T hücreleri inflamasyonu kontrol edebilir veya önleyebilir. Regülatör T hücrelerinin *invivo* immün baskılayıcı aktivitesi IL-10 ve Tümör Büyüme Faktörü β (TGF- β) üretimini gerektirir ve T hücre aktivasyonunun negatif bir düzenleyicisi olan sitotoksik T lenfosit ilişkili antijen-4 (CTLA-4) aracılığıyla sinyallenmeye bağlıdır. Patojenlerle uğraşan aktif T hücrelerindeki apoptozun hızlanması immün cevabın sonlanmasına neden olur (19). CH'lilerde mukozal T hücreleri apoptoza dirençlidir ki bu durum T hücrelerinin yığılmasına ve inflamatuvar cevabın devam etmesine neden olur. Bu direncin, IL 6'nın yüksek mukozal konsantrasyonlarıyla T hücrelerinin sinyallenmesine bağlı olduğu ileri sürülmüştür (20).

Patoloji

Ülseratif kolit, genellikle rektumu ve kolonun proksimale doğru yayılan bir kısmını veya tamamını tutabilen mukozal bir hastalıktır. Hastaların % 40 - 50'sinde tutulum rektum ve rektosigmoide sınırlıdır; % 30 - 40'ında ise sigmoid kolonun proksimaline geçmekte ancak tüm kolonu tutmamaktadır; % 20'sinde de pankolit mevcuttur. Proksimale yayılımın devamlılığı mukozada tutulmamış alan bırakmaksızın gerçekleşir. Tüm kolon tutulduğunda hastaların % 10 - 20'sinde inflamasyon terminal ileumun 2 - 3 cm içine yayılmaktadır. Buna taşma tipi ileit Backwash ileitis adı verilir (21). Backwash ileitinde endoskopik değişiklikler hafif ve yüzeysel olup çok az klinik önem taşırlar. Her ne kadar makroskopik aktivitedeki varyasyonlar atlayan alanlar olduğu izlenimini verse de normal görünen mukozadan alınan biyopsiler genellikle anormaldir. Bu nedenle endoskopi sırasında proksimal veya distalde tutulum yokmuş gibi görünen mukozadan da çoklu biyopsi alınması oldukça önemlidir. Efektif tıbbi tedavi alan hastalarda atlayan lezyonlar ve buradan alınan biyopsilerde mikroskopik olarak normal saptanabilmektedir. Hafif inflamasyonda mukoza eritematöz görünümündedir ve zımpara kağıdına benzeyen ince granüler yüzeye sahiptir. Daha şiddetli hastalıkta mukoza hemorajik, ödematöz ve ülser görünümündedir. Uzun süredir devam eden hastalıkta epitelyal rejenerasyonun sonucu inflamatuvar polipler (psödopolipler) oluşabilir. Remisyonda mukoza normal görünebilir. Ancak uzun yıllardır hasta bireylerde atrofik, niteliksiz görünümde olan tüm kolon daralmış ve kısalmış hale gelir. Fulminan hastalıklı

bireylerde barsak duvarının incelendiği ve mukozanın ileri derece ülser olduğu kısımda toksik kolit veya megakolon gelişebilir ve bu perforasyona neden olabilir (1,7,21).

Histolojik bulgular, endoskopik görünüm ve ÜK'nin klinik seyri ile eş güdümlüdür. İnflamatuvar olaylar fulminan hastalık dışında mukoza ve yüzeysel submukozaya sınırlı olup derin tabakalar etkilenmemiştir. ÜK'de iki majör histolojik özellik kronik hastalık izlenimi uyandırmakta ve infeksiyöz veya akut kendi kendine sınırlayan kolitten ayırmada yardımcı olmaktadır. Birincisi kolonda kript mimarisi bozulmuş, kriptlerin sayısı azalmış, ikiye bölünmüş ve çoğu zaman kript tabanı ve muskularis mukoza arasında boşluk oluşmuştur. İkincisi bazı hastalarda bazal plazma hücreleri ve multipl lenfoid agregatlar mevcuttur. Nötrofiller, lenfositler, plazma hücreleri ve makrofajlardan oluşan inflamatuvar hücre infiltratı, fokal hemoraji ve ödemle birlikte mukozal vasküler konjesyonu oluşturmaktadır. Kriptlerde epitele nötrofil akımı, genelde kriptide neden olur. Sonuçta kript apsesi gelişir. Backwash ileitli bireylerde ideal değişiklikler villöz atrofiyi artmış inflamasyon ile birlikte kript rejenerasyonunu lamina propriada artmış nötrofil ve mono nükleer inflamasyonu, yamalı kriptiti ve kript apselerini içermektedir (1,7,21).

Klinik

Ülseratif kolitte majör semptomlar diyare, rektal kanama, tenezm, mukus pasajı ve kramp tarzında karın ağrısıdır. Semptomların şiddeti hastalığın yaygınlığıyla doğru orantılıdır. ÜK akut olarak kendini gösterse de genellikle semptomlar haftalar veya aylar önce başlamaktadır. Bazen diyare ve kanama aralıklı ve hafif olabilir. Bu nedenle hasta tıbbi yardım aramaz. Proktitli hastalar genelde taze kan veya kanlı mukus, kanla karışık gaita ya da sert gaita üzerinde çizgilenme bildirmektedirler. Aynı zamanda tenesmus veya tam olmayan dışkılama isteği hissi ile birlikte sıkışma tariflerler. Ancak nadiren karın ağrıları mevcuttur. Proktit veya proktosigmoiditte proksimal geçiş yavaşlar. Bu nedenle distal hastalığı olan bireylerde konstipasyon görülebilmektedir. Hastalık rektumun proksimaline yayıldığında kan genellikle gaita ile karışıktır veya şiddetli, kanlı diyare dikkat çekici olabilir. Diyare çoğu zaman nokturnal ve / veya yemek sonrasıdır. Şiddetli ağrı, belirgin semptom olmamasına rağmen aktif hastalığı olan bazı bireyler karın alt bölgede müphem bir rahatsızlık hissi veya göbek çevresinde hafif bir kramp tarif ederler. Şiddetli kramp ve karın ağrısı hastalığın şiddetli ataklarıyla oluşur. Bulantı, iştahsızlık, kusma, ateş ve kilo kaybı hastalığıdaki diğer semptomlardır. Anal kanalda hassasiyet ve rektal muayenede kan proktitte fiziksel belirtileri oluşturmaktadır. Daha yaygın hastalıkta kolon üzerine palpasyonda hassasiyet mevcuttur.

Toksik kolitli bireylerde şiddetli ağrı ve kanama görülmekte ve megakolonda hepatik bölgede timpanik ses alınmaktadır. Eğer perforasyon gelişmişse peritonit işaretleri mevcuttur (1,7,21,22).

Laboratuvar, Endoskopik ve Radyolojik Özellikler

Ülseratif kolit olgularında laboratuvar değişiklikleri inflamatuvar aktivitenin yaygınlığı ve şiddeti ile paralellik gösterir. İnflamasyon ne kadar geniş bir bölgede ve ağır ise o kadar çarpıcı laboratuvar değişiklikleri saptanır. Aktivite azaldıkça laboratuvar bulguları düzelir ve remisyon döneminde ise tamamen normalleşir. Aktif hastalıkta C-Reaktif Protein (CRP) en hızlı artan akut faz belirteçidir. CRP, IL-6 etkisiyle karaciğerden sentezlenir ve yarılanma ömrü 19 saat gibi kısa sürelidir. Bu nedenle inflamasyondaki değişiklikleri dinamik olarak izlememize yardım eder (23). Eritrosit sedimentasyon hızı aktif olgularda süratlenir, ancak inflamasyondaki düzelmeyi, CRP kadar hızlıca yansıtamaz. Aktif olgularda hemogram değişiklikleri de gözlenir; örneğin orta yükseklikte nötrofil lökositoz, trombositoz, uzun süreli aktif olgularda hipokrom mikrositer anemi saptanabilir. Son yıllarda inflamasyonu değerlendirmek için fekal belirteçlerden yararlanılmaktadır. Özellikle fekal kalprotektin ve laktoferrin en sık kullanılanlardır. Her iki bileşikte aktive nötrofillerden salgılanan moleküllerdir ve inflamasyon ile iyi bir korelasyon gösterir. Ancak ekonomik olmamaları nedeniyle yaygın olarak kullanılmamaktadır. Özellikle fekal kalprotektin histolojik aktivite ile yakın bağlantı göstermektedir. Nüksleri ve poş inflamasyonunu ön görmede çok yararlıdır (23).

Tanı; hastanın hikayesine, klinik semptomlara, negatif gaita muayenesine, sigmoidoskopik görünüme ve rektum veya kolon biyopsi örneklerinin histolojisine dayanır (21). ÜK serolojik belirteçlerle çalışılmaktadır. Anti nötrofil sitoplazmik antikor P alt tipi (P-ANCA), en sık ilişkilendirilmiş belirteçtir. P-ANCA aynı zamanda kolonik yerleşimli CH olgularında pozitif olabilir. P-ANCA ilişkili ÜK'de, tıbbi tedaviye direnç ve daha erken cerrahi gereksinime yatkınlık vardır. Ayrıca cerrahi sonrası ileal poş anal anostomoz yapılan hastalarda kronik poşit gelişmektedir (22).

ÜK olgularında endoskopik inceleme tanıda, anatomik yaygınlığın saptanmasında, tedavinin başarısının takibinde ve kolorektal kanser taranmasında kullanılan önemli bir araçtır. İleo-kolonoskopi başlangıçta tüm olgulara yapılarak değişik kolon segmentlerinden ve ileumdan biyopsiler alınmalıdır. Aktif olgularda inflamasyon diffüz, simetrik, kesintisiz olarak rektumdan proksimale doğru yayılır. Görüntü olarak mukoza ödemli, granüler, üzeri

mukus sıvalı, inflamasyon ağırlaştıkça küçük yüzeysel ülserlerden derine penetre olan biçime dönüşür. Mukoza dokunma ile ya da kendiliğinden kanayabilir (mukozal frajilite). Submukozal damar ağı kaybolmuştur. Hastalıklı ve slim bölge arasındaki sınır neredeyse keskin bir biçimde belirlemektedir. İnflamasyonun şiddeti kolonun distaline gidildikçe artmaktadır. Remisyon döneminde mukozada tam düzelme olabilir, bunun dışında mukozada atrofik hale gelebilir. Submukozal damar ağı yeniden belirir. Eğer mukozal onarım abartılı olarak gerçekleşirse polipe yapılar ortaya çıkar. Bunlara pseudopolip adı verilir. İnflamasyon uzun süreli ve kontrol edilemeyen şiddette devam ederse, premalign mukozal değişiklikler oluşabilir.

Ülseratif kolitte görünen en erken radyolojik değişiklik tek kontrastlı baryumlu grafide ince mukozal granülaritedir. Şiddetin artmasıyla mukozada kalınlaşır ve yüzeysel ülserler görülür. Derin ülserasyonlar yaka düğmesi şeklinde görünebilir ve ülserasyonun mukozaya penetre olduğunun göstergesidir. Hafif hastalıkta haustral kıvrımlar normal olabilir ancak aktivitenin artmasıyla ödematöz hale gelirler ve kalınlaşırlar. Özellikle uzun süreli hastalıkta haustrasyonlar kaybolur. Dahası kolon kısalmış ve daralmış hale gelir. Kolondaki polipler post inflamatuvar polip veya psödotopolip, adenomatöz polip ya da karsinom olabilir. Bilgisayarlı tomografi görüntülemesi tanıda endoskopi ve baryumlu grafi kadar faydalı değildir. Ancak hafif duvar kalınlaşması (< 1,5 cm) homojen olmayan duvar dansitesi ince barsakta kalınlaşmanın olmaması, perirektal ve presakral yağ artışı, rektumda hedef tahtası görünümü ve adenopati gibi tipik bulguları içermektedir (21).

Komplikasyonlar

ÜK genellikle yavaş başlangıçlı, uzun bir sürede dalgalanmalar gösteren bir hastalıktır. Çoğunlukla kanlı dışkılama başka bir nedene bağlanarak tanıda gecikmelere yol açar. Klinik şiddet açısından değerlendirildiğinde olguların % 20'si hafif, % 71'i orta, % 9'u ise ağır aktiviteli olarak başlangıç gösterir (24). Etkin bir medikal tedavi ile ÜK olgularında komplikasyon olasılığı azaltılabilir.

Hastaların % 1'inde şiddetli ataklarda masif kanama olur ve genellikle hastalığın tedavisiyle kanama da durmaktadır. Ancak 24 – 48 saat içinde 6 – 8 ünite kan gerekirse kolektomi endikedir. ÜK'nin şiddetli ataklarında haustrasyonların kaybı, transvers veya sağ kolonun çapının 6 cm'yi geçmesi toksik megakolon olarak tanımlanmıştır. Mega kolon atakların % 5'inde gelişebilir; elektrolit anormallikleri ve narkotik kullanımı bu durumu tetikleyebilir. Akut dilatasyonların % 50'si tek başına tıbbi tedavi ile gerilemektedir. Ancak

düzelmenin olmadığı durumlarda acil kolektomi gereklidir. Özellikle glukokortikoid alan hastalarda perforasyon lokal komplikasyonların en tehlikelidir ve peritonitin fiziksel bulguları aşık hale gelebilir. Her ne kadar perforasyon oldukça seyrek görülse de toksik kolon ile komplike olmuş hastalarda perforasyonun mortalitesi % 15'tir. Dahası hastalarda dilatasyon olmadan pefore olabilecek toksik kolit ve ağır ülserasyonlar gelişebilir (1,7,21,22). Striktürler hastaların % 5–10'unda gelişir ve altta yatan neoplazi olasılığı nedeniyle ÜK'de her zaman kaygılandırmaktadır. ÜK'de inflamasyon ve fibrozis zemininde selim striktürler gelişebilse de kolonoskopiyle geçilemeyen striktürler, aksi kanıtlanana kadar habis farz edilmelidir. Kolonoskopun geçişini engelleyen bir striktür, cerrahi endikasyonudur. ÜK hastalarında zaman zaman anal fissürler, perianal apseler veya hemoroidler gelişebilir. Ancak yaygın perianal lezyonların varlığı CH'yi akla getirmelidir (1,7,21,22).

Ekstraintestinal Bulgular

İnflamatuvar barsak hastalığı primer olarak barsağı tutmakla beraber diğer organ ve sistemlerdeki bulgular da eşlik edebilir. Ekstraintestinal bulgular klinik aktivitesi barsak hastalığının aktivitesine bağlı olanlar ve barsak hastalığının aktivitesinden bağımsız olanlar olarak iki ana grupta değerlendirilebilir. Bunlardan gezici artrit, piyoderma gangrenosum, eritema nodosum hastalığın kontrol altına alınmasıyla birlikte gerilerler. Tersine sklerozan kolanjit, ankilozan spondilit barsak hastalığı kontrol altına alınsa dahi progrese olmaya devam edebilir. Yine İBH'de tromboembolik olaylara yatkınlık, üveit ve episklerit gibi oküler komplikasyonlar, metabolik kemik, malabsorpsiyon ve üriner kalkül görülebilir (1,7,21).

Tedavi

İBH'de medikal tedavinin amacı aktif hastalık durumunda remisyonu sağlamak, remisyondaki hastalıkta ise bu süreci uzatmaktır. Tedavi genellikle ömür boyu yapılır. Tedavi hastalığın yerleşim yerine, ağırlık derecesine ve komplikasyonların varlığına göre belirlenir. Hastalarda kullanılan başlıca ilaçlar; antiinflamatuvarlar, immunosupresifler, immunomodulatörler, antibiyotikler ve destekleyici ajanlardır (25).

Aminosalisilatlar: İnflamatuvar barsak hastalıklarının temel ilacı antiinflamatuvar etkili aminosalisilatlardır. İlk kez 1965 yılında kullanılmaya başlanmıştır. Bu grubun ilk üyesi olan sulfasalazin, sulfapiridine azo bağıyla bağlanmış 5-aminosalisilik asid'den (5-ASA) ibarettir. Bu bileşikteki sulfapiridin taşıyıcı olup, esas etkili ve aktif kısmı 5-ASA'dır. Bunlardan klinik kullanımda olanları olsalazin, mesalazin ve balsalaziddir (25). 5-ASA'nın

muhtemel etki mekanizmaları arasında "Natural Killer" (NK) hücrelerinin, antikor sentezinin, siklooksijenaz ve lipooksijenaz yollarının ve nötrofil fonksiyonlarının inhibisyonu ile serbest oksijen radikallerinin temizlenmesi yer alır. 5-ASA ağız yoluyla direkt verildiğinde, hemen hemen tamamı üst sindirim kanalından emilir ve kana geçer. İBH'de 5-ASA, etkisini sindirim kanalındaki inflamasyonlu bölgeye ulaşıp diffüz olarak da gösterir, yani topikal etkilidir. Sulfasalazin ağız yoluyla alındığında çekuma ulaştınca bakteriler azoredüktaz enzimi aracılığıyla sulfasalazin ve 5-ASA arasındaki azo bağına parçalar ve aktif bileşik 5-ASA açığa çıkar. Sulfapiridin hızla emilip karaciğerde metabolize edilir ve idrarla atılır. 5-ASA'nın % 25 kadarı kolondan emilir, geri kalanı dışkı ile değişmeden atılır (7,25). Sulfasalazindeki taşıyıcı inaktif molekül olan sulfapiridin, sulfasalazin kullananlarda rastlanan yan etkilerin büyük kısmından sorumludur. Sulfasalazin alanların % 25-30'unda doza bağlı (bulantı, kusma, iştahsızlık, folat malabsorbsiyonu, baş ağrısı, saç dökülmesi) veya aşırı duyarlılığa bağlı (raş, hemolitik anemi, agranülositoz, toksik hepatit, pankreatit, fibrozan alveolit, oligo-azospermi) yan etkiler görülebilir. Hastaların % 15'inde bu yan etkiler sulfasalazinin kesilmesini gerektirecek ciddiyettedir (25). ÜK'de hem remisyonun sağlanması hem de idamesinde sulfasalazin ve 5-ASA bileşikleri eşdeğer dozlarda eşdeğer etkinliğe sahiptir, ancak sulfasalazin çok daha ucuzdur. Dolayısıyla ÜK'de ilk kullanılacak oral aminosalisilat bileşiği sulfasalazindir. Genç erkeklerde ve sulfasalazin intoleransında 5-ASA verilir. CH'de oral aminosalisilat seçimi hastalığın tutulum yerine göre yapılır (7,25).

Kortikosteroidler: ÜK'nin alevlenme dönemlerinde hızlı ve efektif olarak semptomları azalttıklarından hala önem taşımaktadırlar. Orta ve ciddi şiddetteki ÜK hastalarında ve CH'de kullanılmaktadır. Etki mekanizmaları arasında araşidonik asit oluşumunun engellenmesi, lökosit fonksiyonlarının değişmesi ve proinflamatuvar sitokin prodüksiyonunun azalması sayılabilir (1). Kortikosteroidlerin kısa ve uzun dönem yan etkileri yüzünden İBH'de çok uzun süre kullanılmaları önerilmez. Ayrıca bu hastalarda kortikosteroid tedavisine karşı direnç gelişebilir (26). Glukokortikoid reseptörleri yaygın olarak bulunduğu için kortikosteroid kullanımına bağlı yan etkiler kaçınılmazdır. Bu yan etkileri; hastaların büyük kısmında hemen başlayanlar (uyku bozukluğu, psikişik değişiklikler, Cushingoid görünüm, akne, iştah artması, sıvı retansiyonu, dispepsi), predispoze bir durumun aktive olması (hipertansiyon, psikoz, hiperglisemi, diyabet, peptik ülser), uzun süreli kullanıma bağlı (osteopeni, büyümede duraklama, miyopati, stria, santral yağ toplanması) ve idiyosenkroziye bağlı (vasküler nekroz, katarakt) olarak özetleyebiliriz (1,26). Kortikosteroidler orta, ağır ve

fulminan ÜK hastalığında, orta ve ağır CH'de remisyon indüksiyonunda birinci basamak ajanıdır. Oral, intravenöz (iv) ve lavman olarak çeşitli biçimlerde hastanın gereksinimine göre kullanılırlar.

İmmüsupresifler: ÜK'de pürin analogları olan 6-Merkaptopürin ve onun ön ilacı olan Azotiyopirin RNA ve DNA sentezini ve böylece hücre büyümesini inhibe eden pürin antagonistleridir. Steroid ihtiyacını azaltması ve dirençli vakalarda hızlı remisyon sağlaması son yıllarda kullanımını arttırmıştır. Akut hastalıkta 5-ASA preparatları ile aynı etkiyi gösterirler (27).

Siklosporin: Siklosporin-A (CSA) hem hücrel hem humoral immün sistemi inhibe eden lipofilik bir peptittir. TH lenfositlerinin IL-2 üretimini bloke eder. CSA siklofiline bağlanır ve bu kompleks T hücre aktivasyonunu sağlayan bir sitoplazmik fosfotaz enzimi olan kalsinörini inhibe eder. Ayrıca T hücrelerini bloke ederek dolaylı yoldan B hücre fonksiyonlarını da inhibe eder. İntravenöz glukokortikoidlere refrakter ağır ÜK'de iv verilen CSA etkili olup % 82 olguda cevap alınır. Kolektomiye alternatif olabilir. CSA ciddi toksisiteye neden olabilir. Renal fonksiyon monitörizasyonu sık yapılmalıdır. Hipertansiyon, gingival hiperplazi, hipertrikoz, parestezi, tremor, baş ağrısı, elektrolit anormallikleri, bilinen yan etkilerdir. Fırsatçı enfeksiyonlar açısından da dikkatli olunmalıdır (21).

Metotreksat: Bozulmuş DNA sentezi ile sonuçlanan dihidrofolat redüktaz enzimi inhibitörüdür. Ek antiinflamatuvar özellikleri IL-1 üretimindeki azalma ile ilişkili olabilir. Genellikle CH'de remisyon indüksiyonu ve glukokortikoid dozunu düşürmekte kullanılır. Lökopeni, hepatik fibroz, nadiren hipersensitivite pnömonisi potansiyel toksisitelerdir (21).

Takrolimus: Takrolimus CSA'ya benzer immünomodülatuar özellikleri olan makrolit gurubu antibiyotiktir. CSA'dan 100 kat daha potenttir. Emilimi mukozal bütünlüğe ve safraya bağlı değildir. Steroid bağımlı veya refrakter ÜK ve CH'de etkindir (21).

Antibiyotikler: İBH'nin tedavisinde antibiyotiklerin rolüne ilişkin çok az veri vardır. Bunlar CH'nin tedavisinde uzun süredir başarıyla kullanılırken ÜK'de etkinlikleri hakkında inandırıcı kanıtlar yetersizdir. CH'de, siprofloksasin ve metranidazolun kombinasyonu ile % 76 olguda cevap alınmıştır (28). Metranidazol, ileum ya da çıkan kolon tutulumu olan ve ağır

perianal hastalığı olan Crohn hastalarında kullanılmaktadır. Siprofloksasin ise metranidazolü tolere edemeyen hastalarda alternatif olarak kullanılmaktadır. Aynı antibiyotikler, fistüllü veya intraabdominal abseli Crohn hastalarında da başarıyla kullanılır (29).

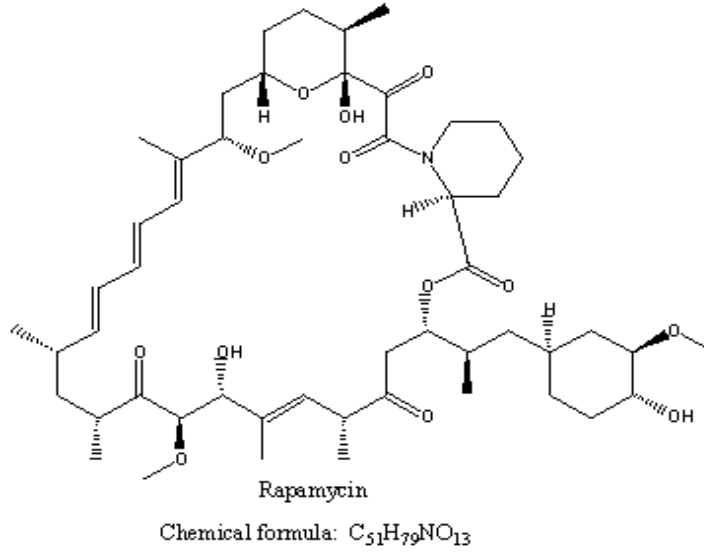
Biyolojik ajanlar: Anti TNF ajanlar kullanılan ilk biyolojik tedavilerdir. TNF α üzerine şimerik IgG1 antikorlu olan infliksimab orta ve ağır aktif ÜK'de kullanılmaktadır. Azotioprin ile kombine edildiğinde tek başına kullanımına göre steroidden bağımsız daha uzun remisyon süreleri elde edilmiştir. İnfliksimaba karşı gelişen antikorlar tedavinin etkinliğini düşürmektedir. Diğer TNF ajanlarda da (adalimumab, sertolizumab pegol) infliksimabta olduğu gibi hematolojik maligniteler, tüberküloz, fırsatçı fungal enfeksiyonların riski artmıştır. Başka tedaviler için monoklonal antikorlar (IL-12, IL-23) geliştirme çabası devam etmektedir (1,7,21,22).

PROLİFERE HÜCRE NÜKLEER ANTİJENİ

Prolifere hücre nükleer antijeni (PCNA), ilk kez 1986 yılında Bravo tarafından bulunmuş ve siklin olarak adlandırılmıştır. Geni 20. kromozomda yerleşiktir. Bu protein hem bitkilerde hem hayvanlarda bulunur. Hücrelerde başlıca DNA replikasyonu veya sentezi olan yerlerde bulunur (30). Genomik DNA replikasyonu, rekombinasyonu, tamiri ve DNA polimeraz gama için gerekli hücre proliferasyonunun başlamasında önemli rolü olan 36 kilodalton ağırlığında temel bir proteindir (30,31). Hücre siklusunun G₁ fazında sentezlenmeye başlayan PCNA, S fazında en yüksek seviyesine ulaşır. G₂ ve mitoz evresinde ise PCNA miktarı düşer. G₁ evresinden S evresine geçen hücrelerde PCNA ekspresyonu çekirdekte belirlenerek bir hücrenin mitotik aktivitesi izlenebilir (30). Kolon dokusunda hücre kaybı veya DNA sentezinde bozulmalar olduğu zaman PCNA düzeyi azalır.

SIROLİMUS

Sirolimus, diğer adıyla rapamisin, 1975 yılında Paskalya adasında bulunan toprak numunesinden elde edilen *Streptomyces hygroscopicus* adlı bakteri ailesinden izole edilmiş bir peptiddir (2). Kimyasal formülü C₅₁H₇₉NO₁₃ olup formülün şematize hali aşağıdaki gibidir (Şekil 2).



Şekil 2. Sirolimusun kimyasal yapısı (2)

Yirmi yılı aşan çalışmalar sonunda, rapamisin'in yeni bir immunsupresyon mekanizmasını da kapsayan çok çeşitli ve ilginç özellikleri ortaya konmuştur. Bu nedenle bu ajanla ilgili olarak kemoterapiden, organ transplant rejeksiyonuna; kardiak cerrahide uygulanan stentlerin açık tutulmasından, kornea yanıkları tedavisine pek çok alanda değişik denemeler yapılmış ve pek çoğunda da olumlu sonuçlar alınmıştır. Özellikle organ transplantasyonu konusunda kısıtlı donör sayısı göz önüne alındığında rejeksiyon gibi major bir problemin ortadan kaldırılmasının önemi daha iyi anlaşılacaktır. Diğer immunsupresan ilaçlardan farklı etki mekanizması ve az sayıdaki yan etkisiyle tıp dünyasında kısa sürede popülerlik kazanmış bu ajanla ilgili geniş çalışmalar halen devam etmektedir. Sirolimus 1999 yılında Food and Drug Administration (FDA) onayı almış ve günümüzde kullanımı gitgide yaygınlaşmaktadır (32).

Bir serin-treonin kinaz inhibitörü olan sirolimus, hücre siklusunun G1 fazında duraklamaya ve apoptoza yol açar. Sirolimus, programlı hücre ölümünü ve T hücrelerde apoptoza tetikleyerek immün sistemi bloke eder. Sirolimus, T hücrelerinin zarına penetre olarak, FKBP12 (FK 506 bağlayıcı protein) adlı bir hücre içi reseptöre bağlanır. Bu kompleks daha sonra FRAP (FKBP-Rapamisin bağlayıcı protein) adlı hücre siklusunun G1 fazının regulasyonunu sağlayan bir proteine bağlanarak T hücrelerinin IL-2'ye olan proliferasyon şeklindeki cevabını inhibe eder. Bu şekilde sirolimus hücre siklusunu G1 fazından tranzisyon fazına geçiş esnasında durdurur. Buna karşılık immunsupresan olarak kullanılan diğer benzer ajanlar siklosporin ve FK-506, kalsinorine bağlanıp kalsiyum metabolizmasını etkileyerek

aktivite gösterirler. Bu nedenle, bu ajanlar kullanıldığında hücre siklusu G0 fazından G1 fazına geçiş sürecinde duraklar. Sirolimus selektif olarak T hücre siklusuna müdahale ettiğinden benzer yan etkiler bu ajanın kullanımında görülmez (33).

Sirolimus yalnızca aktive olmuş hücreleri etkilediğinden, immun sistemin geri kalan hücreleri fonksiyonlarını devam ettirirler ve enfeksiyonlarla savaşmayı sürdürürler. Bunun esas sebebi sirolimusun hücre siklusuna girmiş hücreleri sentez fazına girmeden hemen önce inhibe etmesi ve esas fonksiyonunu proliferasyon üzerine göstermesidir (32). Sirolimusun p70S6 kinaz ve 4E-BP1'in fosforilasyonlarını bloke etmek yoluyla antitümoral etki gösterdiği de çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir (34).

Sirolimus immunofilinlere bağlanarak etki gösteren immunsupresiflerdendir. Sirolimus-FKBP12 kompleksinin spesifik hedefi mTOR adlı bir polipeptid kinaz olup, enzimin aktivitesi kompleks tarafından bloke edilir. TOR proteinleri, hücre döngüsü progresyonu, DNA onarımı ve kombinasyonunu da içeren pek çok hücre fonksiyonunda görev alır. mTOR bu anahtar basamaklarda protein translasyonunu etkileyerek regülasyonu sağlar (34).

Sirolimusun selektivite oranı oldukça yüksek olup, yaklaşık 500 kat civarındadır. Doza bağımlı olarak immunsupresif etki gösterir. Düşük dozlarda (0,25 mg/kg/g) yalnızca immunsupresif etkileri mevcutken, daha yüksek dozlarda (0,5 mg/kg/g) antifibroblastik, antiproliferatif ve neovaskülarizasyonu önleyici etkileri eklenir. Oral doz sonrası en yüksek plazma konsantrasyonuna insanlarda yaklaşık 3-3,5 saat sonra erişirken, ratlarda bu süre yaklaşık 2-2,5 saat kadardır. Oral uygulama sonrası insanlarda ve ratlarda absorpsiyon oranları yüksektir, biyoyararlanımı % 90 olarak belirlenmiştir. Ratlarda % 87, insanlarda % 84 oranında plazma proteinlerine bağlandığı bildirilen sirolimusun yarılanma ömrü insanlarda 20 saat, ratlarda ise 16 ila 18 saattir. Sirolimus ratlarda ve insanlarda karaciğerde metabolize edilerek idrarla atılır. Sitokrom p-450 sistemi üzerine etkisi yoktur. Yan etkileri genellikle doza bağımlı ve geri dönüşümlüdür (32,33).

Sirolimusun en sık karşılaşılan yan etkileri; artmış lipid ve kolesterol seviyeleri, hipertansiyon, anemi, diyare, dermatit, akne ve trombositopenidir. Sirolimusun terapötik dozda kullanımı sırasında gaita renginde koyulaşma, göğüs ağrısı, halsizlik, nefes darlığı ve kilo kaybı görülebilir ancak bunlar genellikle zararsız ve ilacın bırakılmasıyla geri dönüşümlüdür. Hastalar genellikle anksiyete ve depresif düşünceden yakınır ancak bu şikayetler çoğunlukla subjektiftir (32).

Çalışmamızda deneysel kolit oluşturulan ratlarda, sirolimus tedavisinin inflamatuvar sürece ve kolon mukozasındaki makroskopik, mikroskopik ve immüno histokimyasal değişikliklere etkisi incelenerek, İBH tedavisinde yeni bir görüş sunmak hedeflenmiştir.

GEREÇ VE YÖNTEMLER

Çalışmamız Trakya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi Komisyonu (TÜBAP) desteğiyle Ağustos 2012 – Nisan 2013 tarihleri arasında Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Genel Cerrahi Anabilim Dalı, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı işbirliği ile Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Araştırma Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir. (TÜBAP proje No: 2012/164) (Ek 1). Araştırma izni Trakya Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul tarafından onaylandı (Ek 1 TÜHDYEK- 2012.06.04). Trakya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi Komisyonu (TÜBAP) tarafından desteklendi (TÜBAP proje No: 2012/164) (Ek 2).

Ağırlıkları 225–275 gram arasında değişen, 28–32 haftalık 30 adet Spraque–Dawley dişi sıçan kullanıldı. Gruplar randomize olarak her biri 10'ar sıçandan oluşan 3 gruba ayrıldı. Gruplar ayrı kafeslerde standart laboratuvar koşullarında 22 ± 1 °C, % 55 nem, 12 saat aydınlık, 12 saat karanlık olacak şekilde uygun ortamda bırakılarak standart sıçan yemi ile beslendi. Hepsinin günlük temizlikleri düzenli olarak yapıldı.

Her bir sıçana kolit oluşturmak için, bir kez intrakolonik olarak 1 mL verilmek üzere % 0,9 sodyum klorür içinde % 4'lük asetik asit çözeltisi hazırlandı. Yirmidört saat aç bırakılan sıçanlara eter anestezi uygulandıktan sonra hazırlanan asetik asit solüsyonu, rektal yoldan 8 cm içeriye ilerletilen 6 F katatere vazelin ile yeterli kayganlık verilerek uygulandı. Solüsyon intrarektal olarak verilirken, rektum yukarıda olacak şekilde pozisyon verilip 30 saniyede yavaş bir şekilde verildi ve daha sonra solüsyonun rektumdan geri kaçmasını önlemek için 1 dakika kadar rektum yukarıda kalacak şekilde beklendi. Kontrol grubuna aynı

şekilde % 0,9 NaCl, 1 cc intrarektal uygulandı. Uygulama bittikten sonra sıçanlar tartıldı, ayrı numaralanmış ve gruplara ayrılmış olarak kafeslerine bırakıldı.

Grup 1'e (n=10, kontrol grubu) % 0.9 NaCl rektal uygulandı.

Grup 2'ye (n=10, kolit grubu) kolit oluşturmak için % 4 asetik asit (% 0.9 NaCl içerisinde) rektal bir kez verildi.

Grup 3'e (n=10, tedavi grubu) kolit oluşturmak için % 4 asetik asit (% 0.9 NaCl içerisinde) bir kez rektal verildi ve 10 gün süresince 0.8 mg/kg dozunda oral yoldan gavage tüpüyle sirolimus verildi.

Kolit indüksiyonunun 10. günü 50 mg/kg Ketamin ve 10 mg/kg Xylazine ile anestezi indüksiyonu sonrası IL-1, IL-10 ve MPO çalışılmak üzere intrakardiyak kan örneği alındı. Anestezi indüksiyonu sonrası kolit grubundaki ratlardan biri eksitus oldu. Kan örnekleri santrifüj edilip -80°C'de korundu. Anestezi verilen sıçanlara servikal dekapitasyon uygulandı. Açılan karın boşluğundan kolonun distal 8 cm'lik kısmı rezeke edildi ve longitudinal kesi sonrası kolon % 0.9 NaCl ile yıkanıp makroskopik olarak incelendi. Her 3 grubun makroskopik kolon görünümü normalden ağır ülserasyona kadar 0-6 arasında skorlandı (Tablo 1).

Tablo 1. Kolon makroskopik değerlendirmesi (35)

| Skor | Mukoza |
|------|---|
| 0 | Normal |
| 1 | Hiperemi |
| 2 | Ülserasyon yok, hiperemi ve ödem var |
| 3 | Tek ve küçük ülserasyon (< 1 cm) |
| 4 | İki ve daha fazla, küçük ülserasyon (< 1cm) |
| 5 | >1 cm ülserasyon |
| 6 | >2 cm ülserasyon |

Işık Mikroskopik İnceleme

Işık mikroskopik incelemeler için kolon dokuları, Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Işık Mikroskopi Laboratuvarı'nda işlemlendirildi. Bu amaçla kolon dokuları % 10'luk tamponlu formaldehit fiksatoründe 2 gün fikse edildikten sonra yıkama işlemine geçildi. Dokular artan alkol serilerinde (% 70, % 90, % 96, % 100) bir saat tutuldu. Dehidratasyon aşamasından sonra saydamlaştırma basamağı için dokular 2 seri

bir saat toluol ile muamele edildi. Gömme işleminden önce dokular yumuşak parafinde bir gece tutuldu. Bir sonraki gün kolon dokuları yumuşak parafinden alınarak bir saat sıvı parafinde tutularak bloklandı. Bu bloklardan Leica RM-2245 silindirik mikrotom bıçağı kullanılarak 5 µm kalınlığında kesitler alındı. Kolon segmentlerinin histolojik yapı değişikliklerini ortaya koyabilmek amacıyla alınan kesitler hematoksilin-eozin (HE) ile boyandı. Işık mikroskopunda (Olympus CX31-Japan) incelenerek, bulguların fotoğrafları çekildi. Buna göre ön planda izlenen lezyon olan mukozal ülserasyon yoğunluk ve yaygınlığına göre 0 ile 3 arasında derecelendirildi. Mikroskopik değerlendirme normal mukozadan total ülserasyona kadar 0-3 arasında skorlandı (Tablo 2).

Tablo 2. Kolon mikroskopik değerlendirmesi (35)

| | |
|----------|--|
| 0 | Ülserasyon yok |
| 1 | Minimal ülserasyon (40X büyütmede, 1 mikroskopik sahada) |
| 2 | Büyük ülserasyon (40X büyütmede, 1 mikroskopik sahadan daha fazla) |
| 3 | Total ülserasyon |

İmmunohistokimyasal İnceleme

PCNA incelemesi: İmmunohistokimyasal inceleme için kolon dokusundan 5 µm kalınlığında kesitler alındı ve deparafinizasyon işlemi takiben kesitler suya indirildi. Suya indirilen kesitler antijen retrieval içinde mikrodalga fırında 20 dk kaynatıldı. Kesitler oda sıcaklığında 20 dk soğumaya bırakıldıktan sonra fosfat buffer solüsyonu (PBS) ile yıkandı. Bu aşamadan sonra hidrojen peroksidad aktivitesinin giderilmesi için metanolde (Riedel-de Haen 24229) hazırlanan % 3'lük hidrojen peroksit (H₂O₂) ile 20 dk muamele edildi. Kesitler distile su içinde çalkalanarak PBS (pH 7,6) ile yıkandı. Özgül olmayan antikor bağlanmalarını bloklamak üzere kesitlere blocking solution (invitrogen 85-9043) uygulandı. Daha sonra kesitler nemli chamber içinde 1/100 oranında sulandırılmış primer antikor ile 1 saat süre ile inkübe edildi. Kullanılan antikor, mouse monoclonal anti-PCNA antibody (MS-106-B, Thermo LabVision, USA) idi. Kesitler 3 kez PBS ile yıkama sonrasında 20 dk sekonder antikor solüsyonunda (Biotinylated Goat Anti-Mouse, LabVision, TM-015-BN) tutuldu. Üç kez PBS'de yıkanan kesitlere 20 dk streptavidin peroksidad solüsyonu (Streptavidin Peroxidase, LabVision, TS-015-HR) uygulandı. Kesitlere 3 kez PBS ile yıkama sonrasında 10 dk 3,3-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) (invitrogen, 85-9043) uygulandı. Kesitler distile su ile yıkandıktan sonra 5 dk Mayer hematoksilin uygulanarak zıt boyama

yapıldı. Akarsuda 5 dk yıkanan kesitler sırasıyla % 70, % 80, % 90, % 96, % 100'lük alkollerden geçirilerek dehidrasyon yapıldı. Toluol ile saydamlaştırıldı. Kapatma mediumu (DPX mounting medium Biostain RRSP29/B) ile kapatıldı. Proliferasyon indeksi; 30 büyük büyütme sahasındaki PCNA ile boyanmış hücre sayısı ile total hücre sayısı hesaplanarak her 1000 hücreye oranı şeklinde tanımlandı (μm^2) ve ortalama PCNA pozitif hücre sayısı tespit edildi.

CD3⁺, CD5⁺ ve CD45⁺ T lenfositlerin incelenmesi: İmmunohistokimyasal inceleme için kolon dokusundan 5 μm kalınlığında kesitler alındı ve deparafinizasyon işlemini takiben kesitler suya indirildi. Lamlar mikrodalgaya dayanıklı özel şalelerde pH 6.0 sitrat buffer solüsyonu içine sıralanarak Vestel marka 1550 model mikrodalga fırında maksimum konumunda 5 dk, sonra medium konumunda tekrar 5 dk çevrilerek inkübe edildi. Daha sonra oda ısısında 20-25 dk soğumaya bırakıldı. Lamlar pH 7,2-7,4 PBS'de 3x5 dk yıkandı. Endojen peroksidaz aktivitesini bloke etmek için % 3'lük H₂O₂'nin distile sudaki solüsyonunda 20 dk inkübe edildi ve distile suda iyice yıkandı. Doku çevresi silinerek dokular nemli bir ortamda yatay konularak üzerine PAB (primary antibody) damlatıldı (Abbiotec-USA). CD3, CD5 ve CD45'de oda ısısında 90-120 dk bekletildi. PBS'de 3-5 dk yıkandı. Kesit çevresi silindikten sonra sekonder antibody (biotinli) damlatılarak 10 dk oda ısısında inkübe edildi. PBS'de 3x5 dk yıkandı. Kesit çevresi silindikten sonra HRP-streptavidin damlatılarak 10 dk oda ısısında inkübe edildi. PBS' de 3x5 dk yıkandı. Kesit çevresi silindi. AEC kromojen damlatıldı. 10 dk sonra mikroskop altında boyanma olup olmadığı kontrol edilerek dokular distile suya alındı. Weigert'ın demirli hematoksilen'de 1-3 dk zemin boyaması yapıldı ve musluk suyunda 3x5 dk yıkandı. Kesitler distile sudan geçirildi, su bazlı kapatma maddesi (Gliserin-jelatinle) ile kapatıldı.

Serum IL-1, IL-10 ve MPO Düzeylerinin Ölçülmesi

Serum IL-1, IL-10 ve MPO düzeyi için kan örnekleri 4000 devir/dakikada 10 dakika santrifüj edilerek serum ayrıştırıldı. Serum örnekleri eppendorf tüplerine konularak analiz gününe kadar -80 °C'de saklandı. Serum IL-1 düzeyi pg/mL olarak rat IL-1 ELISA kiti ile saptandı (Rat IL 1 ELISA Kit KRC0011, Invitrogen). Serum IL-10 düzeyi pg/mL olarak rat IL-10 ELISA kiti ile saptandı (Rat IL-10 ELISA Kit KRC0101, Invitrogen). Serum MPO düzeyi pg/mL olarak rat MPO ELISA kiti ile saptandı (Rat MPO ELISA Kit HK105, Hycult biotech).

İSTATİSTİKSEL ANALİZ

Verilerin istatistiksel analizinde Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyoistatistik Anabilim Dalı'nda SPSS 20.0 (seri no: 10240642) programı kullanıldı. Üç grubun nonparametrik değerleri Mann-Whitney U testi ile kıyaslandı. $p < 0,05$ değeri istatistiksel açıdan anlamlı kabul edildi.

BULGULAR

Kontrol grubundaki (Grup 1) sıçanların makroskopik ve mikroskopik kolon incelemesinde bir hasara rastlanılmadı (Tablo 3). Normal kolon mukozasının ışık mikroskopi incelemesinde lamina propria ve kript epitelleri düzenli iken, kolit oluşturulmuş kolon mukozasında yaygın ülserasyonlar görüldü (Şekil 5). Kontrol grubunun ortalama IL-1 değeri 2.39 pg/mL, IL-10 değeri 9.52 pg/mL, MPO değeri 8.68 pg/mL olarak bulundu (Tablo 4). Kontrol grubunun immunohistokimyasal değerlendirmesinde CD3⁺ T lenfositlerin dağılım ortalaması 18.56, CD5⁺ T lenfositlerin dağılım ortalaması 19.00, CD45⁺ T lenfositlerin dağılım ortalaması 17.84, PCNA profilerasyon indeksi 47.34 olarak bulundu (Tablo 5).

Tablo 3. Grup-1'in makroskopik ve mikroskopik değerlendirilmesi

| Grup-1 | Makroskopi | Makroskopik ülserasyon skoru | Mikroskopi | Mikroskopik ülserasyon skoru |
|-----------------|-------------------|-------------------------------------|-------------------|-------------------------------------|
| 1.sıçan | Normal | 0 | Ülserasyon yok | 0 |
| 2.sıçan | Normal | 0 | Ülserasyon yok | 0 |
| 3.sıçan | Normal | 0 | Ülserasyon yok | 0 |
| 4.sıçan | Normal | 0 | Ülserasyon yok | 0 |
| 5.sıçan | Normal | 0 | Ülserasyon yok | 0 |
| 6.sıçan | Normal | 0 | Ülserasyon yok | 0 |
| 7.sıçan | Normal | 0 | Ülserasyon yok | 0 |
| 8.sıçan | Normal | 0 | Ülserasyon yok | 0 |
| 9.sıçan | Normal | 0 | Ülserasyon yok | 0 |
| 10.sıçan | Normal | 0 | Ülserasyon yok | 0 |

Tablo 4. Grup 1'in IL-1, IL-10 ve MPO değerleri (Ort ± SS)

| | IL-1 | IL-10 | MPO |
|---------------|-------------|--------------|------------|
| Grup-1 | 2,39±2,70 | 9,52±5,04 | 8,68±8,45 |

IL 1: İnterlökin 1; **IL 10:** İnterlökin 10; **MPO:** Myeloperoksidaz; **Ort:** Ortalama; **SS:** Standart Sapma.

Tablo 5. Grup 1'in immunohistokimyasal değerleri (Ort ± SS)

| | CD 3 | CD 5 | CD 45 | PCNA |
|---------------|-------------|-------------|--------------|-------------|
| Grup-1 | 18,56±2,25 | 19±2,21 | 17,84±2,34 | 47,34±5,12 |

CD: Cluster of Differentiation; **PCNA:** Proliferating Cell Nuclear Antigen; **Ort:** Ortalama; **SS:** Standart Sapma.

Kolit grubundaki (Grup 2) sıçanların makroskopik kolon örnekleri incelendiğinde üçünde 2 cm' den büyük ülserasyon, üçünde 1 cm altında 2 ve daha fazla ülserasyon, ikisinde hiperemi ve ödem, birinde hiperemi izlendi. Mikroskopik incelemede beş sıçanda total ülserasyon, üç sıçanda büyük ülserasyon, bir sıçanda minimal ülserasyon izlendi (Tablo 6). Grup 2'nin ortalama IL-1 değeri 490.81 pg/mL, IL-10 değeri 345.27 pg/mL, MPO değeri 109.15 pg/mL olarak bulundu (Tablo 7). Grup 2'nin immunohistokimyasal değerlendirmesinde CD3⁺ T lenfositlerin dağılım ortalaması 38.93, CD5⁺ T lenfositlerin dağılım ortalaması 34.25, CD45⁺ T lenfositlerin dağılım ortalaması 33.34, PCNA proliferasyon indeksi 61.03 olarak bulundu (Tablo 8).

Tablo 6. Grup-2'nin makroskopik ve mikroskopik özellikleri

| Grup-2 | Makroskopi | Makroskopik ülserasyon skoru | Mikroskopi | Mikroskopik ülserasyon skoru |
|----------------|------------------------------------|------------------------------|--------------------|------------------------------|
| 1.sıçan | 2 veya daha fazla ülserasyon <1 cm | 4 | Total ülserasyon | 3 |
| 2.sıçan | ülserasyon >2 cm | 6 | Total ülserasyon | 3 |
| 3.sıçan | Hiperemi ve ödem | 2 | Büyük ülserasyon | 2 |
| 4.sıçan | 2 veya daha fazla ülserasyon <1 cm | 4 | Total ülserasyon | 3 |
| 5.sıçan | Hiperemi ve ödem | 2 | Büyük ülserasyon | 2 |
| 6.sıçan | ülserasyon >2 cm | 6 | Total ülserasyon | 3 |
| 7.sıçan | Hiperemi | 1 | Minimal ülserasyon | 1 |
| 8.sıçan | 2 veya daha fazla ülserasyon <1 cm | 4 | Büyük ülserasyon | 2 |
| 9.sıçan | ülserasyon >2 cm | 6 | Total ülserasyon | 3 |

Tablo 7. Grup 2'nin IL-1, IL-10 ve MPO değerleri (Ort ± SS)

| | IL-1 | IL-10 | MPO |
|---------------|---------------|---------------|--------------|
| Grup-2 | 490,81±665,61 | 345,27±398,53 | 109,15±54,57 |

IL 1: İnterlökin 1; **IL 10:** İnterlökin 10; **MPO:** Myeloperoksidaz; **Ort:** Ortalama; **SS:** Standart Sapma.

Tablo 8. Grup 2'nin immünohistokimyasal değerleri (Ort ± SS)

| | CD3 | CD5 | CD45 | PCNA |
|---------------|------------|------------|-------------|-------------|
| Grup-2 | 38,93±4,51 | 34,25±6,02 | 33,34±3,80 | 61,03±4,84 |

CD: Cluster of Differentiation; **PCNA:** Proliferating Cell Nuclear Antigen; **Ort:** Ortalama; **SS:** Standart Sapma

Tedavi grubundaki (Grup 3) sıçanların makroskopik kolon örnekleri incelendiğinde birinde 2 cm'den büyük ülserasyon, ikisinde 1 cm altında 2 ve daha fazla ülserasyon, dördünde hiperemi ve ödem, üçünde hiperemi izlendi. Mikroskopik incelemede altı sıçanda büyük ülserasyon, dört sıçanda minimal ülserasyon izlendi (Tablo 9). Grup 3'ün ortalama IL-1 değeri 19.05 pg/mL, IL-10 değeri 33.87 pg/mL, MPO değeri 90.19 pg/mL bulundu (Tablo 10). Grup 3'ün immünohistokimyasal değerlendirmesinde CD3⁺ T lenfositlerin dağılım ortalaması 25.06, CD5⁺ T lenfositlerin dağılım ortalaması 27.50, CD45⁺ T lenfositlerin dağılım ortalaması 23.96, PCNA profilerasyon indeksi 73.68 olarak bulundu (Tablo 11).

Tablo 9. Grup 3'ün makroskopik ve mikroskopik özellikleri

| Grup-3 | Makroskopi | Makroskopik ülserasyon skoru | Mikroskopi | Mikroskopik ülserasyon skoru |
|-----------------|------------------------------------|-------------------------------------|--------------------|-------------------------------------|
| 1.sıçan | 2 veya daha fazla ülserasyon <1 cm | 4 | Büyük ülserasyon | 2 |
| 2.sıçan | Hiperemi ve ödem | 2 | Büyük ülserasyon | 2 |
| 3.sıçan | Ülserasyon >2 cm | 6 | Büyük ülserasyon | 2 |
| 4.sıçan | Hiperemi ve ödem | 2 | Büyük ülserasyon | 2 |
| 5.sıçan | Hiperemi ve ödem | 2 | Minimal ülserasyon | 1 |
| 6.sıçan | Hiperemi | 1 | Minimal ülserasyon | 1 |
| 7.sıçan | 2 veya daha fazla ülserasyon <1 cm | 4 | Büyük ülserasyon | 2 |
| 8.sıçan | Hiperemi | 1 | Minimal ülserasyon | 1 |
| 9.sıçan | Hiperemi | 1 | Minimal ülserasyon | 1 |
| 10.sıçan | Hiperemi ve ödem | 2 | Büyük ülserasyon | 2 |

Tablo 10. Grup 3'ün IL-1, IL-10 ve MPO değerleri (Ort ± SS)

| | IL-1 | IL-10 | MPO |
|---------------|-------------|--------------|------------|
| Grup-3 | 19,05±8,9 | 33,87±12,99 | 90,19±2,07 |

IL 1: İnterlökin 1; **IL 10:** İnterlökin 10; **MPO:** Myeloperoksidaz; **Ort:** Ortalama; **SS:** Standart Sapma.

Tablo 11. Grup 3'ün immünohistokimyasal değerleri (Ort ± SS)

| | CD3 | CD5 | CD45 | PCNA |
|---------------|------------|------------|-------------|-------------|
| Grup-3 | 25,06±2,91 | 27,50±3,43 | 23,96±3,19 | 73,68±8,24 |

CD: Cluster of Differentiation; **PCNA:** Proliferating Cell Nuclear Antigen; **Ort:** Ortalama; **SS:** Standart Sapma

Tüm grupların makroskopik ve mikroskopik ülserasyon skoru ortalamaları ve standart sapmaları Tablo 12'de verildi.

Makroskopik ülserasyon skorları (ort±SS) Grup 1'de 0±0, Grup 2'de 3.88±1.90, Grup 3'de 2.50±1.64 olarak bulundu. Ortalama makroskopik ülserasyon skoru en yüksek Grup 2'de, en düşük Grup 1'de saptandı.

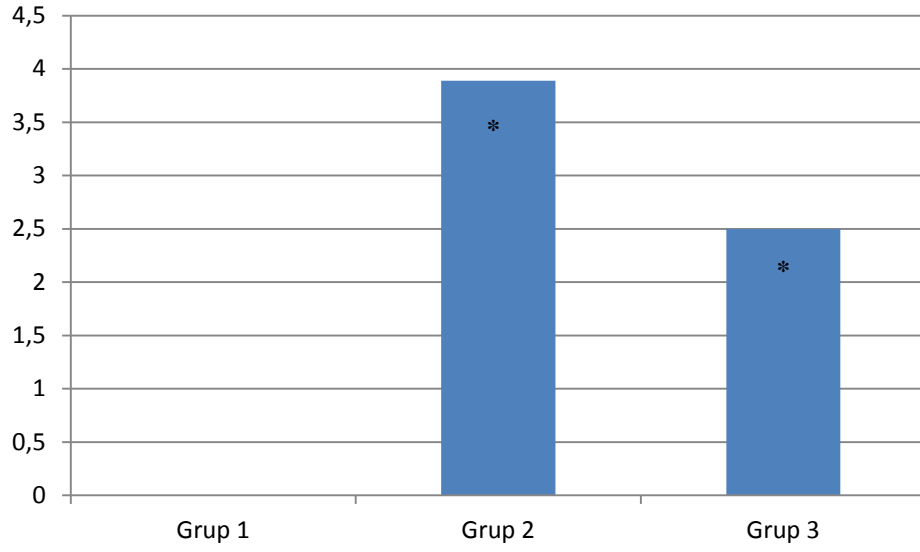
Mikroskopik ülserasyon skorları (ort±SS) Grup 1'de 0±0, Grup 2'de 2.44±0.72, Grup 3'de 1.6±0.51 olarak bulundu. Ortalama mikroskopik ülserasyon skoru en yüksek Grup 2'de, en düşük Grup 1'de saptandı.

Tablo 12. Grupların histopatolojik parametreleri (Ort ± SS)

| Parametreler Gruplar | Grup 1 | Grup 2 | Grup 3 |
|-------------------------------------|---------------|---------------|---------------|
| Makroskopik ülserasyon skoru | 0±0 | 3,88±1,90 | 2,50±1,64 |
| Mikroskopik ülserasyon skoru | 0±0 | 2,44±0,72 | 1,60±0,51 |

Ort: Ortalama; **SS:** Standart Sapma.

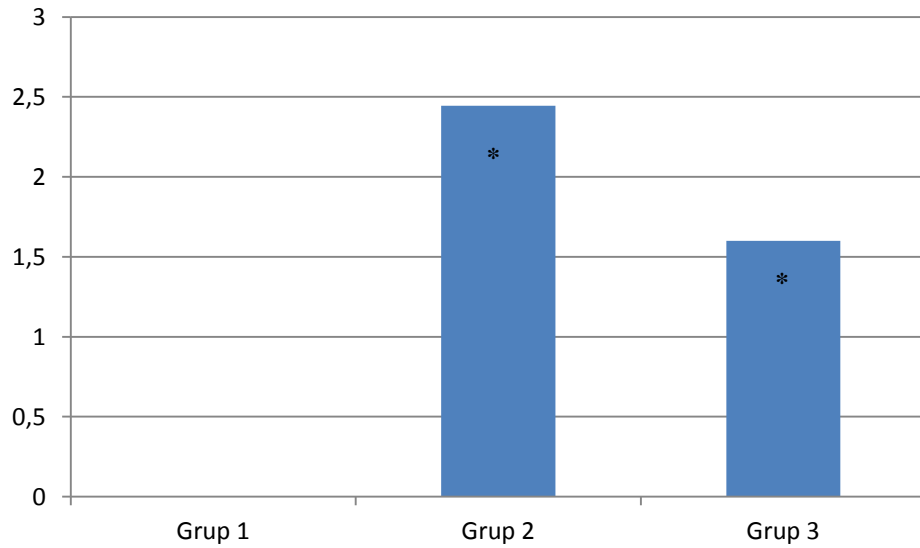
Ortalama makroskopik ülserasyon skoru en yüksek Grup 2'de, en düşük Grup 1'de saptandı (Şekil 3). Grup 1'in makroskopik ülserasyon skoru Grup 2 ve Grup 3 ile karşılaştırıldığında istatistiksel yönden anlamlı fark bulundu ($p<0,05$). Grup 2 ve Grup 3 arasındaki makroskopik ülserasyon skorları istatistiksel açıdan anlamlı değildi.



*: $p < 0,05$ Grup 1'e göre istatistiksel olarak anlamlı.

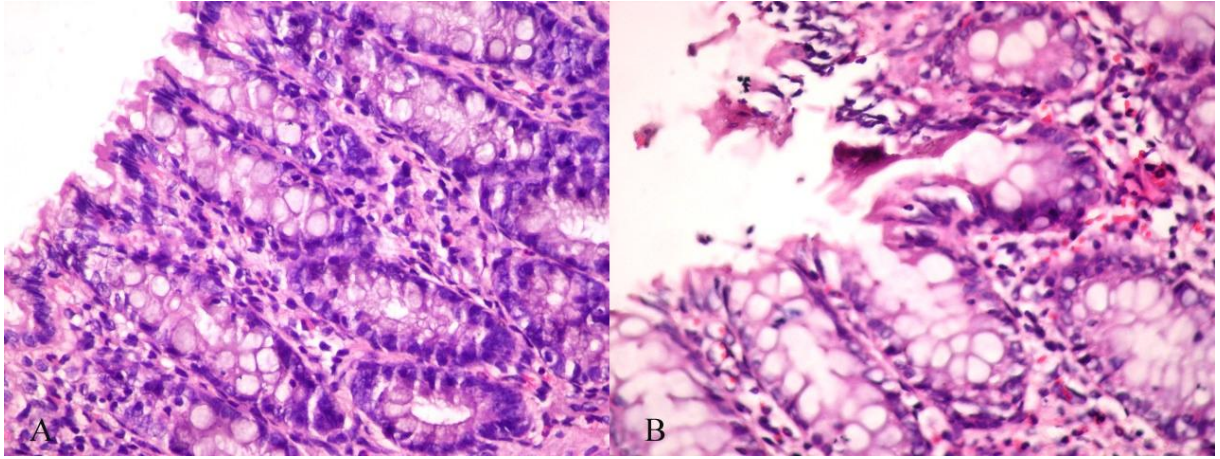
Şekil 3. Grupların makroskopik ülserasyon skorları

Ortalama mikroskopik ülserasyon skoru en yüksek Grup 2'de, en düşük Grup 1'de saptandı (Şekil 4). Grup 1'in mikroskopik ülserasyon skorları Grup 2 ve Grup 3 ile karşılaştırıldığında istatistiksel yönden anlamlı fark saptandı ($p < 0,05$). Mikroskopik ülserasyon skorları açısından Grup 2 ve Grup 3 arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildi.



*: $p < 0,05$ Grup 1'e göre istatistiksel olarak anlamlı.

Şekil 4. Grupların mikroskopik ülserasyon skorları



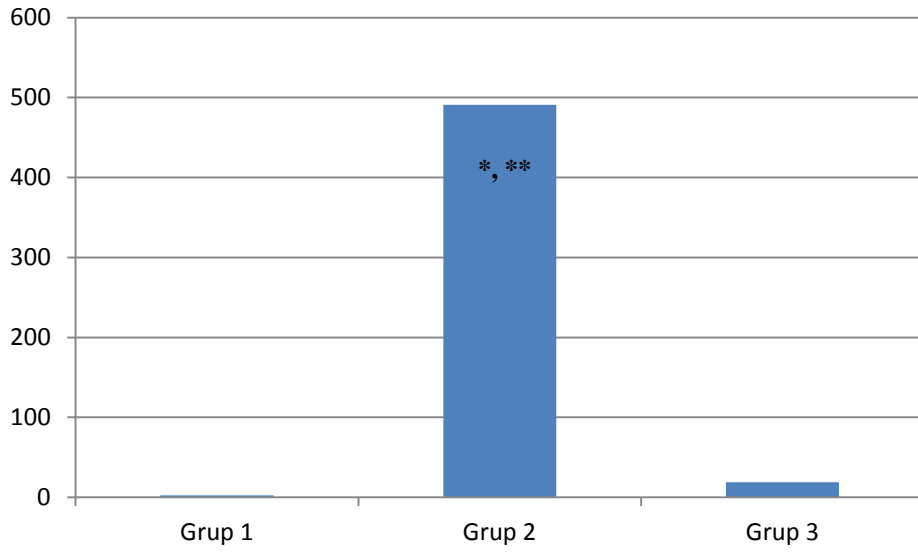
Şekil 5. Normal kolon mukozası (A) ve hastalıklı kolon mukozası (B); A. HE, X400, B. HE, X400

Tablo 13. Grupların biyokimyasal parametreleri (Ort ± SS)

| Parametreler Gruplar | Grup 1 | Grup 2 | Grup 3 |
|----------------------|-----------|---------------|-------------|
| IL-1 | 2,39±2,70 | 490,81±665,61 | 19,05±8,90 |
| IL-10 | 9,52±5,04 | 345,27±398,53 | 33,87±12,99 |
| MPO | 8,68±8,45 | 109,15±54,57 | 90,19±2,07 |

IL 1: İnterlökin 1; **IL 10:** İnterlökin 10; **MPO:** Myeloperoksidaz; **Ort:** Ortalama; **SS:** Standart Sapma.

Grupların IL-1 düzeyleri kıyaslandığında; en düşük değer Grup 1’de (2,39±2,70), en yüksek değer Grup 2’de (490,81±665,61) tespit edildi (Tablo 13). Bu fark istatistiksel açıdan anlamlı bulundu ($p<0,05$). Grup 1 ve Grup 3 arasındaki fark (19,05±8,90) istatistiksel olarak anlamlılık düzeyine ulaşmadı. Grup 2’nin IL-1 düzeyi Grup 3’ten istatistiksel olarak anlamlı yüksekti ($p<0,05$) (Şekil 6).

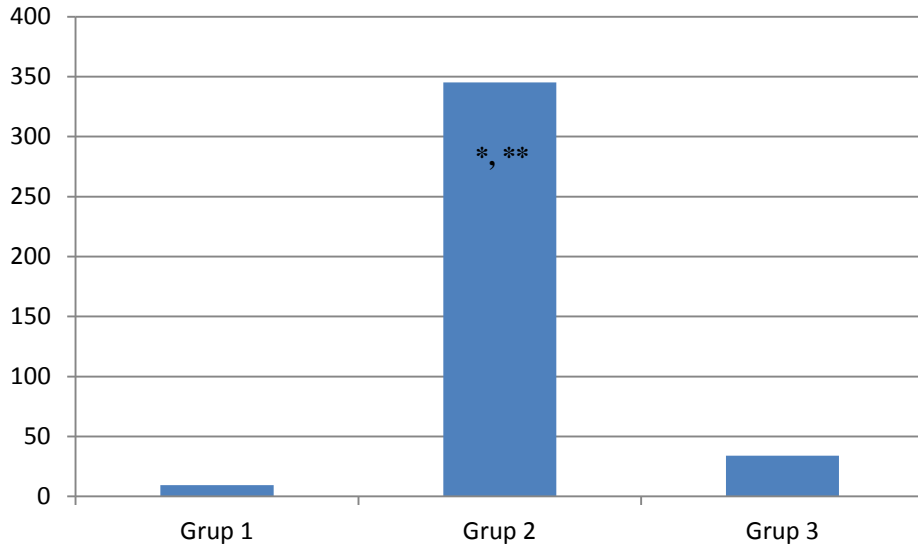


*: $p < 0,05$ Grup 1'e göre istatistiksel olarak anlamlı.

** : $p < 0,05$ Grup 3'e göre istatistiksel olarak anlamlı.

Şekil 6. Grupların IL-1 değerleri

IL-10 düzeyleri kıyaslandığında; en düşük değer Grup 1'de ($9,52 \pm 5,04$), en yüksek değer Grup 2'de ($345,27 \pm 398,53$) tespit edildi (Tablo 13). Bu fark istatistiksel açıdan anlamlı bulundu ($p < 0,05$). Grup 1 ve Grup 3 arasındaki fark ($33,87 \pm 12,99$) istatistiksel olarak anlamlı değildi. Grup 2'nin IL-10 düzeyi Grup 3'ten istatistiksel açıdan anlamlı yüksekti ($p < 0,05$) (Şekil 7).

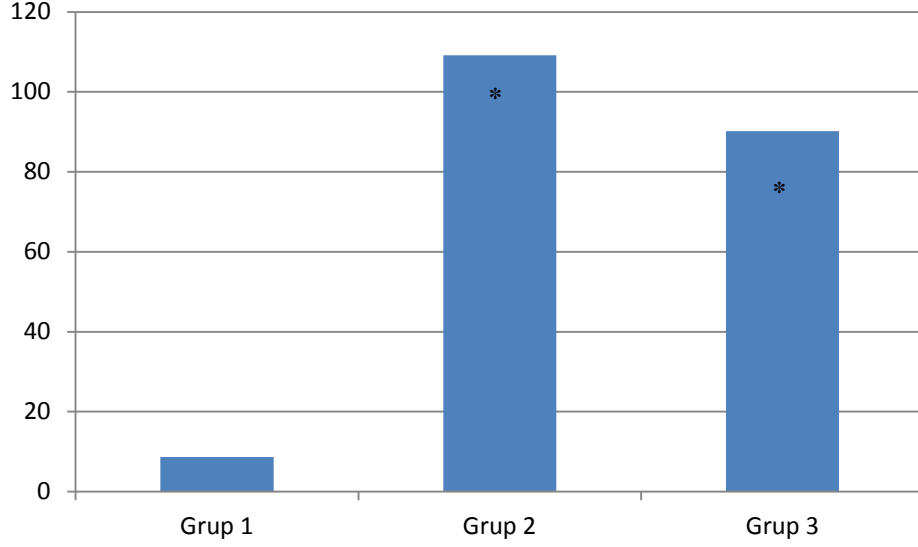


*: $p < 0,05$ Grup 1'e göre istatistiksel olarak anlamlı.

** : $p < 0,05$ Grup 3'e göre istatistiksel olarak anlamlı.

Şekil 7. Grupların IL-10 değerleri

MPO düzeyleri kıyaslandığında; en düşük değer Grup 1’de ($8,68 \pm 8,45$), en yüksek değer Grup 2’de ($109,15 \pm 54,57$) bulundu (Tablo 13). Bu fark istatistiksel açıdan anlamlı olarak yorumlandı. Grup 1’in MPO değerleri Grup 3’ten ($90,19 \pm 2,07$) anlamlı düşüktü ($p < 0,05$). Grup 2’nin MPO değeri de Grup 3’ten anlamlı yüksek bulundu ($p < 0,05$) (Şekil 8).



*: $p < 0,05$ Grup 1’e göre istatistiksel olarak anlamlı.

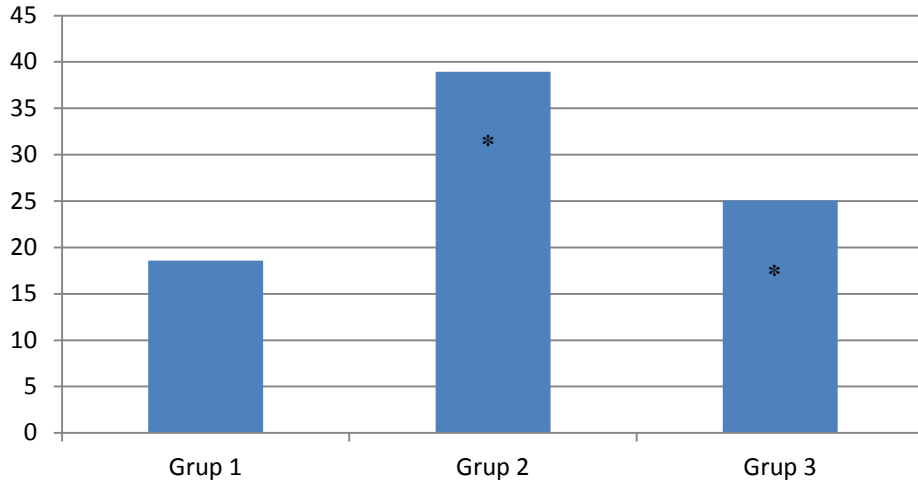
Şekil 8. Grupların MPO değerleri

Tablo 14. Grupların immünohistokimyasal parametreleri (Ort ± SS)

| Parametreler Gruplar | Grup 1 | Grup 2 | Grup 3 |
|----------------------|------------|------------|------------|
| CD 3 | 18,56±2,25 | 38,93±4,51 | 25,06±2,91 |
| CD 5 | 19±2,21 | 34,25±6,02 | 27,50±3,43 |
| CD 45 | 17,84±2,34 | 33,34±3,80 | 23,96±3,19 |
| PCNA | 47,34±5,12 | 61,03±4,84 | 73,68±8,24 |

CD: Cluster of Differentiation; **PCNA:** Proliferating Cell Nuclear Antigen; **Ort:** Ortalama; **SS:** Standart Sapma

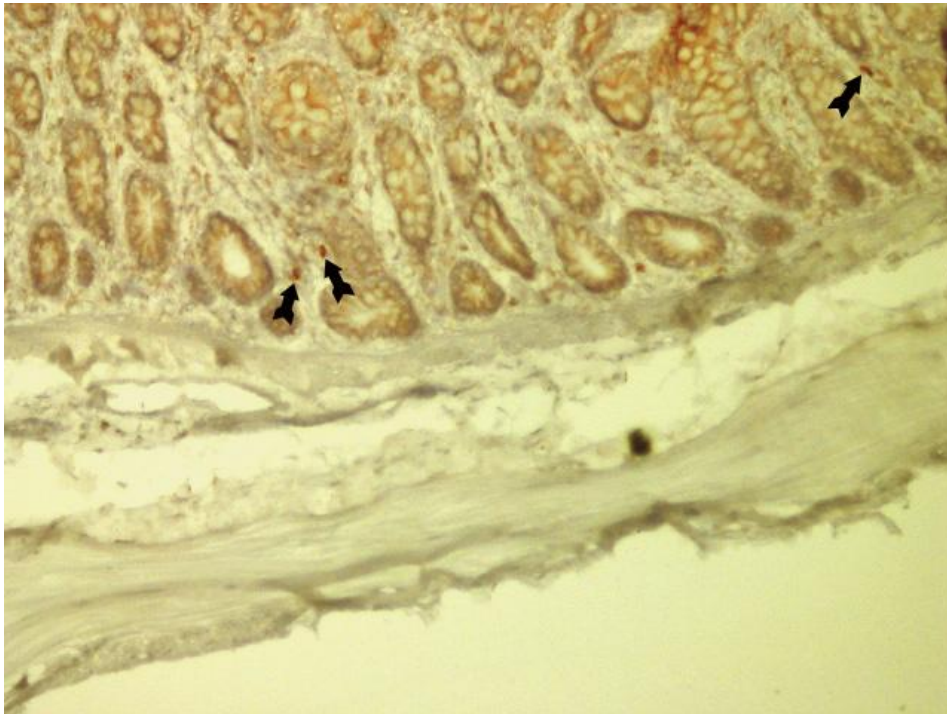
Grupların immünohistokimyasal parametreleri değerlendirildiğinde; $CD3^+$ T lenfosit dağılımı en düşük Grup 1’de ($18,56 \pm 2,25$), en yüksek Grup 2’de ($38,93 \pm 4,51$) bulundu (Tablo 14). Bu fark istatistiksel olarak anlamlı olarak değerlendirildi. Grup 1’in $CD3^+$ T lenfosit dağılımı Grup 3’ten ($25,06 \pm 2,91$) anlamlı düşüktü ($p < 0,05$). Grup 2’nin $CD3^+$ T lenfosit dağılımı Grup 3’ten anlamlı yüksekti ($p < 0,05$) (Şekil 9).



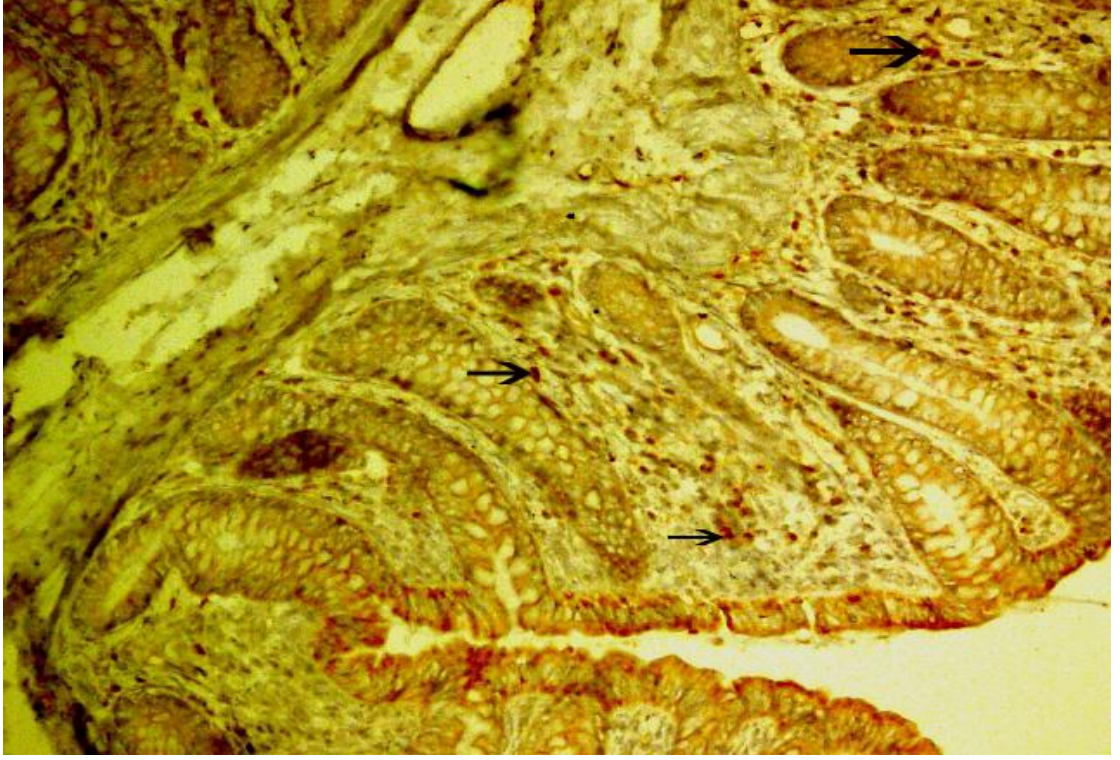
*: p<0,05 Grup 1'e göre istatistiksel olarak anlamlı.

Şekil 9. Grupların CD3⁺ T lenfosit dağılımları

Sağlıklı kolon mukozasında lamina propriada ve bağ dokudaki dağılmış olan CD3⁺ T lenfositlerin az sayıda olduğu görülmektedir (Şekil 10). Kolit oluşturulan ve kolit oluşturulduktan sonra sirolimus tedavisi verilen gruplarda lamina propria subepitelyal duvarda, mukozal bezlerin çevresinde çok sayıda CD3⁺ T lenfositlerin dağılmış olduğu görülmektedir. CD3⁺ T lenfositler en fazla kolit grubu barsak mukozasında saptanmıştır (Şekil 11-14).



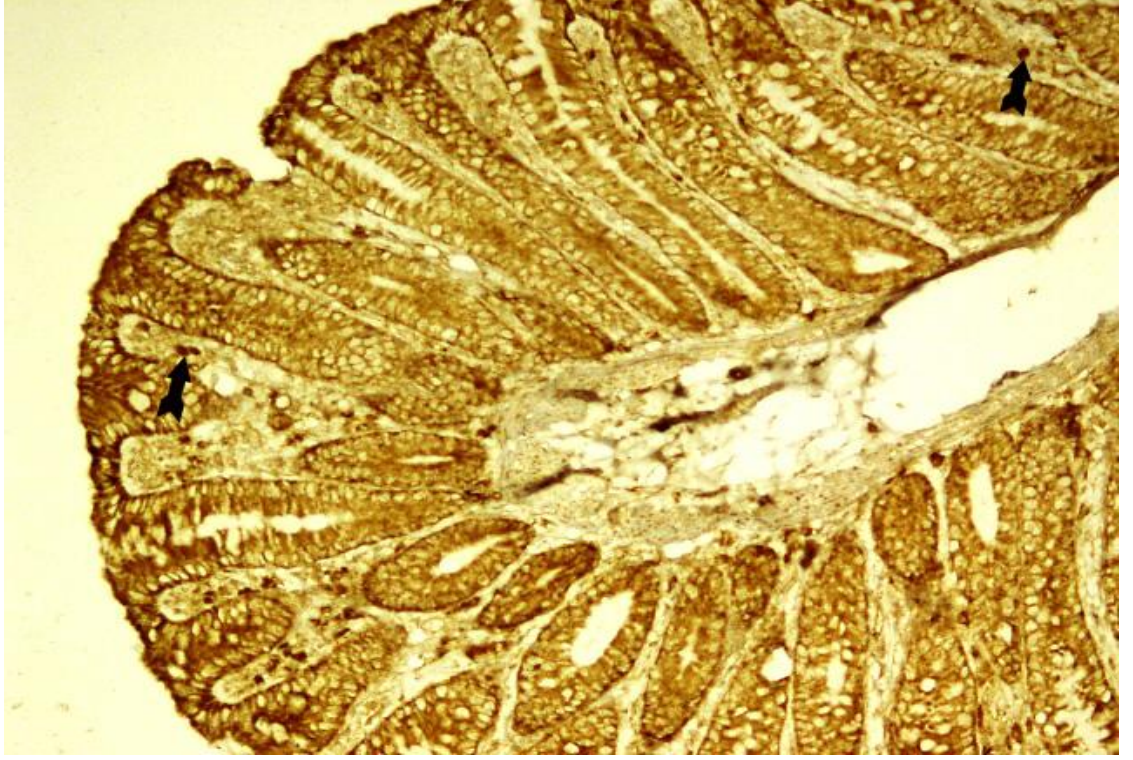
Şekil 10. Sağlıklı kolon mukozasında CD 3⁺ T lenfositler (oklar); HE, X400



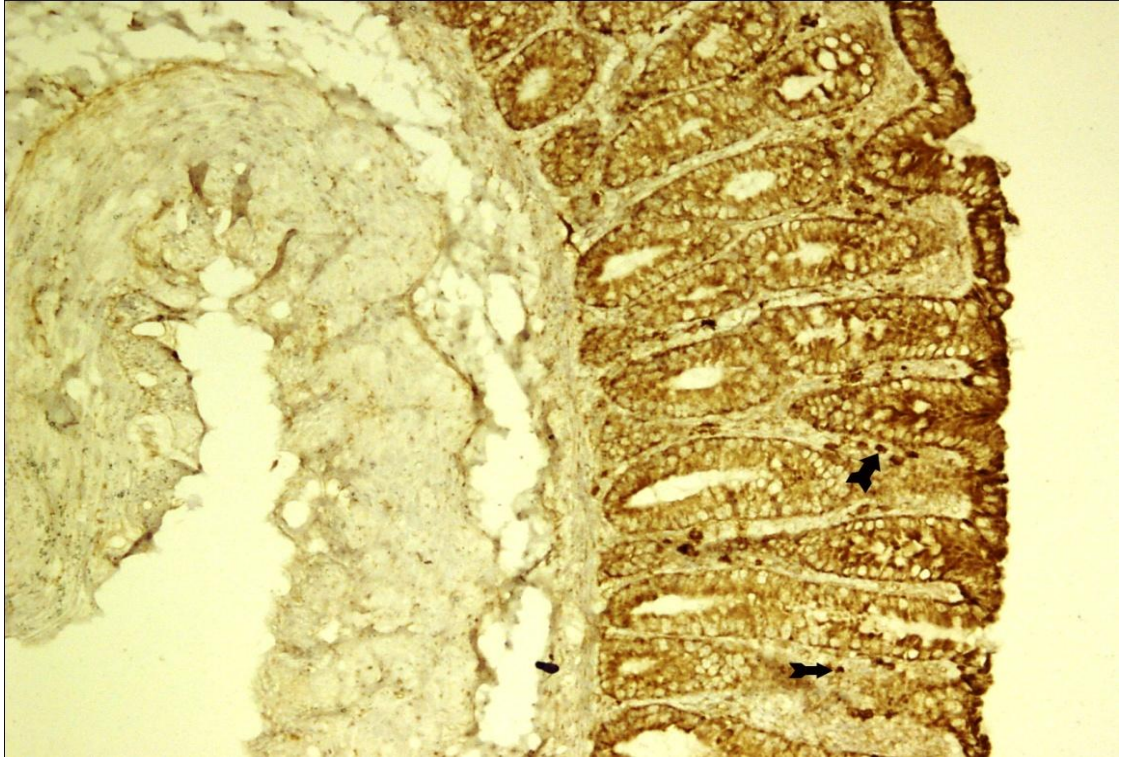
**Şekil 11. Kolit grubunda barsak mukozasındaki CD3⁺ T lenfositlerin (oklar);
immünoperoksidaz, Hematoksilen zıt boyaması, X400**



**Şekil 12. Kolit grubunda barsak mukozasındaki CD3⁺ T lenfositlerin (oklar);
immünoperoksidaz, Hematoksilen zıt boyaması, X400**

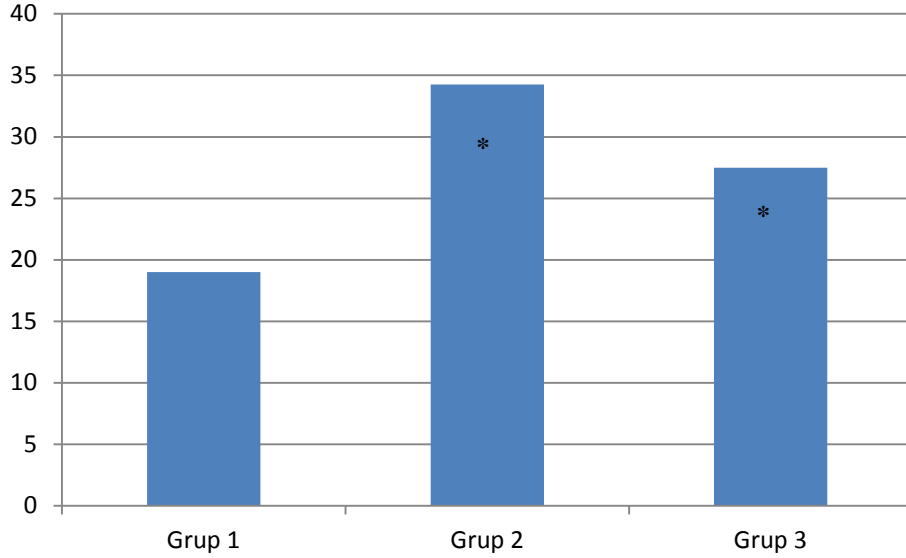


**Şekil 13. Tedavi grubunda barsak mukozasındaki CD3⁺ T lenfositlerin (oklar);
immünoperoksidaz, Hematoksilen zıt boyaması, X400**



**Şekil 14. Tedavi grubunda barsak mukozasındaki CD3⁺ T lenfositlerin (oklar);
immünoperoksidaz, Hematoksilen zıt boyaması, X400**

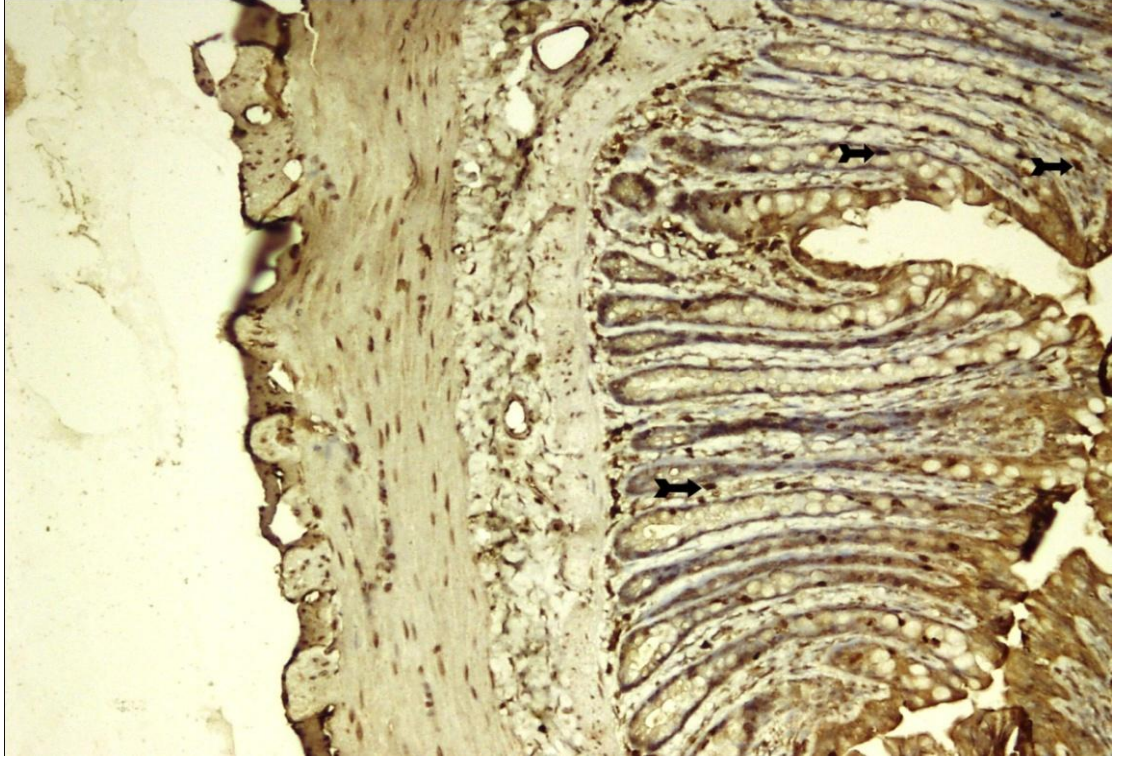
Grupların CD5⁺ T lenfosit dağılımı kıyaslandığında; en düşük değer Grup 1’de (19±2,21), en yüksek değer Grup 2’de (34,25±6,02) tespit edildi (Tablo 14). Bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu (p<0,05). Grup 1’in CD5⁺ T lenfosit dağılımı Grup 3’ten (27,50±3,43) anlamlı düşüktü (p<0,05). Grup 2’nin CD5⁺ T lenfosit dağılımı Grup 3’ten anlamlı yüksekti (p<0,05) (Şekil 15).



*: p<0,05 Grup 1’e göre istatistiksel olarak anlamlı.

Şekil 15. Grupların CD5⁺ T lenfosit dağılımları

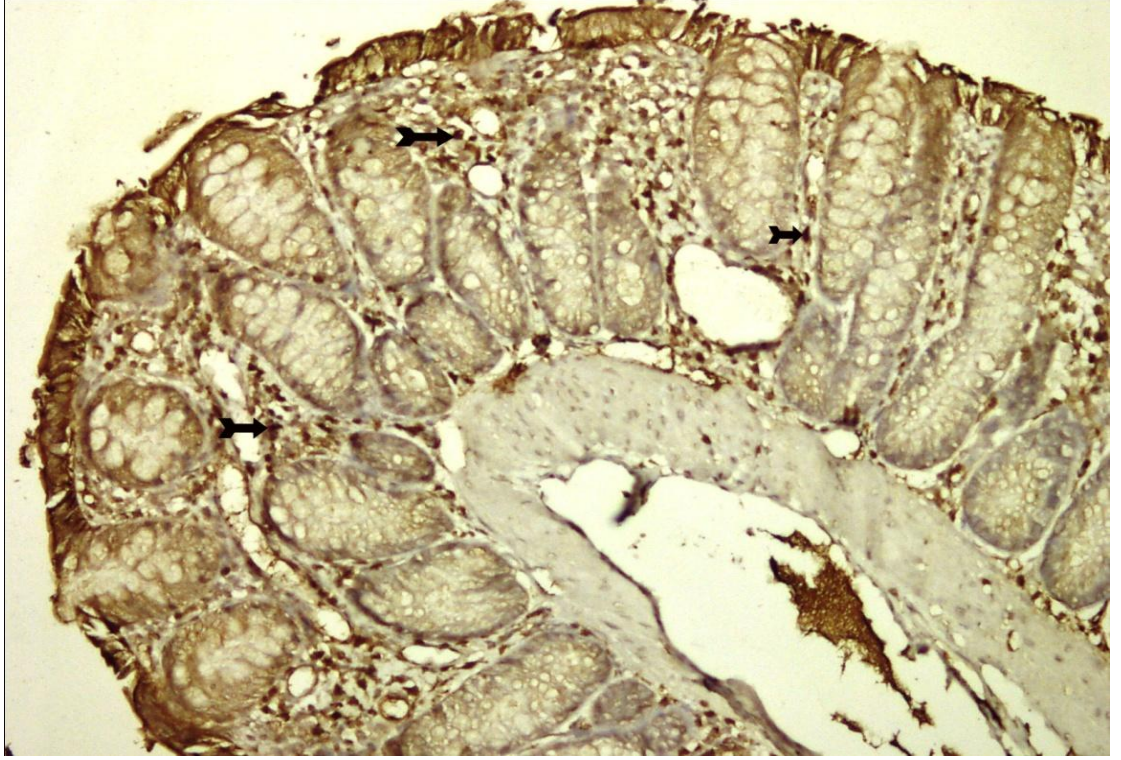
Sağlıklı kolon mukozasında lamina propria ve bağ dokudaki dağılmış olan CD5⁺ T lenfositlerin az sayıda olduğu izlenmektedir (Şekil 16). Kolit oluşturulan ve kolit oluşturulduktan sonra sirolimus tedavisi verilen gruplarda lamina propria subepitelyal duvarda, mukozal bezlerin çevresinde çok sayıda CD5⁺ T lenfositlerin dağılmış olduğu görülmektedir. CD5⁺ T lenfositler en fazla kolit grubu barsak mukozasında saptanmıştır (Şekil 17-20).



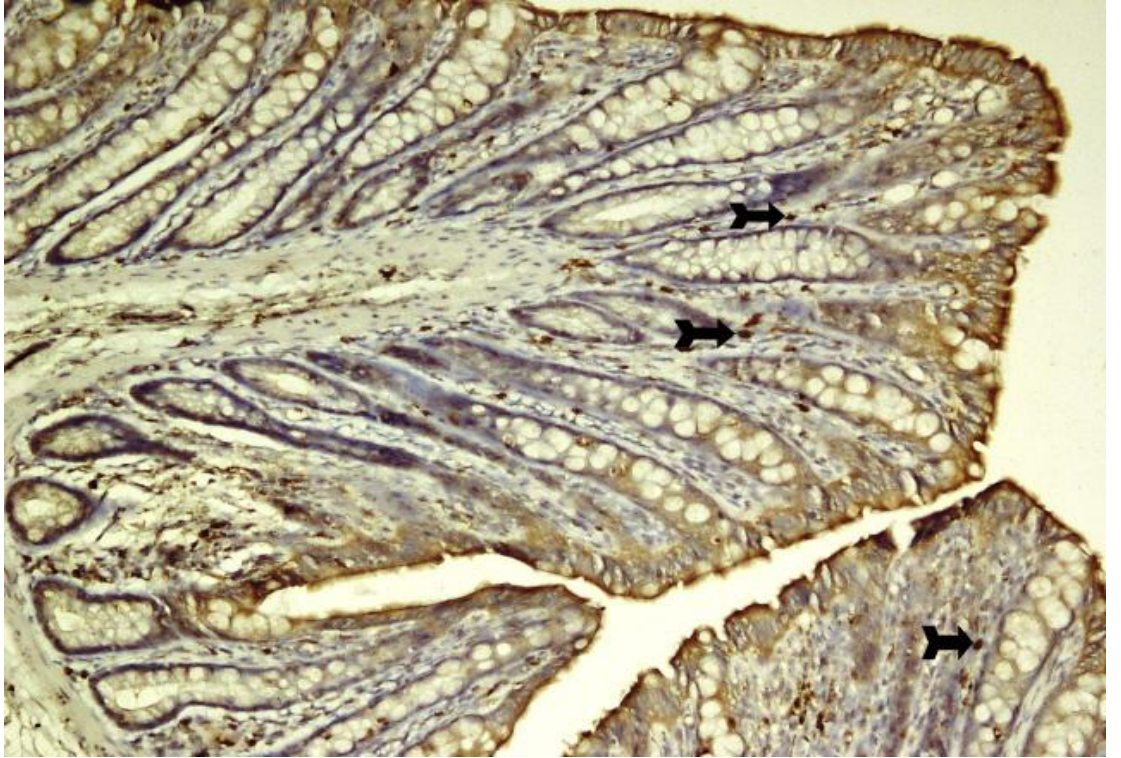
Şekil 16. Sağlıklı kolon mukozasında CD5⁺ T lenfositler (oklar); HE, X400



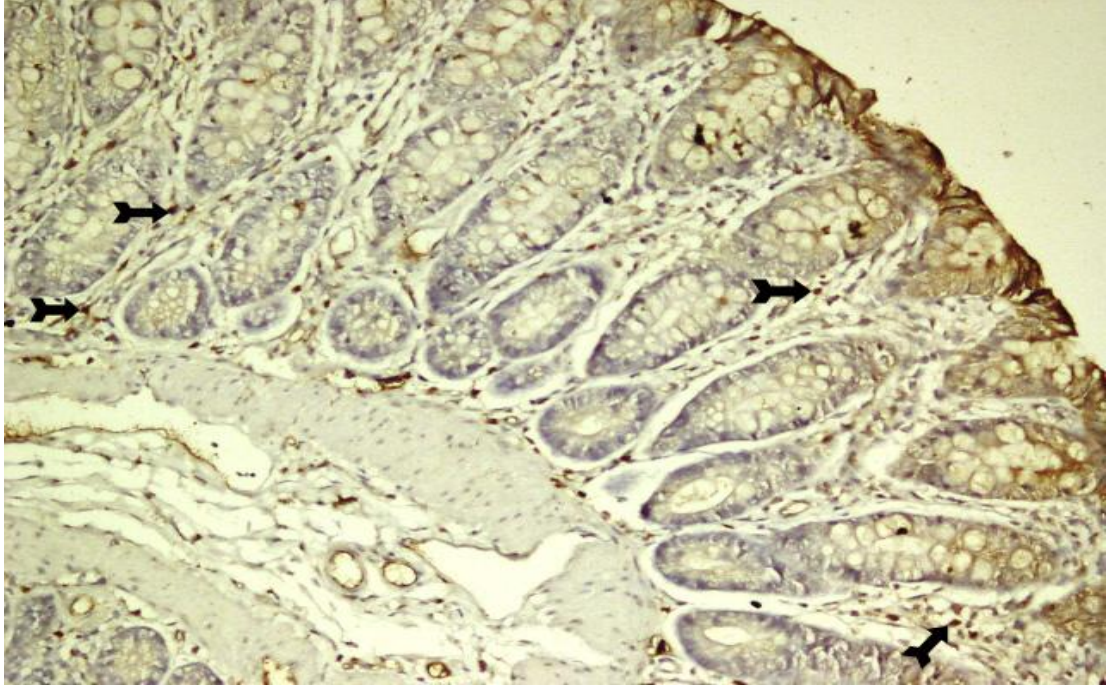
Şekil 17. Kolit grubunda barsak mukozasındaki CD5⁺ T lenfositlerin (oklar);
immünoperoksidaz, HE zıt boyaması, X400



**Şekil 18. Kolit grubunda barsak mukozasındaki CD5⁺ T lenfositlerin (oklar);
immünoperoksidaz, HE zıt boyaması, X400**

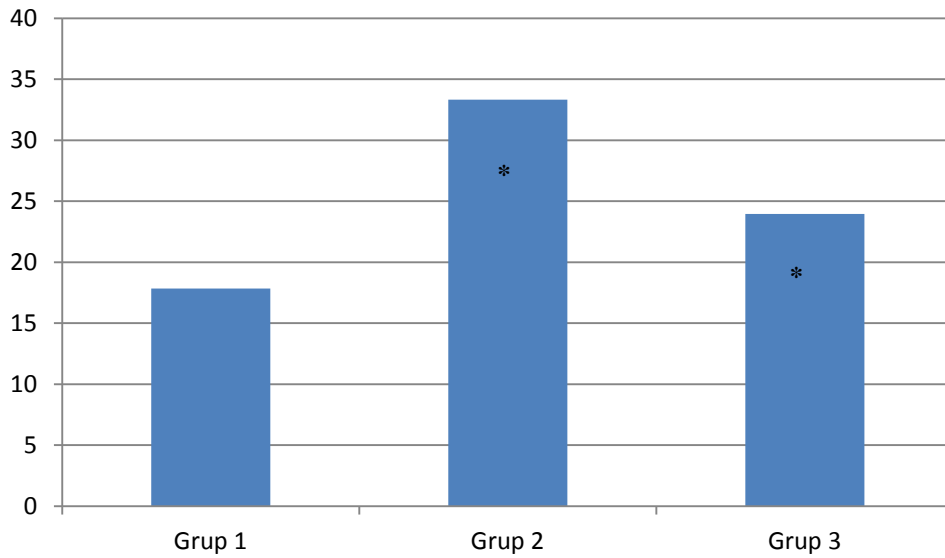


**Şekil 19. Tedavi grubunda barsak mukozasındaki CD5⁺ T lenfositlerin (oklar);
immünoperoksidaz, HE zıt boyaması, X400**



Şekil 20. Tedavi grubunda barsak mukozasındaki CD5⁺ T lenfositlerin (oklar); immünoperoksidaz, HE zıt boyaması, X400

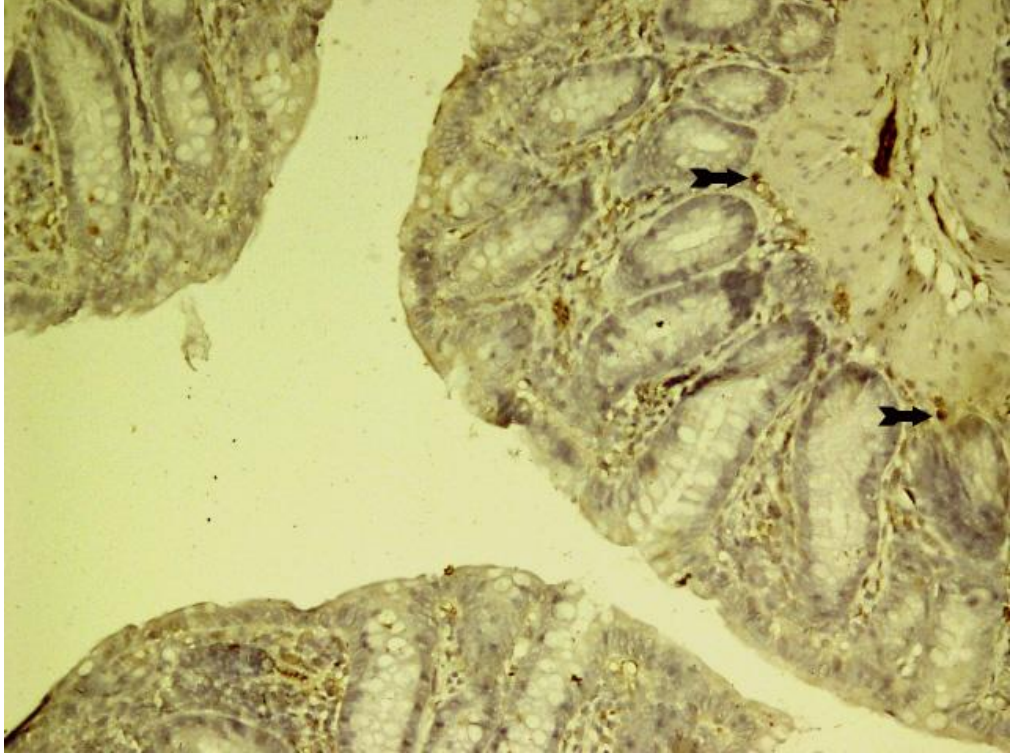
Grupların CD45⁺ T lenfosit dağılımı kıyaslandığında; en düşük değer Grup 1’de (17,84±2,34), en yüksek değer Grup 2’de (33,34±3,80) bulundu. Bu fark istatistiksel açıdan anlamlı olarak yorumlandı (p<0,05). Grup 1’in CD45⁺ T lenfosit dağılımı Grup 3’ten (23,96±3,19) anlamlı düşüktü (p<0,05). Grup 2’nin CD45⁺ T lenfosit dağılımı Grup 3’ten anlamlı yüksekti (p<0,05) (Şekil 21).



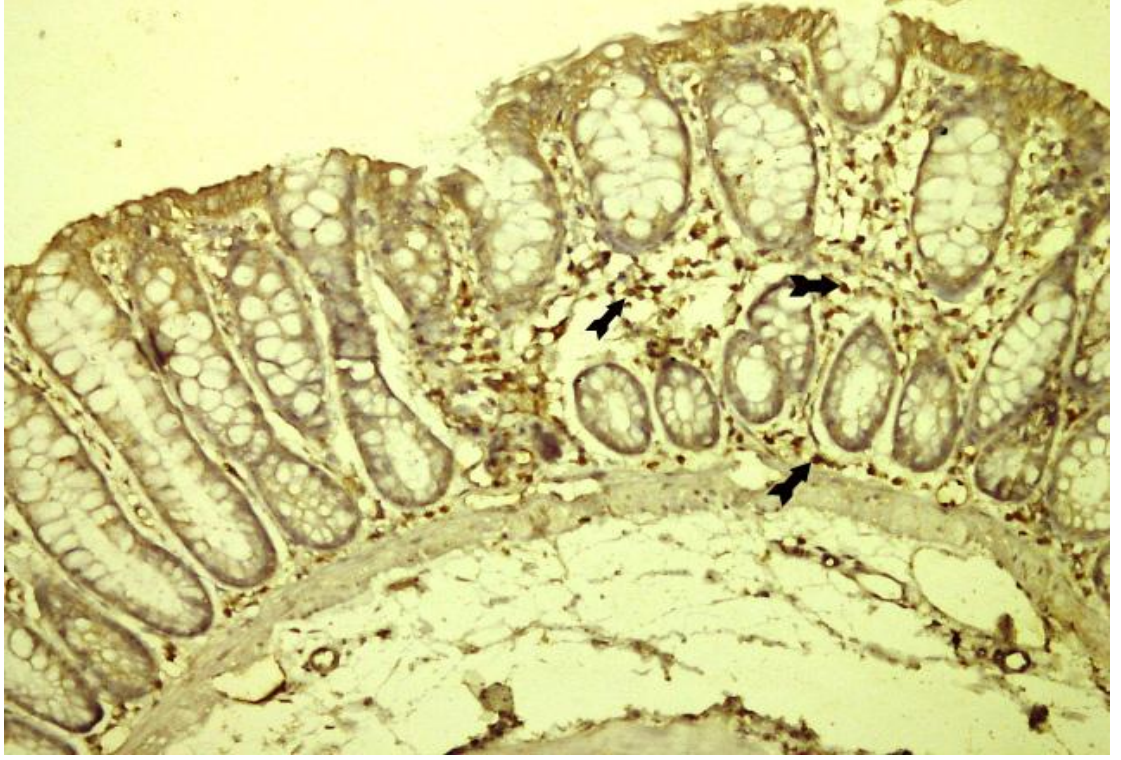
*: p<0,05 Grup 1’e göre istatistiksel olarak anlamlı.

Şekil 21. Grupların CD45 T⁺ lenfosit dağılımları

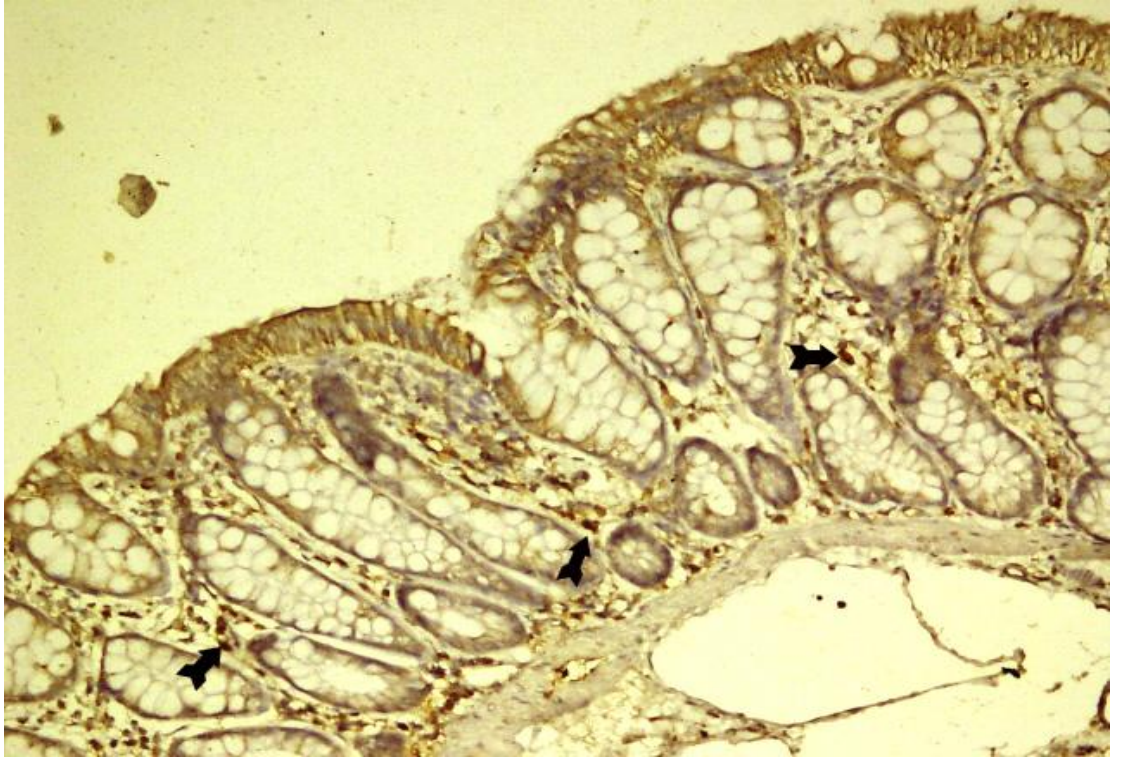
Sağlıklı kolon mukozasında lamina propriada ve bağ dokudaki dağılmış olan CD45⁺T lenfositlerin az sayıda olduğu izlenmektedir (Şekil 22). Kolit oluşturulan ve kolit oluşturulduktan sonra sirolimus tedavisi verilen gruplarda lamina propria subepitelyal duvarda, mukozal bezlerin çevresinde çok sayıda CD45⁺ T lenfositlerin dağılmış olduğu görülmektedir. CD45⁺ T lenfositler en fazla kolit grubu barsak mukozasında saptanmıştır (Şekil 23-26).



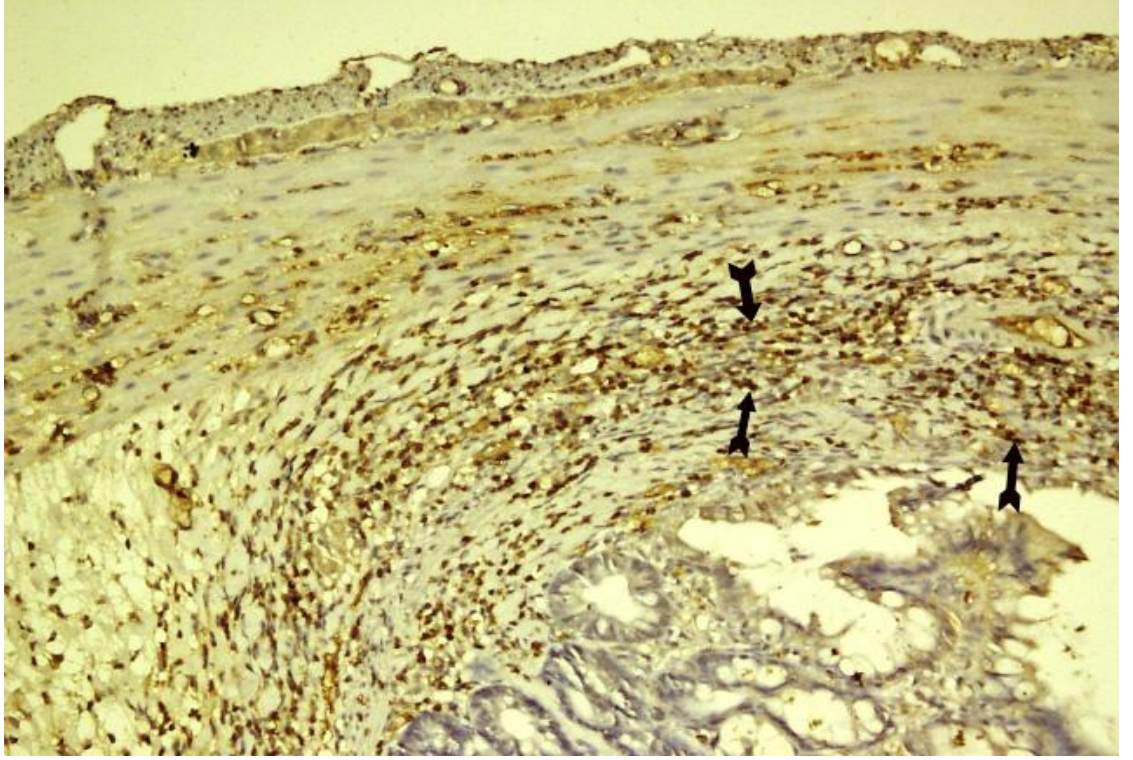
Şekil 22. Sağlıklı kolon mukozasında CD45⁺ T lenfositler (ok); HEX400



**Şekil 23. Kolit grubunda barsak mukozasındaki CD45⁺ T lenfositlerin (oklar);
immünoperoksidaz, HE zıt boyaması, X400**



**Şekil 24. Kolit grubunda barsak mukozasındaki CD45⁺ T lenfositlerin (oklar);
immünoperoksidaz, HE zıt boyaması, X400**

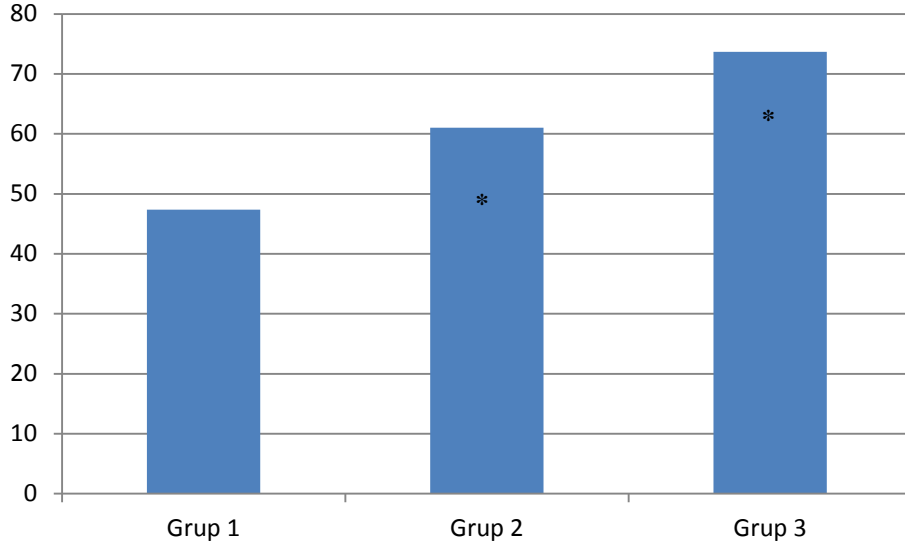


**Şekil 25. Tedavi grubunda barsak mukozasındaki CD45⁺ T lenfositlerin (oklar);
immünoperoksidaz, HE zıt boyaması, X400**



**Şekil 26. Tedavi grubunda barsak mukozasındaki CD45⁺ T lenfositlerin (oklar);
immünoperoksidaz, HE zıt boyaması, X400**

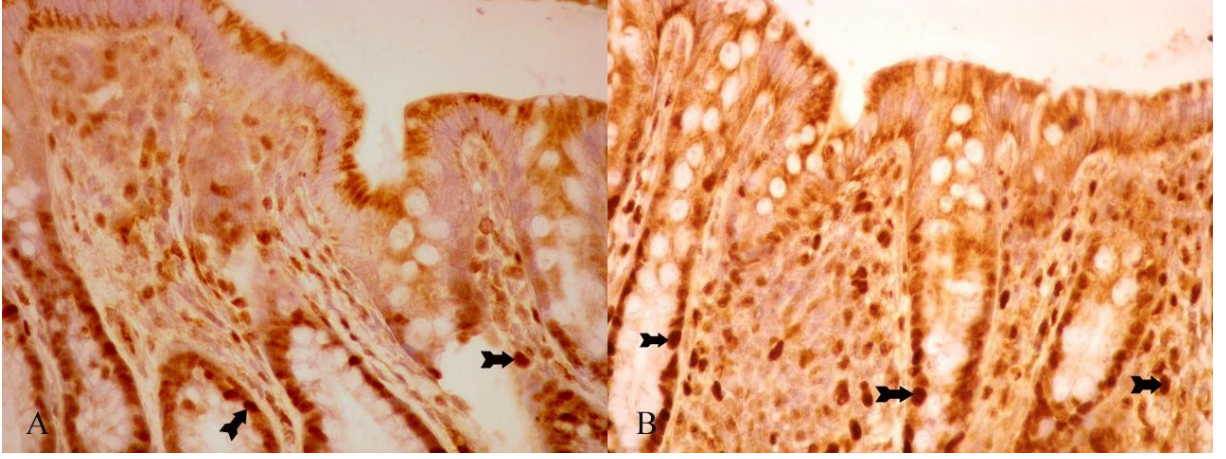
Grupların PCNA proliferasyon indeksleri kıyaslandığında; en düşük değer Grup 1’de ($47,34 \pm 5,12$), en yüksek değer Grup 3’te ($73,68 \pm 8,24$) tespit edildi (Tablo 14). Bu fark istatistiksel açıdan anlamlı bulundu ($p < 0,05$). Grup 1’in PCNA proliferasyon indeksi Grup 2’den anlamlı düşüktü ($61,03 \pm 4,84$). Grup 2’nin PCNA proliferasyon indeksi Grup 3’ten anlamlı düşük bulundu ($p < 0,05$) (Şekil 27).



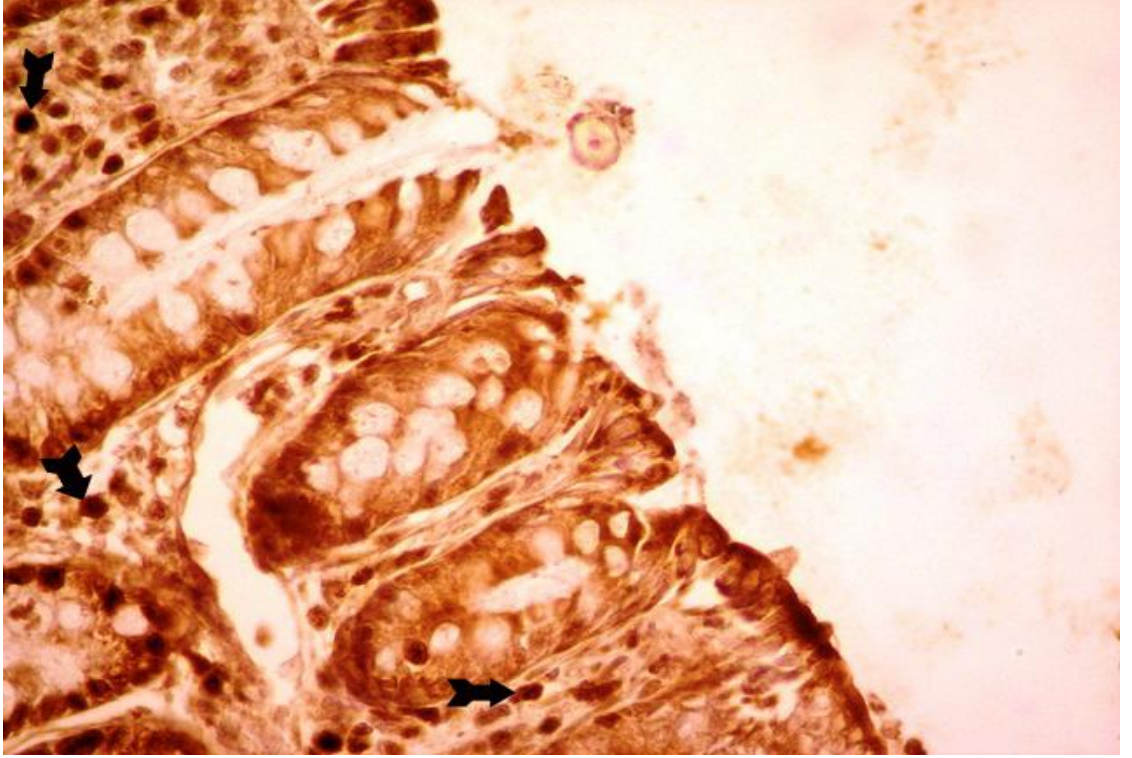
*: $p < 0,05$ Grup 1’e göre istatistiksel olarak anlamlı.

Şekil 27. Grupların PCNA proliferasyon indeksi dağılımları

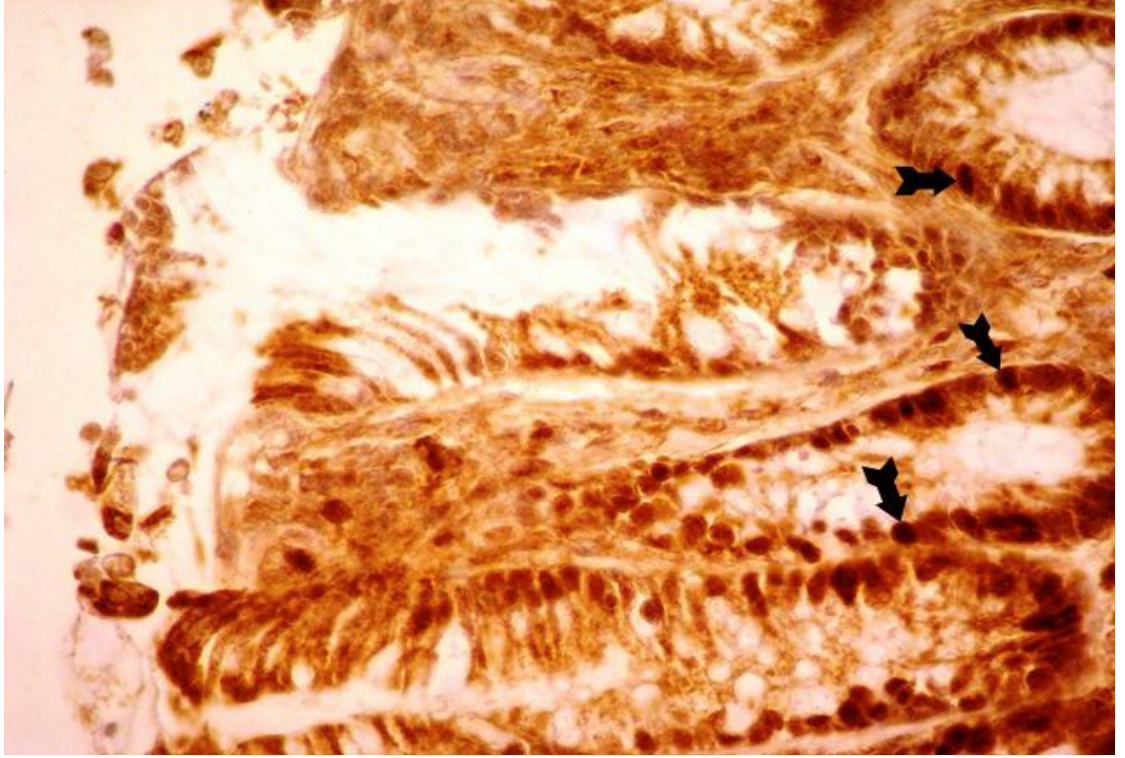
Sağlıklı kolon mukozasında lamina propria ve bağ dokudaki dağılmış olan PCNA pozitif hücrelerin az sayıda olduğu izlenmektedir (Şekil 28). Kolit oluşturulan ve kolit oluşturulduktan sonra sirolimus tedavisi verilen gruplarda lamina propria subepitelyal duvarda, mukozal bezlerin çevresinde çok sayıda PCNA pozitif hücrelerin dağılmış olduğu görülmektedir. PCNA pozitif hücrelerin en fazla tedavi grubu barsak mukozasında saptanmıştır (Şekil 29-32).



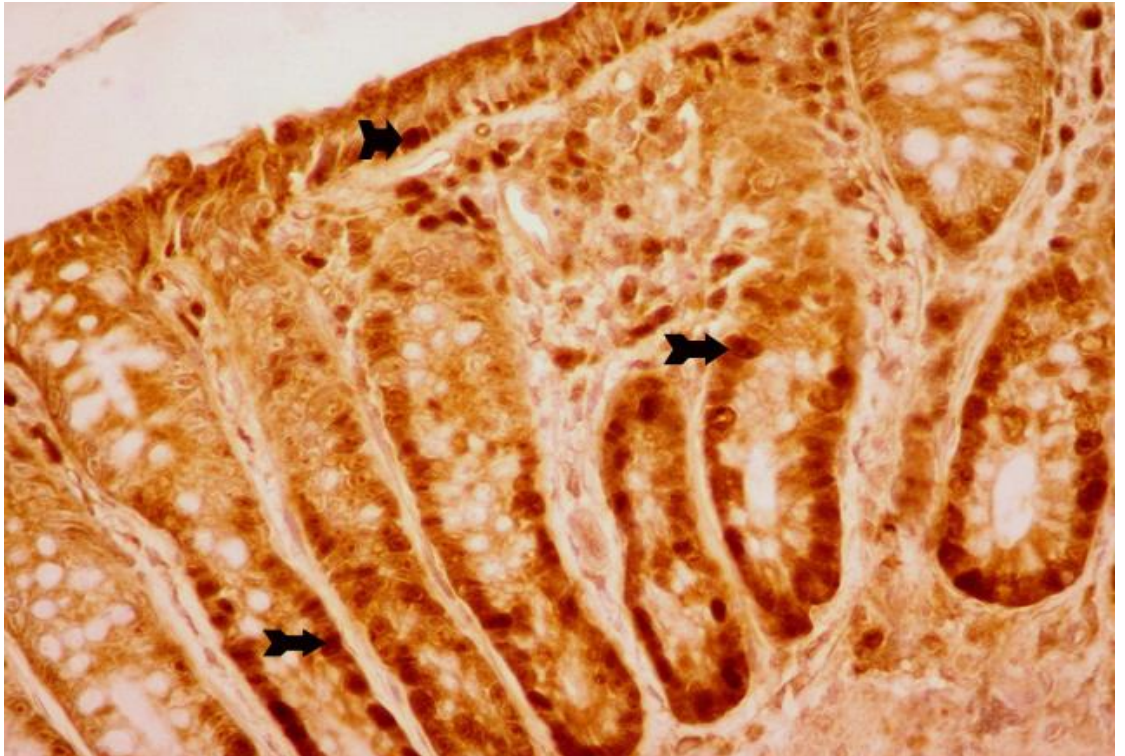
Şekil 28. Kontrol grubunda barsak mukozasındaki PCNA pozitif hücreler (oklar); (A ve B); İmmünoperoksidaz, HE zıt boyaması, X400



Şekil 29. Kolit grubunda barsak mukozasındaki PCNA pozitif hücreler (oklar); İmmünoperoksidaz, HE zıt boyaması, X400



Şekil 30. Kolit grubunda barsak mukozasındaki PCNA pozitif hücreler (oklar); İmmünoperoksidaz, HE zıt boyaması, X400



Şekil 31. Tedavi grubunda barsak mukozasındaki PCNA pozitif hücreler (ok); İmmünoperoksidaz, HE zıt boyaması, X400



**Şekil 32. Tedavi grubunda barsak mukozasındaki PCNA pozitif hücreler (oklar);
İmmünoperoksidaz, HE zıt boyaması, X400**

TARTIŞMA

İnflamatuvar barsak hastalığı, intestinal epitelin bariyer fonksiyonlarının bozulması ve immün sistemdeki defektlere bağlı olarak anormal bir cevap sonucu gelişir. Etiyopatogeneizde; genetik yatkınlık, çevresel faktörler, infeksiyöz ajanlar, değişmiş epitelyal geçirgenlik ve bozulmuş konakçı immün cevabı gibi faktörler önemli rol oynar (36).

İnflamatuvar barsak hastalığı klinisyenin karşısına kalın barsaktaki inflamasyon ile seyreden bir grup hastalık ile gelebilir. Bu grup içinde rektum ve kolon mukozasının yaygın yangısal, etyolojisi kesin olmayan, kanlı diyare ve mukusla karakterize, remisyon ve alevlenmelerle seyreden ÜK, enfeksiyöz ajanlara sekonder olarak gelişen gerek amibik gerekse de bakteriyel orijinli kolit, kolon ile rektum mukoza katmanlarında irritasyona sekonder gelişen kolit gibi tablolar şeklinde karşımıza çıkabilir (36).

Kesin etyolojik bir faktörün olmayışı ve İBH'yı tam olarak taklit eden bir deneysel model olmayışı İBH patogenezinin anlaşılmasını zorlaştırmaktadır (36). Birkaç potansiyel sorumlu etkenin, inflamatuvar sürecin başlamasında etkili olduğu düşünülüyorsa da; kabul edilen görüşe göre immün olayların baskılanmasında bir eksiklik vardır. Bu nedenle temel fizyopatolojik mekanizmanın; Th1 ve Th2 lenfositlerin aktivasyonunda düzensizlik ya da proinflamatuvar sitokinler ile antiinflamatuvar sitokinler arasındaki dengenin bozulması olduğunu destekleyen çalışmalar mevcuttur. Th1 hücreleri inflamatuvar yanıtta fazla miktarda artan ve bu yanıtın devamlılığını sağlayan sitokinleri (TNF α , IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, IL-12, INF- γ) üretirken, Th2 hücreleri ise inflamasyonu azaltan sitokinleri (IL-4, IL-10, IL-11, IL-13) üretirler. Bu düşünce ile proinflamatuvar sitokinlerin etkisini yok edecek ya da azaltacak tedaviler üzerinde çalışılmaktadır (37).

Bir serin-treonin kinaz inhibitörü olan sirolimus, hücre siklusunun G1 fazında duraklama ve apoptoza yol açar. Ayrıca, programlı hücre ölümünü ve T hücrelerde apoptozu tetikleyerek immün sistemi bloke eder. Sirolimus, T hücrelerin zarına penetre olarak, FKBP12 (FK 506 bağlayıcı protein) adlı bir hücre içi reseptöre bağlanır. Bu kompleks daha sonra FRAP (FKBP-Rapamisin bağlayıcı protein) adlı hücre siklusunun G1 fazının regulasyonunu sağlayan bir proteine bağlanarak T hücrelerinin IL-2'ye olan proliferasyon cevabını inhibe eder (32,33).

Sirolimus yalnızca aktive olmuş hücreleri etkilediğinden, immün sistemin geri kalan hücreleri fonksiyonlarını devam ettirirler ve enfeksiyonlarla savaşmayı sürdürürler. Bunun esas sebebi sirolimusun hücre siklusuna girmiş hücreleri sentez fazına girmeden hemen önce inhibe etmesi ve esas fonksiyonunu proliferasyon üzerine göstermesidir (2) .

İnflamatuvar barsak hastalığı tedavisinde sirolimus kullanımının bazı etkileri deneysel olarak oluşturulan kolitli sıçan çalışmalarında gösterilmiştir. Yin ve ark. deneysel olarak oluşturdukları kolit modelinde proinflamatuvar sitokinler olan TNF- α , IL-6 ve IL-17A düzeylerindeki düşüşün sirolimus tedavisi ile ilişkili olduğunu ve aynı tedavinin TGF- β düzeyini arttırdığını göstermişlerdir (38). Ayrıca sirolimusun sitotoksositeye ve apoptoza yol açmayan çok düşük dozlarında dahi endotelial hücre migrasyonunu engellediği ve proinflamatuvar sitokinleri baskılamak yoluyla neovaskularizasyonu durdurduğu gösterilmiştir (39).

İnflamatuvar barsak hastalığı araştırmalarında kullanılacak bir hayvan modelinde barsakta benzer morfolojik değişiklikler ortaya çıkmalı, patofizyoloji ile klinik semptom ve bulgular insandaki İBH'ye benzer olmalıdır. Çalışmamızda daha önce defalarca yapılan ve kolit oluşturduğu bildirilen % 4'lük asetik asiti rektal yoldan 6F katater ile uygulayarak akut kolit modeli oluşturduk.

Işık mikroskopik değerlendirmemizde kontrol grubunda beklendiği gibi kolonda makroskopik ve mikroskopik değişiklikler saptanmadı. Kolit grubunda da makroskopik ve mikroskopik ülserasyon saptanmadı ancak hiperemik ve ödemli kolon mukozasına sahip sıçanlar olmakla birlikte sıçanların çoğunda yaygın ülserasyonlar izlendi.

Biyokimyasal parametreleri karşılaştırdığımızda; kontrol grubunda inflamatuvar göstergeler olan IL-1, IL-10 ve MPO düzeylerini kolit grubuna göre istatistiksel açıdan anlamlı düşük bulduk. Kolit grubunun IL-1 düzeylerini tedavi grubundan istatistiksel olarak anlamlı yüksek tespit ettik. Kontrol ve tedavi grubunun IL-1 düzeyleri benzerdi. Beklediğimizin aksine IL-10 düzeyini en yüksek kolit grubunda saptadık. Kolit grubunun IL-

10 düzeylerini tedavi grubundan istatistiksel açıdan anlamlı yüksek tespit ettik. Kontrol ve tedavi gruplarının IL-10 düzeyleri farklı değildi. Kolit ve tedavi gruplarının MPO düzeyleri benzerdi. Kontrol grubunun MPO düzeylerini tedavi grubundan istatistiksel olarak anlamlı düşük bulduk.

İmmünohistokimyasal değerlendirmede CD3⁺, CD5⁺, CD45⁺ T lenfosit dağılımlarını en yüksek kolit grubunda, en düşük kontrol grubunda saptadık. Kolit grubunun CD3⁺, CD5⁺, CD45⁺ T lenfosit dağılımları tedavi grubundan istatistiksel olarak anlamlı yüksek bulduk. PCNA proliferasyon indeksini en yüksek tedavi grubunda, en düşük kontrol grubunda saptadık. Kolit grubunun PCNA proliferasyon indeksini tedavi grubundan istatistiksel olarak anlamlı düşük tespit ettik.

Tüm sonuçları birlikte değerlendirdiğimizde; asetik asit diğer çalışmalarda da olduğu gibi kolit oluşturmaktadır. Ancak kolit grubu ile sirolimus uygulanan grup karşılaştırıldığında makroskopik değerlendirmede ve ışık mikroskopik değerlendirmede istatistiksel açıdan anlamlı fark olmadığı görüldü. Beklediğimiz gibi proinflamatuvar sitokinlerden IL-1 kolit grubunda yüksek saptanırken, sirolimus verilen tedavi grubunda düşük saptandı. Antiinflamatuvar sitokinlerden IL-10'un kolit grubunda yüksek bulunması ise kolit grubunun kolit dışı etkenlerden etkilenmiş olabileceğini gösterebilir. Kolit ve tedavi gruplarının MPO düzeylerinin benzer bulunması ise doku MPO düzeylerinin değil serum MPO düzeylerinin ölçümlerine bağlı olabilir. Bu değerlendirmeler sirolimusun hem proinflamatuvar hem de antiinflamatuvar sitokinleri azalttığını göstermektedir.

İmmünohistokimyasal değerlendirmede CD3⁺, CD5⁺ ve CD45⁺ T lenfosit dağılım ortalaması beklenildiği gibi en fazla kolit grubunda saptandı. PCNA proliferasyon indeksi değerlendirildiğinde ortalamanın en fazla sirolimus verilen tedavi grubunda tespit edilmesi sirolimusun kolit yapılan barsak dokusunun iyileşmesinde etkili olduğunu düşündürmektedir.

Sonuç olarak; çalışmamızda sirolimusun IL-1 düzeyini düşürerek, kolitli barsak mukozasında PCNA proliferasyon indeksini artırarak İBH'de etkili olduğunu gösterdik. ÜK'deki inflamatuvar sürecin aydınlatılmasını ve sirolimusun İBH'nin tedavisindeki etkinliğini kanıtlayan daha geniş çalışmalara ihtiyaç olduğunu düşünüyoruz.

SONUÇLAR

Çalışmamız Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Genel Cerrahi Anabilim Dalı, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dallarının iş birliği ile Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Hayvanları Araştırma Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir. Çalışmamızın sonucunda;

1. Kolit oluşturulan grupların makroskopik incelemesinde gruplar arası istatistiksel açıdan anlamlı fark saptanmadı.

2. Kolit oluşturulan grupların mikroskopik incelemesinde gruplar arası istatistiksel açıdan anlamlı fark saptanmadı.

3. Kolit grubunda IL-1 ve IL-10 düzeylerinin belirgin olarak arttığı, kolit oluşturulup sirolimus verilen grupta ise kolit grubuna göre IL-1 ve IL-10 düzeylerinin daha düşük olduğu saptandı.

4. Kolit grubunda CD3⁺, CD5⁺ ve CD45⁺ T lenfositlerinin dağılım ortalamasının belirgin olarak arttığı görüldü. Kolit oluşturulup sirolimus verilen grupta PCNA proliferasyon indeksi kolit grubuna göre istatistiksel açıdan yüksek bulundu.

ÖZET

Çalışmamızda asetik asit ile deneysel kolit oluşturulan sıçanlarda, sirolimusun inflamatuvar sürece etkisini, makroskopik, ışık mikroskopik, biyokimyasal ve immünohistokimyasal olarak araştırdık.

Otuz adet dişi Spraque–Dawley sıçan 10'arlı 3 gruba ayrıldı: 1. grup kontrol grubu, 2. grup kolit grubu, 3. grup kolit oluşumuyla eş zamanlı sirolimus tedavisi verilen grup.

Makroskopik ve mikroskopik olarak; kolit oluşturulan gruplar arasında istatistiksel yönden anlamlı bir fark saptanmadı ($p>0,05$).

Kolit grubunda interlökin-1 ve interlökin-10 düzeylerinin belirgin olarak arttığı, kolit oluşturulup sirolimus verilen grupta ise kolit grubuna göre interlökin-1 ve interlökin-10 düzeylerinin istatistiksel açıdan anlamlı düşük olduğu tespit edildi ($p<0,05$).

Kolit grubunda cluster of differentiation 3⁺, cluster of differentiation 5⁺ ve cluster of differentiation 45⁺ T lenfositlerinin dağılım ortalamasının belirgin olarak arttığı görüldü. Kolit oluşturulup sirolimus verilen grupta proliferasyon hücre nükleer antijeni proliferasyon indeksi ortalamasının istatistiksel açıdan kolit grubuna göre yüksek olduğu saptandı ($p<0,05$).

Sonuç olarak; inflamatuvar barsak hastalığının tedavisinde sirolimusun etkinliğini araştıran daha geniş kapsamlı çalışmalara ihtiyaç olduğunu düşünüyoruz.

Anahtar kelimeler: Ülseratif kolit, inflamatuvar barsak hastalığı, rapamisin

THE EFFECTS ON INFLAMMATORY PROCESS OF USING SIROLIMUS IN RATS WITH EXPERIMENTAL COLITIS INDUCED BY ACETIC ACID

SUMMARY

In our study, we investigated the effect of sirolimus on inflammatory processes by macroscopic, light microscopic, biochemical and immunohistochemical evaluation in a experimental colitis rat model with acetic acid.

Thirty female Sprague-Dawley rats were divided into 3 groups, each group consisting 10 animals. First group was the control group, second group was colitis group and the third group was colitis group which was treated with sirolimus.

There was no statistically significant difference found between the colitis groups in macroscopic and microscopic evaluation ($p > 0,05$).

Interleukin-1 and interleukin-10 levels were significantly increased in colitis group. However there was a statistically significant decrease in interleukin-1 and interleukin-10 levels in colitis group which was treated with sirolimus ($p < 0,05$).

Cluster of differentiation 3⁺, cluster of differentiation 5⁺ and cluster of differentiation 45⁺ T lymphocytes average range was were significantly increased in colitis group. Proliferating cell nuclear antigen proliferation index in colitis group which was treated with sirolimus was statistically higher than the colitis group ($p < 0.05$).

As a result, more extensive studies should be performed about the effects of sirolimus in the treatment of inflammatory bowel disease.

Key words: Ulcerative colitis, inflammatory bowel disease, rapamycin

KAYNAKLAR

1. Stenson WB, Hanauer SB, Cohen RD. Inflammatory bowel disease. In: Yamada T (Ed). Textbook of Gastroenterology. 5th ed. Oxford: Blackwell Publishing; 2009. p.1386-472.
2. Sehgal S. Rapamune (RAPA, rapamycin, sirolimus): mechanism of action immunosuppressive effect results from blockade of signal transduction and inhibition of cell cycle progression. Clinical Biochemistry 1998;31(5):335-40.
3. Kaymakoğlu S. Gastroenterohepatoloji. İnflamatuvar Barsak Hastalıkları; İstanbul:Nobel Tıp Kitabevi; 2001. s.189-211.
4. Gilat T, Grossman A, Fireman Z, Rozen P. Inflammatory Bowel Disease. In: Mc Connell R, Rozen R (Eds). The genetics and epidemiology of inflammatory bowel disease. New York: Karger; 1986.p. 84-8.
5. Irvine E.J. A critical review of epidemiologic studies in inflammatory bowel disease. Scand J Gastroenterology 2001;36:2-15.
6. Retsky JE, Kraft SC. The extraintestinal manifestations of inflammatory bowel disease. In: Shorter EG (Ed), Inflammatory Bowel Disease. Williams and Wilkins. Baltimore:1995.p.474-91.
7. Goldmann L, Ausiello D, Ülseratif Kolit (çeviri: Sonsuz A.) Cecil Medicine 23th Ed. İstanbul: Güneş Tıp Kitabevi; 2011.s.1044-50.
8. Weterman IT, Pena AS. Familial incidence of Crohn's disease in the Netherlands and a review of the Literature. Gastroenterology 1984; 86:449-52.
9. Satsangi J, Grootcholten C, Holt H, Jewell DP. Clinical patterns of familial inflammatory bowel disease. Gut 1996;38(5):738-41.
10. Tysk C, Lindberg E, Jarnerot G, Floderus-Myrhed B. Ulcerative colitis and crohn's disease in an unselected population of monozygotic and dizygotic twins: a study of heritability and the influence of smoking. Gut 1988;29:990-6.

11. Gaya DR, Russell RK, Nimmo ER, Satsangi J. New genes in inflammatory bowel disease: lesson for complex disease. *Lancet* 2006;376(9518):1271-84.
12. Xavier RJ, Podolsky DK. Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature* 2007;448:427-34.
13. Shih DQ, Targan S. Immunopathogenesis of inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 2008;14(3):390-400.
14. Tezel A. Etiopathogenesis of ulcerative colitis. *Turkiye Klinikleri J Gastroenterohepatol Special Topics* 2009;2(1):7-12.
15. Gonzalez R, Medina F.S, Martinez-Augustin O, Nieto A, Galvez J, Risco S. Anti inflammatory effect of diosmectite in hapten-induced colitis in the rat. *British J Pharmacol* 2004;141:951-60.
16. Elson CO. Commensal bacteria as targets in Crohn's disease. *Gastroenterology* 2000;119:254-7.
17. Sartor RB. Pathogenesis and immune mechanisms of chronic inflammatory bowel diseases. *Am J Gastroenterol* 1997;92:5-11.
18. Duchmann R, May E, Heike M, Knoille P, Neurath M, Buschenfelde KH. T cell specificity and cross reactivity towards enterobacteria, bacteroides, bifidobacterium and antigens from resident intestinal flora in humans. *Gut* 1999;44:812-8.
19. Ardizzone S, Bianchi Porro G. Inflammatory bowel disease: new insights into pathogenesis and treatment. *J Int Med* 2002;252:475-96.
20. Boirivant M, Marini M, Di Felice G. Lamina propria T cell in Crohn's disease and other gastrointestinal inflammation show defective CD2 pathway-induced apoptosis. *Gastroenterology* 1999;116:557-65.
21. Friedman S, Blumberg RS. Inflammatory Bowel Disease. In: Longo DL, Fauci A, Kasper D, Hauser S, Jameson JL, Loscalzo J (Eds). *Harrison's Principles of Internal Medicine*. 18th Ed. USA: Mc Graw Hill Co; 2012.p.4961-83.
22. Levine JS, Burakoff R. Inflammatory Bowel Disease: Medical Considerations. In: Greenberger N, Blumberg R, Burakoff R (Eds). *Current Diagnosis & Treatment Gastroenterology, Hepatology & Endoscopy*. 2nd ed. USA: Mc Graw Hill Co; 2012.p.23-35.
23. Vermeire S, Van Assche G, Rutgeerts P. C-reactive protein as a marker for inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 2004;10(5):661-5.
24. Blonski W, Buchner A, Lichtenstein GR. Clinical predictors of aggressive/disabling disease: ulcerative colitis and crohn disease. *Gastroenterol Clin N Am* 2012;41(2):443-62.

25. Friedman SL, McQuaid KR, Grendell JH. İtihabi Barsak Hastalıkları (çeviri: Osmanoğlu N). Current Gastroenteroloji Tanı ve Tedavi. 2. baskı. Ankara: Güneş Kitabevi;2007.s.108-30.
26. Çavuşoğlu H. İnflamatuvar Barsak Hastalığı. İliçin G, Biberöglu K, Süleymenlar G, Ünal S (Editörler). İç Hastalıkları. 2.baskı. Ankara: Güneş Kitabevi; 2005.s.1577-91.
27. Dubinsky MC, Lamothe S, Yang HY, Targan SR, Sinnett D, Theoret Y, Seidman EG. Pharmacogenomics and metabolite measurement of 6-mercaptopurine therapy in inflammatory bowel disease. Gastroenterology;2000.p.705-13.
28. Greenbloom, S.L, Steinhart A.H, Greenberg G.R. Combination ciprofloxacin and metronidazole for active Crohn's disease. Can J Gastroenterology;1998.p.53-6.
29. Prantera C, Zannoni F, Scribano ML, Berto E, Andreoli A, Kohn A, Luzi C. An antibiotic regimen for the treatment of active Crohn's disease: a randomized, controlled clinical trial of metronidazole plus ciprofloxacin. Am J Gastroenterol;1996.p.328-32.
30. Kelman Z,Hurwitz J. Protein-PCNA interactions: a DNA-scanning mechanism? Trends Biochem Sci 1998;23(7):236-38.
31. Tsurimoto T. PCNA binding proteins. Front Biosci; 1999.p.849-58.
32. Stepkowski S.M. Mechanisms of action of Sirolimus; Expert reviews in Molecular Medicine;Cambridge University Pres, 2000;33:179-84.
33. Banasynski LA, Liu CW, Wandless TJ. Characterization of the FKBP,rapamycin,FRB ternary complex. J Am Chem Soc 2005;127(13):4715-21.
34. Noh WC, Mondesire WH, Peng J, Jian W, Zhang H, Dong J et al. Determinants of Rapamycin sensitivity in breast cancer cells. Clin Cancer Res 2004;10(3):1013-23.
35. Aguilar-Nascimento JE, França-da-Silva LR, De-Oliveira AF, Gomes-da-Silva MH. Enhanced mucosal re-epithelialization induced by short chain fatty acids in experimental colitis. Braz J Med1999;32(8):961-6.
36. Yamamoto M, Yoshizaki K, Kishimoto T. IL-6 Is required for the development of Th1 Cell-mediated murine colitis. J Immunol 2000;164:4878-82.
37. Giroir BP. Mediators of septic shock: New approaches for interrupting the endogenous inflammatory cascade. Crit Care Med 1993;21:780-6.
38. Hui Y, Xiangyong L, Bobin Z, Tao L, Baohong Y, Qian Ni et al. Sirolimus ameliorates inflammatory responses by switching the Treg/Th17 profile in murine colitis. Immunology 2013 8.doi:10.1111/imm.12096.
39. Kwon YS, Hong HS, Kim JC, Shin JS, Son Y. Inhibitory effect of rapamycin on corneal neovascularization in vitro and in vivo. Invest Ophthalmol Vis Sci 2005;46(2):454-60.

EKLER

Ek 1

T.C.


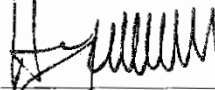

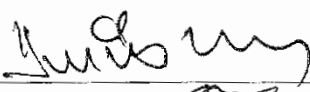
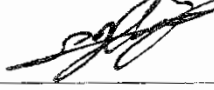
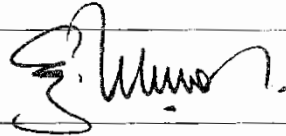

TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU KARARLARI

EDİRNE

Oturum Sayısı: 06
KARAR NO: 2012.06.04

Karar Tarihi: 16.08.2012

Yürütücülüğünü Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi öğretim üyesi Yrd.Doç.Dr.Tamer Sağıroğlu'nun yaptığı Araş. Gör. Dr. Eyüp Kahya'nın Tıpta Uzmanlık tezi olarak planlanan TÜHDYEK-2012/66 protokol nolu "Asetik asit ile oluşturulan deneysel kolitli sıçanlarda sirolimus kullanımının inflamatuvar süreç üzerine etkisi" başlıklı çalışma hakkında görüşüldü; araştırmanın amaç, yaklaşım, gereç ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmesi sonucunda; Hayvan Hakları Evrensel Bildirgesi ve etik kurallara uygun olarak hazırlandığına ve çalışmanın yapılabileceğine mevcudun oy birliği ile karar verilmiştir.

| Ünvanı/Adı/Soyadı | Araştırma ile İlişki | Toplantı Katılımı | İmza |
|---|---|--|---|
| Yrd.Doç.Dr. Burhan AKSU Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi | <input type="checkbox"/> var <input type="checkbox"/> yok | <input type="checkbox"/> evet <input type="checkbox"/> hayır |  |
| Yrd.Doç. Dr. Hayati ARDA Fen-Edebiyat Fakültesi Öğretim Üyesi | <input type="checkbox"/> var <input type="checkbox"/> yok | <input type="checkbox"/> evet <input type="checkbox"/> hayır |  |
| Vet.Hek. Ziya ÇUKUR Veteriner Hekim | <input type="checkbox"/> var <input type="checkbox"/> yok | <input type="checkbox"/> evet <input type="checkbox"/> hayır |  |
| Hüseyin KOÇ Sivil Toplum Örgütü Üyesi Sivil Üye | <input type="checkbox"/> var <input checked="" type="checkbox"/> yok | <input checked="" type="checkbox"/> evet <input type="checkbox"/> hayır |  |
| Yrd.Doç.Dr. Beytullah ÖZKAN Fen-Edebiyat Fakültesi Öğretim Üyesi | <input type="checkbox"/> var <input checked="" type="checkbox"/> yok | <input checked="" type="checkbox"/> evet <input type="checkbox"/> hayır |  |
| Yrd.Doç.Dr. Y. Atakan SEZER Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi | <input type="checkbox"/> var <input type="checkbox"/> yok | <input type="checkbox"/> evet <input type="checkbox"/> hayır | |
| Doç. Dr. Enis ULUÇAM Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi | <input type="checkbox"/> var <input checked="" type="checkbox"/> yok | <input type="checkbox"/> evet <input type="checkbox"/> hayır |  |
| Yrd.Doç.Dr.Hakan GÜRKAN Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi | <input type="checkbox"/> var <input type="checkbox"/> yok | <input type="checkbox"/> evet <input type="checkbox"/> hayır | |
| Osman GÜLTEKİN Sivil Üye | <input type="checkbox"/> var <input checked="" type="checkbox"/> yok | <input checked="" type="checkbox"/> evet <input type="checkbox"/> hayır |  |

Ek 2

| | |
|--|--------------------------------------|
| TRAKYA ÜNİVERSİTESİ | PROJE NO : 2012/164 |
| BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ SÖZLEŞMESİ | PRJ NİTELİĞİ : Tıpta Uzmanlık |

1- PROJE BAŞLIĞI

Asetik Asit ile Oluşturulan Deneysel Kolitli Sıçanlarda Sirolimus Kullanımının İnflamatuvar Süreç Üzerine Etkisi

2- PROJE PERSONELİ

| | Adı ve Soyadı | Unvanı | Telefon (İş) |
|--------------------|-----------------|---------------|------------------------|
| Proje Yöneticisi : | Tamer SAĞIROĞLU | Yrd. Doç. Dr. | Tel: 235 27 25 - 1150 |
| Araştırmacılar : | Eyüp KAHYA | Arş. Gör. Dr. | Fax: |
| | Turan KARACA | Doç. Dr. | Cep Tel: 506 253 73 06 |

3- PROJE BÜTÇESİ

| | |
|--|-------------|
| Teçhizatın Tanımı : Detay listesi ektedir. | Fiyatı (TL) |
| | |
| | |
| | |

| Ekonomik Kod | | |
|----------------------|--|---------------------|
| | 03.2 Tüketime Yönelik Mal ve Malzeme Alımları | 19.517,00 TL |
| | 03.3 Yolluklar | |
| | 03.5 Hizmet Alımları | |
| | 03.7 Menkul Mal, Gayrimaddi Hak Alım,Bakım ve Onarım Giderleri | |
| | 06.1 Mamul Mal Alımları | |
| TOPLAM ÖDENEK | | 19.517,00 TL |

4- PROJENİN GELİŞİMİ :

| | | |
|--|-----------------------------------|---------------------|
| 1.Projenin Kabul Tarihi:10.09.2012 | 4. I. Rapor Tarihi :24.04.2013 | Sonuç : (+/-) |
| 2. Projenin Başlama Tarihi :23.10.2012 | 5. II. Rapor Tarihi : | Sonuç : (+/-) |
| 3.Projenin Bitiş Tarihi:23.10.2013 | 6. III. Rapor Tarihi : | Sonuç : (+/-) |
| 4.Projenin Süresi: 12 Ay | 7. IV. Rapor Tarihi : | Sonuç : (+/-) |
| | 8.Sonuç Raporu Tarihi: 23.10.2013 | Sonuç : (+/-) |

5- İLGİLİ BÖLÜM VE FAKÜLTE : Tıp Fakültesi Genel Cerrahi Anabilim Dah

6- PROJENİN UYGULANMASI :

- Bu proje 2547 sayılı YÖK Kanununun 4684 sayılı Kanunla değişik 58.maddesi gereğince, Yükseköğretim Kurumları Bilimsel Araştırma Projeleri Hakkında Yönetmelik ve Trakya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Uygulama Yönergesi çerçevesinde yürütülmüştür.
- Proje süresinde ve harcama fasıllarında Rektörlük onayı alınmadan değişiklik yapılamaz.
- Proje Yöneticisi her 6 ayın sonunda gelişme raporunu, Bölüm Başkanlığı ve ilgili Dekanlık veya Enstitü Müdürlüğü aracılığı ile Rektörlüğe iletmekle yükümlüdür.
- Projelerden alınan teçhizat tüm öğretim üyelerinin kullanımına açıktır.
- Bir ay geçtiği halde gelişme raporu verilmemiş veya süresi bitmiş olup süre uzatımı talebinde bulunulmamış projeler iptal edilir. Bakiye ödenek, BAP Komisyonu tarafından kabul edilecek yeni projelere tahsis edilir veya diğer projelere aktarılır.

| Adı ve Soyadı | İmza | Tarih |
|--|--|------------|
| Proje Yöneticisi : Yrd. Doç. Dr. Tamer SAĞIROĞLU |  | 30.10.2012 |

Komisyon Başkanı

...../...../2012

Prof. Dr. Süleyman PIŞKIN

Rektör Yardımcısı