

**T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS PROGRAMI**

Tez Yöneticisi
Prof. Dr. Dikmen DÖKMECİ

**DENEYSEL ARTRİT MODELİNDE ERDOSTEİN,
KAFFEİK ASİT FENETİL ESTER VE KOMBİNE
TEDAVİNİN ETKİSİ**

(Yüksek Lisans Tezi)

Fisun ÖGE DAĞDELEN

Referans no:10028408

EDİRNE-2014

**T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS PROGRAMI**

Tez Yöneticisi
Prof. Dr. Dikmen DÖKMECİ

**DENEYSEL ARTRİT MODELİNDE ERDOSTEİN,
KAFFEİK ASİT FENETİL ESTER VE KOMBİNE
TEDAVİNİN ETKİSİ**

(Yüksek Lisans Tezi)

Fisun ÖGE DAĞDELEN

Destekleyen Kurum: TÜBAP

Proje No: 2011/182

T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürlüğü

ONAY


Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı çerçevesinde ve Prof. Dr. Dikmen DÖKMECİ'nin danışmanlığında Yüksek Lisans öğrencisi Fisun ÖGE DAĞDELEN'e ait tarafından tez başlığı "Deneysel Artrit Modelinde Erdosteine, Kafeik Asit Fenetil Ester ve Kombine Tedavinin Etkisi" olarak teslim edilen bu tezin tez savunma sınavı 21.02.2014 tarihinde yapılarak aşağıdaki jüri üyeleri tarafından "**Yüksek Lisans Tezi**" olarak kabul edilmiştir.



Prof. Dr. Dikmen DÖKMECİ
JÜRİ BAŞKANI



Prof. Dr. Nurettin AYDOĞDU
ÜYE



Yrd. Doç. Dr. Özgür GÜNDÜZ
ÜYE

Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

Doç. Dr. Tammam SİPAHİ
Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimimde ve tez çalışmamda değerli katkıları olan danışman hocam Prof. Dr. Dikmen DÖKMECİ'ye, ayrıca Prof. Dr. Ahmet ULUGÖL, Prof. Dr. Ç. Hakan KARADAĞ, Yrd. Doç. Dr. Özgür GÜNDÜZ, Yrd. Doç. Dr. F. Nesrin TURAN, Doç. Dr. Ufuk USTA, Doç. Dr. Hakan ERBAŞ, Prof. Dr. Nurettin AYDOĞDU'ya, bölüm sekreterimiz Gülçin AKIN, TÜBAP ve Dr. Ahmet DAĞDELEN'e teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

GİRİŞ VE AMAÇ	1
GENEL BİLGİLER	3
ROMATOİD ARTRİT	3
KAFEİK ASİT FENETİL ESTER	9
ERDOSTEİN	11
SİTOKİNLER	12
SERBEST RADİKALLER	14
GEREÇ VE YÖNTEMLER	15
BULGULAR	28
TARTIŞMA	48
SONUÇ	54
ÖZET	56
SUMMARY	58
KAYNAKLAR	60
ŞEKİLLER LİSTESİ	67
ÖZGEÇMİŞ	69
EKLER	

SİMGE VE KISALTMALAR

α	: Alfa
Anti CCP	: Antisiklik sitrüllenmiş peptit
ARA	: American Rheumatology Association
β	: Beta
CAPE	: Kafeik asit fenetil ester
DIC	: Dissemine intravasküler koagülopati
DİF	: Distal interfalangeal
DMARD	: Disease modifying antirheumatic drugs
DMSO	: Dimethyle sulfoxide
ELISA	: Enzyme-linked immunosorbent assay
FCA	: Freund's complete adjuvant
HE	: Hematoksilen & eosin
HLA	: Human leukocyte antigen
HRP	: Yaban turbu peroksidazi
IFN	: İnterferon
Ig	: İmmunglobulin
İG	: İntragastrik
İL	: İnterlökin
İP	: İnterperitoneal
MDA	: Malondialdehit
MKF	: Metakarpofalangeal
MTF	: Metatarsofalangeal

MTX	: Metotreksat
NK	: Naturel killer
NSAİİ	: Nonsteroid anti-inflamatuar ilaçlar
PAM	: Pressure application measurement
PG	: Prostaglandin
PIF	: Proksimal interfalangeal
RA	: Romatoid artrit
RF	: Romatoid faktör
TBA	: Tiyobarbutirik asit
TMB	: Tetrametil benzidin
TNF	: Tümör nekroz faktör

GİRİŞ VE AMAÇ

Romatoid artrit (RA), etyolojisi kesin bilinmeyen, çoğunlukla simetrik poliartiküler tutulum gösteren kronik, multisistemik, otoimmün ve sinovyal proliferasyona yol açıp eklem harabiyetine neden olan inflamatuvar bir hastalıktır (1-7). Cilt, kalp, akciğer ve göz gibi ekstra artiküler tutulum gösterebilir (8-11).

Hastalığın ilk belirtisi sabah tutukluğu ve aktivite ile semptomların düzelmesiyle karakterize inflamatuvar artritlerin prototipidir. Hastalığın fizyopatolojisinde aktive olan inflamatuvar mediatörler sinoviaya infiltre olarak eklem hasarı ve kalıcı sakatlığa yol açar. Bu inflamasyona lökotrien ve prostaglandin (PG)'lerin salınmasını sağlayan polimorfonükleer hücre kemotaksisi ve reaktif oksijen radikalleri neden olur. Polimorfonükleer hücre ürünü olan interlökin (IL)'ler ve tümör nekroz faktör (TNF) alfa (α) artritinin temel mekanizmasını oluşturur (12).

Kafeik asit fenetil ester (CAPE), propolis içerisinde farmakolojik olarak en etkili ve aktif bileşiklerden biridir. CAPE ile ilgili yapılan çalışmalarda antiviral, antikarsinojenik, antiinflamatuvar, antioksidan, immünmodülatör ve yara iyileştirmesini hızlandırıcı etkileri kanıtlanmıştır (13,14).

Erdostein [N-(karboksimetil)-homosisteintiolakton], hepatik metabolizasyondan sonra aktifleşen 2 tiyol grubu içeren antioksidan, antiinflamatuvar ve bakteriyel adhezyonu engelleyen kronik pulmoner hastalıklarda kullanılan mukolitik bir ajandır. Ayrıca birçok çalışmada erdosteinin serbest radikal süpürücü etkisinin olduğu gösterilmiştir (15).

Bu çalışmada sıçanlarda oluşturulan artrit modelinde erdostein, CAPE ve kombine tedavinin koruyucu etkisini araştırmayı amaçladık. Yaptığımız literatür taramasında insanlarda görülen romatoid artritinin benzeri kabul edilen, sıçanlardaki deneysel adjuvant artrit

modelini oluşturması sıçanlarda kolay ve efektif olduğundan ve yayınlanmış pek çok sıçan adjuvant artrit modeli ile yapılmış çalışma olduğundan deneylerimizde deney hayvanı olarak sıçan kullanmaya karar verdik. Bu çalışmamız literatürde deneysel adjuvant artrit modelinde erdosteine, CAPE ve kombine tedavinin etkisinin incelendiği ilk çalışma olacaktır.

GENEL BİLGİLER

ROMATOİD ARTRİT

Romatoit artrit, hücresel ve otoimmün mekanizmalarla sinoviyal dokuda hasara neden olan, sistemik bulgular gösteren, kronik, inflamatuvar poliartritle karakterize multisistemik bir hastalıktır (1-5). RA; dünyada tüm ırklarda görülebilen otoimmün hastalıklardan biri olup prevalansı yaklaşık %1, kadın/erkek oranı 3/1'dir (1,2). Hayatın 3-5. dekatında daha sık gözükmetedir (6,8). RA, birçok hastada değişik derecelerde kemik ve eklem tahribi yaparak zamanla şekil bozukluğuna ve işlev kaybına yol açmaktadır (5-12).

Etyopatogenez

Romatoit artritin etyolojisi tam olarak bilinmemektedir. Spesifik infeksiyöz ajanlar ya da başka sebeplerin bulunamamasına karşın genetik yatkınlık ön plana çıkmaktadır. *Human leucocyte antigen* (HLA) DR4 pozitif olan kişilerde hastalık daha ciddi seyirlidir (8,12).

Eklem tutulumunda ayırt edici özelliği özellikle monosit ve T lenfositlerden oluşmuş polimorfonükleer hücre infiltrasyonu içeren bir proliferatif sinovium olan sinovial pannustur. Pannus kemik, kıkırdak ve sinovial yüzeylerde ilerleyici tahribe neden olur. Radyolojik olarak kemik erezyonları şeklinde görülebilir. Diğer yumuşak dokularda aynı zamanda sinovium ve romatoid nodüller de gelişebilir (12).

Hastalığın erken döneminde sinovial zar hiperemik, ödemli ve kalınlaşmıştır; bunun sonucunda eklem boşluğunu dolduracak şekilde villuslar oluşur. Eklem kıkırdağı ile sinovial zar arasında oluşan granülasyon dokusu (pannus) oluşur. Sonra pannus kalın ve fibröz doku oluşturarak eklem fibröz ankilozuna yol açar. Sinovial sıvı artmış ve bulanıktır. Mikroskopik olarak sinovial zar çok katlı bir hiperplazi, vaskülarizasyon, lenfosit ve plazma

hücrelerinden zengin bir hücresel infiltrasyon ve fibrinoid dejenerasyon içerir. Hücre infiltrasyonu bazı alanlarda lenfoid agregasyon veya folliküller oluşturur (6). Bu işlem direkt olarak kemik ve kıkırdak azalmasına neden olan matriks metalloproteinazları etkiler ve proinflamatuvar prostanoitler salgılanır. Monosit ürünleri olan IL-1 ile TNF- α bu işlemin asıl merkezidir. TNF- α özellikle matriks metalloproteinazların aktivitesinde, IL-1 ise PG-E2 uyarılmasında anahtardır. Ek olarak TNF- α , IL-1 ve lenfotoksin osteoklastları aktive eden etkenlerdir. TNF- α 'nın etkinliğinde salgılanan IL-6 gibi diğer sitokinler ve tek başına IL-1 ateş, miyalji, kilo kaybı ve akut faz proteinlerinin indüksiyonuyla sonuçlanan sistemik semptomlara neden olur (12).

Klinik Özellikler

Hastaların büyük bir kısmında birkaç haftaya yayılmış, halsizlik, yorgunluk, kilo kaybı, bir ya da birkaç küçük eklemden ağrı ve hafif ateşin eşlik ettiği bir başlangıç söz konusudur (5,6). Hastalarda genellikle bir saat veya daha fazla süren sabah tutukluğu meydana gelmektedir. Uzun süre hareketsizlikten sonra oluşan katılık orta derecede aktiviteyle düzelir (12).

Romatoit artrit tipik olarak küçük ve büyük eklemleri simetrik olarak tutan kronik bir poliartritir. Sıklıkla metakarpofalangeal (MKF), el bilekleri ve proksimal interfalangeal (PIF) eklemler; daha az sıklıkla diz, dirsek, metatarsofalangeal (MTF) eklemler de olaya katılır. Tipik olarak bu eklemlerde görülen RA'da ilk belirtiler herhangi bir eklemden başlayabilir ancak dorsal, lomber vertebraların, sakroiliak eklemlerin ve distal interfalangeal (DİF) eklemlerin tutulumu beklenmez (6,7).

Tutulan eklemden sinoviyumun inflamasyonu sonucu ağrı, şişlik ve ısı artışı vardır. Zamanla eklem destrüksiyonu oluşmaktadır; genellikle bir saat veya daha fazla süren sabah tutukluğu meydana gelmektedir. Uzun süre hareketsizlikten sonra oluşan katılık orta derecede aktiviteyle düzelir (12).

Sinovial inflamasyon kemik ve kıkırdak dokuda şekil bozukluğuna sebep olduğu gibi; tendon kılıfının inflamasyonuna tendonun seyrinde uzama ya da kısalmaya neden olur.

Yaygın şekil bozuklukları arasında;

- a) Ekstensör tendonun zayıflaması lateral bantların palmar yöne yer değiştirmesi, PİF ve DİF eklemlerde hiperekstansiyon oluşmasına yol açar buna düğme iliği deformitesi denir (6).

b) MKF eklem fleksörlerinin kontraksiyonu sonucu MKF ekleminde fleksiyon kontraktürü, PİF ekleminde hiperekstansiyon oluşmasıyla ortaya çıkan deformiteye de kuğu boynu deformitesi denir (6).

Parmakların MKF eklemlerde kayması sonucu ulnar deviasyon görülür. Dirseklerde ilk olarak ekstansiyon kusuru gelişir; hastaların bir kısmında ilk tutulan diz eklemidir. Diz ekleminde sinovial sıvının popliteal fossaya ulaşmasıyla baker kisti gelişir (8).

Hastaların bir kısmında ayak eklemleri tutulur. Ayakta en sık MTF, daha sonra subtalar daha az oranda da tibiotalar eklemler tutulur. Medial malleolun hemen arkasında nervus tibialis posteriorun geçtiği tarsal tünelin sinovit sonucu sıkışması ile ayak tabanında yanma ve uyuşmalar görülebilir. Geç dönemde MTF eklem tutulumu ayak ön tarafında genişleme, halluks valgus ve çekiç parmağa neden olabilir (8).

Servikal vertebra tutulumu nadir olmasına rağmen en sık atlantoaksiyel eklem tutulumu görülür. Atlantoaksiyel eklemindeki sinovit sonucu eklem genişler ve aksisin odontoid çıkıntısı foramen magnuma doğru hareket edip spinal kordu sıkıştırır. Spinal kord sıkışması oksipital bölgeye yayılan ağrı, üst ekstremitelerde parestezi, pozisyon his kaybı, reflekslerde artış, barsak ve mesane fonksiyon bozukluğu gibi ciddi sonuçlar doğurabilir (8).

Ayrıca RA, temporomandibular eklemi tutarak çenede ağrı ve açılma kusuru, aritenoid eklemi tutarak seste değişiklikler, iç kulak kemikçiklerini tutarak işitme kusurları, omuz eklemi de tutarak donuk omuz (*frozen shoulder*) yapabilir (8).

Romatoid Artrit Eklem Dışı Bulguları

Romatoid artrit, eklemleri tutan bir hastalık olsa da diğer organ tutulumları da görülebilir. En sık görülenler romatoid nodüllerdir. Bunlar subkutan dokuda palpe edilebilen, büyüklüğü ile hastalığın aktivitesi arasında doğru orantılı bir ilişki olan ağrısız birkaç milimetreden birkaç santimetreye kadar değişen boyutta ve sıklıkla periosta yapışık sert kıvamlı şişliklerdir. Özellikle dirsek ekstensör tendon yüzeylerinde olmakla beraber el sırtı, oksipital bölge, sakrum, aşil tendonu gibi bası noktalarında daha sıklırlar (8,12).

Romatoid nodüller daha az olarak da akciğer, plevra, perikardium, sklera ve nadir vakalarda kalp gibi diğer kısımlarda da gelişebilir. Multiple pulmoner nodül oluşumu ve pnömokonyoz Kaplan sendromu olarak bilinir (8,12).

Atlantoaksiyel eklem tutulumu sonucu birkaç hafta veya ay içinde yavaşça artış gösteren el ve ayaklarda pareteziler, motor zayıflık ve oksipital bölgeye yayılan ense ağrısı da görülebilir. Periferik bir sinirin sinovit veya tenosinovit sonucu sıkışmasıyla tuzak nöropatisi gelişir; en klasik örneği median sinirin el bileğinden geçerken tuzaklanması sonucu

karpal tünel sendromu oluşur ve el parmaklarında özellikle geceleri artan ağrı, uyuşma ve yanma hissi ileri dönemde de motor kusur ve tenar kas atrofisi gelişir (8).

Periferik nöropati, diyabette olduğu gibi eldiven çorap tarzında pareteziler yapan distal sensöryal nöropatidir. Periferik bir sinirin ani ve ağrılı tutulumuna da mononöritis multiplaks denir; düşük el ve düşük ayak gibi dramatik görüntülere neden olabilir (8).

Vaskülit RA'nın geç döneminde ortaya çıkabilir. Erken dönemde görülmesi kötü prognoz işaretidir. Seropozitif, romatoid nodül ve eklem harabiyeti olan hastalarda sıklığı artar. En sık tırnak dibi kapillerlerinde tromboz, parmak uçlarında infarkt ve bacak ülserleri görülebilir (8).

Romatoid artritte geç dönemde görülen splenomegali, lökopeni, tekrarlayan pulmoner enfeksiyonlar Fetly sendromu olarak tanımlanır (8,12). Ayrıca proteinüri ile kendini belli eden sekonder amiloidoz, ağız kuruluğu ve gözyaşı azalması ile seyreden Sjögren sendromu görülebilir (8).

Laboratuvar ve Radyolojik Bulgular

Romatoid artritte en karakteristik labratuvar bulgusu immunglobülin (Ig) G'yi antijen olarak algılayan Ig M tipi otoantikordur. Hastalığın kesin tanısını koydurmaz. Başlangıçta olguların % 50 kadarında pozitifdir, yine olguların % 20-35' i tanı konulduktan sonraki 6 ay içerisinde pozitifleşir (7,8).

Romatoid faktör (RF), diğer romatolojik hastalıklar sistemik lupus eritomatozus, sistemik skleroz, kronik bakterial enfeksiyonlar, tüberküloz, sifiliz, viral enfeksiyonlar, sitomegalovirüs, rubella, kronik karaciğer hastalıkları, sarkoidoz gibi hastalıklarda ve ileri yaş ile artan sıklıkta normal kişilerde de pozitif bulunabilir. Erken RA tanısında RF'den daha özgü olan antisiklik sitrüllemiş peptit (anti CCP) antikolar tanımlanmıştır (7,8).

Romatoid artritli hasların büyük çoğunluğunda hastalığın derecesiyle doğru orantılı kronik hastalık anemisi görülür. Bu da demir metabolizma bozukluğu, eritrosit yapım ve yıkımındaki dengesizliğe ve yaşam süresinin kılmasına yol açar. Ayrıca eritropoetin seviyesinde azalma ve kemik iliğinin eritropoetine azalmış ilgisi aneminin sebeplerindedir. Nonsteroid antiinflamatuvar ilaçlar (NSAİİ)'m kullanımına bağlı gastrointestinal sistemden olan gizli kanama ve kullanılan tedavi edici ajanlar anemiye neden olur (7,8).

Erken dönemde simetrik yumuşak doku şişlikleri ve tutulan eklem çevresindeki osteoporoz direkt grafide görülebilir. Hastaların üçte birinde tanı sırasında eklem köşelerinde gelişen ve erezyon olarak adlandırılan küçük yenikler zamanla büyük kistler oluşturabilir. Erozyonların ilerlemesi hastalığın gidişatı ile yakından ilişkilidir (7,8).

Romatid Artritte Ayırıcı Tanı

Tanı klinik olarak hastalığın erken döneminde çoğunlukla diğer hastalıkların dışlanması ile konur. Her ne kadar simetrik eklem tutulumu ve RF pozitifliği ayırıcı tanıda yardımcı olsalar da sistemik lupus eritematosus ve sedef artritine özgü klinik bulgular olmaksızın ayırt edilemez. Bunların dışında hastalığın ilk günlerinde viral infeksiyonlar kısa süren klinik bulgularından dolayı RA'dan ayırt edilir. Yaşlı hastalarda polimiyalji romatika, hipotiroidizm ve yaygın osteoartroz ayırıcı tanıda sıklıkla karışıklığa neden olan durumlardır. Bugün için RA'yı en iyi tanımlayan araç ARA (Amerikan Rheumatology Association)'nın 1987 yılında yayınladığı kriterlerdir (8,12).

Tanı Kriterleri

- 1. Sabah sertliği** : Eklem çevresinde 1 saatten fazla süren sabah sertliği
- 2. En az 3 eklemde artrit** : En az 3 eklem bölgesinde hekim tarafından kaydedilen yumuşak doku şişliği ve sinoviyal sıvı artışı ile birlikte olan artrit
- 3. El eklemlerinde artrit** : Elde en az bir eklem bölgesinde şişlik
- 4. Simetrik artrit** : Aynı eklem bölgesinde bilateral artrit
- 5. Romatoid nodüller** : Kemik çıkıntılar, eklem ekstensör yüzlerinde subkutan nodüller
- 6. RF pozitifliği** : Herhangi bir yöntemle RF pozitifliğinin gösterilmesi
- 7. Radyolojik bulgular** : Ön-arka el ve bilek grafilerinde RA'ya tipik erozyonların gösterilmesi

*Bu bulgulardan en az 4 tanesi olmalı ve ilk 4 bulgu da en az 6 hafta süre ile devam etmelidir.

Sinoviyal sıvıda inflamasyon hakimdir. RF % 80-90 hastada pozitif bulunmuştur ancak RF'nin pozitif olması kesin tanı olmamakla beraber hastayı seropozitif yapar. Çok sayıda eklem tutulumu, sürekli aktif seyir, yüksek RF düzeyi, anti CCP pozitif olması, nodül gelişimi ve HLA DR4 haplo tipi kötü prognoz habercisidir (8).

Tedavi

Romatoid artritte tedavinin amacı ağrıyı azaltmak, eklem harabiyetini önlemek ve eklem dışı komplikasyonları azaltıp hastanın yaşam kalitesini artırmaktır. Bu amaçla ilaç tedavisinin yanında hastaya eğitim verilmeli ve hekim hasta arasında güven oluşmalıdır. Tedavi ile hastalığın kaderinin değişebileceği, bunun da uzun zaman alabileceği ve bu hastalığa multidisipliner yaklaşım gerektiği vurgulanmalıdır. Özellikle son yıllarda ilaç

tedavisi, fizik tedavi ve rehabilitasyon, ortopedi ve rekonstrüktif cerrahi alanları da RA tedavisine destek olmaktadır (6,8,12).

Romatoid artrit tedavisinde; NSAİİ, kortizol, hastalığın seyrini değiştiren ilaçlar *disease modifying antirheumatic drugs* (DMARD) ve biyolojikler kullanılmaktadır (5,8).

Nonsteroid antiinflamatuar ilaçlar; analjezik, inflamasyon baskılayıcı etkisinden faydalanmak ve temel etkili ilaç kullanımına zaman kazandırmak için kullanılır. Ancak eklem tahribi ve erezyona karşı etkili değildir. NSAİİ genelde güvenilir olmalarına rağmen gastrointestinal toksisite, trombosit fonksiyon bozukluğu ve renal perfüzyonun azalması ciddi sonuçlara yol açabilir (5,8,12).

Glukokortikoidler halen antiinflamatuar hastalıkların tedavisinde kullanılan en güçlü ilaçlardan biridir. Özellikle hastalığın akut alevlenmesinde ve DMARD tedavisine başlarken köprü görevi görürler. Uzun süreli kullanımı hareket kısıtlılığı olan RA'lı hastalarda osteoporoz, patolojik kırıklar, avasküler nekroz, diabetes ve obezite gibi sorunları beraberinde getirir. Ancak bu ilaçların intaartiküler uygulanmasında hemen hemen hiç yan etki olmadığı gibi RA'nın artiküler yakınmalarını ciddi derecede azaltırlar (8,12).

Romatoid artrit hastalarının birçoğunda erozyon gelişimini geciktirdiği veya durdurduğu için hastalığın seyrini değiştiren ilaçlar olan DMARD'lar kullanılmaktadır. Önceleri DMARD'lar hastalığın şiddetinin arttığı geç dönemde verilirdi, ancak oluşan sakatlıklar nedeniyle DMARD'ların daha erken dönemde geniş bir şekilde kullanımı yaygınlaştı (5,8,12). RA tedavisinde en çok tercih edilen DMARD grubu ilaç metotreksat (MTX)'tir. Folik asit antagonisti olan MTX, RA'nın kemik erezyonlarını dramatik şekilde azaltmakta; buna karşın folik asit eksikliğine bağlı oral ülserler, bulantı, kusma ve kemik iliği süpresyonuna neden olabilmektedir (5,7,8,12).

Sülfasalazin erezyon gelişimini azaltan bir diğer ilaçtır. MTX ile kombine kullanımı etkinliğini artırır. Hidroksiklorokin antimalaryal bir ajandır. RA tedavisinde en çok MTX ile kombine edilir. Hidroksiklorokin DMARD'ların en az toksik olanı olmasına rağmen nadir de olsa makula toksisitesine neden olabilir; bu nedenle yılda bir kez oftalmolog kontrolü önerilir (5,8).

Leflunamid bir diğer erozyon gelişimini azaltan primidin sentez inhibitörü ilaçtır. Yan etkileri arasında en sık diare, karın ağrısı, zayıflama, döküntü ve karaciğer enzim bozukluğu görülür. Gebe kalmak isteyen ya da daha önce leflunamid almış olan bayanlarda arındırma protokolleri uygulanır (5,8,12).

Romatoid artrit tedavisinde yeni bir yaklaşım olan biyolojik ajanların kullanımına başlanmıştır. Biyolojik ajanlar sinovial makrofajlar tarafından üretilen ve eklem harabiyetine sebep olan TNF- α 'ya ve diğer sitokinlere karşı geliştirilmişlerdir. Bunlarda TNF- α ' ya karşı etanercept, infliksimab, adalimumab ve IL-1'e karşı anakinra biyolojik ajan olarak geliştirilmiştir. Biyolojik ajanlar eklem harabiyetini belirgin şekilde durdurmakta; belirti ve bulguları dramatik şekilde azaltmaktadır. Ancak bu, TNF- α inhibitörlerinde daha iyi gözlenmektedir. Bu ilaçlara ilaveten T hücre kostimülasyon inhibitörü abatacept ve B hücre azaltıcı ajan rituksimabtır. Biyolojik ajanların kullanımıyla beraber infeksiyonlara yatkınlık (tüberküloz reaktivasyonu), lenfoma gibi maligniteler, alerjik reaksiyonlar ve demiyelinizan (multiple skleroz) hastalıklar artmaktadır (5,7,8,12).

Siklosporin diğer ilaçlara yanıt vermeyen hastalarda tek başına veya MTX ile kombine olarak kullanılır. Siklosporine renal toksisite açısından dikkat edilmelidir. Günümüzde altın ve d-penisilamin ise pek kullanılmamaktadır (7,8). RA tedavisinde MTX ve biyolojik ajanlar her ne kadar iyileşme sağlıyor olsa da hastalığı tamamen ortadan kaldıran daha güvenli ve etkili bir tedavi yaklaşımı bulunamamıştır. Bu nedenle RA tedavisi için sürekli araştırmalar yapılmaktadır (8,11,12).

KAFEİK ASİT FENETİL ESTER

Kafeik asit fenetil ester, arıların bitkilerden topladığı propolis adı verilen özütün içindeki biyolojik olarak aktif bir moleküldür (13-16).

Propolis; çam, meşe, huş, okaliptüs, kavak, kestane vb. ağaçlar ve bazı otsu bitkilerin tomurcuk, yaprak gibi kısımlarından arılar tarafından toplanan ve bal mumu karıştırılarak kovan içerisinde birçok amaca yönelik olarak kullanılır (17). Şekil 1'de de görüldüğü gibi propolis zambak gibi yapışkan, reçinemsiz, kokulu ve rengi koyu sarıdan kahverengiye kadar değişen bir maddedir.



Şekil 1. Propolis (BURSA-Cumalıkızık köyü-15.06.2012)

Propolis insanların dikkatini tıbbi açıdan binlerce yıl önce çekmiş ve bu doğal ürün eski çağlarda Avrupa ve Kuzey Afrika'da, Mısır, Yunan ve Romalılarca yaygın olarak kullanılmıştır (17).

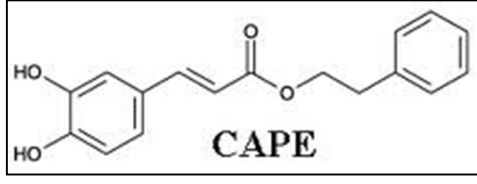
Propolisi, Mısırlılar bazı hastalıkların tedavi edilmesi ve ölümlerin mumyalanmasında, Yunanlılar ve Romalılar da deri apselerini iyileştirmede yüzyıllarca ilaç olarak kullanmışlardır (17). Ayrıca propolisin ahşap koruma ve vernikleme veya cilalamada kullanıldığı, bu nedenle cilalanmasında propolis kullanılan kemanların 400 yıldan fazla sağlam kalarak günümüze kadar ulaştığı bilinmektedir (17).

Ünlü Yunan filozofu Aristo arıların çalışmasını saydam kovan kullanarak incelemek istemiş, ancak kovanın koyu renkte mumsu maddeler ile kaplanarak saydamlığını yitirdiğini bildirmiştir. Bu maddenin propolis olduğu tahmin edilmektedir (17).

Propolisin kimyasal yapısı bal arılarının ziyaret ettiği bitki çeşidine göre yüksek çeşitlilik göstermektedir. Propolis içerisinde şu ana kadar 180 farklı bileşik tanımlanmıştır. Propolis ortalama olarak, %55 oranında reçineli bileşikler ve balsamları, %30 oranında balmumu, %10 oranında aromatik yağları ve %5 oranında arı poleni içermektedir. Kalan %5'lik kısmında ise flavanoidler, aminoasitler, B vitamini ve en önemli olarak tanımlayabileceğimiz antibiyotik içeriği bulunmaktadır (17,18).

Farmakolojik olarak etkili en önemli bileşikler flavanoid grubu (flavonlar, flavanoller ve flavanonlar) çeşitli fenolik ve aromatiklerdir. Galangin, kaempferol, kuarsetin, pinosembrenin, pinosambrenin ve pinobanksin olmak üzere 38 flavanoid tanımlanmıştır. Diğer fenolikler arasında sinnamik alkol, sinnamik asit, benzil alkol, benzoik asit, kafeik asit ve fenilik asit bulunmaktadır (19,20).

Kovandan alınan propolis hamdır ve saflaştırılarak kullanılması gerekir. Propolis suda az çözünür. Ham propolisin en pratik çözücüsü %96'lık etanoldur. Ancak %95'lik alkolde de büyük ölçüde erir. Tıbbi amaçlı kullanımlarda %70'lik etanolda erimiş çözelti kullanılırken, kimyasal analiz amaçlı çözücü için %99'luk etanol gerekmektedir (17). CAPE, kimyasal olarak şekil 2'de görüldüğü gibi iki halkasal yapı içerir. Bu halkasal yapılardan bir tanesinde redoks reaksiyonlarında aktif rol oynayarak antioksidan özellik gösteren iki adet hidroksil grubu bulunmaktadır (16,20-23).



Şekil 2. Kafeik asit fenetil ester

Propolis içerisinde yoğun olarak bulunan flavanoidler çok güçlü antioksidanlardır. Antioksidanlar, serbest radikalleri tutma özelliğine sahiptirler, böylece lipidleri korur ve C vitamini gibi diğer bileşiklerin oksitlenmesini ve yıkılmasını engellerler (18).

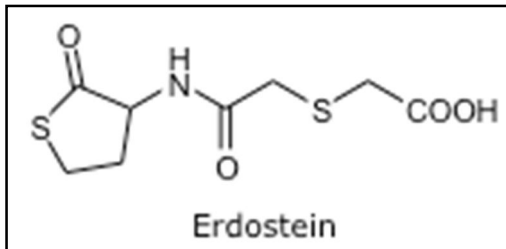
Propolisin aktif bileşeni olan CAPE'nin antioksidan, sitotoksik, antiinflamatuvar etkisi, antiviral, antikarsinojenik, analjezik-anestezik, yara iyileşmesini hızlandırıcı ve immunmodülatör etkileri vardır (24-36).

Spinal kord iskemisi/reperfüzyon hasarında, Parkinson hastalığında, yenidoğanlarda hipoksik iskemik beyin hasarında, multiple sklerozda, beyin tümörlerinde, antikanser tedavilerde tedavi edici ajanın toksik etkilerine karşı ve hepatik ensefalopatide CAPE'nin antioksidan etkisi nedeni ile koruyucu etki gösterdiği yapılan deneysel çalışmalarda gösterilmiştir (16,24).

ERDOSTEİN

Erdosteine [N-(carboxymethylthioacetyl)-homocysteine thiolactone]; antioksidan, antiinflamatuvar özellikleri olan ve bakteriyel adhezyonu inhibe eden kronik obstrüktif pulmoner hastalıklarda ve bu hastalıkların akut alevlenmelerinde mukolitik ajan olarak kullanılan bir ön ilaçtır (15,37,38).

Erdosteine bloke edilmiş iki tiyol grubuna sahiptir. Hepatik metabolizasyonla aktifleşen tiyol derivativesi iki sülfidril grubu oluşmaktadır. Aktifleşen sülfidril grupları erdosteinein antiinflamatuvar ve serbest radikal süpürücü etkisini oluşturmaktadır (39-52). Şekil 3'de erdosteinein kimyasal formülü verilmiştir.



Şekil 3. Erdosteine

Barsaklardan emilip dolaşıma geçtikten sonra hepatik dolaşımında üç metabolitine dönüşerek aktif hale geçer. Mukusun bileşiminde yer alan glikoproteinlerdeki disülfit bağlarını kırarak mukolitik etki gösterir. Mukus üretimi ile viskozitesini modüle ederek ve mukosilyer transportu artırarak ekspektorasyonu kolaylaştırır. Erdostein bakteri fimbriyasındaki disülfit bağına da kırarak bakterinin mukozaya adezyonunu önler. Böylece antibiyotiklerle birlikte kullanıldığında sinerjik etki oluşturur (46).

Glutasyon gibi endojen antioksidanların üretimini artırarak güçlü antioksidan etki gösterir. Ayrıca sürfaktan aktivitesini de artırır. Özellikle sigara içenlerde α_1 -antitripsin inaktivasyonu, lipit peroksidasyonu ve azalan nötrofil kemotaktik yanıtına karşı koruyucu etkisi ile de antioksidan aktivitesi gösterilmiştir (38,40,46,47).

SİTOKİNLER

Sitokinler, immün sistem hücreleri arasında iletişimi sağlayan peptid yapılı mediyatörlerdir. Bağışık yanıtta çok sayıda birbirinden farklı üretilen sitokinler; doğal ve spesifik immün yanıtın rol aldığı inflamasyon viral savunma mekanizması, T ve B hücre proliferasyonu gibi mekanizmaları düzenleyen ekstraselüler moleküllerdir (53,54).

Sitokinler, üretildikleri hücrede depolanmadan salgılanırlar ve kendilerine özgü reseptörlere bağlanırlar. Bu reseptörler genellikle antijen ile karşılaşmadan hemen sonra lenfositlerde belirmeye başlar böylece özgül olmayan sitokin aktivasyonu antijenle sınırlı kalır. Ortama salınan sitokinlerin yarı ömrünün kısa olması etkilerinin sınırlı bir zamanda kalmasına neden olur (55).

Sitokinler genel olarak birbirlerine benzerler ancak üstlendikleri roller yönünden bazılarında farklılıklar bulunur. İşlevleri karmaşıktır; genellikle birbirlerinin üretimini veya yanıtını etkiler ve tek başlarına etki göstermezler. Sitokinler üretildikleri hücreye etki ederlerse otokrin, yakınındaki hücrelere etki ederse parakrin, daha uzak hücrelere etki ederse de endokrin etkiden bahsedilir (54,55).

Romatoid artrit gibi kronik inflamasyonla karakterize otoimmün hastalıklarda sitokin salınımı önemli rol oynamaktadır. Sitokinler sinoviyal hücre proliferasyonu meydana getirerek membran hipeplazisi ve pannus oluşumundan sorumlu tutulmuşlardır. RA patogenezinde başlıca TNF- α ve IL-1 olmakla birlikte IL-2, IL-6, IL-10'un da rol oynadığına dair yayınlar bulunmaktadır (56-59).

İnterlökin-1

İnterlökin-1 aralarında B hücreleri, keratinositler, mezangial hücreler ve endotel hücrelerin de bulunduğu esas olarak makrofajlar tarafından üretilen bir sitokindir. İnflamasyon oluşumunda makrofaj ve nötrofiller için kemotaktik etkilidir. Hepatositlerde akut faz proteinlerinin sentezinin ve kıkırdak ve kemik rezorbsiyonunun artmasına neden olur. IL-1 önemli bir inflamatuvar mediyatör olup, RA ve diğer inflamatuvar eklem hastalıklarında kemik ve kıkırdak yıkımından sorumlu olduğu düşünülmektedir. IL-1 ayrıca ön hipotalamusta lokal prostoglandin salınımını artırarak ateşi yükseltir. Bu özelliği ile endojen pirojen olarak da adlandırılır. İştahsızlık ve ağrı duyusunu azaltma fonksiyonu vardır. T-helper hücrelerini de uyarak farklılaşmalarını ve IL-2 üretmelerini sağlar (55,56,60-62). IL-1, molekül ağırlıkları aynı yükleri farklı olan IL-1 α ve IL-1 β olarak ikiye ayrılır. Yapılan çalışmalarda aktif RA'lı hastaların plazmasında ve eklem sıvısında IL-1 β düzeyi anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (4,56,61).

İnterlökin-2

İnterlökin-2 başlıca T helper hücreleri tarafından üretilen bir sitokindir. T lenfositleri ve *naturel killer* (NK) hücreleri üreme yönünden uyarır. Antijenle karşılaşan dinlenme halindeki T hücreleri, hem IL-2 üretme hem de yüzeylerinde IL-2 reseptörleri oluşturması yönünde uyarılır. IL-4 ile sinerjistik etki göstererek B lenfositlerin fonksiyonunu düzenler. Antijenle karşılaşma sürekli olduğunda ve aşırı miktarda IL-2 üretildiğinde apoptotik gücü artar. Bu özelliği IL-2'nin deneysel kanser tedavisinde kullanılmasına neden olur (55,60,63).

İnterlökin-6

T helper ve monositler tarafından üretilir. Proinflamatuvar ve antiinflamatuvar özelliği vardır. B lenfositlerden IgG yapımını uyarır. Ateş ve akut faz proteinlerinin artmasına neden olabilir (54,56,57). RA'lı hastalarda plazmada ve yıkılan eklem dokusunda IL-6 yüksek oranda görülür (61).

İnterlökin-10

T-helper 2 hücreleri tarafından üretilmektedir. İnterferon (IFN) gama üretimini kısıtlayarak negatif geri beslemeyle olası hücre yıkımını engellemeye çalışır. Sitokin sentezini inhibe ederek aktifleşmiş makrofajların etkisini azaltır (55,60,63).

Tümör Nekroz Faktör-Alfa

Esas olarak endotoksinle karşılaşmış makrofajlar tarafından üretilir. Lipoprotein lipazı inhibe ederek kaşeksi yapması nedeniyle kaşektin olarak da adlandırılır.

Düşük konsantrasyonda infeksiyon odağındaki endotel hücrelerinde adhezyon moleküllerinin üretimini artırarak nötrofillerin damar duvarına yapışmasını sağlar. Ayrıca nötrofillerdeki solunum patlamasını da etkinleştirerek fagositlerin öldürme kapasitesini artırır. TNF- α , düşük seviyelerde T helper ve B lenfositleri uyarır. Yüksek konsantrasyonda ise sistemik etki gösterir. Hipotalamusta PG salgısını tetikleyip ateşi yükseltir.

Karaciğerde amiloid A ve akut faz proteinlerinin üretimini artırır. Kalp kasılması ve damar tonusunu azaltarak hipotansiyona, kanama diyatezini bozup dissemine intravasküler koagülopati (DIC)'ye neden olur. Bunların sonucunda septik şok tablosu görülür. Bu nedenle TNF- α septik şok göstergesi olarak kullanılır (60,63,64). TNF- α , RA'da majör proinflamatuvar sitokin olup; PGE₂ ve kollejenaz yapımı ile kırıkta harabiyetine, osteoklast aktivitesini artırıp kemik yıkımına neden olur. Ayrıca IL-1 sentezi, HLA klas 1 ve 2 üretimini uyarır (56,59,64).

SERBEST RADİKALLER

Serbest radikaller birçok fizyolojik ve patolojik reaksiyon sonucu oluşabilen, son yörüngelerinde ortaklaşmamış bir veya daha fazla elektronun olduğu kararsız durumdaki maddelerdir.

Malondialdehit

Serbest radikaller reaktif yapıları ile protein, lipid, DNA ve nükleik asitleri hasara uğrattırır. En fazla hasar gören hücre membranındaki doymamış (poliansature) yağ asitleridir. Burada üç veya daha fazla çift bağ içeren poliansature yağ asitlerinin lipid peroksidasyonu ile malondialdehit (MDA) ve 4-hidroksinonenol gibi aldehit yıkım ürünleri oluşur. MDA düzeyleri tiyobarbutirik asit (TBA)'le ölçülebilmektedir. Hücre membran lipidlerinin okside olması hücre içi ve dışı iyon dengesinin bozulması sonucunda hücre hasarına neden olur (1,2,64-69).

Romatoid artritli eklemlerde inflamatuvar hücrelerin olması, artmış intraartiküler basınç, vasküler değişiklikler sinoviyal dokudaki artmış metabolik hız oksidatif stresi artırarak lipid peroksidasyonuna neden olmaktadır (70). MDA ise lipid peroksidasyonunun son ürünüdür.

GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmamız için Trakya Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul onayı alınmıştır (Ek-1).

DENEKLER

Çalışmamızda Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Biriminde üretilmiş olan, ortalama 260-300 gram ağırlığında 56 adet Sprague Dawley erkek sıçan kullanılmıştır. Tüm denekler standart laboratuvar koşullarında ($22\pm 1^{\circ}\text{C}$, % 55 nem ve 12 saat aydınlık/karanlık siklusunda) barındırılmıştır. Beslenmeleri için standart sıçan yemi ve musluk suyu kullanılmıştır.

İLAÇLAR

Freund's Complete Adjuvant (FCA), 10 mg/ml, Sigma

Kafeik Asit Fenetil Ester (CAPE), Sigma

Erdostein, Erdostin, Sandoz

Diklofenak Sodyum, Diclomec, Abdi İbrahim

Rompun, Xylazin, Bayer

Ketamin, Ketalar, Pfizer

DENEY DÜZENİ

Çalışmamızda adjuvant artrit önceden RA değerlendirilmesi için tarif edilen metodlara göre, ısıda öldürülmüş ve kurutulmuş *Mycobacterium tuberculosis* içeren sıvı parafin emülsiyonunun (Freund's Complete Adjuvant, FCA, 10 mg/ml), hayvanların sağ arka ayak pençelerine, 22 numaralı iğne ile 0,1 ml'lik tek doz intradermal olarak injeksiyonu (şekil 4) ile oluşturuldu (3,11,64).

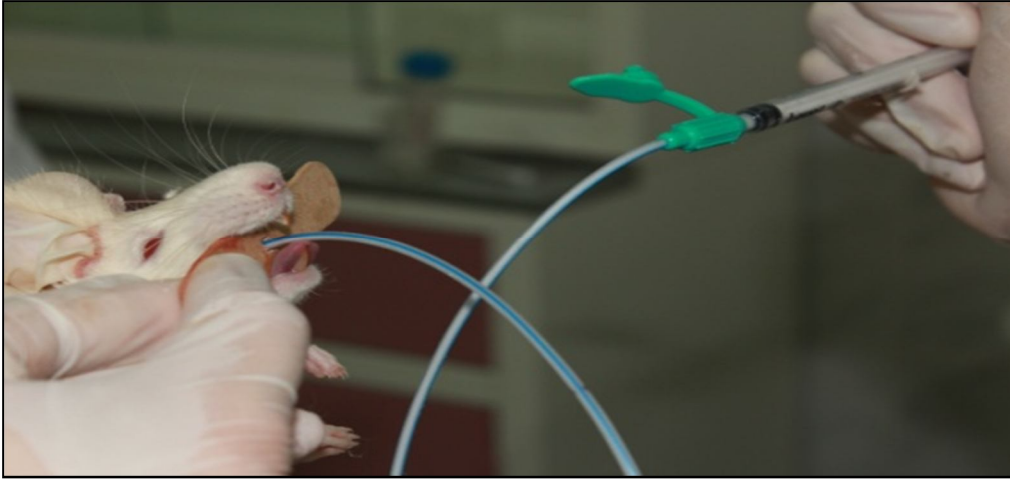


Şekil 4. İntradermal FCA uygulaması

Çalışmamızda toplam 7 grup oluşturuldu ve her grupta 8 hayvan kullanıldı. Birinci grup kontrol grubu olarak ayrıldı. Diğer gruplara ise, 0. gün intradermal olarak 0,1 ml FCA injeksiyonu yapıldı ve 17-27 günler arası ikinci gruba sadece serum fizyolojik, üçüncü gruba CAPE'nin çözücüsü olan dimetil sülfoksit (DMSO) verildi. Dördüncü gruba erdosteine (500 mg/kg), beşinci gruba CAPE (10 µmol/kg), altıncı gruba kombine tedavi (Erdosteine+CAPE) ve yedinci gruba da pozitif kontrol için diklofenak (1 mg/kg) uygulandı. Serum fizyolojik, CAPE ve diklofenak intraperitoneal yolla (şekil 5); erdosteine ise gastrik gavaj yoluyla (şekil 6) uygulandı. Pençe takibi sonrası 27. gün tüm gruplardan kalpten kan alındı (şekil 7).



Şekil 5. İntraperitoneal uygulama

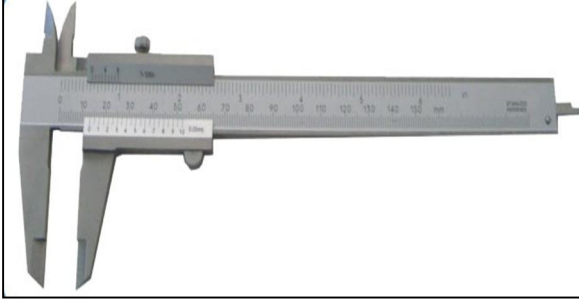


Şekil 6. Gastrik gavaj ile uygulama



Şekil 7. 27. Gün kalpten ponksiyonla kan alma

İnflamatuar reaksiyon, inokülasyon günü 0. gün kabul edilerek; 0, 17, 20, 23 ve 27. günlerde özel bir alet olan kumpas (şekil 8) ile ölçüldü. Ayrıca uygulanan ilaçların analjezik etkinliğinin saptanması amacıyla sıçanların artritli pençelerine basınç uygulanarak ağrı ölçen bir cihaz olan *pressure applications measurement* (PAM) kullanıldı (şekil 9).



Şekil 8. Kumpas



Şekil 9. Pressure application measurement (PAM)

Hayvanlar deney sonunda ksilazin/ketamin (10/50 mg/kg, i.p.) anestezisi altındayken kalpten ponksiyon ile kan alınıp ilaçların antioksidan etkileri plazma lipid peroksidasyonu son ürünü olan MDA ve sitokinlerin (TNF- α , IL-1 β , IL-2, IL-6 ve IL-10) düzeyleri ölçülerek istatistiksel olarak değerlendirildi. Sıçanların eklemleri çıkarılarak formole konuldu ve Fakültemiz Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı'nda histopatolojik olarak değerlendirildi (11,64).

KULLANILAN CİHAZLAR

Spektrofotometre	:	(Spectronic Unicam Helios α , İngiltere)
Elektronik tartı	:	(Denver Instrument APX-200, ABD)
Soğutmalı santrifüj	:	(MPW 350R, Polonya)
Soğutmalı santrifüj	:	(Hettich Micro 220R, Almanya)
Su banyosu	:	(Nickel Clifton Elektro LTD, İngiltere)
Vorteks	:	(Nüve NM110, Türkiye)

Derin dondurucu	:	(Thermo Elektron Corposiçanion, USA)
pH metre	:	(InoLab, Level 1, Almanya)
Manyetik karıştırıcı	:	(Heidolph MR 3001, Almanya)
Distile su cihazı	:	(Millipore, France)
Pletismometre	:	(7140 Plethysmometer, ITALY)
Pressure application measurement	:	(Ugo Basile 38500, ITALY)

TNF- α ÖLÇÜMÜ

TNF- α düzeyleri ölçümünde Platinum *Enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) ölçüm kiti kullanıldı.

Prensip

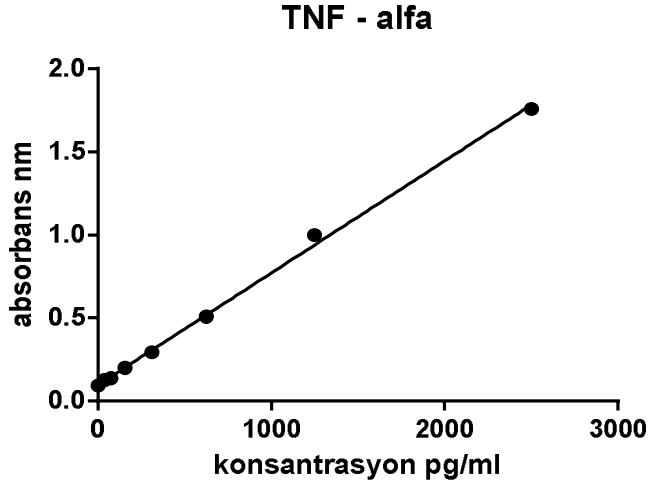
Anti sıçan TNF- α kaplanmış ELISA kuyucuklarına örnek veya standart koyulur. Örnek veya standart içindeki TNF- α tarafından bağlarak yakalanır. İlk antikorlar tarafından yakalanan sıçan TNF- α 'ya biyotin konjugat anti sıçan TNF- α bağlanır. Bağlanmayan biyotin konjugat anti-sıçan TNF- α yıkanarak uzaklaştırılır. Sonrasında streptavidin-HRP eklenerek biyotin konjugat anti sıçan TNF- α antikoruna bağlanması sağlanır. Takiben bağlanmayan streptavidin-HRP yıkanarak uzaklaştırılır. HRP ile reaksiyon sonucunda renk değişikliği gösteren substrat solüsyonu kuyucuklara eklenir. Reaksiyon asit ilavesi (stop solüsyonu) ile sonlandırılır ve meydana gelen renk değişimi absorbans 450 nm'de ölçülür.

Deney

Spektrofotometre tabakasına TNF- α standartlarının ve örneklerin koyulacağı kuyucukların şeması belirlendi. Deney başlangıcında kuyucukların tümü 400 μ l wash buffer (%1 tween 20 ve % 10 sığır serum albumini içeren fosfat tamponlu tuzlu su) ile 2 kez yıkandı. External dilüsyon yapılacak konsantrasyonları sırasıyla 2500 - 1250 - 625 - 312,5- 156,3 - 78,6 - 35,6 pg/ml olarak ayarlanan standartlardan 100 μ l konuldu. Örnek kuyucuklarına 50 μ l sample dilüent ve 50 μ l örnek konuldu. Ardından tüm kuyucuklara 50 μ l biyotin konjugat konularak tabakanın üzeri şeffaf yapışkan filmle kapatıldı. Oda sıcaklığında çalkalayıcıda (200 rpm) 2 saat inkübe edildi. Çalkalamadan sonra kuyucukların hepsi boşaltılarak 400 μ l wash buffer ile 4 kez yıkandı. Hazırlanan streptavidin - yaban turbu peroksidazı (HRP) tüm kuyucuklara koyulup çalkalayıcıda üzeri filmle kapatılarak 1 saat inkübe edildi. Sonrasında kuyucukların tamamı boşaltılarak 400 μ l wash buffer ile 4 kez yıkandı. Sonra tüm kuyucuklara 100 μ l tetrametil-benzidin (TMB) substrat solüsyonu eklenerek 10 dakika oda sıcaklığında doğrudan ışık almayan yerde bekletildi. En yüksek

standardın rengi koyu mavi olunca herbir kuyucuğa 100µl stop solüsyonu (fosforik asit) eklenerek reaksiyon durduruldu. Daha sonra adsorbansı 450 nm dalga boyunda spektrofotometre ile ölçüldü.

Hesaplama



Şekil 10. TNF- α standart eğrisi

Linear ($\log y = A(\log x) + B$) $A=0.9768$ $B=-3.1429$, $R\text{-Square}=0.9932$

İNERLÖKİN-1β ÖLÇÜMÜ

İnterlökün-1β düzeyleri ölçümünde Platinum ELISA ölçüm kiti kullanıldı.

Prensip

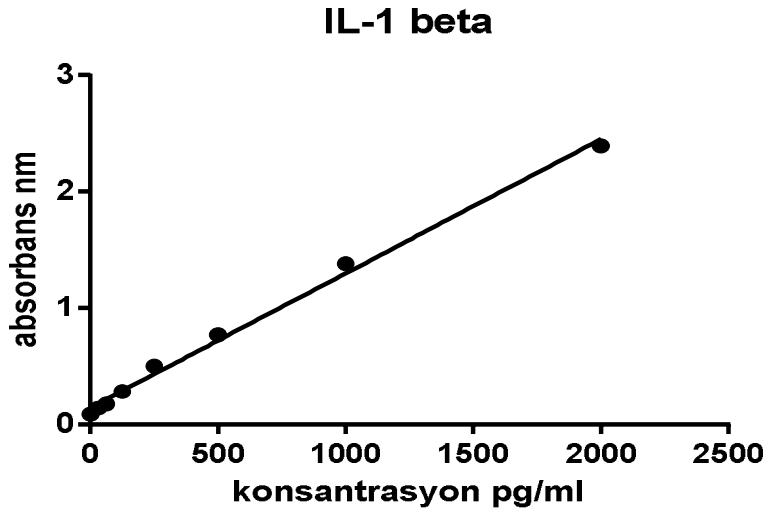
Anti sıçan IL-1β kaplanmış ELISA kuyucuklarına örnek veya standart koyulur. Örnek veya standart içindeki IL-1β tarafından bağlanarak yakalanır. İlk antikorlar tarafından yakalanan IL-1β'ya biyotin konjugat anti sıçan IL-1β bağlanır. Bağlanmayan biyotin konjugat anti sıçan IL-1β yıkanarak çıkarılır. Sonrasında streptavidin-HRP eklenerek biyotin konjugat anti sıçan IL-1β antikoruna bağlanması sağlandı. Takiben bağlanmayan streptavidin-HRP yıkanarak uzaklaştırılır. HRP ile reaksiyon sonucunda renk değişikliği gösteren substrat solüsyonu kuyucuklara eklenir. Reaksiyon asit ilavesi (stop solüsyonu) ile sonlandırılır ve meydana gelen renk değişimi absorbans 450 nm'de ölçülür.

Deney

Spektrofotometre tabakasına IL-1β standartlarının ve örneklerin koyulacağı kuyucukların şeması belirlendi. Deney başlangıcında kuyucukların tümü 400µl wash buffer ile 2 kez yıkandı. External dilüsyon yapılacak konsantrasyonları sırasıyla 2500 - 1250 - 625 -

312,5-156,3 - 78,6 - 35,6 pg/ml olarak ayarlanan standartlardan 100 µl konuldu. Örnek kuyucuklarına 50µl sample dilüent ve 50µl örnek konuldu. Ardından tüm kuyucuklara 50µl biyotin konjugat konularak tabakanın üzeri şeffaf yapışkan filmle kapatıldı. Oda sıcaklığında çalkalayıcıda (200 rpm) 2 saat inkübe edildi. Çalkalamadan sonra kuyucukların hepsi boşaltılarak 400µl wash buffer ile 3 kez yıkandı. Hazırlanan streptavidin HRP tüm kuyucuklara konularak çalkalayıcıda üzeri filmle kapatılarak 1 saat inkübe edildi. Sonrasında kuyucukların tamamı boşaltılarak 400µl wash buffer ile 3 kez yıkandı. Sonra tüm kuyucuklara 100µl TMB substrat solüsyonu eklenerek 10 dakika oda sıcaklığında doğrudan ışık almayan yerde bekletildi. En yüksek standardın rengi koyu mavi olunca her bir kuyucuğa 100µl stop solüsyonu eklenerek reaksiyon durduruldu. Daha sonra adsorbansı 450 nm dalga boyunda spektrofotometre ile ölçüldü.

Hesaplama



Şekil 11. IL-1β

standart eğrisi

Linear (log y = A(log x) + B) A=0.9713 B=-2.8020, R-Square=0.9958

İNERLÖKİN-2 ÖLÇÜMÜ

İnterlökin-2 düzeyleri ölçümünde Platinum ELISA ölçüm kiti kullanıldı.

Prensip

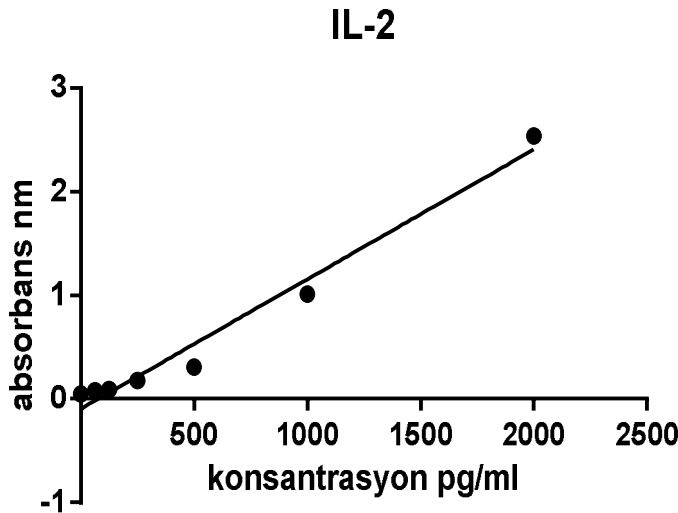
Anti sıçan IL-2 kaplanmış ELISA kuyucuklarına örnek veya standart koyulur. Örnek veya standart içindeki IL-2 tarafından bağlanarak yakalanır. İlk antikorlar tarafından yakalanan sıçan IL-2'ye biyotin konjugat anti-sıçan IL-2 bağlanır. Bağlanmayan biyotin konjugat anti-sıçan IL-2 yıkanarak çıkarılır. Sonrasında streptavidin-HRP eklenerek biyotin konjugat anti-

sıçan IL-2 antikoruna bağlanması sağlanır. Takiben bağlanmayan streptavidin-HRP yıkanarak uzaklaştırılır. HRP ile reaksiyon sonucunda renk değişikliği gösteren substrat solüsyonu kuyucuklara eklenir. Reaksiyon asit ilavesi (stop solüsyonu) ile sonlandırılır ve meydana gelen renk değişimi absorban 450 nm'de ölçülür.

Deney

Spektrofotometre tabakasına IL-2 standartlarının ve örneklerin koyulacağı kuyucukların şeması belirlendi. Deney başlangıcında kuyucukların tümü 400µl wash buffer ile 2 kez yıkandı. External dilüsyon yapılacak konsantrasyonları sırasıyla 2500 - 1250 - 625 - 312,5-156,3 - 78,6 - 35,6 pg/ml olarak ayarlanan standartlardan 100 µl konuldu. Örnek kuyucuklarına 50µl sample dilüent ve 50µl örnek konuldu. Ardından tüm kuyucuklara 50 µm biyotin konjugat konularak tabakanın üzeri şeffaf yapışkan filmle kapatıldı. Oda sıcaklığında çalkalayıcıda (200 rpm) 3 saat inkübe edildi. Çalkalamadan sonra kuyucukların hepsi boşaltılarak 400µl wash buffer ile 4 kez yıkandı. Hazırlanan streptavidin-HRP tüm kuyucuklara konulup çalkalayıcıda üzeri filmle kapatılarak 1 saat inkübe edildi. Sonrasında kuyucukların tamamı boşaltılarak 400µl wash buffer ile 4 kez yıkandı. Sonra tüm kuyucuklara 100µl TMB substrat solüsyonu eklenerek 10 dakika oda sıcaklığında doğrudan ışık almayan yerde bekletildi. En yüksek standardın rengi koyu mavi olunca herbir kuyucuğa 100µl stop solüsyonu eklenerek reaksiyon durduruldu. Daha sonra adsorbansı 450 nm dalga boyunda spektrofotometre ile ölçüldü.

Hesaplama



Şekil 12. IL-2 standart eğrisi

Linear ($\log y = A(\log x) + B$) $A=1.7755$ $B=-5.4429$, $R\text{-Square}=0.9970$

İTERLÖKİN-6 ÖLÇÜMÜ

İnterlökün-6 düzeyleri ölçümünde Platinum ELISA ölçüm kiti kullanıldı.

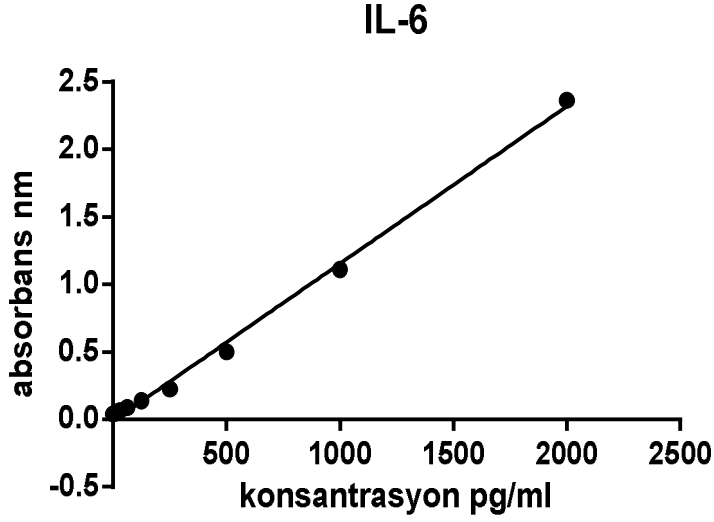
Prensip

Anti sıçan IL-6 kaplanmış ELISA kuyucuklarına örnek veya standart koyulur. Örnek veya standart içindeki IL-6 tarafından bağlanarak yakalanır. İlk antikorlar tarafından yakalanan sıçan IL-6'ya biyotin konjugat anti-sıçan IL-6 bağlanır. Bağlanmayan biyotin konjugat anti-sıçan IL-6 yıkanarak çıkarılır. Sonrasında streptavidin-HRP eklenerek biyotin konjugat anti-sıçan IL-6 antikoruna bağlanması sağlanır. Takiben bağlanmayan streptavidin-HRP yıkanarak uzaklaştırılır. HRP ile reaksiyon sonucunda renk değişikliği gösteren substrat solüsyonu kuyucuklara eklenir. Reaksiyon asit ilavesi (stop solüsyonu) ile sonlandırılır ve meydana gelen renk değişimi absorbans 450 nm'de ölçülür.

Deney

Spektrofotometre tabakasına IL-6 standartlarının ve örneklerin koyulacağı kuyucukların şeması belirlendi. Deney başlangıcında kuyucukların tümü 400µl *wash buffer* ile 2 kez yıkandı. External dilüsyon yapılacak konsantrasyonları sırasıyla 2500 - 1250 - 625 - 312,5-156,3 - 78,6 - 35,6 pg/ml olarak ayarlanan standartlardan 100 µl konuldu. Örnek kuyucuklarına 50µl sample dilüent ve 50µl örnek konuldu. Ardından tüm kuyucuklara 50µl biyotin konjugat konularak tabakanın üzeri şeffaf yapışkan filmle kapatıldı. Oda sıcaklığında çalkalayıcıda (200 rpm) 2 saat inkübe edildi. Çalkalamadan sonra kuyucukların hepsi boşaltılarak 400µl wash buffer ile 6 kez yıkandı. Hazırlanan streptavidin hrp tüm kuyucuklara konulup çalkalayıcıda üzeri filmle kapatılarak 1 saat inkübe edildi. Sonrasında kuyucukların tamamı boşaltılarak 400µl *wash buffer* ile 4 kez yıkandı. Sonra tüm kuyucuklara 100µl TMB substrat solüsyonu eklenerek 10 dakika oda sıcaklığında doğrudan ışık almayan yerde bekletildi. En yüksek standardın rengi koyu mavi olunca her bir kuyucuğa 100µl stop solüsyonu eklenerek reaksiyon durduruldu. Daha sonra adsorbansı 450 nm dalga boyunda spektrofotometre ile ölçüldü.

Hesaplama



Şekil 13. IL-6 standart eğrisi

Quadsıçanic ($\log y = A(\log x)^2 + B(\log x) + C$) $A=0.0818$ $B=-2.8794$, $R\text{-Square}=0.9996$

İNERLÖKİN-10 ÖLÇÜMÜ

İnterlökün-10 düzeyleri ölçümünde Platinum ELISA ölçüm kiti kullanıldı.

Prensip

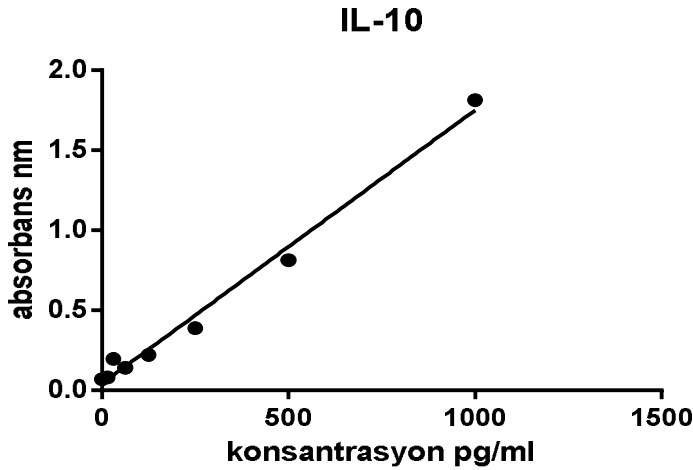
Anti sıçan IL-10 kaplanmış ELISA kuyucuklarına örnek veya standart koyulur. Örnek veya standart içindeki IL-10 tarafından bağlarak yakalanır. İlk antikorlar tarafından yakalanan sıçan IL-10 biyotin konjugat anti-sıçan IL-10'a bağlanır. Bağlanmayan biyotin konjugat anti-sıçan IL-10 yıkanarak çıkarılır. Sonrasında streptavidin-HRP eklenerek biyotin konjugat anti-sıçan IL-10 antikoruna bağlanması sağlanır. Takiben bağlanmayan streptavidin-HRP yıkanarak uzaklaştırılır. HRP ile reaksiyon sonucunda renk değişikliği gösteren substrat solüsyonu kuyucuklara eklenir. Reaksiyon asit ilavesi (stop solüsyonu) ile sonlandırılır ve meydana gelen renk değişimi absorbans 450 nm'de ölçülür.

Deney

Spektrofotometre tabakasına IL-10 standartlarının ve örneklerin koyulacağı kuyucukların şeması belirlendi. Deney başlangıcında kuyucukların tümü 400µl wash buffer ile 2 kez yıkandı. External dilüsyon yapılacak konsantrasyonları sırasıyla 2500 - 1250 - 625 - 312,5-156,3 - 78,6 - 35,6 pg/ml olarak ayarlanan standartlardan 100 µl konuldu. Örnek

kuyucuklarına 50µl sample dilüent ve 50µl örnek konuldu. Ardından tüm kuyucuklara 50µl biyotin konjugat konularak tabakanın üzeri şeffaf yapışkan filmle kapatıldı. Oda sıcaklığında çalkalayıcıda (200 rpm) 2 saat inkübe edildi. Çalkalamadan sonra kuyucukların hepsi boşaltılarak 400µl wash buffer ile 3 kez yıkandı. Hazırlanan streptavidin HRP tüm kuyucuklara konulup çalkalayıcıda üzeri filmle kapatılarak 1 saat inkübe edildi. Sonrasında kuyucukların tamamı boşaltılarak 400µl wash buffer ile 4 kez yıkandı. Sonra tüm kuyucuklara 100µl TMB substrat solüsyonu eklenerek 10 dakika oda sıcaklığında doğrudan ışık almayan yerde bekletildi. En yüksek standardın rengi koyu mavi olunca herbir kuyucuğa 100µl stop solüsyonu eklenerek reaksiyon durduruldu. Daha sonra adsorbansı 450 nm dalga boyunda spektrofotometre ile ölçüldü.

Hesaplama



Şekil 14. IL-10 standart eğrisi

Linear (log y = A(log x) + B) A=1.2288 B=-3.4703, R-Square=0.9981

MDA ÖLÇÜMÜ

Prensip

Plazma MDA tayini, lipid peroksidasyonunun yıkım ürünlerinden olan MDA'nın TBA ile sıcak ve soğuk ortamda reaksiyona girmesi sonucu oluşan pembe renkli kompleksin renk şiddetinin 532 nm dalga boyunda ölçülmesi esasına dayanan metodla gerçekleştirilir (64).

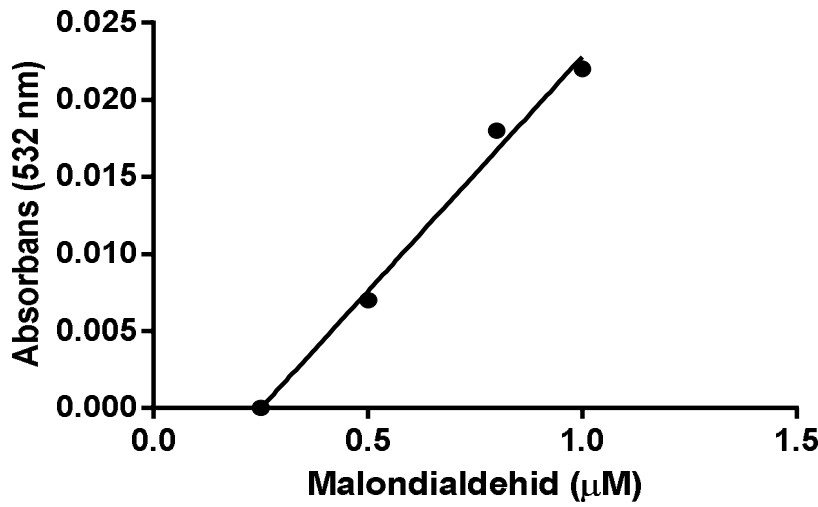
Deney

0,2 ml 10 kat dilüe edilmiş doku homojenatı; 0,2 ml %8,1'lik sodyum dodesil sülfat, 1,5 ml % 20'lik asetik asit, 1,5 ml % 0,8'lik TBA ve 0,6 ml distile su ile karıştırıldı. Karışım 95 °C'deki

sıcak su banyosunda 1 saat tutuldu. Musluk suyu ile soğutulduktan sonra üzerine 1 ml distile su ve 5 ml butanol/piridin (15:1) eklenerek vorteksle 1 dakika karıştırıldı. Organik faz 4000xg'de 10 dk santrifüj edilerek ayrıldı. Absorbanslar homojenat içermeyen ayıraç körüne karşı 532 nm dalga boyunda spektrofotometrede okundu.

Hesaplama

Standartlar kullanılarak MDA standart eğrisi (Şekil 16) çizildi. Regresyon analizi ile saptanan formül kullanılarak örneklerdeki MDA konsantrasyonu bulundu.



Şekil 15. MDA standart eğrisi

HİSTOPATOLOJİK İNCELEME

Histopatolojik incelemelerin yapılması için deney sonunda sıçanların sağ ayak bileği eklemleri çıkarıldı. Deneyde yer alan gruplara göre ayrılarak formoldahit içerisinde Fakültemiz Tıbbi Patoloji laboratuvarına götürüldü.

Tüm sıçanlara ait sağ arka ayak pençeleri %10 tamponlu formaldehitte bir gece tespit edildikten sonra MTF eklemleri içerecek şekilde örneklenerek %10 formik asit içeren dekalsifikasyon solüsyonunda bir gece bekletildi. Dekalsifiye olan dokular akan suda yarım saat yıkandıktan sonra gece boyu süren alkol takibine tabi tutuldu. Parafine gömülen dokulardan elde edilen 5 mikron kalınlığındaki kesitlere deparafinizasyon işleminin ardından rutin boyalar olan hematoksilin ve eozin (H&E) boyları uygulandı. Lamel ile kapatılan kesitler Olympus BX51 mikroskobunda gruplara ait bilgi olmadan kör değerlendirmeye alındı, bulgular tablo halinde kaydedildi. Değerlendirme her dokudaki ekleme komşu

dokularda inflamasyon, sinoviyal proliferasyon, vasküler proliferasyon ve ödem şiddetine göre derecelendirilerek yapıldı. Buna göre; 0-lezyon yok, 1-hafif şiddetli lezyon, 2-orta şiddetli lezyon, 3-şiddetli lezyon olarak kabul edilmiş ve semikantitatif olarak skorlanmıştır. Vasküler proliferasyonun tespiti için 5 büyük büyütme alanındaki (BBA= x40) damarlar sayılmış ve ortalamaları alınarak büyük büyütme alanı başına düşen damar sayısı hesaplanmıştır.

İSTATİSTİKSEL ANALİZ

İstatistiksel değerlendirme, 10240642 seri numaralı SPSS 21 istatistik programı kullanılarak yapıldı. Ölçülebilen verilerin normal dağılıma uygunlukları tek örnek Kolmogorov Smirnov testi ile bakıldıktan sonra normal dağılım gösterenler için gruplar arası kıyaslamalarda tek yönlü varyans analizi ve posthoc Dunnett T3 testi, normal dağılım göstermeyenler için ise Kruskal Wallis varyans analizi ve sonrasında Mann Whitney U testi kullanıldı. Normal dağılıma uyan verilerin grup içi kıyaslamalarında bağımlı gruplarda t testi ve normal dağılıma uymayan verilerin değerlendirilmesinde ise Wilcoxon eşleştirilmiş iki örnek testi kullanıldı. Niteliksel verilerde Pearson χ^2 testi ve Kolmogorov Smirnov iki örnek testi kullanıldı. Tanımlayıcı istatistikler olarak Median (Min-Max) değerleri ve aritmetik ortalama±standart sapma verildi. Tüm istatistikler için anlamlılık sınırı p<0.05 olarak seçildi. Grafikler ise Graphpad Prism for MAC OSX Version 6.0cprogramı kullanılarak çizildi.

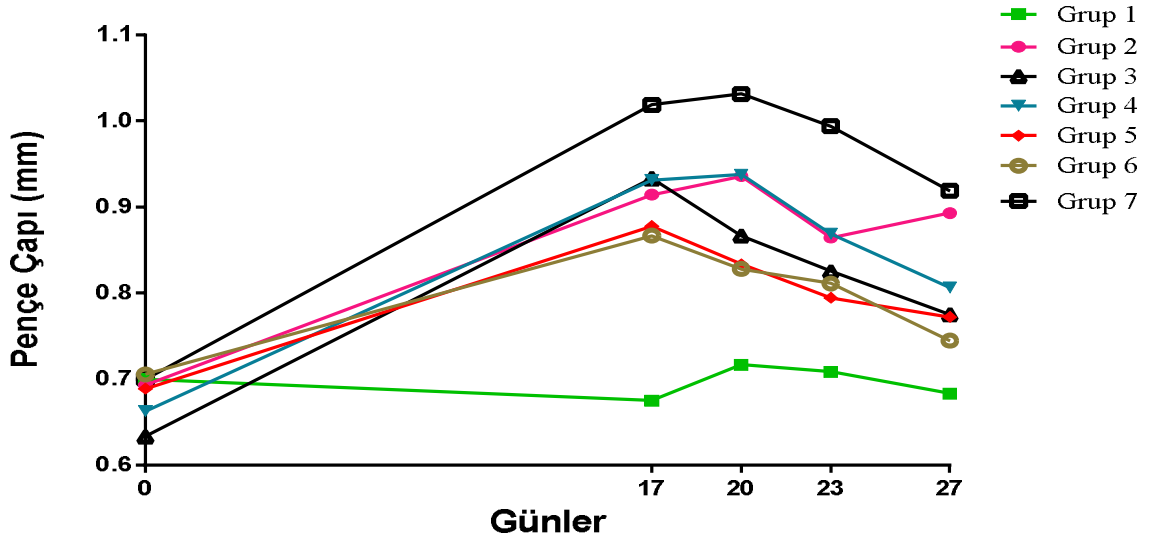
BULGULAR

Sıçanların sağ arka ayak pençelerine 0. gün pençe çapı, ağrı ve ağırlık ölçümleri sonrası uygulanan intradermal FCA injeksiyonu, pençede belirgin bir inflamatuvar reaksiyon oluşturdu. Bu etki 17. günde belirgindi. Çalışmamızda 0. günde tek doz FCA injeksiyonunu takiben kontrol (Grup 1) grubuna göre, diğer gruplarda (grup 2, 3, 4, 5, 6, 7) sağ pençede adjuvant artrit oluşturduğu ödem, kumpas ile 17. günde yapılan ölçümde istatistiksel farkın ($p<0.05$) gösterilmesiyle (şekil 16, tablo1) ortaya konuldu. Ayrıca sağ pençede ödem oluşmasını takiben ağrı ölçümleri de özel bir cihaz olan PAM ile yapılan ölçümde istatistiksel farkın ($p<0.05$) gösterilmesiyle (şekil17, tablo 2) belirlendi.

Erdostein, CAPE ve kombine tedavinin oluşan adjuvant artrit üzerine etkisini değerlendirmek amacıyla birinci grup kontrol grubu olarak ayrıldı. Diğer gruplara ise, 0. gün intradermal olarak 0,1 ml FCA injeksiyonundan sonra 17-27 günler arası ikinci gruba sadece serum fizyolojik, üçüncü gruba CAPE'nin çözücüsü olan DMSO uygulandı. Dördüncü gruba erdostein (500 mg/kg), beşinci gruba CAPE (10 $\mu\text{mol/kg}$), altıncı gruba kombine tedavi (Erdostein+CAPE) (500 mg/kg+10 $\mu\text{mol/kg}$) ve yedinci gruba da pozitif kontrol için diklofenak (1 mg/kg) uygulandı. CAPE'nin çözücüsü olan DMSO'nun antiinflamatuvar ve antioksidan etkinliğinin araştırıldığı bazı yayınlar olması nedeniyle sonuçları etkileyebileceği düşünülerek 27. günde DMSO kullanılan tedavi grupları (5. ve 6. grup) ile 3. grup (DMSO+artrit), çözücü olarak DMSO kullanılmayan tedavi grupları (4. ve 7. grup) ile 2. grup (artrit+serumfizyolojik) karşılaştırıldı (76). Tüm tedavi grupları (4, 5, 6, 7) da birbirleriyle karşılaştırıldı. 0-17. günler arası kontrol grubuna (grup 1) göre, diğer grupların sağ pençe çapında istatistiksel olarak anlamlı artış olduğu görüldü ($p<0.05$). Bu bulgumuz adjuvant artrit modelini başarı ile gerçekleştirdiğimizin göstergesidir. Pençe ödeminin 20. günden itibaren

azalmaya başladığı gözlenmiştir. Kumpas ile yapılan pençe ölçümündeki değerler grup içi ve günlere göre karşılaştırıldığında; 17-20. günde grup 3 ve 5'te ($p<0.05$), 17- 23. günde grup 4, 5 ve 6'da, istatistiksel olarak anlamlı azalma saptanmıştır ($p<0.05$). 23. günde 3. grupta pençe ödeminde azalma olmasına rağmen, istatistiksel olarak anlamlılık bulunamamıştır.

Aynı şekilde 17-27. günler arası grup içi karşılaştırmada pençe ödeminde istatistiksel olarak 3, 4, 5, 6 ve 7. gruplarda bir azalma saptanmıştır ($p<0.05$) (şekil 16, tablo 1). Bu da DMSO, erdostein, CAPE, erdostein+CAPE ve diklofenak tedavilerinin adjuvant artritte pençede ortaya çıkan inflamasyon ve ödemi iyileştirdiklerinin bir göstergesi olarak düşünülmektedir.



Şekil 16. Sağ pençe takibi (kumpas)

Tablo 1. Sıçan sağ pençe takibi (kumpas) ortalamaları (mm) ve standart sapmaları

	0. gün	17. gün	20. gün	23. gün	27. gün
Grup 1	7±0,3	6,8±0,5	7,2±0,2	7±0,3	6,8±0,4
Grup 2	6,9±0,6	9±0,6*†	9,3±0,5	8,7±0,4	9±1
Grup 3	6,3±0,4	9,3±0,9*†	8,7±0,7‡	8,3±0,6	7,8±1
Grup 4	6,6±0,7	9,3±1*†	9,3±0,9	9±0,9§	8±0,9
Grup 5	6,8±0,3	8,7±0,7*†	8,3±0,6‡	8±0,1§	7,7±0,6
Grup 6	7±0,3	8,6±1*†	8,2±1	8,1±0,6§	7,4±0,7
Grup 7	7±0,2	10,2±2*†	10,3±2	9,9±1	9±1

* p<0.05, grupların kendi içinde 0. gün ile 17. gün karşılaştırılması

†p<0.05, 17. günde grup 1 ile karşılaştırma

‡p<0.05, 17-20. günlerde grup içi karşılaştırma

§p<0.05, 17-23. günlerde grup içi karşılaştırma

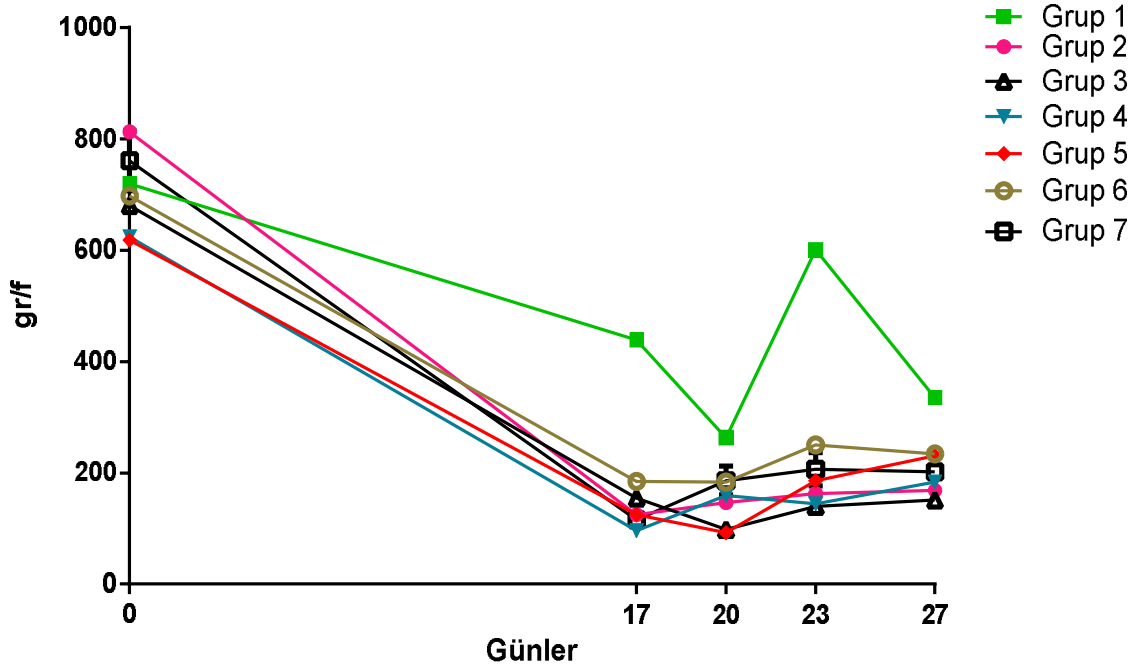
^{||}p<0.05, 17-27. günlerde grup içi karşılaştırma

PAM ile yapılan ağrı ölçümünde 0. gün ile 17. gün arası grup içi karşılaştırmada kontrol grubu hariç tüm gruplarda anlamlı bir farklılık saptandı (p<0.05) (Şekil 17, Tablo 2). Bu sonuçlar bize artriti başarıyla gerçekleştirdiğimizi ve artrit oluştuğu için sıçanların ağrıya daha az kuvvette tepki verdiklerini göstermektedir.

17. gündeki sağ pençede PAM değerleri, grup 1 (kontrol) değerleri ile karşılaştırıldığında, tüm gruplarda istatistiksel olarak anlamlılık saptanmıştır (p<0.05). PAM ile yapılan ağrı ölçümündeki değerler grup içi ve günlere göre karşılaştırıldığında; 17-20.

günde istatistiksel olarak sadece 7. grupta ($p<0.05$), 17- 23. günde grup 5 ve 7’de istatistiksel olarak anlamlı artış saptanmıştır ($p<0.05$). 23. günde 4. grupta artış olmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlılık bulunamamıştır.

17-27. günler arası yapılan ölçümler karşılaştırıldığında grup 4 (erdostein), grup 5 (CAPE) ve grup 7 (diklofenak)’de istatistiksel olarak anlamlı bir artış saptanmıştır ($p<0.05$). Grup 6’da da PAM değerlerinde artış olmasına rağmen istatistiksel olarak bir anlamlılık bulunamamıştır.



Şekil 17. Sağ pençe PAM ölçümleri

Tablo 2. Tüm gruplarda PAM ölçümleri ortalamaları (g/f) ve standart sapmaları

	0. gün	17. gün	20. gün	23. gün	27. gün
Grup 1	719±59	439±133	264±90	600±238	335±134
Grup 2	813±253	125±41**	147±74	163±56	168±53
Grup 3	681±183	121±79**	98±11	140±60	152±40
Grup 4	624±231	96±22**	160±103	145±72	183±45
Grup 5	619±90	125±53**	92±44	186±47 [§]	231±85
Grup 6	698±181	185±105**	184±63	250±84	234±92
Grup 7	761±155	116±21**	186±74 [‡]	207±85 [§]	202±34

* p<0.05, grupların kendi içinde 0. gün ile 17. gün karşılaştırılması

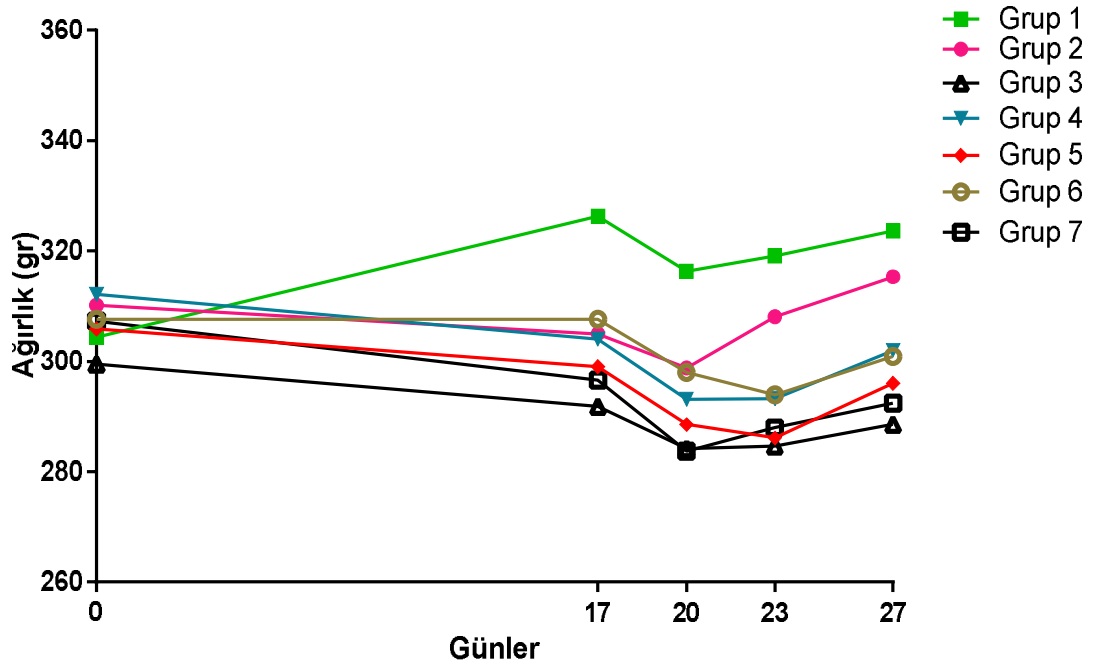
†p<0.05, 17. günde grup 1 ile karşılaştırma

‡p<0.05, 17-20. günlerde grup içi karşılaştırma

§p<0.05, 17-23. günlerde grup içi karşılaştırma

||p<0.05, 17-27. günlerde grup içi karşılaştırma

Sıçanlar deneyin başlangıcında (0. gün), 17, 20, 23 ve 27. günlerde ağırlıkları ölçülerek takip edilmiştir. Grup içi ve günler arasında ağırlıklar açısından herhangi bir istatistiksel anlamlılık saptanmamıştır (Şekil 18, Tablo 3).



Şekil 18. Ağırlık ölçümleri (g)

Tablo 3. Tüm gruplarda ağırlık ortalamaları (g) ve standart sapmaları

	0.gün	17.gün	20.gün	23.gün	27.gün
Grup 1	304±21	326±22	316±21	319±20	323±21
Grup 2	309±28	305±23	299±29	308±22	315±22
Grup 3	299±15	291±18	284±20	284±24	288±32
Grup 4	312±27	304±33	293±31	293±31	302±33
Grup 5	305±25	288±25	288±23	286±24	296±24
Grup 6	307±39	307±33	298±31	293±31	300±30
Grup 7	307±33	296±34	283±31	288±29	292±29

SERUM TÜMOR NEKROZ FAKTÖR ALFA DÜZEYLERİ

Serum TNF- α düzeyi Platinum ELISA kiti kullanılarak spektrofotometrik yöntemle mikromolar (μM) olarak ölçüldü. ELISA kiti ile yapılan ölçümde TNF- α bulunamadı. TNF- α bulunamamasının deney aşamasında yapılan ölçüm hatalarından kaynaklandığını düşünmekteyiz.

SERUM MALONDİALDEHİT DÜZEYLERİ

Serum MDA düzeyi Platinum ELISA kiti kullanılarak spektrofotometrik yöntemle μM olarak ölçüldü. Ortalama ve standart sapmaları hesaplandı (Tablo 4). Hesaplanan verilerin normalitesi incelendi. Nonparametrik Kruskal-Wallis varyans analizi ve Mann Whitney U testi uygulandı. 27. günde istatistiksel olarak 2-7 ve 3-6 gruplar arasında anlamlı farklılık ($p<0.05$) olduğu görüldü (Şekil 19).

Tablo 4. Plazma malondialdehid düzeyi ortalama ve standart sapmaları

GRUPLAR	1	2	3	4	5	6	7
Ort±SD	0,08±0,05	0,06±0,05	0,06±0,03	0,06±0,01	0,09±0,04	0,27±0,02†	0,35±0,05*

Ort: Ortalama; SD: Standart sapma.



Şekil 19. Gruplara göre plazma malondialdehit düzeylerinin dağılımı

*p<0.05, 27. günde 2. gruba göre, Kruskal-Wallis varyans analizi, Mann Whitney U

†p<0.05, 27. günde 3. gruba göre, Kruskal-Wallis varyans analizi, Mann Whitney U

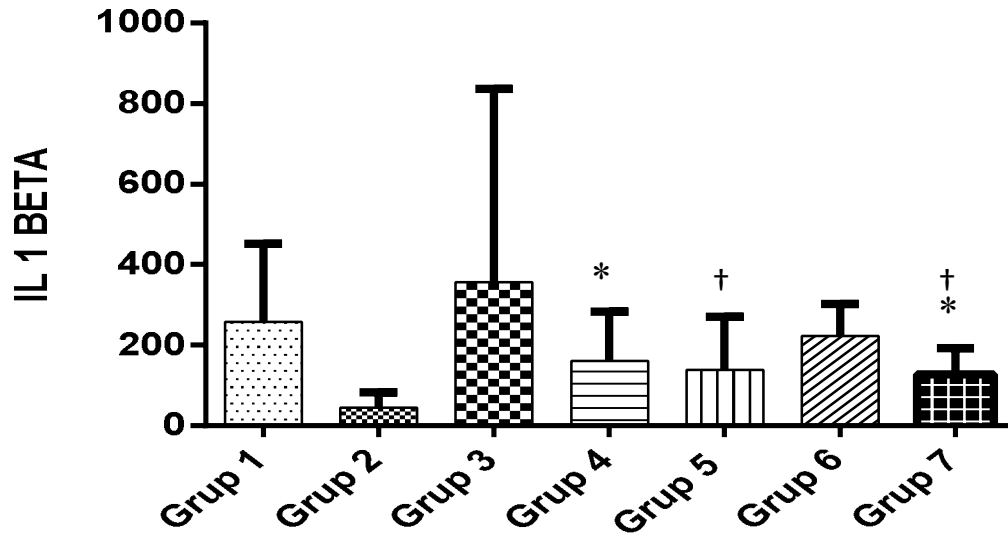
SERUM İNTERLÖKİN-1 BETA DÜZEYLERİ

Serum IL-1 β düzeyi ölçümleri Platinum ELISA kiti kullanılarak spektrofotometrik yöntemle μ M olarak ölçüldü. Ortalama ve standart sapmaları hesaplandı (Tablo 5). Hesaplanan verilerin normalitesi incelendi. Nonparametrik Kruskal-Wallis varyans analizi ve Mann Whitney U testi uygulandı. 27. günde istatistiksel olarak grup 2 ile 4 ve 7. gruplar arasında; grup 3 ile 5 ve 7. gruplar arasında anlamlı fark bulundu (Şekil 20).

Tablo 5. Plazma interlökin-1 beta düzeyi ortalama ve standart sapmaları

GRUPLAR	1	2	3	4	5	6	7
Ort±SD	259±193	33±8	357±479	162±122*	139±132†	224±79	129±65*†

Ort: Ortalama; SD: Standart sapma.



Şekil 20. Gruplara göre interlökin-1β düzeylerinin dağılımı

*p<0.05, 27. günde 2. gruba göre, Kruskal-Wallis varyans analizi, Mann Whitney U

†p<0.05, 27. günde 3. gruba göre, Kruskal-Wallis varyans analizi, Mann Whitney U

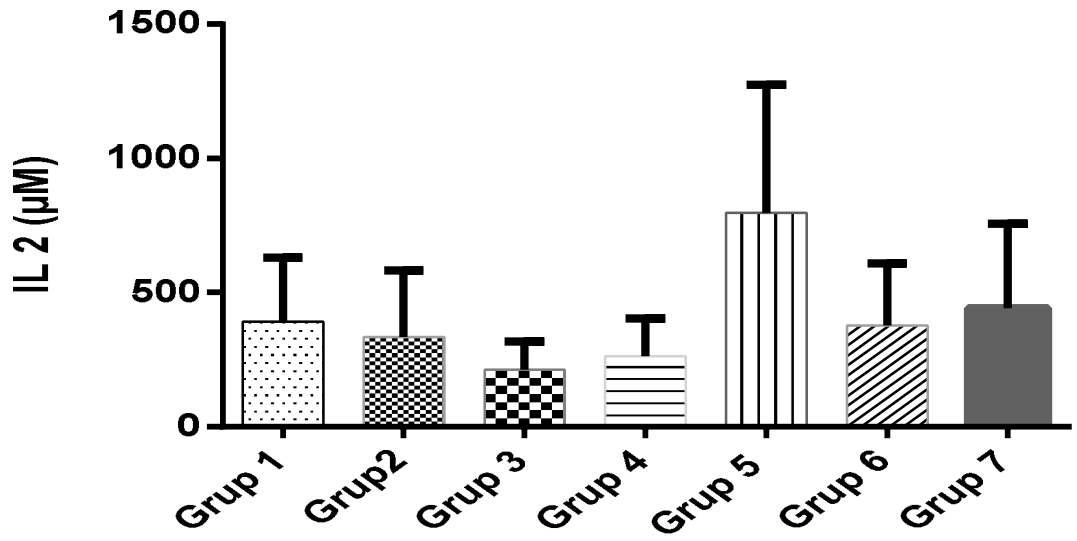
SERUM İNTERLÖKİN-2 DÜZEYLERİ

Serum IL-2 düzeyi ölçümleri Platinum ELISA kiti kullanılarak spektrofotometrik yöntemle μM olarak ölçüldü. Ortalama ve standart sapmaları hesaplandı (Tablo 6). Hesaplanan verilerin normalitesi incelendi. Nonparametrik Kruskal-Wallis varyans analizi ve Mann Whitney U testi uygulandı. 27. günde istatistiksel olarak gruplar arasında anlamlı fark bulunamadı (Şekil 21).

Tablo 6. Plazma interlökin-2 düzeyi ortalama ve standart sapmaları

GRUPLAR	1	2	3	4	5	6	7
Ort±SD	392±238	334±248	213±105	265±140	798±476	377±231	443±313

Ort: Ortalama; **SD:** Standart sapma.



Şekil 21. Gruplara göre interlökin-2 düzeylerinin dağılımı

Kruskal-Wallis varyans analizi, Mann Whitney U test

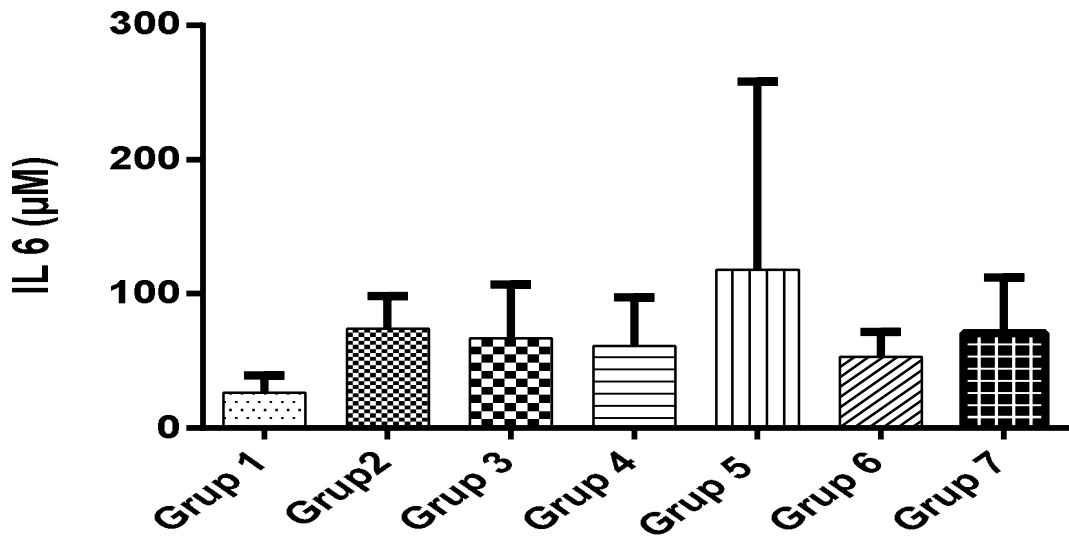
SERUM İNTERLÖKİN-6 DÜZEYLERİ

Serum IL-6 düzeyi ölçümleri Platinum ELISA kiti kullanılarak spektrofotometrik yöntemle μM olarak ölçüldü. Ortalama ve standart sapmaları hesaplandı (Tablo 7). Hesaplanan verilerin normalitesi incelendi. Nonparametrik Kruskal-Wallis varyans analizi ve Mann Whitney U testi uygulandı. 27. günde istatistiksel olarak gruplar arasında anlamlı fark bulunamadı (Şekil 22).

Tablo 7. Plazma interlökin-6 düzeyi ortalama ve standart sapmaları

GRUPLAR	1	2	3	4	5	6	7
Ort±SD	26±13	74±24	67±40	61±36	118±140	53±19	71±42

Ort: Ortalama; **SD:** Standart sapma.



Şekil 22. Gruplara göre interlökin-6 düzeylerinin dağılımı

Kruskal-Wallis varyans analizi, Mann Whitney U test

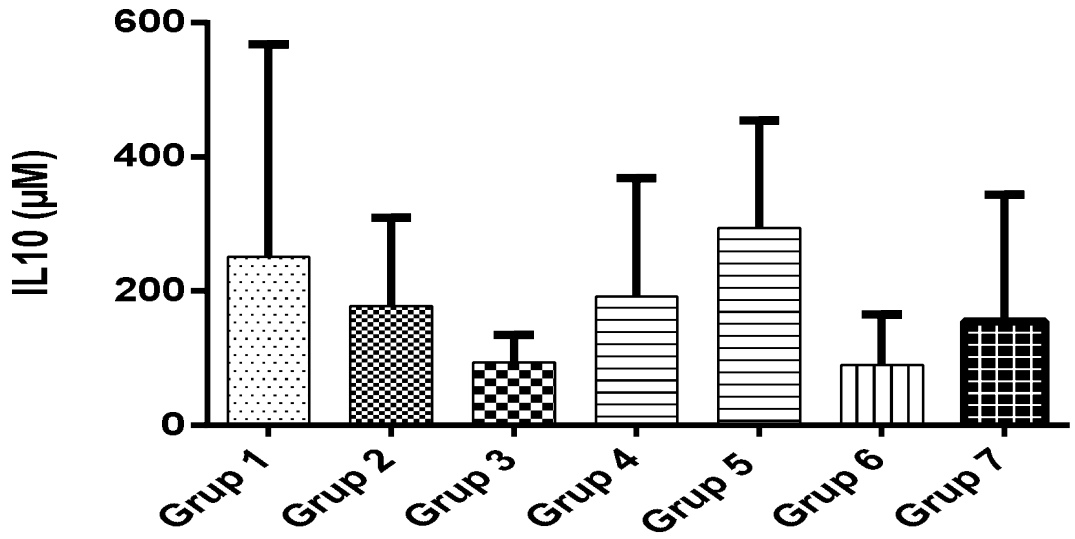
SERUM İNTERLÖKİN-10 DÜZEYLERİ

Serum IL-10 düzeyi ölçümleri Platinum ELISA kiti kullanılarak spektrofotometrik yöntemle µM olarak ölçüldü. Ortalama ve standart sapmaları hesaplandı (Tablo 8). Hesaplanan verilerin normalitesi incelendi. Nonparametrik Kruskal-Wallis varyans analizi ve Mann Whitney U testi uygulandı. 27. günde istatistiksel olarak gruplar arasında anlamlı fark bulunamadı(Şekil 23).

Tablo 8. Plazma interlökin-10 düzeyi ortalama ve standart sapmaları

GRUPLAR	1	2	3	4	5	6	7
Ort±SD	251±316	178±132	94±41	192±176	294±160	90±75	155±189

Ort: Ortalama; **SD:** Standart sapma.



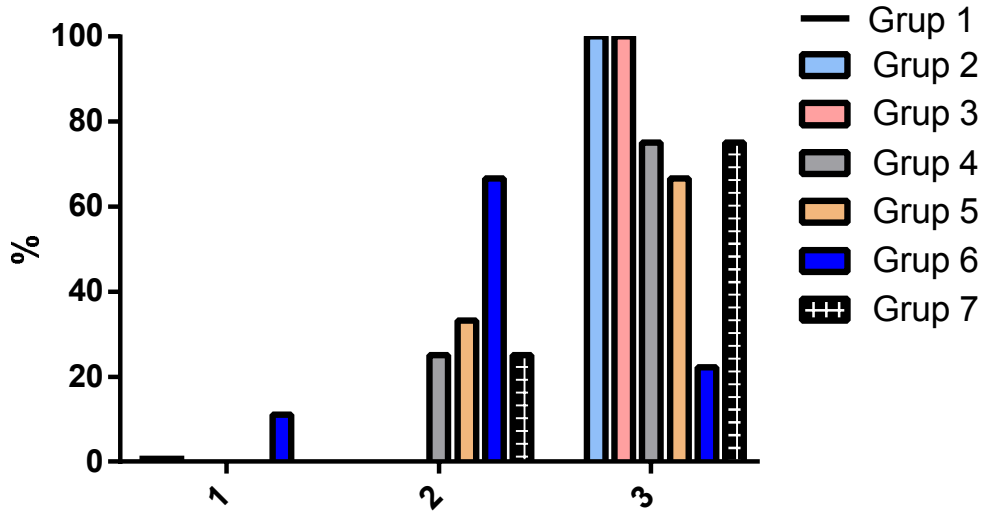
Şekil 23. Gruplara göre interlökin-10 düzeylerinin dağılımı

Kruskal-Wallis varyans analizi, Mann Whitney U test

HİSTOPATOLOJİK İNCELEMELER

İnflamasyon

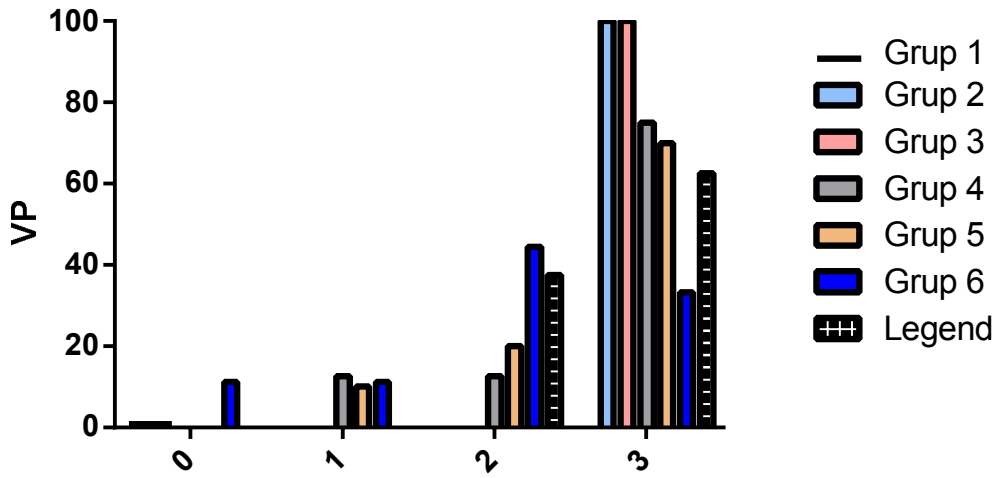
Yirmi yedinci günde sıçanların sağ arka ayak pençelerinin histopatolojik incelemelerinde grup 1'deki (kontrol grubu) hayvanlarda inflamasyona rastlanmadı. Grup 2 ve 3'te %100 şiddetli, grup 4'te %25 orta, %75 şiddetli; grup 5'te %33,3 orta, %66,7 şiddetli; grup 6 da %11,1 hafif, %66,7 orta, %22,2 şiddetli; grup 7 de %75 şiddetli, %25 orta derecede inflamasyon görüldü (Şekil 24).



Şekil 24. Gruplara göre inflamasyonun zayıf-orta-şiddetli olarak % değerleri
0: yok, 1: zayıf, 2: orta, 3: şiddetli.

Vasküler Proliferasyon

Sıçanların sağ arka ayak pençelerinin histopatolojik incelemelerinde 40'lık büyütmeye 5 alan incelendi. Vasküler yapılar sayıldı ve ortalamaları alındı. 27. günde grup 1 (kontrol) hayvanlarda vasküler proliferasyona rastlanmadı. Grup 2 ve 3'ün tamamında şiddetli, grup 4'ün %12,5 hafif, % 12,5 orta, % 75 şiddetli, grup 5'in % 11,1 hafif, % 22,2 orta, % 66,7 şiddetli, grup 6'nın % 11,1 yok, % 11,1 hafif, % 44,4 orta, % 33,3 şiddetli, grup 7'nin % 37,5 orta, % 62,5 şiddetli vasküler proliferasyon görüldü (Şekil 25).

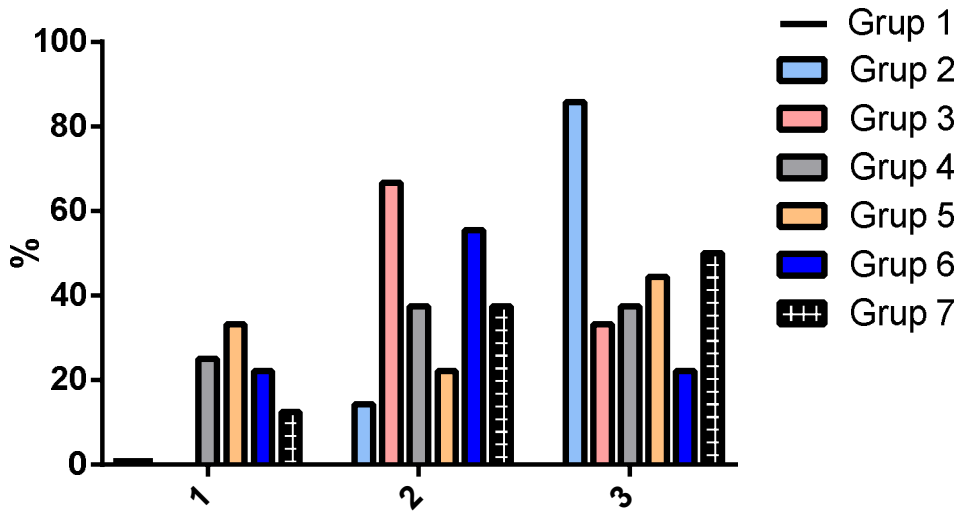


Şekil 25. Gruplara göre vasküler proliferasyon median değerleri

0: yok, 1: zayıf, 2: orta, 3: şiddetli.

Ödem

Yirmi yedinci günde sıçanların sağ arka ayak pençelerinin histopatolojik incelemelerinde grup 1'deki (kontrol grubu) hayvanlarda ödeme rastlanmadı. Grup 2'de % 14,3 orta,% 85,7 şiddetli, grup 3 de %66,7 orta, %33,3 şiddetli ödem görülürken; tedavi gruplarından grup 4'te %25 zayıf, %37,5 orta, %37,5 şiddetli; grup 5'te %33,3 zayıf, %22,2 orta, %44,4 şiddetli; grup 6'te %22,2 zayıf, % 55,5 orta,% 22,2 şiddetli; grup 7'da % 12,5 zayıf, %37,5 orta, %50 şiddetli ödem görüldü (Şekil 26).

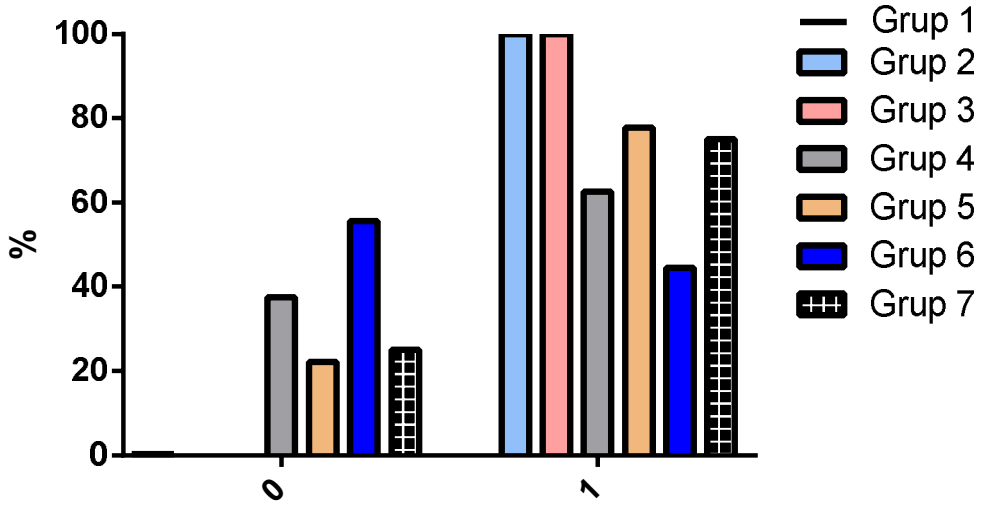


Şekil 26. Gruplara göre ödem % değerleri

0: yok, 1: zayıf, 2: orta, 3: şiddetli.

Sinovyal Proliferasyon

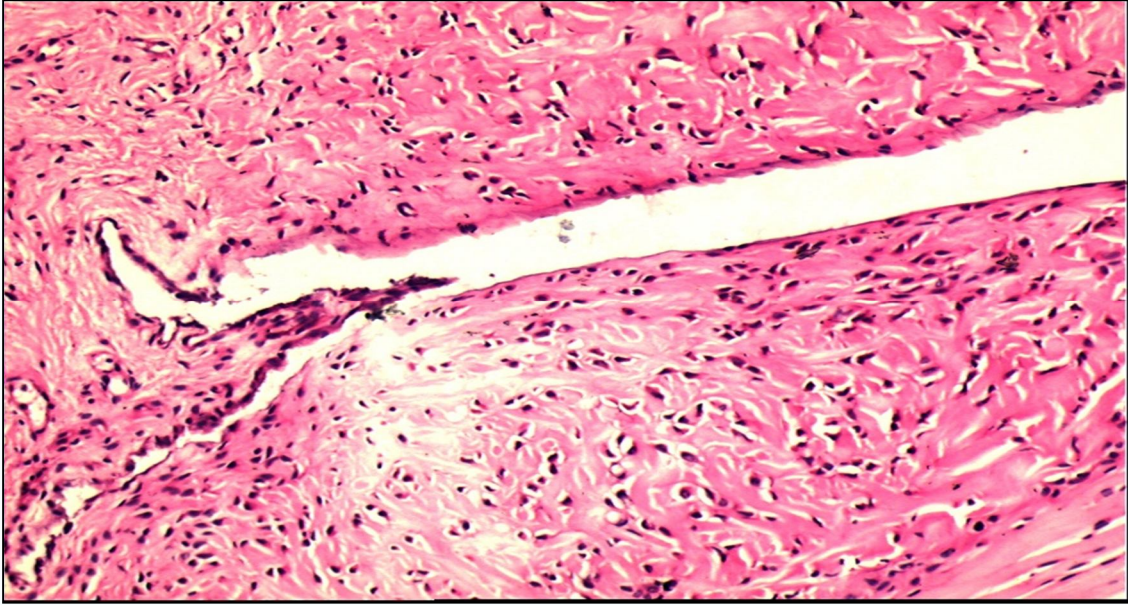
Sıçanların sağ arka ayak histopatolojik incelemelerinde 27. günde grup 1 (kontrol) hayvanlarda sinovyal proliferasyona rastlanmadı. 2. ve 3. grubun tamamında sinovyal proliferasyon görülürken; 4. grupta % 62,5, 5. grupta %77,8, 6. grupta %44,5 ve 7. grupta %75 oranında sinovyal proliferasyon görüldü (Şekil 27).



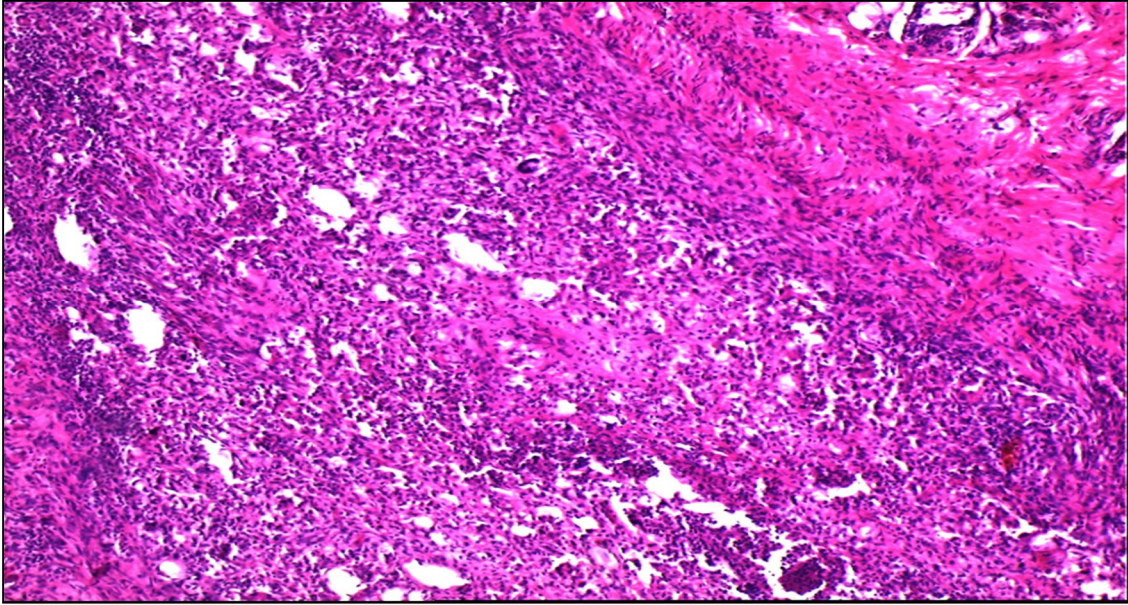
Şekil 27. Gruplara göre sinovyal proliferasyon % değerleri

0: yok, 1: var

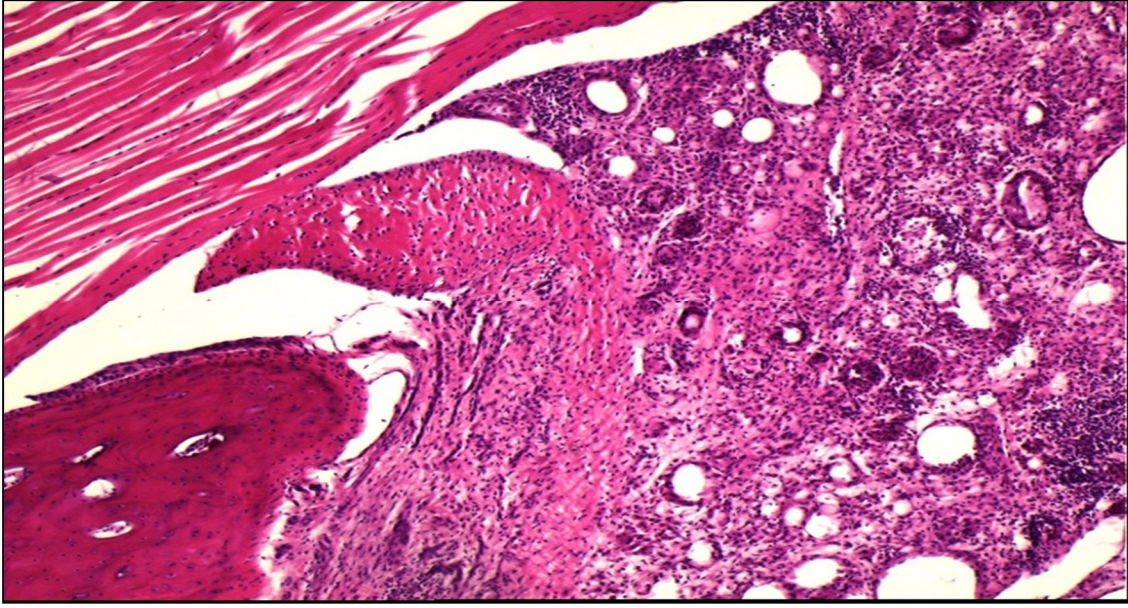
Histopatolojik olarak grup 1 (Şekil 28), grup 2 (Şekil 29), grup 3 (şekil 30), grup 4 (şekil 31), grup 5 (şekil 32), grup 6 (şekil 33) ve grup 7 (şekil 34) doku örnekleri aşağıda verilmiştir.



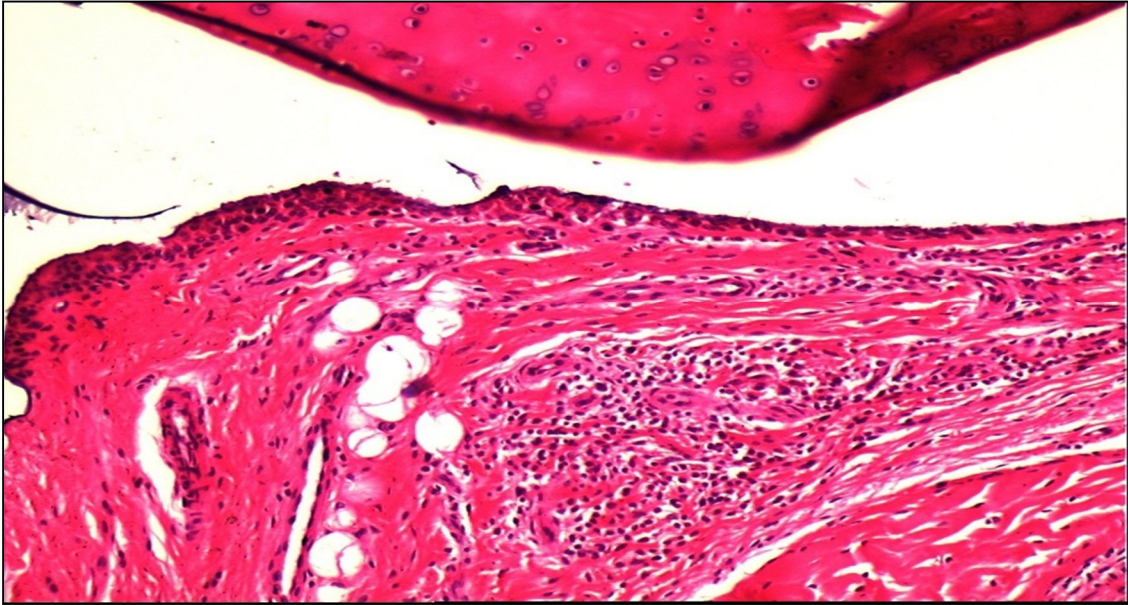
Şekil 28. Sinovyal hiperplazi ve inflamasyon yok (HEx100) - Kontrol Grubu (Grup 1)



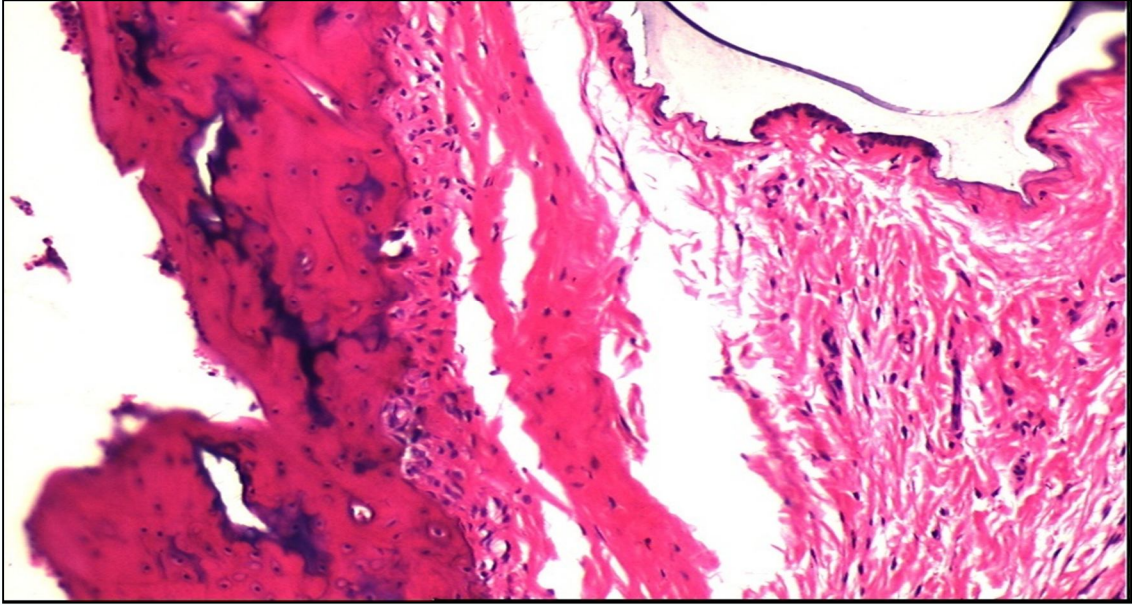
Şekil 29. Şiddetli kronik inflamasyon ve belirgin vasküler proliferasyon (HEx50) - Artrit Grubu (Grup 2)



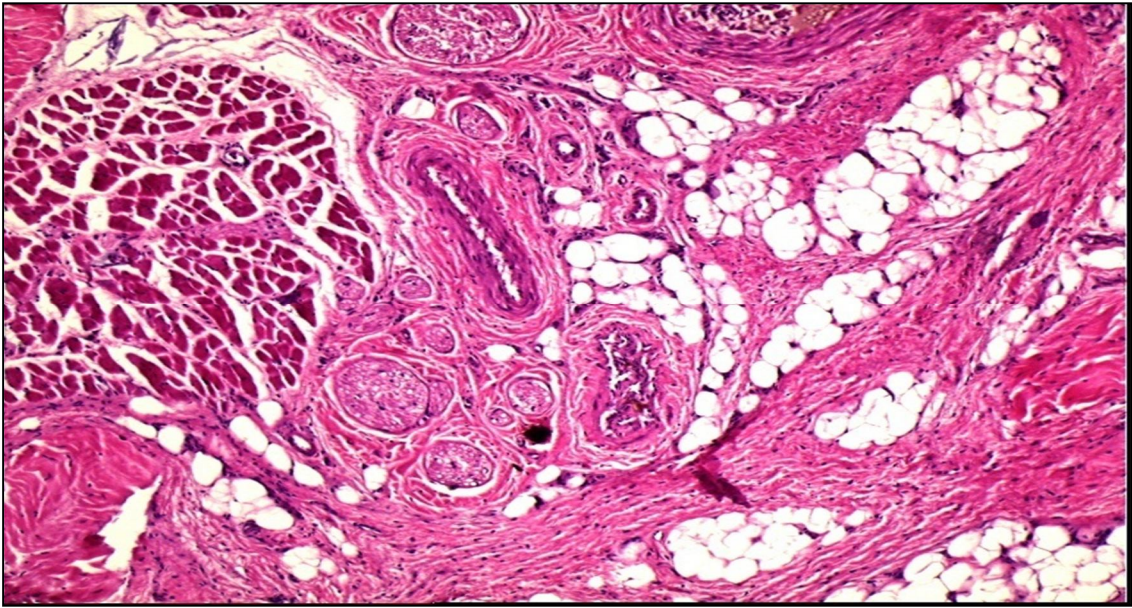
Şekil 30. Orta dereceli inflamasyon, sinovyal hiperplazi yok (HEX50) - DMSO + Artrit Grubu (Grup 3)



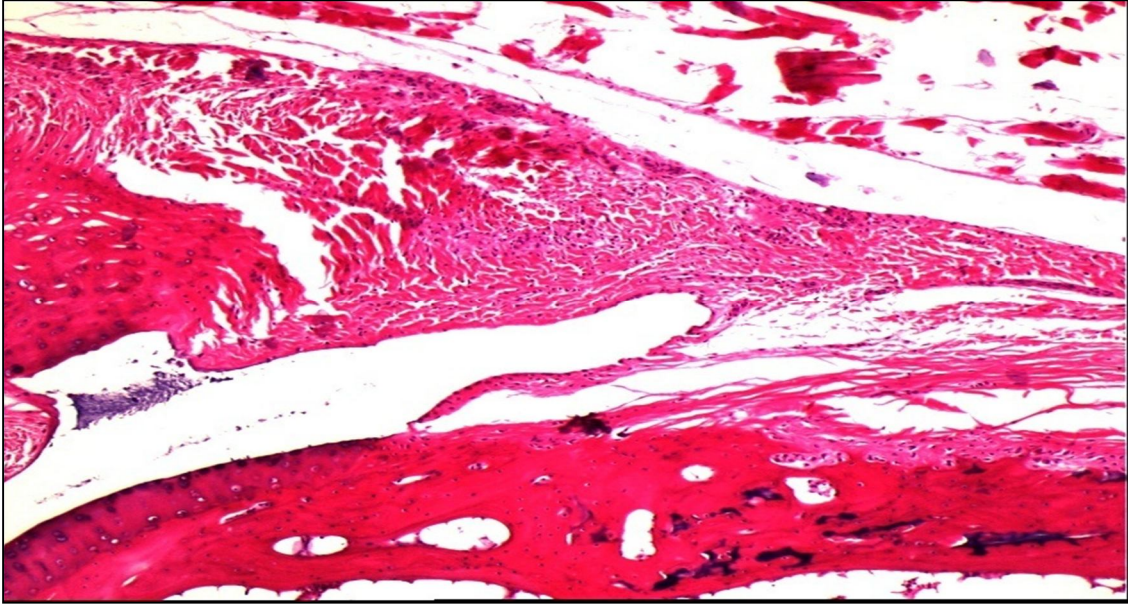
Şekil 31. Orta dereceli sinovyal hiperplazi, hafif dereceli kronik inflamasyon (HEX100) - Erdostein Grubu (Grup 4)



Şekil 32. Sinovyal hiperplazi ve inflamasyon yok (HEx100) - CAPE Grubu (Grup 5)



Şekil 33. Yumuşak dokuda normal morfoloji (HEx50) - Erdosteine + CAPE Grubu (Grup 6)



**Şekil 34. Yumuşak dokuda normal morfoloji, minimal inflamasyon ve ödem (HEx50) -
Diklofenak Grubu (Grup 7)**

TARTIŞMA

Romatoit artrit, hücrenel ve otoimmün mekanizmalarla sinoviyal dokuda hasara neden olan, sistemik bulgular gösteren, kronik, inflamatuvar poliartritle karakterize multisistemik bir hastalıktır. RA; dünyada tüm ırklarda görülebilen otoimmün hastalıklardan biri olup prevalansı yaklaşık %1, kadın/erkek oranı 3/1'dir. Hayatın 3-5. dekatında daha sık gözükmetedir. RA, birçok hastada değişik derecelerde kemik ve eklem tahribi yaparak zamanla şekil bozukluğuna ve işlev kaybına yol açmaktadır (1,2,5,6,8,12).

Romatoit artrit tedavisini araştırmak için birçok deneysel artrit modeli geliştirilmiştir. Bunlardan biri FCA'nın sıçan pençesine injeksiyonuyla oluşturulan adjuvant artrit ve RA modeli olarak sıklıkla kullanılmaktadır (64). Adjuvant artrit parafin yağı ile güçlendirilmiş mikobakteri kapsülündeki antijene karşı immünolojik yanıt olarak gelişir. Adjuvant artrite hücrenel immün yanıt aracılık eder ve histopatolojik görünümü RA ile oldukça benzerdir (71).

Çalışmamızda adjuvant artrit oluşturmak amacıyla 0. günde tek doz intradermal 0,1ml FCA injeksiyonu uygulandı. Bunu takiben 17. gün kumpas ile yapılan ölçümde, FCA uygulanan tüm gruplarda sağ pençede adjuvant artrit oluşturduğu ödem değerlendirildi. Kontrol (grup 1) grubuna ve 0. Gün değerlerine göre, diğer grupların sağ pençe çapında istatistiksel olarak anlamlı artış ($p<0.05$) olduğu görüldü. Bu bulgumuz adjuvant artrit modelini başarı ile gerçekleştirdiğimizin göstergesidir.

Yine 17. gün PAM ile yapılan ölçümde, FCA uygulanan tüm gruplarda sağ pençede adjuvant artrit nedeniyle oluşan inflamasyona bağlı, ağrılı uyarana karşı artmış hassasiyet

saptandı. Kontrol (grup 1) grubuna göre, diğer grupların sağ pençelerinde oluşan ağrıya tepki kuvvetinde istatistiksel olarak anlamlı azalma ($p<0.05$) olduğu görüldü. Bu bulgumuz adjuvant artrit modelini başarı ile gerçekleştirdiğimizizin göstergesidir.

Prostaglandin sentez inhibisyonuyla etkilerini gösteren NSAİİ'm, sıçanlarda oluşturulan adjuvant artritte pençedeki ağrı, ödem, eritem gibi inflamatuvar parametreleri azalttığı yapılan çalışmalar ile belirlenmiştir (71,72)

Diklofenak artrit tedavisinde sıklıkla kullanılan bir nonsteroid antiinflamatuvardır. Bizim çalışmamızda diklofenak; erdosteine, CAPE ve kombine tedavinin adjuvant artritte inflamasyon, ağrı ve ödemdeki etkisini karşılaştırmak için kullanıldı. Çalışmamız sıçanlarda deneysel olarak oluşturulan artrit modelinde erdosteine, CAPE ve kombine tedavinin etkilerini incelemek amacıyla yapılmıştır ve bu çalışmamız literatürde deneysel adjuvant artrit modelinde erdosteine, CAPE ve kombine tedavinin etkisinin incelendiği ilk çalışma olacaktır.

Çalışmamızda oluşturduğumuz adjuvant artrit tedavisine 17. gün başlandı ve 27. güne kadar devam edildi. Erdosteine, CAPE ve kombine tedavinin uygulandığı 4, 5 ve 6. grupların ve diklofenak uygulanan 7. grubun, 17. gün ile 27. gündeki pençe çapı değerleri karşılaştırıldığında kumpas ile yapılan ölçümde DMSO, erdosteine, CAPE, kombine ve diklofenakın pençe ölçüm değerlerini istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalttığı görüldü. Bu sonuç bize CAPE'nin çözücüsü olan DMSO, erdosteine, CAPE, kombine tedavinin ve diklofenakın adjuvant artritteki inflamasyonu azaltmada etkili olduğunu düşündürmektedir.

Pençe ölçüm değerleri incelendiğinde tedavi grupları arasında, deneyin başlangıç günü olan 0. gün değerine en yakın olanın kombine tedavi (grup 6) olduğu gözlemlendi.

Ağrı bakımından PAM ile yapılan ölçümündeki değerler grup içi ve günlere göre karşılaştırıldığında; 17-20. günde istatistiksel olarak sadece 7. grupta ($p<0.05$), 17- 23. günde grup 5 ve 7'de ($p<0.05$) istatistiksel olarak anlamlı artış saptanmıştır. 23. günde 4. grupta artış olmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlılık bulunamamıştır. 17-27. günler arası yapılan ölçümde istatistiksel olarak grup 4, 5 ve 7'de anlamlı bir artış saptandı ($p<0.05$). Bu sonuç bize diklofenak gibi CAPE ve erdosteine de analjezik etki gösterdiğini düşündürmektedir. İstatistiksel olarak anlamlı olmasa da kombine tedavi grubunda (grup 6) da PAM değerlerinde artış olduğu görüldü.

Romatoid artrit bulgularını değerlendirmek amacıyla çalışmamızın sonunda sıçanların pençelerini histopatolojik olarak inceledik. 27. günde vasküler proliferasyon sayılarının median değerleri grup 1 (kontrol)' e göre grup 2'de istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksekti ($p<0.05$). Grup 2 ve 3'ün tamamında şiddetli, grup 4'ün % 12,5 hafif, % 12,5 orta,

% 75 şiddetli, grup 5'in % 11,1 hafif, % 22,2 orta, % 66,7 şiddetli, grup 6'nın % 11,1 yok, % 11,1 hafif, % 44,4 orta, % 33,3 şiddetli, grup 7'nin % 37,5 orta, % 62,5 şiddetli vasküler proliferasyon görüldü. Vasküler proliferasyon yüzde olarak en az kombine tedavi grubunda (grup 6) görülmüştür.

Sıçanların sağ arka ayak histopatolojik incelemelerinde 27. günde kontrol grubundaki (grup 1) hayvanlarda sinovyal proliferasyona rastlanmadı. 2. ve 3. grupta % 100 görülürken; 4. grupta % 62,5, 5. grupta % 77,5, 6. grupta % 44,5 ve 7. grupta % 75 oranında sinovyal proliferasyon görüldü. Sinovyal proliferasyon yüzde olarak en az kombine tedavi grubunda (grup 6) görülmüştür.

27. günde histopatolojik bulgularda; 27. günde sıçanların sağ arka ayak pençelerinin histopatolojik incelemelerinde grup 1'deki (kontrol) hayvanlarda inflamasyona rastlanmadı. Grup 2 ve 3'te % 100 şiddetli, grup 4'te % 25 orta, % 75 şiddetli; grup 5'te % 33,3 orta, % 66,7 şiddetli; grup 6 da % 11,1 hafif, % 66,7 orta, % 22,2 şiddetli; grup 7 de % 75 şiddetli, % 25 orta derecede inflamasyon görüldü. İnflamasyon yüzde olarak en az kombine tedavi grubunda (grup 6) görülmüştür.

Ödem oluşumu açısından 27. günde sıçanların sağ arka ayak pençelerinin histopatolojik incelemelerinde grup 1'deki (kontrol grubu) hayvanlarda ödeme rastlanmadı. Grup 2 de % 14,3 orta, % 85,7 şiddetli, grup 3'de % 66,7 orta, % 33,3 şiddetli ödem görülürken; tedavi gruplarından grup 4'te % 25 zayıf, % 37,5 orta, % 37,5 şiddetli; grup 5'te % 33,3 zayıf, % 22,2 orta, % 44,4 şiddetli; grup 6'te % 22,2 zayıf, % 55,5 orta, % 22,2 şiddetli; grup 7'da % 12,5 zayıf, % 37,5 orta, % 50 şiddetli ödem görüldü. Ödem yüzde olarak en az kombine tedavi grubunda (grup 6) görüldü.

Histopatolojik sonuçlar açısından CAPE ve erdosteinin birlikte kullanımının istatistiksel olarak anlamlı derecede vasküler proliferasyon, sinovyal proliferasyon ve inflamasyonu azaltması kombine tedavinin RA'daki ödem ve inflamasyon üzerine etkili olabileceğini düşündürmektedir.

Kafeik asit fenetil ester, arıların bitkilerden topladığı propolis adı verilen özütün içindeki biyolojik olarak aktif bir moleküldür (13-16). Propolis insanların dikkatini tıbbi açıdan binlerce yıl önce çekmiş ve bu doğal ürün eski çağlarda Avrupa ve Kuzey Afrika'da, Mısır, Yunan ve Romalılarca yaygın olarak kullanılmıştır. Propolisi, Mısırlılar bazı hastalıkların tedavi edilmesi ve ölümlerin mumyalanmasında, Yunanlılar ve Romalılar da deri apselerini iyileştirmede yüzyıllarca ilaç olarak kullanmışlardır (17).

Propolis içerisinde yoğun olarak bulunan flavanoidler, çok güçlü antioksidanlardır. Antioksidanlar, serbest radikalleri tutma özelliğine sahiptirler, böylece lipidleri korur ve C vitamini gibi diğer bileşiklerin oksitlenmesini ve yıkılmasını engellerler (18). Propolisin aktif bileşeni olan CAPE'nin antioksidan, sitotoksik, antiinflamatuvar etkisi, antiviral, antikarsinojenik, analjezik-anestezik, yara iyileşmesini hızlandırıcı ve immunmodülatör etkileri vardır (24-36).

Spinal kord iskemi/reperfüzyon hasarında, Parkinson hastalığında, yenidoğanlarda hipoksik iskemik beyin hasarında, multiple sklerozda, beyin tümörlerinde, antikanser tedavilerde tedavi edici ajanın toksik etkilerine karşı, hepatik ensefalopatide CAPE'nin antioksidan etkisi nedeni ile koruyucu etki gösterdiği yapılan deneysel çalışmalarda gösterilmiştir (16,24). Bizim çalışmamızda CAPE'nin RA tedavisinde ağrı ve inflamasyonu azaltmada tek başına ve erdosteine ile birlikte etkili olduğu bulunmuştur.

Erdosteine; antioksidan ve antiinflamatuvar özellikleri olan ayrıca bakterial adhezyonu inhibe eden kronik obstrüktif pulmoner hastalıklarda ve bu hastalıkların akut alevlenmelerinde mukolitik ajan olarak kullanılan bir ön ilaçtır (15,37,38). Erdosteine bloke edilmiş iki tiyol grubuna sahiptir. Hepatik metabolizasyonla aktifleşen tiyol derivesi iki sülfidril grup oluşmaktadır. Aktifleşen sülfidril grupları erdosteinin antiinflamatuvar ve serbest radikal süpürücü etkisini oluşturmaktadır (39-52). Bizim çalışmamızda erdosteinin tek başına ve CAPE ile birlikte kullanıldığında antiinflamatuvar ve anajezik etkinlik gösterdiği saptanmıştır.

Son yıllarda yapılan çalışmalarda serbest radikallerin RA'nın patogenezinde rol oynadığı yönünde bulgular elde edilmiştir. Normal sinovyal sıvıda mononükleer hücre hakimiyeti vardır. RA'lı sinovyal sıvıda ise baskın hücre olan polimorfonükleer lökositlerde, fagositoz esnasında süperoksit anyonları meydana gelmekte ve bu anyonlar bağ dokusu elemanları üzerine zararlı etkiler oluşturmaktadır (71). Serbest radikaller birçok fizyolojik ve patolojik reaksiyon sonucu oluşabilen, son yörüngelerinde ortaklaşmamış bir veya daha fazla elektronun olduğu kararsız durumdaki maddelerdir.

Serbest radikaller reaktif yapıları ile protein, lipid, DNA ve nükleik asitleri hasara uğrattırır. En fazla hasar gören hücre membranındaki doymamış (poliansature) yağ asitleridir. Burada üç veya daha fazla çift bağ içeren poliansature yağ asitlerinin lipid peroksidasyonu ile MDA ve 4-hidroksinonenol gibi aldehit yıkım ürünleri oluşur. Hücre membran lipidlerinin okside olması hücre içi ve dışı iyon dengesinin bozulması sonucunda hücre hasarına neden olur (1,2,64-69). Yapılan birçok çalışmada plazma MDA düzeyi RA'li

hastalarda sağlıklı kontrollere göre yüksek bulunmuştur (72,73). Kajanachumpol ve ark. (74) ise MDA düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı fark bulamamışlardır. Taştekin ve ark. (64) yaptığı çalışmada adjuvant artritli sıçanlarda plazma MDA düzeylerinin sağlıklı kontrol grubuna göre arttığını görmüşlerdir. Bizim çalışmamızda MDA değerleri adjuvant artritli sıçanlarda (2. ve 3. grup) sağlık kontrol grubuna göre azaldığı görüldü. 27. günde istatistiksel olarak 2-7 ve 3-6 gruplar arasında anlamlı bir artış ($p<0.05$) olduğu görüldü. Bu sonuç bize kombine tedavi (grup 6) ve diklofenak (grup 7) gruplarının oksidan özellik gösterdiğini düşündürmektedir.

Sitokinler, immün sistem hücreleri arasında iletişimi sağlayan peptit yapılı mediyatörlerdir. Bağışık yanıtta çok sayıda birbirinden farklı üretilen sitokinler; doğal ve spesifik immün yanıtın rol aldığı inflamasyon, viral savunma mekanizması, T ve B hücre proliferasyonu gibi mekanizmaları düzenleyen ekstraselüler moleküllerdir (53,54). RA gibi kronik inflamasyonla karakterize otoimmün hastalıklarda sitokin salınımı önemli rol oynamaktadır. Sitokinler sinoviyal hücre proliferasyonu meydana getirerek membran hipeplazisi ve pannus oluşumundan sorumlu tutulmuşlardır. RA patogenezinde başlıca TNF- α ve IL-1 olmakla birlikte IL-2, IL-6, IL-10'un da rol oynadığı yönünde çalışmalar görülmektedir (56-59).

Tümör nekroz faktör alfa, esas olarak endotoksinle karşılaşmış makrofajlar tarafından üretilir. Düşük konsantrasyonda infeksiyon odağındaki endotel hücrelerinde adhezyon moleküllerinin üretimini arttırarak nötrofillerin damar duvarına yapışmasını sağlar. Bizim çalışmamızda yaptığımız ölçümlerde TNF- α bulunamadı. Bunun deneysel hatalardan kaynaklanmış olabileceğini düşünüyoruz.

İnterlökin 1 önemli bir inflamatuvar mediyatör olup, RA ve diğer inflamatuvar eklem hastalıklarında kemik ve kıkırdak yıkımından sorumlu olduğu düşünülmektedir. IL-1, molekül ağırlıkları aynı yükleri farklı olan IL-1 α ve IL-1 β olarak ikiye ayrılır. Ortalama IL-1 β düzeyi aktif RA'lı hastaların plazmasında ve eklem sıvısında anlamlı derecede yüksektir (4,56,61). Bizim çalışmamızda sağlıklı kontrol ile diğer gruplar arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır.

İnterlökin-2, başlıca T helper hücreleri tarafından üretilen bir sitokindir. Antijenle karşılaşan dinlenme halindeki T hücreleri, hem IL-2 üretme hem de yüzeylerinde IL-2 reseptörleri oluşturması yönünde uyarılır. IL-1 T-helper hücrelerini de uyararak farklılaşmalarını ve IL-2 üretmelerini sağlar (60). Bizim çalışmamızda sağlıklı kontrol grubuyla yapılan karşılaştırmada gruplar arasında anlamlı bir farklılık bulunamamıştır.

İnterlökün-6, T helper ve monositler tarafından üretilir. Proinflamatuvar ve antiinflamatuvar özelliği vardır. B lenfositlerden IgG yapımını uyarır. Ateş ve akut faz proteinlerinin artmasına neden olabilir (54,56,57). RA'lı hastalarda plazmada ve yıkılan eklem dokusunda IL-6 yüksek oranda görülür (61). Bizim çalışmamızda gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamamıştır.

İnterlökün-10, T-helper 2 hücreleri tarafından üretilir. IFN gama üretimini kısıtlayarak negatif geri beslemeyle olası hücre yıkımını engellemeye çalışır. Sitokin sentezini inhibe ederek aktifleşmiş makrofajların etkisini azaltır (63). Khalifeh ve ark (75)'nin yaptığı çalışmada IL-10 düzeyleri sağlıklı kontrole göre daha düşük bulunmuştur (75). Bizim çalışmamızda sağlıklı kontrole diğer gruplar arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır.

Sonuç olarak, FCA'nın sıçanların sağ arka ayak pençelerine uygulanması ile oluşturulan adjuvant artrit modelinde, erdostein ve CAPE'nin deneysel çalışmalar ile kanıtlanmış olan antiinflamatuvar etkinliğinin, bizim çalıştığımızda da bulunduğunu; ayrıca birlikte kullanıldıklarında histopatolojik olarak daha etkili olduklarını düşündürmektedir. Ek olarak yapılan ağrı testleri sonucunda çalışmamızda erdostein ve CAPE'nin analjezik etkilerinin olduğu da saptanmıştır. Erdostein, CAPE ve kombine tedavinin antiinflamatuvar ve analjezik etkisinin değerlendirilmesi için daha kapsamlı çalışmaların yapılmasının RA tedavisinde faydalı olabileceğini düşünmekteyiz.

SONUÇLAR

Çalışmamızda sıçanların sağ arka ayak pençelerine FCA'nın intradermal olarak tek doz verilmesiyle oluşturduğumuz adjuvant artritte erdosteine, CAPE ve kombine tedavinin etkilerini inceledik. İncelemeler sonucunda elde edilen veriler aşağıdaki gibidir;

1. FCA uygulamasından sonraki 17. günde tüm gruplarda sağ pençede adjuvant artrit oluşturduğu inflamasyon ve ödem değerlendirildi. Kontrol (grup 1) grubuna göre, diğer grupların sağ pençe çapında istatistiksel olarak anlamlı artış olduğu görüldü. Bu bulgumuz adjuvant artrit modelini başarı ile gerçekleştirdiğimizin göstergesidir.
2. FCA uygulamasından sonraki 27. günde sağ arka ayak pençe çapları, 17. gündeki değerleri ile karşılaştırıldığında hiçbir işlem uygulanmayan sağlıklı kontrol grubunun (grup 1) değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı bir değişim olmadığı görüldü.
3. FCA ile oluşturulan artrit sonrası, CAPE'nin çözücüsü olan DMSO (grup 3), erdosteine (grup 4), CAPE (grup 5), kombine (grup 6) ve diklofenak (grup 7) tedavisi sonrası 27. gün ile 17. gündeki pençe çapı değerleri karşılaştırıldığında kumpas ile yapılan ölçümde tüm gruplarda pençe çaplarının değerlerinin istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azaldığı görüldü.
4. 27. günde tedavi grupları (4, 5, 6 ve 7) kendi aralarında karşılaştırıldıklarında kumpas ile yapılan ölçümde istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı. Ancak 0-27. gün ölçümlerine bakıldığında kombine tedavinin (grup 6) pençe ödemi başlangıç değerine en çok yaklaştırdığı görüldü.

5. PAM ile yapılan ağrı ölçümlerinde 17-27 günler arası grup içi yapılan karşılaştırmalarda erdosteine (grup 4), CAPE (grup 5) ve diklofenak (grup 7)'de istatistiksel olarak anlamlı bir artış (g/f) olduğu görüldü. İstatistiksel olarak olmasa da kombine tedavide de (grup 6) bir azalma olduğu görüldü. Kombine tedavide (grup 6) PAM değerlerinde 27. günde, 17. güne göre bir artış olsa da bu istatistiksel olarak anlamlılık göstermemiştir.
6. Erdosteine ve CAPE'nin birlikte uygulandığı kombine grubun (grup 6) adjuvant artrit histopatolojik bulgularından olan vasküler proliferasyon, sinoviyal proliferasyon, inflamasyon ve ödemi en iyi azalttığı görüldü.
7. 27. günde MDA düzeyleri ölçümünde grup 2-7 ve grup 3-6 istatistiksel olarak anlamlı bir farklılığın olduğu saptandı.
8. 27. günde inflamasyon belirteci olan TNF- α , IL-2, IL-6, IL-10 değerlerinde gruplar arasında anlamlı bir farklılık bulunmadı. Sadece IL-1 β bakımından grup 2 ile 4, 7 arasında ve grup 3 ile 5 ve 6 arasında anlamlı bir farklılık saptanmıştır.

Sonuçlar DMSO (grup 3), erdosteine (grup 4), CAPE (grup 5) , CAPE + erdosteine (grup 6) ve diklofenak (grup 7) tedavisinin deneysel adjuvant artrit modelinde pençe çapı ve histopatolojik ölçümler doğrultusunda antiinflamatuvar etkisinin olduğunu göstermektedir. Yine ağrı parametre ölçümlerinde de yalnız başlarına erdosteine (grup 4), CAPE (grup 5) ve diklofenak (grup 7) tedavisinin etkili olduğu görülmektedir. Fakat oksidatif stres ve inflamatuvar sitokinler üzerine anlamlı sonuçlar elde edilememiştir. Bu konuda daha kapsamlı ve ayrıntılı araştırmalar yapılması gerektiğini düşünmekteyiz.

ÖZET

Çalışmamızda erdostein, kafeik asit fenetil ester ve kombine tedavinin sıçanlarda deneysel olarak oluşturulan adjuvant artrit modelindeki etkisi incelendi. Her grupta 8 sıçan olacak şekilde 7 grup oluşturuldu. 1. grup kontrol grubu olarak ayrıldı ve diğer grupların sağ arka pençelerine 0,1 ml tek doz intradermal *Freund's Complete Adjuvant* verilerek artrit oluşturuldu. Erdostein ve kafeik asit fenetil esterinin oluşan adjuvant artrit üzerine etkisini değerlendirmek amacıyla 17-27 günler arası ikinci gruba sadece serum fizyolojik, üçüncü gruba kafeik asit fenetil esterinin çözücüsü olan dimetil sülfoksit, dördüncü gruba erdostein (500 mg/kg), beşinci gruba kafeik asit fenetil ester (10 µmol/kg), altıncı gruba kombine tedavi (Erdostein+kafeik asit fenetil ester) (500 mg/kg+10 µmol/kg) ve yedinci gruba da pozitif kontrol için diklofenak (1 mg/kg) uygulandı. Serum fizyolojik, dimetil sülfoksit, kafeik asit fenetil ester ve diklofenak sodyum intraperitoneal yolla, erdostein ise sıçanlara gastrik gavaj yoluyla verildi.

İnflamatuvar reaksiyon 0, 17, 20, 23 ve 27. günlerde kumpas ile ölçüldü. 27. günde intrakardiyak olarak kanlar alındı ve patolojik inceleme için sıçanların sağ arka ayak eklemleri çıkarıldı. Plazmada malondialdehit, tümör nekroz faktör-alfa, interlökin-1beta, interlökin-2, interlökin-6, interlökin-10 düzeyleri ölçüldü ve eklemler histopatolojik olarak incelendi.

Freund's Complete Adjuvant uygulamasından sonraki 17. günde sağ pençe ölçümleri 0. gün değerleriyle ve kontrol grubu (grup 1) değerleriyle karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı derecede ödemliydi.

27. günde sağ pençe ölçümleri 17. gündeki değerleri ile karşılaştırıldığında kontrol grubu (grup 1) değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı bir değişimin olmadığı görüldü.

17 - 27. günlerdeki pençe çapı ölçümlerinde istatistiksel olarak grup 3, 4, 5, 6 ve 7' de anlamlı bir azalmanın olduğu görülmektedir.

Dimetil sülfoksit, erdosteine, kafeik asit fenetil ester ve kafeik asit fenetil ester+erdosteine (kombine) tedavi gruplarının deneysel adjuvant artrit modelinde pençe ödemi ve histopatolojik ölçümler doğrultusunda antiinflamatuar etkisinin olduğunu göstermektedir. Erdosteine ve kafeik asit fenetil esterin birlikte uygulandığı kombine grupta (grup 6) adjuvant artrit histopatolojik bulgularından olan vasküler proliferasyon, sinoviyal proliferasyon, ödem ve inflamasyonun azaldığı görülmüştür. Ağrı parametre ölçümlerinde ise yalnız başlarına erdosteine ve kafeik asit fenetil ester tedavisinin analjezik etki gösterdiği görülmektedir. Fakat oksidatif stres ve inflammatuar sitokinler üzerine anlamlı sonuçlar elde edilememiştir.

Anahtar sözcükler: Adjuvant artrit, erdosteine, diklofenak, kafeik asit fenetil ester, romatoid artrit

THE EFFECTS OF ERDOSTEIN, CAFFEIC ACID PHENETHYL ESTER AND COMBINE TREATMENT ON THE ADJUVANT ARTHRITIS

SUMMARY

In our study we observed the effects of erdosteine, caffeic acid phenethyl ester and combine treatment on experimentally induced adjuvant arthritis model in rats. We divided them into 7 groups and every group was consisted of 8 rats. The first group was known as a control group and, we formed adjuvant arthritis to the other groups by injected 0.1 ml single dose Freund's Complete Adjuvant solution their back right paws. Among the 17th and 27th days; second group was given only serum physiological, third group was given dimethyl sulfoxide, fourth group was given erdosteine 500 mg/kg dose, fifth group was given caffeic acid phenethyl ester 10 μ mol/kg dose, sixth group was given combine treatment and seventh group was given diclofenac sodium (1 mg/kg) for positive control. Serum physiological, dimethyl sulfoxide, caffeic acid phenethyl ester and diclofenac sodium was given intraperitoneal, erdosteine was given gastric gavaj.

Inflammatory reaction was measured on days 0, 17, 20, 23 and 27th with special callipers. At the end of the experiment, the rats' blood was taken from heart and for the pathological investigation the right back leg joints were taken out. In plasma malondialdehit, tumor necrosis factor-alfa, interleukin-1beta, interleukin-2, interleukin-6, interleukin-10 levels were measured and their joints were investigated histopathologically.

After Freund's Complete Adjuvant application in 17th day, 0th day of the right paw measurement values and the control group (group 1) compared with the values in the edema was statistically significant.

Right paw diameter in 27. day values compared to the values of 17. day first group of a change in the values were not statistically significant 17 - 27 days paw diameter measurements statistically 3, 4, 5, 6, 7 are seen to be of a significant reduction in the groups.

Dimethyl sulfoxide, erdostein, caffeic acid phenethyl ester ve caffeic acid phenethyl ester + erdostein (combined) treatment groups in an experimental model of adjuvant arthritis and histopathological paw edema measurements show that the anti-inflammatory effect in line. Erdosteine and the co-administration of caffeic acid phenethyl ester in the combined group (group 6), one of the histopathological findings of adjuvant arthritis vascular proliferation, synovial proliferation, edema and inflammation were reduced. If the parameters in the measurement of pain alone erdosteine and it is seen that the analgesic effect of caffeic acid phenethyl ester treatment. But on oxidative stress and inflammatory cytokines meaningful results could not be obtained.

Key words: Adjuvant arthritis, caffeic acid phenethyl ester, diclofenac, erdostein, rheumatoid arthritis

KAYNAKLAR

1. Ramprasath VR, Shanthi P, Sachdanandam P. Semecarpus anacardium Linn. nut milk extractan indigenous drug preparation, modulates reactiveoxygen/nitrogen species levels and antioxidative system in adjuvant arthritic rats. *Mol Cell Biochem*2005;276:97-104.
2. Jaswal S, Mehta HC, Sood AK, Kaur J. Antioxidant status in rheumatoid arthritis and role of antioxidant therapy. *Clin Chim Acta*.2003;338:123-9.
3. Kumar VL, Gruprased B, Wahane VD. Atorvastatin Exhibits anti-inflammatory and anti-oxidant properties in adjuvant-induced monoarthritis. Springer Basel AG 2010; 18:303-8.
4. Cascão R, Vidal B, Raquel H, Neves-Costa A, Figueiredo N, Gupta V, Fonseca JE, Moita LF. Effective treatment of rat adjuvant-induced arthritis by celastrol. *Autoimmun Rev* 2012;11(12):856-62.
5. James R. O'Dell, (çeviri: T. Arası) Current Romatoloji Tanı ve Tedavi. İstanbul: Habitat Yayıncılık; 2006:145-56.
6. Gümüüşdiş G. Klinik romatoloji. İstanbul: Deniz matbaası, 1999: 269-77.
7. Mills, Stacey E. Histology for pathologists. 3th ed. USA: Lippincot Williams & Wilkins, 2006: 924-30.
8. Hamuryudan V. Romatoid artrit. İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri, Romatolojik Hastalıklar, Sempozyum Dizisi 2007;55: 69-77.
9. Metavi SA, Abbas D, Kamal MM, Ibrahim MK. Serum and synovial fluid levels of interleukin-17 in correlation with disease activity in patients with RA. *Clin Rheumatol*2011;30:1201-7.
10. Adelovo OO, Ojo O, Oduenyl I, Okvara CC. Rheumatoid arthritis among Nigerians: the first 200 patients from a rheumatology clinic. *Clin Rheumatol*2010;29:593-7.

11. Gündüz S. Adjuvant artritli sıçanlarda pelargonium sidoidesin etkisi (tez). Edirne: Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü; 2011.
12. Wongmekiat O, Gomonchareonsiri S, Thamprasert K. Caffeic acid phenethyl ester protects against oxidative stress-related renal dysfunction in rats treated with cyclosporin A. *Fundam Clin Pharmacol* 2011;25(5):619-26.
13. Wang X, Stavchansky S, Kerwin SM, Bowman PD. Structure-activity relationships in the cytoprotective effect of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) and fluorinated derivatives: Effects on heme oxygenase-1 induction and antioxidant activities. *Eur J Pharmacol* 2010; 635:16-22.
15. Yılmaz HR, Uz E, Gökalp O, Özçelik N, Çiçek E, Özer MK. Protective role of caffeic acid phenethyl ester and erdoesteine on activities of purine-catabolizing enzymes and level of nitric oxide in red blood cells of isoniazid-administered rats. *Toxicol Ind Health* 2008;24:519-24.
16. Akyol S, Armutçu F, Yiğitoğlu MR. The Medical Usage of Caffeic Acid Phenethyl Ester an Active Compound of Propolis, in Neurological Disorders and Emergencies. *Spatula DD*. 2011; 1(1):37-42.
17. T.C. Samsun Valiliği İl Tarım Müdürlüğü. Propolis. Samsun: ÇEY; 2008.
18. Elibol G. Propolis nedir?
<http://www.kimyaturk.net/index.php?action=printpage;topic=7274.0> Erişim tarihi: 15.10.2012.
19. Tanaka M, Okamoto Y, Fukui T, Masuzawa T. Suppression of interleukin 17 production by Brazilian propolis in mice with collagen-induced arthritis. *Inflammopharmacol* 2012; 20:19-26.
20. F.Hepşen İ, Tilgen F, Er H. Propolis: tıbbi özellikleri ve oftalmik kullanımı. *Turgut Özal Tıp Merkezi Dergisi* 1996; 3(4): 386-91.
21. Özyurt B, Özyurt H, Söğüt S, Şahin Ş, Temel İ, Akyol Ö. Bleomisin ile oluşturulan akciğer fibrozisinde pürin katabolizması enzim aktiviteleri üzerine CAPE'nin etkisi. *Fırat Tıp Dergisi* 2007; 12(3):168-72.
22. Özyurt B, Özyurt H, Atış Ö, Akbaş A, Yılmaz HR, Söğüt S. Deneysel olarak oluşturulan akciğer fibrozisinde e vitamini ve kafeik asit fenetil esterinin akciğer dokusundaki bazı metabolik enzimlere etkisi. *Tıp Araştırmaları Dergisi* 2006; 4(3): 14-8.
23. Cüre E. Ratlarda demir yüklenmesi ile oluşturulan oksidatif stresin önlenmesinde kafeik asit fenetil ester'in etkinliğinin araştırılması (tez). Isparta: Süleyman Demirel Üniversitesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı; 2007.
24. Uzar E, Acar A, Fırat U, Evliyaoğlu O, Alp H, Tüfek A, Yavuz C, Sinan Demirtaf, Taflidemir N. Deneysel Serebral iskemi/Reperfüzyon Hasarında Kafeik Asit Fenetil Esterinin Koruyucu Etkisi. *Türk Norol Derg* 2011;17:131-6.

25. Pekmez H, Kuş İ, Çolakoğlu N, Zararsız İ, Ögetürk M, Sarsılmaz M. Sıçanlarda Sigara İnhalasyonu Sonucu Prefrontal Kortekste Oluşan Yapısal Değişiklikler Üzerine Kafeik Asit Fenetil Ester (CAPE)'in etkisi. *Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi* 2004; 13(3):18-25.
26. Tarek K. Motawi, Hebatallah A. Darwish, Azza M. Abd El Tawab. Effects of caffeic acid phenethyl ester on endotoxin-induced cardiac stress in rats: a possible mechanism of protection. *J Biochem Molecular Toxicology* 2011; 25(2):84-8.
27. Biray C, Gündüz C, Yılmaz B, Şahin F, Topçuoglu N. Propolis ve etken maddeleri olan kafeik asit fenetil ester (CAPE) ve sinamik asit'in, insan t hücreli akut lenfoblastik lösemi hücre dizisi (CCRF-CEM)'de sitotoksik ve apopitotik etkinliğinin değerlendirilmesi. *Ege Tıp Dergisi* 2006;45(2): 83-92.
28. Hu F, Hepburn HR, Li Y, Chen M, Radloff SE, Daya S. . Effects of ethanol and waterextracts of propolis (bee glue) on acute inflammatory animal models. *J Ethnopharmacol* 2005;100(3):276-83.
29. Borrelli F, Maffia P, Pinto L, Ianaro A, Russo A, Capasso F, Lalenti A. Phytochemical compounds involved in the anti-inflammatory effect of propolis extract. *Fitoterapia*. 2002;73 Suppl 1:S53-63.
30. Chen H, Tran JT, Anderson RE, Mandal MN. Caffeic acid phenethyl ester protects 661W cells from H₂O₂-mediated cell death and enhances electroretinography response in dim-reared albino rats. *Mol Vis*. 2012;18:1325-38.
31. Song JJ, Lim HW, Kim K, Kim KM, Cho S, Chae SW. Effect of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) on H₂O₂ induced oxidative and inflammatory responses in human middle ear epithelial cells. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 2012;76(5):675-9.
32. Tekin A, Küçükkartallar T, Türkyılmaz S, Dinçkan A, Esen H, Ateş B, Yılmaz H, Kartal A. Effects of Caffeic Acid Phenethyl Ester (CAPE) on Sepsis in Rats. *Inflammation*, Vol. 31, No. 4, August 2008.
33. Abdallah FB, Fetoui H, Zribi N, Fakhfakh F, Keskes L. Protective role of caffeic acid on lambda cyhalothrin-induced changes in sperm characteristics and testicular oxidative damage in rats. *Toxicol Ind Health*. 2012;28(7):639-47.
34. Serarslan G, Altuğ ME, Konaş T. Kafeik Asid Fenetil Ester'in insizyonel Yara Modelinde Plazma Lipid Peroksidasyonu, Antioksidan Durum ve Nitrik Oksit Seviyesi Üzerine Etkisi. *Turkderm* 2007;41:11-4.
35. Onera M, Kafadara İ, Guneya A, Halicia M, Deniz K, Turka Y, Argun M. Effect of intraarticular propolis in an experimental septic arthritis model. *J Pediatr Orthop B*. 2011;20(1):8-13.
36. Kamburoğlu K, Özen T. Farelerde Anadolu propolisinin analjezik etkisi. *Agri* 2011;23(2):47-50.

37. Yesildağ A, Özden A, Yılmaz HR, Uz E, Ağackiran Y, Vural H et al. Erdosteine modulates radiocontrast induced hepatotoxicity in rat. *Cell Biochem Funct.* 2009;27(3):142-7.
38. Dal Negro RW. Erdosteine: antitussive and anti-inflammatory effects. *Lung.* 2008;186(1):70-3.
39. Yurdakul T, Kulaksizoglu H, Pişkin MM, Avunduk MC, Ertemli E, Gokçe G, Barışkaner H, Byükbaş S, Kocabas V. Combination antioxidant effect of a-tocopherol and erdosteine in ischemia-reperfusion injury in rat model. *Int Urol Nephrol* 2010;2:647-55.
40. Şehirli Ö, Şener G. Protective effect of erdosteine against naphthalene-induced oxidative. *Marmara Pharmaceutical Journal* 2010;14:67-73.
41. Tunc T, Uysal B, Atabek C, Kesik V, Caliskan B, Oztas E, Ersoz N, Oter S, Guven A. Erdosteine and Ebselen As Useful Agents in Intestinal Ischemia/ Reperfusion Injury. *J Surg Res* 2009;155(2):210-6.
42. Arica V, Tutanc M, Ozturk OH, Arica S, Basarslan F, Erden ES, Oktar S, Kaya HÇ. Dual effects of erdosteine on hemostasis via its different metabolites in young rats. *Hum Exp Toxicol.* 2011;30(10):1644-8.
43. Demiralay R, Gürsan N, Erdem H. The effects of erdosteine, N-acetylcysteine, and vitamin E on nicotine-induced apoptosis of hippocampal neural cells. *J Cell Biochem* 2008;104(5):1740-6.
44. Rahman I. Pharmacological antioxidant strategies as therapeutic interventions for COPD. *Biochim Biophys Acta* 2012;1822(5):714-28.
45. Gul M, Ayan M, Seydanoğlu A, Cander B, Giriflgin S, Erayman. Deneysel sepsis modelinde erdosteine'in glutatyon, serum tnf- α ve doku malonaldehid düzeylerine etkisi. *Akademik Acil Tıp Dergisi* 2007;5(1):19-23.
46. Turgut F, Çarlıoğlu A, Alkan R, Akdeniz D, Haltaş H, Şahin Balçık Ö, Uz E, Karataş ÖF. Erdosteine'in Diyabetik Ratlarda Böbrek Hasarı Üzerine Koruyucu Etkisi. *Türk Nefroloji Diyaliz ve Transplantasyon Dergisi* 2010;19(3):157-161.
47. Armutcu F, Gün BD, Altın R, Gürel A. Examination of lung toxicity, oxidant/antioxidant status and effect of erdosteine in rats kept in coal mine ambience. *Environ Toxicol Pharmacol* 2007 Sep;24(2):106-13.
48. Yılmaz HR, Iraz M, Söğüt S, Özyurt H, Yıldırım Z, Akyol O, Gergerlioğlu S. The effects of erdosteine on the activities of some metabolic enzymes during cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. *Pharmacol Res* 2004;50(3):287-90.
49. Kuvandik G, Duru M, Nacar A, Yonden Z, Helvacı R, Koç A, Kozlu T, Kaya H, Söğüt S. Effects of erdosteine on acetaminophen-induced hepatotoxicity in rats. *Toxicol Pathol* 2008;36(5):714-9.

50. Kandiş H, Erkan ME, Yıldırım U, Güneş H, Erbaş M, Yıldırım HA, Gezer S, Kara IH. Comparison of the effects of N-acetylcysteine and erdosteine in rats with renal injury caused by paracetamol intoxication. *Hum Exp Toxicol* 2011;30(9):1350-8.
51. Sener G, Aksoy H, Sehirli O, Yüksel M, Aral C, Gedik N et al. Erdosteine prevents colonic inflammation through its antioxidant and free radical scavenging activities. *Dig Dis Sci* 2007;52(9):2122-32.
52. Tutanç M, Arıca V, Yılmaz N, Nacar A, Zararsız I, Başarslan F, Tutanc OD, Nacar E. Effects of erdosteine on cyclosporin-A-induced nephrotoxicity. *Hum Exp Toxicol* 2012;31(6):565-73.
53. Jawetz, melnick ve Adelberg. *Tıbbi Mikrobiyoloji* (çeviri: O. Ş. Yenen). İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri 2010;140-44.
54. Roitt I, Brostoff J, Male D. *Immunology*. In: *Cytokines and Cytokine Receptors*. Sixth ed. London: Mosby; 2001; 119-29.
55. Tünger A, Çavuşoğlu C, Korkmaz M. *Asya Mikrobiyoloji. Sitokinler*. 4. basım. Asya Tıp Kitabevi, İzmir:2005;619-26.
56. Özoran K, Tülek N, Düzgün N. Romatoid artrit ve sitokinler: İnterlokın-1 (IL-1), interlökin-6 (IL-6), Tümör nekroz faktör alfa (TNF- α) ve İnterferon Gama (INF- γ). *Ankara Tıp Mecmuası* 1994; 47: 495-504.
57. Kaur G, Sultana S. Evaluation of antiarthritic activity of isoeugenol in adjuvant induced arthritis in murine model. *Food Chem Toxicol* 2012;50(8):2689-95.
58. Shah SU, Ashraf N, Soomro ZH, Shah MR, Kabir N, Simjee SU. The anti-arthritic and anti-oxidative effect of NBD (6-nitro-1,3-benzodioxane) in adjuvant-induced arthritis (AIA) in rats. *Inflamm Res* 2012;61(8):875-87.
59. Zheng FL, Chang Y, Jia XY, Huang M, Wei W. Effects and mechanisms of Cryptotanshinone on rats with adjuvant arthritis. *Chin Med J (Engl)* 2011;124(24):4293-8.
60. Selçuk Biricik S, *Mikrobiyoloji. Sitokinler*. İstanbul: Tusdata yayımları; 2010;335-336.
61. Kayaalp S.O, *Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji. Nonsteroid*. Ankara: Hacattepe-Taş kitapçılık 2002;964.
62. Çelik S. K, Kahraman A, MARALCAN A. Osteoartritin Patogenezinde Rolü Olan Oksidatif Stres ve İnflamasyon Üzerine Hyalüronik Asidin Etkisi. *Kocatepe Tıp Dergisi* 2010;11;1-7.
63. Levinson W, Jawetz E. *Tıbbi Mikrobiyoloji ve immunoloji* (çeviri: O. Ş. Yenen). Dündar İ.H, Erken E, Kılıç B, Memişoğlu H.R, Özcan K, Özgünen T, Yarkın F. Ankara:Güneş Tıp Kitapevleri. 2001;423-7.

64. Tastekin N, Aydogdu N, Dokmeci D, Usta U, Birtane M, Erbas H, Ture M. Protective effect of L-carnitine and alpha-lipoic acid in rats with adjuvant arthritis. *Pharmacol Res* 2007;56(4):303-10.
65. Ademođlu G. *Biyokimya*. İstanbul: Nobel Tıp Kitapevleri. 2009;829-35.
66. Kılınç G. Kardiyovasküler hastalığı olan periodontitisli bireylerde antioksidan enzim ve malondialdehit düzeyleri (tez) Isparta: Süleyman Demirel Üniversitesi; 2009.
67. Öztürk E. *Biyokimya*. İstanbul. 2012;37-39.
68. Ođul Y.T, Romatoid artritli hastalarda antioksidan tablo ve eritrosit membran NA⁺ /K⁺ ATP az aktivitesinin incelenmesi (tez). Erzurum: Atatürk üniversitesi; 2006.
69. Yılmaz E, Yılmaz S, Karakurt L, Serin E. Osteoartritte nitrik oksit ve malondialdehit düzeyleri. 2004;15(1)7-11.
70. Salih ÖZGÖÇMEN, Romatizmal Hastalıklarda Oksidatif Stresin Rolü, Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Fiziksel Tıp ve Rehabilitasyon Anabilim Dalı, Romatoloji Bilim Dalı, Elazığ, Türkiye Ekim 2007.
71. Dökmeci D, Özdemir F, Ulugöl A, Karadağ ÇH, Kokino S, Dökmeci İ. Kronik Adjuvant artritli sıçanlarda diklofenak ve biopton'un antiinflamatuvar etkilerinin karşılaştırılması. *Turk J Phys Med Rehab* 1998;2:67-70.
72. Ulugol A, Unalan H, Dokmeci I, Kokino S. Comparison of the effects of tenoxicam and mid-laser irradiation on chronic adjuvant arthritis in rats. *Clin and Exp Rheumatol* 1997;15:83-6.
73. Kocabaş H, Kocabaş V, Büyükbaş S, Sallı A, Uđurlu H. Romatoid artrit hastalarında hücrel oksidan ve antioksidan statü ve hastalık aktivitesi ile ilişkisi. *Turk J Rheumatol* 2010;25:141-6.
74. Kajanachumpol S, Vanichapuntu M, Verasertniyom O, Totemchokchyakarn K, Vatanasuk M. Levels of plasma lipid peroxide products and antioxidant status in rheumatoid arthritis. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2000;31:335-8.
75. Khalifeh MS, Al-Rukibat R, Hananeh W, Boumezrag A, Okour O. investigation of the role of tumour necrosis factor- α , interleukin-1 β , interleukin-10, nitric oxide and rheumatoid factor-immunoglobulin M in a rat model of arthritis. 2010;44(2):143-9.
76. Aydın S, SA, Çakmak A. Dimetilsulfoksit'in antiinflamatuvar araştırmalarda çözücü olarak kullanılması. 22. Ulusal Farmakoloji Kongresi Özet Kitabı s.183, Antalya, 2013.

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekiller

Şekil 1. Propolis	9
Şekil 2. Kafeik asit fenetil ester kimyasal formülü	11
Şekil 3. Erdostein kimyasal formülü	11
Şekil 4. İntradermal Freund's Complete Adjuvant uygulaması	16
Şekil 5. İntraperitoneal uygulama	17
Şekil 6. Gastrik gavaj uygulaması	17
Şekil 7. Yirmi yedinci günde kalpten ponksiyonla kan alma	17
Şekil 8. Kumpas	18
Şekil 9. Pressure application measurement	18
Şekil 10. TNF- α standart eğrisi	20
Şekil 11. İnterlökin-1 β standart eğrisi	21
Şekil 12. İnterlökin-2 standart eğrisi	22
Şekil 13. İnterlökin-6 standart eğrisi	24
Şekil 14. İnterlökin-10 standart eğrisi	25
Şekil 15. MDA standart eğrisi	26
Şekil 16. Sağ pençe takibi (kumpas)	29
Şekil 17. Sağ pençe PAM ölçümleri	31

Şekil 18. Ağırlık ölçümleri	33
Şekil 19. Gruplara göre plazma malondialdehit düzeylerinin dağılım	35
Şekil 20. Gruplara göre interlökin-1 β düzeylerinin dağılımı	36
Şekil 21. Gruplara göre interlökin-2 düzeylerinin dağılımı	37
Şekil 22. Gruplara göre interlökin-6 düzeylerinin dağılımı	38
Şekil 23. Gruplara göre interlökin-10 düzeylerinin dağılımı	39
Şekil 24. Gruplara göre inflamasyonun zayıf-orta-şiddetli olarak % değerleri	40
Şekil 25. Gruplara göre vasküler proliferasyon median değerleri	41
Şekil 26. Gruplara göre ödem % değerleri	42
Şekil 27. Gruplara göre sinovyal proliferasyon % değerleri	43
Şekil 28. Sinovyal hiperplazi ve inflamasyon yok	44
Şekil 29. Hafif dereceli kronik inflamasyon ve hafif dereceli vasküler proliferasyon	44
Şekil 30. Orta dereceli inflamasyon, sinovyal hiperplazi yok	45
Şekil 31. Orta dereceli sinovyal hiperplazi, hafif dereceli kronik inflamasyon	45
Şekil 32. Sinovyal hiperplazi ve inflamasyon yok	46
Şekil 33. Yumuşak dokuda normal morfoloji	46
Şekil 34. Yumuşak dokuda normal morfoloji, minimal inflamasyon ve ödem	47

Tablolar

Tablo 1. Tüm gruplarda pençe takipleri	30
Tablo 2. Tüm gruplarda PAM ölçümleri	32
Tablo 3. Tüm gruplarda ağırlık ortalamaları	34
Tablo 4. Plazma malondialdehid düzeyi	35
Tablo 5. Plazma interlökin-1 β düzeyi	36
Tablo 6. Plazma interlökin-2 düzeyi	37
Tablo 7. Plazma interlökin-6 düzeyi	38
Tablo 8. Plazma interlökin-10 düzeyi	39

ÖZGEÇMİŞ

30.01.1986 tarihinde Edirne’de doğdum. İlk ve orta öğretimimi Havsa Cumhuriyet İlköğretim Okulunda bitirdim. Lise eğitimime de Havsa Melahat Kilimci Lisesinde devam ettim. 2004 yılında Isparta Süleyman Demirel Üniversitesi Sağlık Bilimleri Fakültesinde başlamış olduğum ebelik bölümünden 2008 yılında mezun oldum. Mezuniyetimden hemen sonra Edirne Özel Ekol Hastanesi pediatri servisinde ilk görevime başladım. 2009-2013’de Trakya Üniversitesi Hastanesi Kadın Hastalıkları Servisinde çalıştım. 2013 Nisan-Ekim de aynı hastanede Kulak Burun Boğaz Servisinde çalıştım. 2013 Ekim ayında eş durumu nedeniyle İstanbul Arnavutköy Devlet Hastanesine atandım. 2010-2011 öğretim yılı içerisinde Trakya Üniversitesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalında başlamış olduğum yüksek lisans eğitimime halen devam etmekteyim.

EKLER

Ek 1

T.C.

TRAKYA ÜNİVERSİTESİ


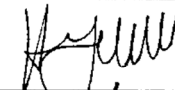
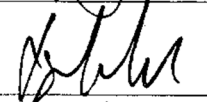
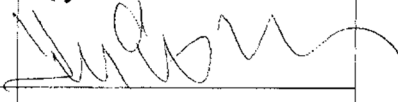
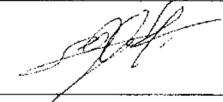
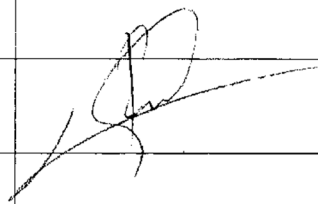
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU KARARLARI

Oturum Sayısı: 08

Karar Tarihi: 30.09.2011

KARAR NO: 2011.08.06

Yürütücülüğünü Tıp Fakültesi öğretim üyesi Prof. Dr. Dikmen Dökmeç'i in yaptığı Fisun Öge Dağdelen Yüksek Lisans tezi olarak planlanan TÜHDYEK-2011/64 protokol nolu "Deneysel artrit modelinde erdosteine, kafeik asid fenetil ester ve kombine tedavinin etkisi" başlıklı çalışma hakkında görüşüldü; araştırmanın amaç, yaklaşım, gereç ve yöntemler 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
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 checked="" type="checkbox"/> yok	<input checked="" 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 Sivi Üye	<input type="checkbox"/> var <input type="checkbox"/> yok	<input type="checkbox"/> evet <input type="checkbox"/> hayır	
İlyas ÖZMEN Sivil Üye	<input type="checkbox"/> var <input type="checkbox"/> yok	<input 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	
Doç.Dr. S. Arzu VARDAR Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi	<input type="checkbox"/> var <input type="checkbox"/> yok	<input type="checkbox"/> evet <input type="checkbox"/> hayır	
Doç. Dr. Nilda TURGUT Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi	<input type="checkbox"/> var <input type="checkbox"/> yok	<input type="checkbox"/> evet <input type="checkbox"/> hayır	
Yrd.Doç.Dr. Ruşen COŞAR-ALAŞ Tıp 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	