



TC.

ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

VBY-D-2013-0001

**TRİNİTROBENZEN SÜLFONİK ASİT (TNBS) İLE
OLUŞTURULAN DENEYSEL KOLİT MODELİNDE
RESVERATROL'ÜN ANTİOKSİDAN METABOLİZMAYA
ETKİLERİ**

Gülserap YILDIZ

DANIŞMAN

Doç. Dr. Pınar Alkım ULUTAŞ

AYDIN-2013

TC.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOKİMYA ANABİLİM DALI
VBY-D-2013-0001

TRİNİTROBENZEN SÜLFONİK ASİT (TNBS) İLE
OLUŞTURULAN DENEYSEL KOLİT MODELİNDE
RESVERATROL'ÜN ANTİOKSİDAN METABOLİZMAYA
ETKİLERİ






Gülserap YILDIZ

DANIŞMAN
Doç. Dr. Pınar Alkım ULUTAŞ

AYDIN-2013

T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE
AYDIN

Biyokimya Anabilim Dalı Doktora Programı öğrencisi Gülserap YILDIZ tarafından hazırlanan 'TNBS ile oluşturulan deneysel kolit modelinde resveratrolün antioksidan metabolizmaya etkisi' başlıklı tez 22.02.2013 tarihinde yapılan savunma sonucunda aşağıda isimleri bulunan jüri üyelerince kabul edilmiştir.

<u>Unvanı, Adı ve Soyadı :</u>	<u>Üniversitesi :</u>	<u>İmzası:</u>
(Başkan)Prof. Dr. Ayşegül BİLDİK	Adnan Menderes Üni.	
Prof. Dr. Funda KIRAL	Adnan Menderes Üni.	
Prof. Dr. Kemal Özdem ÖZTABAK	İstanbul Üniversitesi	
Doç.Dr. Pınar Alkım ULUTAŞ	Adnan Menderes Üni	
Doç.Dr. Cavit KUM	Adnan Menderes Üni	

Jüri üyeleri tarafından kabul edilen bu (tezin türü) tezi, Enstitü Yönetim Kurulunun
..... Sayılı kararıyla (tarih) tarihinde onaylanmıştır.

Prof.Dr. Sacide KARAKAŞ
Sağlık Bilimleri Enst.Müd.

ÖNSÖZ

İnflamatuvar Bağırsak Hastalığı (Inflammatory Bowel Disease, İBH), dünyada ve ülkemizde en yaygın gastrointestinal hastalıklardan biridir. Bu kronik rahatsızlık gelişmiş ülkelerde daha yaygındır ve halen tıbbi tedavisi yoktur. İBH'nin etyolojisi tam olarak bilinmemektedir. Fakat hastalığın oluşması ve seyrinde genetik, immunolojik ve çevresel faktörlerin etkili olduğu kesindir. İBH üzerine yapılan çalışmalardan elde edilen sonuçlar, İBH temelindeki mekanizmaların tahmin edilenlerden daha karmaşık olduğunu göstermektedir.

Resveratrol (RSV), yer fıstığı, üzüm ve dut gibi birçok bitki türünde bulunan ve anti-inflamatuvar, antioksidan, antitümör ve immunomodülatör özellikleri olan doğal bir polifenol bileşimidir. Modern ve alternatif tıpta pek çok hastalıkta kullanılmıştır. TNBS ile oluşturulmuş deneysel kolit modellerinde de kolit sonrası verilerek kolitteki iyileştirici özellikleri gözlenmiştir.

Bu çalışmada, TNBS ile oluşturulmuş deneysel kolit modelinde, tamamı profilaktik olarak verilmiş RSV'nin TNBS koliti üzerindeki etkilerini araştırmak amaçlanmıştır.

Bu çalışma, Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Biriminden alınan VTF-12024 nolu araştırma fonu ile desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY	i
ÖNSÖZ.....	ii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
RESİMLER DİZİNİ	x
1. GİRİŞ.....	1
1.1. İnflamatuvar Bağırsak Hastalığı.....	2
1.1.1.Crohn Hastalığı.....	2
1.1.2. Ülseratif Kolit.....	3
1.2. İBH Epidemiyolojisi.....	4
1.3. Kolit Modelleri	5
1.3.1. İn vitro Modeller.....	5
1.3.1.1. Primer Kültürler.....	6
1.3.1.2.Hücre hatları (cell lines)	6
1.3.2. İn vivo Modeller	6
1.3.2.1. Uyarılabilir (Induced) Modeller	6
1.3.2.2. Defektif T-Hücre Aracılı Kolit.....	8
1.3.2.3. Spontan Modeller	8
1.4. Serbest Radikaller.....	9
1.4.1. Serbest Radikallerin Tanımı	9
1.4.2. Serbest Oksijen Radikali Oluşumuna Neden Olan Kaynaklar	10
1.4.3. Serbest Radikallerin Sınıflandırılması.....	11
1.4.4.Serbest Radikal Çeşitleri	12
1.4.5. Lipidlerde Meydana Gelen Yapısal Değişiklikler	15
1.4.6. Protein ve Nükleik Asitlerde Meydana Gelen Yapısal Değişiklikler	16
1.4.7. Serbest Radikallerin Antimikrobiyal Aktivitede Etkisi.....	16
1.4.8. İBH Patogeneğinde Serbest Radikallerin Rolü.....	18
1.5. Antioksidanlar	19
1.5.1. Enzimatik Olmayan Antioksidan Sistemler (Radikal Tutucular)	20
1.5.2. Enzimatik Antioksidanlar	21
1.5.2.1. Süperoksit Dismütaz.....	21
1.5.2.2. Glutasyon Peroksidaz.....	22
1.5.2.3. Glutasyon Redüktaz	23
1.5.2.4. Katalaz.....	23
1.5.2.5. Glutasyon-S-Transferaz	24

1.5.2.6. Mitokondrial Sitokrom Oksidaz	24
1.6. Resveratrol.....	27
1.6.1. Resveratrolün Metabolizması	28
1.6.2. Resveratrolün Biyolojik Etkileri.....	28
1.6.3. Resveratrolün Antioksidan Etkisi.....	29
2. GEREÇ ve YÖNTEM	31
2.1. Gereç.....	31
2.1.1. Deney Hayvanları	31
2.1.2. Deney Grupları ve Uygulama Protokolü.....	31
2.1.3. Kullanılan Cihazlar	32
2.1.4. Kullanılan Kimyasal maddeler	33
2.1.5. Kullanılan Çözeltiler.....	34
2.1.5.1. Doku Homojenizasyonunda kullanılan Çözeltiler.....	34
2.1.5.2. Protein Miktarını Ölçmek İçin Kullanılan Çözeltiler	35
2.1.5.3. Doku Malondialdehid (MDA) Tayininde Kullanılan Çözeltiler	35
2.1.5.4. Serum Malondialdehid (MDA) Tayininde Kullanılan Çözeltiler	35
2.1.5.5. Doku Süperoksid Dismutaz (SOD) Tayininde Kullanılan Çözeltiler	35
2.1.5.6. Doku Katalaz (CAT) Tayininde Kullanılan Çözeltiler.....	36
2.2. Yöntemler	37
2.2.1. Dokuların homojenizasyonu.....	37
2.2.2. Protein Miktarının Ölçümü.....	37
2.2.3. Dokuda ve Plazmada Myeloperoksidaz (MPO) Ölçümü	38
2.2.4. Doku malondialdehid (MDA) ölçümü	39
2.2.5. Serum Malondialdehit(MDA) Ölçümü	39
2.2.6. Doku Süperoksit Dismutaz (SOD) Aktivitesi Ölçümü.....	40
2.2.7. Doku GSH-Px Aktivitesi Ölçümü	41
2.2.8. Doku katalaz (CAT) aktivitesi ölçümü.....	43
2.3. Makroskopik Skorlama	43
2.4. Histolojik (Mikroskopik) Skorlama.....	43
2.5. İstatistiksel Analiz	44
3. BULGULAR	45
3.1. Biyokimyasal Bulgular	45
3.2. Makroskopik Skorlama	51
3.3. Histolojik Bulgular	52
3.3.1 Histolojik (mikroskopik) Skorlama	52
3.4. Histolojik Sonuçlar	53
4. TARTIŞMA.....	59

5. SONUÇ.....	64
ÖZET	65
SUMMARY	66
KAYNAKLAR.....	67
ÖZGEÇMİŞ.....	85
TEŞEKKÜR	86
Bilimsel Etik Kurul Kararı.....	87

SİMGELER VE KISALTMALAR

AMP	: Adenozin Monofosfat
ATP	: Adenozin Trifosfat
Ca	: Kalsiyum
CAT	: Katalaz
COX	: Siklooksijenaz
Cu	: Bakır
DMSO	: Dimetil Sülfat
DNA	: Deoksiribonükleik asit
EDTA	: Etilendiamintetraasetik asit
FAD	: Flavin Adenin Dinükleotid
Fe	: Demir
GR	: Glutasyon Redüktaz
GSH Px	: Glutasyon Peroksidaz
GSH	: Redükte Glutasyon
GSSG	: Okside Glutasyon
GST	: Glutasyon –S Transferaz
H ₂ O ₂	: Hidrojen Peroksit
HO ₂	: Hidroperoksil Radikali
IBH	: İnflamatuvar Barsak Hastalığı
IFN	: İnterferon
IL	: İnterlökin
i.p	: Periton içi
İNOS	: Uyarılabilir Nitrik Oksit Sentaz
LDL	: Düşük Dansiteli Lipoprotein
LPO	: Lipit peroksidasyon
MDA	: Malondialdehid
µl	: Mikrolitre
Mn	: Mangan
MPO	: Myeloperoksidaz
NAD	: Nikotinamid Dinükleotid
NADPH	: Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat

NF- κ B	: Nükleer faktör-kappa B
nm	: Nanometre
NO	: Nitrik Oksit
O ₂ ⁻	: Süperoksit Anyon Radikali
OH ⁻	: Hidroksil Radikali
PBS	: Fosfat Tamponlu Tuz
PMNL	: Polimorfonükleer Lökositler
RO ⁻	: Alkoksil Radikalleri
ROO ⁻	: Peroksil Radikalleri
ROS	: Reaktif oksijen türleri
rpm	: Dakika başına dönüş sayısı
RSV	: Resveratrol
SOD	: Süperoksit Dismütaz
TNBS	: 2,4,6 Trinitrobenzen sulfonik asit
TNF	: Tümör Nekroz Faktör
TNF α	: Tümör Nekroz Faktör α
Zn	: Çinko

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.4.3. Serbest Radikaller	12
Çizelge 2.3. Kolon mukozasının makroskopik skorlama kriterleri	43
Çizelge 2.4. Kolon mukozasının mikroskopik skorlama kriterleri	44
Çizelge 3.1.1. Ortalama Doku MPO, MDA, SOD, GSH Px ve CAT düzeyleri	45
Çizelge 3.1.2. Ortalama Plazma MPO ve Serum MDA düzeyleri	45

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.4.7	MPO ‘nun etki mekanizması	18
Şekil 1.5.	Oksidatif hasara karşı koruyucu mekanizmalar ve antioksidan sistem ...	20
Şekil 1.5.2.2.	Glutasyonun okside ve redükte formları arasındaki dönüşümü	22
Şekil 1.5.2.6.	ROS oluşum yolları, lipid peroksidasyonu ve oksidatif stres yönetiminde GSH ve diğer antioksidanların (Vitamin E, Vitamin C, lipoik asid) rolü	25
Şekil 1.6	Resveratrol’ün trans ve cis izoformları	27
Şekil 3.1.1.	Doku MPO düzeyleri	46
Şekil 3.1.2.	Doku MDA düzeyleri	47
Şekil 3.1.3	Doku SOD aktivite düzeyleri	48
Şekil 3.1.4	Doku GSH -Px aktivite düzeyleri.....	49
Şekil 3.1.5.	Doku CAT aktivite düzeyleri	50
Şekil 3.2.	Gruplara ait kolon segmentlerinin makroskopik görünümleri.....	51
Şekil 3.3.1.	Mikroskopik skorların istatistiksel analizi.....	52

RESİMLER DİZİNİ

Resim 3.4.1. Kontrol grubunda kalın bağırsağın normal görünümü (H-Ex10)	53
Resim 3.4.2. Sham grubunda kalın bağırsaktaki yapıların görünümü (H-Ex10)	53
Resim 3.4.3. TNBS grubunda kalın bağırsakta oluşturulmuş hasarın görünümü (H-Ex4) 54	
Resim 3.4.4 TNBS grubunda kalın bağırsakta kolit görünümü (H-Ex10)	54
Resim 3.4.5. TNBS grubunda kalın bağırsakta mukozal hemoraji görünümü (H-Ex20)	55
Resim 3.4.6. TNBS grubunda submukozal ödem görünümü (H-Ex10).....	55
Resim 3.4.7. TNBS+ DMSO grubunda kolit görünümü (H-Ex4)	56
Resim 3.4.8. TNBS+DMSO grubunda inflamatuvar hücre infiltrasyonu (H-Ex10)	56
Resim 3.4.9. TNBS+ RSV grubunda kısmen düzelmiş kalın barsak görünümü (H-Ex10)	57
Resim 3.4.10. TNBS+ RSV grubunda mukoza görünümü (H-Ex10)	57
Resim 3.4.11. TNBS+ RSV grubunda kalın bağırsak görünümü (H-Ex10)	58
Resim 3.4.12. TNBS+RSV grubunda kısmen düzelmiş bulgular (H-Ex4)	58

EKLER DİZİNİ

Bilimsel Etik Kurul Kararı.....	87
---------------------------------	----

1.GİRİŞ

Genetik, çevresel ve immunolojik faktörlerin katkıda bulunduğu Crohn hastalığı ve Ülseratif Koliti de içine alan İnflamatuvar Bağırsak Hastalığı (İBH) kesin etyolojisi bilinmeyen ve gastrointestinal sistemde kronik değişikliklere neden olan bir hastalık grubudur. İBH, gelişmiş ülkelerde daha yaygındır ve patogenezi multifaktöryel olan bir hastalıktır (Martín ve ark 2006).

İBH’de kolonda oluşan doku hasarı, nötrofil ve makrofajların epitel bütünlüğünü bozabilme etkilerinin yanında, reaktif oksijen türleri (ROS), nitrojen metabolitleri, sitotoksik proteinler, litik enzimler ve sitokinler gibi mediyatörleri salıverme kabiliyetine de bağlı bulunmuştur (Yavuz ve ark 1999, Grisham ve ark 1991). ROS’un koliti de içine alan birçok inflamatuvar hastalıkta doku hasarının gelişmesinde etkisi vardır (Selve 1992, Norris ve ark 1982, Liu ve ark 2003).

Serbest radikaller ile oluşan doku hasarının derecesi intrasellüler savunma sistemlerinin etkinliğine bağlıdır. Savunma sistemleri, pek çok serbest radikal temizleyicileri (indirgenmiş glutatyon (GSH)) ve enzimlerden (süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), peroksidazlar) oluşur. Bu antioksidan savunma mekanizmaları lipid peroksidasyonunun başlamasını ve serbest radikallerin oluşmasını önlerler (Valko 2007).

Bağırsaklarda immün hücre sel cevabı ortaya çıkaran asetik asit (Terzioğlu ve ark 1997), dinitroklorobenzen (DNCB) veya 2, 4, 6-trinitrobenzen sulfonik asit (TNBS) gibi (Selve 1992, Norris ve ark 1982) çok sayıda bileşik tanımlanmıştır. TNBS ile oluşturulmuş kolit, deneysel model olarak yaygın olarak kullanılmıştır ve insan İBH’ sine benzerliğinden dolayı ilaçların etkilerini gözlemlemede bir yaklaşım olarak kabul edilmiştir.

Bu deneysel model, oksidatif stres ve polimorfonükleer hücrelerin mukozal infiltrasyonu ile karakterizedir. Kolon mukozasında TNBS, askorbat tarafından süperoksit anyonu (O⁻) ve hidrojen peroksit (H₂O₂) verecek şekilde metabolize edilir (Southey ve ark 1997, Morris ve ark 1989, Grisham ve ark 1991).

Oksidanlara maruziyetten dolayı koliti önleme aracı olarak vitamin E ve selenyum, N-asetilsistein (Nosal’ova ve ark 2000), melatonin (Pentney ve ark 1995), askorbat (Simmonds ve ark 1999), CAPE (Ek ve ark 2008) ve resveratrol’ü (RSV) içine alan değişik birçok antioksidan ajan kullanılmıştır.

RSV, birçok yiyecekte bulunan doğal polifenolik bir antioksidandır. Kalbi koruma, LDL inhibisyonu, nitrik oksit üretiminin aktivasyonu ve pıhtı oluşumunun önlenmesi gibi birçok faydaları bulunmuştur (Bertelli ve ark 1996). RSV'nin ayrıca güçlü antioksidan ve anti-inflamatuar özellikleri gösterilmiştir (Shigematsu ve ark 2003, Bishayee ve ark 2010, Gagliano ve ark 2010).

Bu çalışmada TNBS ile oluşturulmuş deneysel kolit modelinde, tamamı profilaktik olarak verilmiş RSV'nin TNBS koliti üzerindeki antioksidan etkilerini dokudaki SOD, CAT, GSH-Px, MPO ve MDA düzeyleri ile plazma MPO ve serum MDA düzeylerini ölçerek araştırmak amaçlanmıştır.

1.1. İnflamatuar Bağırsak Hastalığı (İBH)

İnflamatuar bağırsak hastalığı (İBH), gastrointestinal kanalın kronik veya tekrarlayan immun cevap ve inflamasyonu ile ilgili rahatsızlıkları tanımlayan geniş bir terimdir. En yaygın iki inflamatuvar barsak hastalığı Ülseratif kolit ve Crohn hastalığıdır. Her iki hastalık da belirgin anormal immun cevapla karakterizedir. Normalde immun hücreler, vücudu enfeksiyona karşı korumaktadırlar. Fakat İBH'li hastalarda immun sistem, yabancı maddeleri yakalama noktasında barsaktaki yiyecek, bakteri ve diğer maddeleri ayırt edemeyerek barsak hücrelerine hücum etmektedir. Organizma bu süreçte lökositleri kronik inflamasyonun meydana geldiği yer olan barsak duvarının iç tabakalarına göndermektedir (Kaymakoğlu 2001).

1.1.1. Crohn Hastalığı

Crohn hastalığı, potansiyel olarak gastrointestinal kanalın herhangi bir bölgesini ilgilendiren kronik inflamasyon durumudur. Fakat genellikle ince barsak sonu ile kalın bağırsak başlangıcını etkiler. Crohn hastalığında, bağırsağın bütün tabakaları tutulmuştur ve hastalıklı bölümler arasında sağlıklı bağırsak dokusu devam etmektedir (Hyams 1999).

Semptomlar, inatçı devamlı diyare (gevşek, sulu veya sık bağırsak hareketleri), kramp tarzı karın ağrısı, ateş ve zaman zaman rektal kanamayı içermektedir. İştah ve kilo kaybı ve yaygın bir şikayet olarak da yorgunluk gözlenmektedir. Bununla birlikte, hastalık daima gastrointestinal kanala sınırlı olmayıp, eklemler, göz, deri ve karaciğeri de etkileyebilmektedir. Artmış kanser riskinin, son zamanlara kadar asıl olarak Ülseratif

kolit hastaları için söz konusu olduğu düşünülürken bu yüksek riskin Crohn Hastalığı hastaları için de var olduğu bugün bilinmektedir (Anonim 2012).

Crohn hastalığını tedavi etmek için, aminosalisilatlar (5-ASA), steroidler, immun modifikatörler (azatioprin, 6-MP ve metotrexat), antibiyotikler (metronidazol, ampicilin, ciprofloksin ve diğerleri) ve biyolojik tedavi (infixamab) kullanılmaktadır. Crohn hastalarının 2/3-3/4'ü cerrahi tedavi almak zorunda kalmaktadırlar. Crohn hastalarında ilaçlar semptomları kontrol edemediği zaman cerrahi tedavi gerekli olmaktadır (Rutgeerts 1998, Sutherland ve ark 1991)

1.1.2. Ülseratif Kolit

Ülseratif kolit kalın bağırsağa sınırlı kronik gastrointestinal bir hastalıktır. Ülseratif kolit bağırsağın bütün tabakalarını etkilemeyip, sadece eşit ve sürekli bir dağılımda olacak şekilde kolonun üst tabakalarını etkilemektedir. Dışkılama genellikle kanlı ve kramp tarzı karın ağrısı ve tenezm (bağırsak hareketi için ciddi sıkışma) ile birlikte. Diyare yavaş veya oldukça ani başlayabilir. Yorgunluk, iştah ve kilo kaybı yaygındır. Ciddi kanama vakalarında anemi meydana gelebilmektedir. Ayrıca, deri lezyonları, eklem ağrısı, göz inflamasyonu ve karaciğer hastalıkları birlikte görülebilmektedir. Ülseratif kolitli çocuklar gelişme ve büyüme yetersizliği gösterebilmektedirler (Hildebrand ve ark 1994).

Ülseratif kolit semptomları, hastaların rahatsızlık duymadıkları ve oldukça uzun olan alevlenmeler arası remisyon dönemleri ile gitme eğilimi gösterirler. Ülseratif kolitin komplikasyonları Crohn hastalığından daha az görülür. Komplikasyonlar, derin ülserasyonlardan kanama, barsak perforasyonu, ciddi abdominal şişkinlik ve normal ilaç tedavilerine hasta cevabının yetersizliğini içerir. Ülseratif kolitli hastalar kolon kanseri için yüksek risktedirler (Stenson 1999)

Ülseratif koliti tedavi etmek için kullanılan 4 ana sınıf ilaç, aminosalisilatlar (5-ASA), steroidler, immun modifikatörler (azatioprin, 6-MP ve metotrexat), antibiyotikler (metronidazol, ampicilin, ciprofloksin ve diğerleri) dir. Ülseratif kolitli hastaların 1/4 - 1/3'ünde, tıbbi tedavi tamamen başarılı değildir ve komplikasyonlar ortaya çıkabilmektedir. Bu şartlar altında cerrahi tedavi düşünülmektedir. Cerrahiden sonra tekrarlayabilen Crohn hastalığının tersine ülseratif kolit kolon uzaklaştırıldığında tedavi edilmiş olup, tekrarlamaz (Anonim 2012).

1.2. İBH Epidemiyolojisi

Herhangi bir yaşta meydana gelebilmesine rağmen, İBH başlaması en sık 15-30 yaşlarında görülür. Vakaların yaklaşık %10'u 18 yaşından genç bireylerdir. Crohn hastalığı kadınlarda daha fazla görülürken, Ülseratif kolit erkeklerde kadınlara göre daha sık görülmektedir. İBH, diğer ırk ve etnik gruplara göre beyaz ırk ve Aşkenazi Yahudilerinde daha fazla meydana gelmektedir. Geçmişte, İBH'nin beyazlarla karşılaştırıldığında etnik veya ırksal azınlıklarda daha az meydana geldiği düşünülüyordu fakat daha önce kaydedilen ırksal ve etnik farklılıklar azalmakta gibi görünmektedir (Loftus 2004).

Crohn hastalığının ve Ülseratif kolitin sıklık ve yaygınlığı hakkında kesin bilgi, tanıda bir altın standardın olmayışı, tutarsız vaka tespitleri ve yanlış sınıflandırmalar yüzünden sınırlı olmaktadır. Mevcut veriler, Crohn hastalığının dünya çapında 0,1-16/100000 kişi sıklık ve 396/100000 kişi prevalans gösterdiğini belirtirken, ülseratif kolitin dünya çapında 0.5-24.5/100000 kişi'lik bir sıklık gösterdiğini bildirmektedir (Lakatos 2006).

İBH etyolojisi bilinmemekle beraber genetik, immunolojik ve çevresel faktörlerin etkili olduğu düşünülmektedir; İBH hastalığı için en büyük görece risk, birinci derece akrabalar arasında bulunur. Bu da güçlü bir genetik komponenti önerir. Sigara içme en çok dikkat çeken çevresel faktörlerden biridir. Ülseratif kolit eski içici ve hiç içmeyenler arasında yaygın iken, Crohn hastalığı sigara içenler arasında daha yaygındır. Spesifik olarak İBH ve sosyoekonomik faktörler arasındaki ilişkiyi inceleyen ABD dışında yapılmış 3 çalışma vardır. Sonnenberg (1989) çalışmasında, her iki hastalığın mavi yakalı (fabrika işçileri) mesleklerle karşılaştırıldığında, beyaz yakalı (büro memurları) mesleklerde daha yaygın olduğunu bulmuştur. Bernstein ve ark (2001) Crohn hastalığı ve Ülseratif kolitin sosyo-ekonomik düzeyi yüksek gruplarda daha az yaygın olduğunu bulurken, Li ve ark (2009) hastane bazlı bir çalışmada spesifik meslek hastalığı ve İBH arasında küçük bir ilişki bulmuşlardır.

İBH gelişmiş ülkelerde daha yaygındır. Anlamlı derecede kuzey güney varyasyonu vardır ve şehir toplumlarında taşra bölgelerine göre daha sıktır. Bu gözlemler, şehirleşmenin hastalığın oluşumuna katkıda bulunan bir faktör olduğunu akla getirmektedir. Diyetle değişiklikler, sigara içme, güneş ışığına maruz kalmada

değişimler, hava kirliliği ve endüstriyel kimyasallar gibi hayat tarzındaki değişikliklerin İBH oluşumunu artırdığı ileri sürülmüştür (Hanauer 2006).

İspatlanmamış olmakla beraber, diyet, oral kontraseptifler, perinatal ve çocukluk infeksiyonları veya atipik mikobakteriyel infeksiyonlar gibi diğer faktörlerin de İBH'nin ortaya çıkışında bir rol oynayabileceği ileri sürülmüştür (Feldman ve ark 2006).

NOD2 geni (Nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein 2) iki CARD (Caspase recruitment domain-containing protein) alanı ve LRR (leucine-rich repeats)'ye sahip bir protein kodlar. Protein asıl olarak periferik kan lökositlerinde yapıpı salınır. Bazı bakterilerde bulunan muramil dipeptidi tanıyarak ve NF-kB proteinini aktive ederek immun yanıtta rol oynar. Bu gendeki mutasyonlar Crohn hastalığı ve Graft-versus-host hastalığı ile ilişkilidirler (Kufer ve ark 2006).

Abraham ve ark (2009) NOD2 ve İBH ile ilgili çalışmalarında, sadece NOD2 yolunun bozuk regülasyonunun, intestinal inflamasyonu tamamıyla uyarmak için yetersiz olabileceğini ve NOD2 mutasyonu taşıyan hastalarda Crohn hastalığı gelişmesi için başka ilave katkıda bulunan faktörlerin gerekli olduğunu bildirmişlerdir.

1.3. Kolit Modelleri

Etyolojide ilgili faktörlerin geniş çeşitliliği, insanların genetik heterojenitesi ve kompleks gen-gen ve gen-çevre etkileşimleri, İBD nedenlerini açığa çıkarmayı daha da zorlaştırmaktadır. Bu yüzden günümüzde İBD hakkında anladıklarımızın çoğu iyi tanımlanmış hayvan modelleri üzerindeki sistematik çalışmalardan gelmektedir (Borm ve Bouma 2004).

1.3.1. *In vitro* Modeller

Gastrointestinal kanal, sadece sindirim ve besin emilimi ile ilgili olmayıp aynı zamanda dış ortama karşı fiziksel ve immunolojik bariyer sağlayan birçok farklı hücre içerir. Bu hücrelerin herhangi birindeki eksiklik aşırı mukozal inflamasyona yol açabilir. Bu nedenle böyle kompleks bir sistemin *in vitro* kolay taklid edilemeyeceği söylenebilir. Bununla birlikte, belli bir zamanda sadece bir hücre tipini çalışmakla İBH'yi ilgilendiren hücresel mekanizmaların spesifik yönleri araştırılabilir. Ayrıca, *in vitro* modeller yeni ilaç tedavilerinin toksisite ve etkinlik testlerinde güvenle kullanılabilir (Borm ve Bouma 2004).

1.3.1.1. Primer Kùltürler

Primer kùltürler, kolorektal doku örneği ve ya endoskopi sırasında alınan biyopsilerden elde edilebilir. Bu kùltürler, barsakta mevcut hücre popülasyonlarının aynı kombinasyonunu içermeye avantajına sahiptir ve bundan dolayı *in vivo* durumu temsil eder. Bununla birlikte, onların *in vitro* yaşatılmaları zordur ve genellikle sadece birkaç gün yaşarlar (Buset ve ark 1986).

1.3.1.2. Hücre Hatları (Cell lines)

Genellikle karsinomalardan elde edilen barsak epiteline benzeyen çeşitli hücre hatları ticari olarak mevcuttur. İBH araştırmalarında çok sık kullanılan hücre hattı kolorektal karsinoma hücrelerinden elde edilen ve ince barsak kolumnar epiteline benzeyen CaCO₂ hücre hattıdır (Fogh ve ark 1977). Epitelyal hücre hatları, ilaç tedavilerinin farmakokinetik ve toksisite çalışmalarına uygulanabilir. Hücre hatlarının kullanımındaki sakınca, hücre pasajları sırasında hücrelerin doku karakteristiklerini kaybetmesi ve mukozal immünite ile ilgili diğer hücre tipleriyle etkileşimin olmamasıdır (Borm ve ark 2004).

1.3.2. *In vivo* Modeller

1.3.2.1. Uyarılmış (Induced) Modeller

En ince detaylarıyla çalışılmış modeller, eksojen kolitogenik bir maddenin uygulanmasıyla kolitin uyarılmasını kapsar. Genelde, bu modeller, mukozal bütünlüğü geçici olarak bozan bir maddenin uygulanmasını gerektirir. Bu da, kolitogenik komponentlerin mukozal immün sisteme girmesine izin verir.

İBH'nin ilk modellerinden birinde tavşanlar ovalbuminle sensitize edilmiştir. Sonra kolonik epitelyal bariyer, formalin'in rektal uygulanmasıyla bozulmuştur. Bunu antijenin tekrar uygulanması izlenmiş ve bu şekilde birçok yönleriyle ülseratif kolite benzeyen geçici bir inflamasyon elde edilmiştir (Kraft ve ark 1963).

İBH'de kronik inflamasyonun nedeni, normal mukozal mikroflorada antijenlere gösterilen toleransın ortadan kalkmasından kaynaklanmaktadır. Bugün bilinen hemen hemen tüm modellerde, hayvanlar germden arındırılmış (germfree) şartlarda tutuldukları zaman inflamasyon olmadığı için, bu nonpatojenik luminal floranın varlığı, inflamasyon gelişmesi için bir ön şarttır. Domuzlardaki ilk çalışmalarda, hayvanlar *Bacteroides vulgatusla* infekte

edildiği zaman carrageenan verilmesi ile çekal ülserasyonlar gelişirken, uyarıcı ajan carrageenanın germfree hayvanlarda ülserasyonları provoke etmediği gösterilmiştir (Onderdonk ve ark 1983).

HLA-B27 transgenik ratlar, geleneksel şartlar altında barındırıldıkları zaman, spontanöz barsak, eklem ve deri inflamasyonu geliştirirler. Bununla birlikte, germfree (mikroorganizmadan yoksun) şartlarda tutuldukları zaman bu hayvanlarda intestinal inflamasyon görülmemiştir. Ratların antibiyotiklerle tedavisi inflamasyonun şiddetini azaltmıştır. Bu bulgular insan İBH'sindeki bulgulara benzerlik göstermesine ve bu sahada çok ayrıntılı araştırmalar olmasına rağmen, bugüne kadar hiçbir spesifik patojenik mikroorganizma insan İBH'sine yakınlıkla ilişkilendirilememiştir (Taurog ve ark 1994, Rath ve ark 2001).

TNBS ile oluşturulan kolit modeli, deneysel periyodun kısa olması, çok az miktarda madde gerektirmesi ve çeşitli deney hayvanlarında kolit oluşturması ve insan İBH'sine benzerliği gibi avantajları nedeniyle tercih edilmektedir.

TNBS koliti, etanolde çözülmüş TNBS hapteni ile oluşturulan ve uyardığı hücrel immunité ile barsaklarda kronik inflamasyon ve ülserasyonlara neden olan bir kolit modelidir. TNBS koliti konusunda Jursus ve ark. (2004), mukozal bariyerin etanol ile ortadan kaldırıldığını ve sonrasında doza bağımlı olarak ülserasyon ve inflamasyon geliştiğini ileri sürmüştür. Zhou ve ark. (2006) ülserasyon ve barsak duvarında kalınlaşmanın yaklaşık 8 hafta kadar devam ettiğini bildirmiştir. Bu nedenle TNBS koliti, kronik kolit için uygun bir modeldir. Fakat akut inflamasyon için de kullanılmıştır (Martín ve ark 2004).

Histolojik olarak mukoza ve submukozada polimorfonükleer lökositler (PMNL), makrofaj, lenfosit, bağ dokusu, mast hücreleri ve fibroblastlardan oluşmuş inflamatuvar cevap mevcuttur. TNBS kolit modelinde mukozal ödem, kanama odakları, segmental ülserasyon ve nekrotik alanlar yaygın olarak görülmektedir (Zhou ve ark 2006, Morris ve ark 1989).

1.3.2.2. Defektif T Hücre Aracılı Kolit

Defektif T hücre aracılı kolitte organizma genellikle, mukozal antijenlerle karşılaşmada inflamatuvar cevap vermez, ama onun yerine negatif regülatör T hücre cevabı verir. Vücudun yabancı maddelere karşı savunma mekanizmalarıyla reaksiyon verme eksikliği olan anerjinin uyarılması veya antijen spesifik T hücrelerinin delesyonu olan bu fenomenon oral tolerans olarak bilinir. Bu fenomenon ilk defa 1960'ların sonlarında Halpern ve ark tarafından bildirilmiştir. Bu araştırmacılar çalışmalarında, ratları ölü veya canlı *E.coli* ile immunize etmeden önce, bu ratları *E.coli* ile beslemenin kolit gelişmesini önleyebildiğini göstermişlerdir. Son zamanlarda, zararsız antijenlere immun cevabı azaltmayla ilgili çeşitli farklı regülatör hücreler tespit edilmiştir (O'Garra ve ark 2004).

Bu regülatör hücrelerin fonksiyonu veya gelişmesindeki defektler mukozal inflamasyona yol açmaktadır. Gerçekten, İBH'nin rat ve fare modellerinin şaşırı derecede çok sayısında regülatör T hücre defekti izlenebilir. Bu konuda dikkat çekici bir örnek, regülatör hücreleri eksik doğal (daha önce hiç antijene maruz kalmamış) (CD45RB^{hi}) T hücrelerin transferiyle, ciddi kombine immun yetmezlikli (SCID) farede oluşturulan ve daha sonra regülatör T hücre alt popülasyonlarını içeren matür (CD45RB^{lo}) T hücrelerinin kotransferiyle önlenen mukozal inflamasyondur. Şimdiye kadar, insan İBH'sinde regülatör T hücre fonksiyonundaki anormallikleri izlemek çok zor olmuştur. Bu yüzden bu bulgunun anlamı ve geçerliliğini tespit etmek için daha ileri çalışmaların gerekli olduğu bildirilmiştir (Ogura ve ark 2001).

1.3.2.3. Spontan Modeller

Üçüncü bir kategori, mukozal inflamasyonun spontan modellerini içerir. Bu kategori iki ilgili alt kategoriye ayrılabilir: Bir gen defektinin veya bir transgenin uygunsuz mukozal immun cevaba neden olduğu modeller ve spontan olarak mukozal inflamasyon geliştiren hayvanlardır.

Spontan olarak inflamasyon geliştiren hayvanların en dikkat çekici örneği ülseratif kolite benzer kolit geliştiren cotton-top tamarin türü maymundur (Watanabe ve ark 2004). Bu hayvanlar yeni ilaç tedavilerinin etkinliğini test etmek için teorik olarak mükemmel modellerdir. Fakat etik ve pratik engeller vardır. Diğer bir model, terminal ileumda kronik intestinal inflamasyon geliştiren SAMP1/YitFc farelerdir. Oluşan ileit, terminal ileumda

aralıklı transmural inflamatuvar lezyonlarla insan Crohn hastalığına çok benzerlik taşır (Mahler ve ark 1999).

1.4. Serbest Radikaller

1.4.1. Serbest Radikallerin Tanımı

Moleküllerdeki atomlar uzayda bir yer kaplarlar ve bu kapladıkları yere orbital adı verilir. Her orbitalde biri saat yönünde diğeri de tersi yönde hareket eden iki elektron bulunur. Eğer bir orbitalde yalnızca bir adet elektron bulunuyorsa buna eşleşmemiş elektron denir. Serbest radikal ise dış orbitalinde tek sayıda eşleşmemiş elektron taşıyan, elektrik yüklü veya yüksüz olabilen atom veya moleküllerdir. Kimyasal formüllerde bu elektron bir nokta ile (OH^\cdot) gösterilir (Cotran ve ark 1994, Halliwell 1996).

Serbest radikaller organizmada normal metabolizma sırasında oluştuğu gibi, çeşitli dış etkenlerin etkisiyle de oluşmaktadır. Özellikle reaktif oksijen türleri, kimyasal ve radyasyon yaralanmaları, oksijen ve diğer gaz yaralanmaları, hücre yaşlanması, fagositik hücrelerle mikrobiyal öldürme, inflamatuvar hasar ve makrofajlarla tümör destrüksiyonu gibi pek çok olay sonucu oluşurlar (Nakazawa ve ark 1996). Çok kısa yaşam süreli, ancak yapılarındaki dengesizlik nedeniyle çok aktif yapılı olan serbest radikaller, tüm hücre bileşenleri ile etkileşebilme özelliği gösterirler (Halliwell 1996, Nakazawa ve ark 1996).

Serbest radikaller organizmada mitokondrinin yanı sıra hücrelerin tüm fraksiyonlarında zara bağlı veya serbest halde bulunan pek çok enzimin katalizlediği reaksiyonlar sırasında oluşmaktadır. Bunlar arasında mikrozomal karma fonksiyonlu oksidaz sistemi, sitoplazmada ksantin oksidaz, hücre zarına bağlı NADPH oksidaz ve lipoksigenazlar gibi enzimlerin kataliz ettiği reaksiyonlar sayılabilir (White ve Heckler 1990, Angel ve ark 1987).

Canlı sistemlere zararlı ve faydalı olabildikleri için, normal hücre metabolizması ürünleri olan reaktif oksijen (ROS, örneğin süperoksit) ve nitrojen (RNS, örneğin nitrik oksit) türlerinin, dual bir rol oynadıkları kabul edilmiştir (Valko ve ark 2006). ROS ve RNS normal olarak çok sıkı kontrol edilen enzimler (NADPH oksidaz ve NO sentaz (NOS)) tarafından üretilirler. Mitokondriyal elektron transport zinciri, NAD(P)H veya NOS'un aşırı uyarılması sonucu ROS/RNS'in aşırı üretimi; membranlar, lipidler, proteinler ve DNA'yı içine alan hücre yapılarına zarar veren oksidatif ve nitrozatif strese

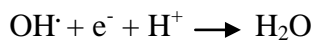
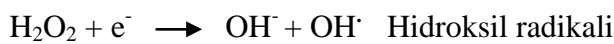
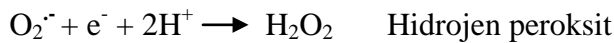
neden olur. Biyolojik sistemlerde bu zararlı etki, ROS/RNS'in aşırı üretimi yanında antioksidan sistemin yetersizliği sonucu da meydana gelir. (Kovacic ve Jacintho 2001, Ridnour ve ark 2005, Valko ve ark 2001).

Zararlı etkilerinin tersine ROS/RNS'in faydalı etkileri, düşük konsantrasyonlarda meydana gelir ve infeksiyöz ajanlara karşı savaş, hücre sinyalizasyon yollarında görev ve mitozun uyarılması gibi durumlara karşı hücrel cevaplarda fizyolojik rolleri ilgilendirir. Enteresan bir şekilde, değişik ROS aracılı olaylar, gerçekte hücreleri ROS'la uyarılan oksidatif strese karşı korur ve redox homeostazisini tekrar sağlar ve sürdürürler. Gittikçe artan deliller, hücre içindeki ROS'un kanser hücrelerinin onkojenik özelliklerini uyararak ve sürdüren intrasellüler sinyalizasyon kaskadlarında ikincil haberci gibi rol oynadığını gösterdiği gibi, aynı zamanda, hücrel yaşlanma ve apoptozisi uyararak anti-tümorojenik bir ajan gibi görev yapabildiğini de göstermektedir (Dröge 2002).

Aerobik organizmalarda yaşamın sürdürülebilmesi için oksijene mutlak gereksinim vardır. Solunan oksijenin % 95 'inden fazlası mitokondrilerde ATP şeklinde enerji oluşumunda kullanılırken, yaklaşık % 5'ide oldukça toksik ROS'lara dönüşmektedir (Cantürk ve Sayek 2005).

Oksijenin bir elektron alarak indirgenmesi ile $O_2^{\cdot -}$ radikali, iki elektron alarak indirgenmesi ile hidrojen peroksit (H_2O_2) oluşur. Üçüncü elektron ilavesi ile yüksek derecede reaktif OH^{\cdot} radikali oluşur. Dördüncü elektron ilavesi ile de su oluşmaktadır (White ve Heckler 1990, Angel ve ark 1987).

Serbest radikallerin oluşumu:



1.4.2. Serbest Oksijen Radikali Oluşumuna Neden Olan Kaynaklar

Serbest oksijen radikallerinin oluşumunda iki önemli kaynak rol oynamaktadır (Ceyhan ve ark 1996):

A) Endojen olarak serbest oksijen radikali oluşumuna neden olan kaynaklar;

- NADPH oksidaz, lipooksijenaz, prostaglandin sentetaz gibi plazma membranı enzimleri, lipid peroksidasyonu vs.
- Ksantin oksidaz, triptofan dioksijenaz gibi enzimler ve hemoglobin.
- Hücre mitokondriumunda yerleşmiş bulunan elektron transport sistemi.
- İntoksikasyon, iskemi, travma vb durumlara bağlı olarak meydana gelen oksidatif stres
 - Tioller, katekolaminler, hidrokinonlar, flavinler, tetrahidroproteinler, antibiyotikler gibi küçük moleküllerin otooksidasyonu.
 - Nükleus membranı ve endoplazmik retikulumda bulunan elektron transport sistemleri (sitokrom p-450).
 - Kloroplast elektron transport sistemi.
 - Fagositik hücrelerin aktivasyonu sonucunda ortaya çıkan solunumsal patlama (respiratory burst).
 - Peroksizomlarda bulunan enzimler.
 - Yaşlanma.

B) Eksojen olarak serbest oksijen radikali oluşumuna neden olan kaynaklar;

- İyonizan ve non iyonizan radyasyon.
- Isı şoku.
- Antineoplastik ajanlar.
- Alkol, uyuşturucu gibi bağımlılık yapan maddeler.
- Stres; streste kan katekolamin düzeyi armakta ve bunu sonucunda artan katekolaminlerin oksidasyona uğraması ile radikal üretimi artmaktadır.
- Anestezik maddeler, aromatik hidrokarbonlar, solventler, hiperoksi, hava kirliliği, sigara dumanı, pestisitler vs.
- Güneş ışığı

1.4.3. Serbest Radikallerin Sınıflandırılması

Aerobik metabolizması olan memelilerde serbest radikaller başlıca oksijenden türemektedir (Çizelge 1.4.3). Ancak organizmada oksijen türevi serbest radikaller dışında karbon ve kükürt merkezli radikaller de oluşmaktadır (Uysal 1998).

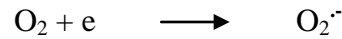
Çizelge 1.4.3. Serbest Radikaller

Oksijen Merkezli Serbest Radikaller	Oksijen Merkezli Olmayan Serbest Radikaller	Radikal Olmayan Reaktif Türler
Moleküler Oksijen Üçlü (triplet) durum $^3\text{O}_2$ Tekli (singlet) durum $^1\text{O}_2$ Süperoksit Radikali $\text{O}_2^{\cdot-}$ Hidroksil Radikali OH^{\cdot} Perhidroksi Radikali HO_2^{\cdot} Alkoksil Radikali RO^{\cdot} Peroksi Radikali ROO^{\cdot}	Karbon Merkezli Lipid Radikalleri L^{\cdot} Alkil Radikalleri R^{\cdot} Sülfür Merkezli Sülfür Radikalleri R-S^{\cdot} Hidrojen Merkezli Hidrojen Atomu + H^{\cdot} Demir Merkezli Perferil Radikalleri $\text{Fe}^{+3}-\text{O}_2-\text{Fe}^{+2}$ Azot Merkezli Nitrik Oksid NO^{\cdot} Nitrojen Dioksit NO_2	Ozon O_3 Hidrojen Peroksidler Hidrojen Peroksid H_2O_2 Lipid Peroksidleri LOOH Hipoklorik asit HOCl Kloraminler $\text{R}'\text{RNCl}$

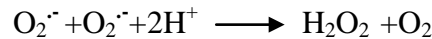
1.4.4. Serbest Radikal Çeşitleri

-Süperoksit Radikali

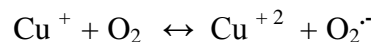
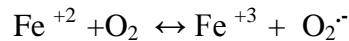
Hemen tüm aerobik hücrelerde oksijen molekülüne bir elektronun transfer edilmesi (oksijenin indirgenmesi) ile süperoksit serbest radikal anyonu ($\text{O}_2^{\cdot-}$) oluşmaktadır.



Bu radikalden spontan ya da enzimatik dismütasyon ile, ikinci bir ara ürün, H_2O_2 oluşur:

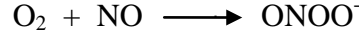


Demir (Fe) ve Bakır (Cu) gibi geçiş metalleri iyonlarının indirgeyicisi olması bakımından da önemlidir :



Süperoksit radikali biyolojik dokulara direkt olarak fazla zarar vermez. Asıl önemi H_2O_2 kaynağı olması ve geçiş metalleri iyonlarının indirgeyicisi olmasıdır (Greenwald 1991).

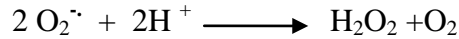
Süperoksidin, fizyolojik bir serbest radikal olan NO ile birleşmesi sonucu reaktif bir oksijen türevi olan peroksinitrit (ONOO⁻) meydana gelir. Böylece NO'in normal etkisi inhibe edilir. Ayrıca, peroksinitlerin doğrudan proteinlere zararlı etkileri vardır ve azot dioksit (NO₂), hidroksil radikali (OH⁻) ve nitronyum iyonu (NO₂⁻) gibi daha başka toksik ürünlere dönüşürler (Grace 1994).



Süperoksit radikali, ortam pH 'sının düşük olduğu durumlarda bir proton alarak daha reaktif olan perhidroksil radikaline (HO₂[·]) dönüşür. Ancak, ortam pH'sı fizyolojik sınırlarda iken oluşan perhidroksil formu %1'in altındadır (Greenwald 1991).

-Hidrojen Peroksit (H₂O₂)

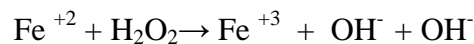
H₂O₂ normal olarak her aerobik hücrede bulunur. Hücre solunumu sırasındaki çeşitli metabolik işlemler ve oksidatif stres sonucunda üretilir (Fridovich 1978). H₂O₂ membranlardan kolayca geçebilen uzun ömürlü bir oksidandır. Biyolojik sistemlerde hidrojen peroksidin asıl üretimi süperoksidin dismutasyonu ile olur. İki O₂^{-·} Molekülü iki proton alarak H₂O₂ ve moleküler oksijeni oluştururlar (Akkuş 1995):



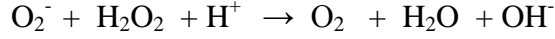
H₂O₂, bir serbest radikal olmadığı halde, reaktif oksijen türleri içine girer ve serbest radikal biyokimyasında önemli bir rol oynar. Çünkü O₂^{-·} ile reaksiyona girerek, en reaktif ve zarar verici serbest oksijen radikali olan hidroksil radikali oluşturmak üzere kolaylıkla yıkılabilir. Ultraviyole ışınları ile kolaylıkla parçalanabilmektedir. H₂O₂, enzimatik olarak katalaz ve glutatyon peroksidaz ile non-enzimatik olarak da piruvat ve geçiş metal iyonlarının katalizlediği fenton reaksiyonu ile parçalanarak zararsız hale getirilir (IARC 1999).

-Hidroksil Radikali (OH⁻)

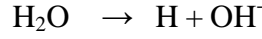
OH⁻, H₂O₂'nin geçiş metallerinin varlığında indirgenmesiyle meydana gelir. Bu reaksiyona *Fenton reaksiyonu* adı verilir:



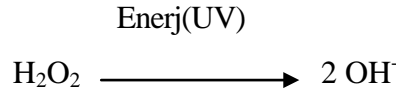
H₂O₂ ile O₂⁻ reaksiyona girerek hidroksil radikalini oluşturur. Bakır veya demir iyonları varlığında gerçekleşen bu reaksiyona *Haber-Weis reaksiyonu* adı verilir:



Suyun yüksek enerjili iyonize edici radyasyona maruz kalması sonucunda da hidroksil radikali oluşur:



Ayrıca H₂O₂'nin ultraviyole ışığına maruz kalması ile de OH⁻ oluşabilir:



Hidroksil radikali; son derece reaktif bir oksidan radikalidir. Yarılma ömrü çok kısadır. Oluştığı yerde büyük hasara sebep olur (Akkuş 1995). Reaktif oksijen türlerinin en güçlüsüdür ve lipid peroksidasyonunda rol oynar. Yağ asitleri ve tiyoller gibi moleküllerden proton kopararak tiyil radikalleri, karbon merkezli organik radikaller, organik peroksitler gibi yeni radikallerin oluşmasına yol açar (Koç 2007).

Singlet (¹O₂)

Bu molekül gerçekte bir serbest radikal değildir. Ancak serbest radikal reaksiyonları esnasında üretilmesinden dolayı serbest oksijen radikalleriyle birlikte değerlendirilen reaktif oksijen türüdür (Akkuş 1995).

Karbon Merkezli Radikaller (R[•])

Biyolojik bir molekülü okside edici bir serbest radikalın etkilemesi sonucunda oluşmaktadırlar. Bu biyolojik moleküller, protein, karbonhidrat, lipid veya nükleik asit olabilir. Bu radikaller, ilgili peroksil radikallerini (ROO[•]) oluşturmak üzere oksijen molekülü ile çok hızlı bir şekilde birleşirler. Ayrıca bu peroksil radikalleri, alkoksil radikallerini (RO[•]) oluşturan reaksiyonlara da katılabilmektedir (Wright ve ark 2009).

Nitrik Oksit:

NO hemostatik olaylarda ve organizmanın savunma mekanizmalarında otokrin ve parakrin etkisi olan bir araçtır. Makrofajlar, nötrofiller, hepatositler ve endotel hücreler

tarafından üretilir. En önemli fonksiyonu vücudun çeşitli dokularında interlökin-1 ve sitokinlerin etkilerine paralel bir işlev görmesidir (Aktan ve Yalçın 1998).

Tümör hücrelerini, parazitleri, bakteri ve mantar hücrelerini öldürmede görev alır. Ancak yüksek seviyelerde normal hücreler üzerinde toksik etkisi vardır. O_2^- anyonları ile inaktifleşir ve SOD enzimi ile korunur. Bu bakımdan serbest radikal tutucu olarak kabul edilse de uygun ortamlarda süperoksit ile güçlü bir oksidan olan peroksinitriti oluşturur. Düşük pH'da durağan değildir. Spontan olarak parçalanarak hidroksil radikali ve nitrojen oksit oluşur (Greenwald 1991, Grace 1994).

1.4.5. Serbest Radikallerin Lipidlere Etkileri

Serbest radikaller etkilerini hücre için hayati önem taşıyan DNA, protein ve yağlara karşı gösterirler.

Hücrelerin membranlarında bulunan çoklu doymamış yağ asitleri okside edici serbest radikaller tarafından kolaylıkla etkilenebilmektedirler. Poliansatüre yağ asitlerinin oksidatif hasarı lipid peroksidasyonu (LPO) olarak da adlandırılmaktadır. LPO sonucunda hücrede kendiliğinden devam eden zincir reaksiyonları başlamaktadır. Oksidasyon sonucunda oluşan peroksil radikalleri ($LOO\cdot$) bir sonraki doymamış yağ asidini okside ederek yeni zincir reaksiyonları başlatırlar. Zincirleme reaksiyonlar sonucunda hidroperoksitler ($LOOH$) oluşmaktadır. Hidroperoksitler de daha zararlı radikal özelliği olan türlere, özellikle aldehitlere çevrilirler. (Akkuş 1995).

Aldehitlerin çoğu biyolojik olarak aktiftirler ve lipid hidroperoksitler parçalandığı zaman oluşurlar. Bunlardan en çok bilineni 'hidroksialkenoller'dir ve bu da 4-hidroksinonenal üyesidir (Bu bileşikler, oluştukları yerden diffüze olup hücrenin diğer kısımlarına giderek hasara neden olabilmektedirler(Esterbauer ve ark 1991, 1988).

LPO sonucunda membran yapısında bulunan kolesterol ve yağ asitlerinin doymamış bağları, serbest radikallerle reaksiyona giren peroksidasyon ürünleri oluşturarak membranda bazı değişikliklere yol açarlar. Bunlar kısaca (Long ve Bielski 1980),

1-) LPO sırasında meydana gelen lipid hidroperoksitleri biyomembranlar üzerindeki enzimleri inhibe ederler.

2-) Membran üzerindeki yağ asidi miktarında azalma meydana gelir.

3-) Membranın yapı taşlarından olan yağların akışkanlığını bozar.

4-)Tiyol gruplarını oksidasyona uğratarak membran üzerindeki protein–lipid ilişkisini bozar.

5-) LPO sonucu oluşan serbest radikaller membran dışında da çeşitli moleküllerde bozulmalara sebep olurlar.

LPO zincirleme bir reaksiyondur ve lipid hiperoksitlerinin aldehit ve diğer karbonil bileşiklere dönüşmesiyle sona ermektedir. Bu bileşiklerden sonuncusu olan Malondialdehit (MDA) miktarı tiyobarbitürik asit ile ölçülmekte ve bu yöntem lipid peroksit düzeylerinin saptanmasında sıklıkla kullanılmaktadır (Uysal 1998).

1.4.6. Protein ve Nükleik Asitlerde Meydana Gelen Yapısal Değişiklikler

Poliansatüre yağ asitleri serbest radikal etkilerine duyarlı olmalarına karşın protein ve nükleik asitler bu zararlı etkilere karşı daha dirençlidir. Bunun başlıca sebebi, şiddetli hasar oluşturuvcu zincir reaksiyonlarının protein ve nükleik asit moleküllerinde gerçekleşme ihtimalinin çok zayıf olmasıdır. Radyasyon biyologlarınca da gösterildiği gibi, eğer serbest radikaller DNA molekülüne çok yakın bir bölgede meydana geliyorsa, okside edici radikaller tarafından DNA molekülü kolaylıkla hasara uğratılabilmektedir. Proteinlerde olduğu gibi hızlı zincir reaksiyonlarının olma ihtimali çok azdır (Akyol 1994).

Sülfür ve doymamış bağ içeren tirozin, triptofan, histidin, fenilalanin, sistein, metionin gibi aminoasitlere sahip proteinler serbest radikallerden kolaylıkla etkilenirler. Proteinlerde oluşan hasar sonucunda protein fragmentasyonu ve agregasyonu oluşabilir. Bunun neticesinde hücresel fonksiyonlarda bozukluklar ve enzim aktivitelerinde değişiklikler meydana gelebilir (Freeman ve Crapo 1982).

1.4.7 Serbest Radikallerin Antimikrobiyal Aktivitede Etkisi (MPO–Hidrojen Peroksid –Halid Sistemi) :

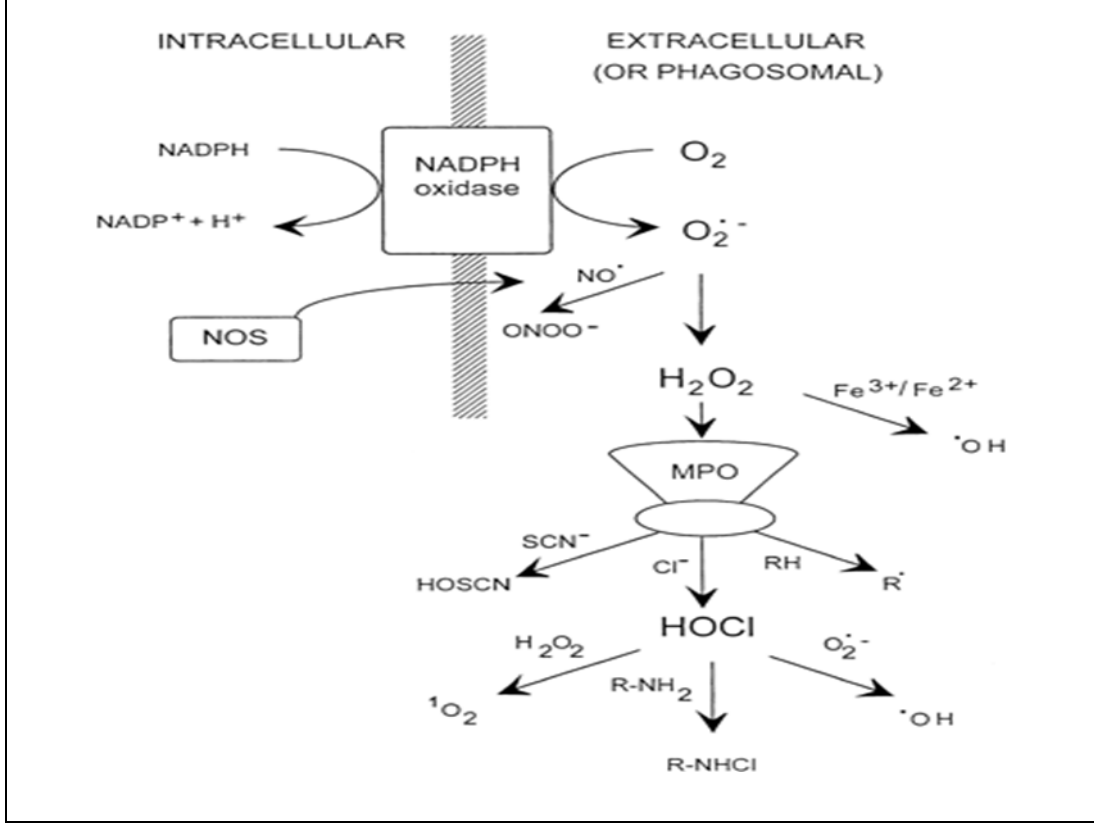
Aktive olmuş makrofajlar, nötrofiller ve eozinofillerde fagositik solunumsal patlama sırasında çeşitli serbest radikaller oluşur. Fagositik lökositler opsonize mikroorganizmalar, C5a kompleman fragmanı, lökotrien B4, bakteriyel orijinli N-formil oligopeptitler gibi partiküler ya da çözünebilir bir uyarıcıyla uyarıldıklarında lizozomal komponentleri dışarıya vermeye başlarlar ve reaktif oksijen metabolitlerinin oluşumuyla birlikte

mitokondri dışında oksijen tüketiminde bir patlama (solunumsal patlama) gösterirler. Fagosite edilmiş bakteri, solunumsal patlama ürünlerinin etkisiyle öldürülür. Ancak bu oksidan ürünler hücrelerin antioksidan savunma güçlerini aştığında normal konak hücrelere zarar verirler ve çeşitli hastalıkların patogeneğinde rol oynarlar(Akkuş 1995).

Fagositlerin uyarılması, heksoz monofosfat şantı yoluyla glukozun oksidasyonunda artışa yol açar. Solunumsal patlama sırasında elektron vericisi olarak NADPH kullanılır ve moleküler oksijenin (O_2) süperoksit radikaline ($O_2^{\cdot-}$) indirgenmesi sonucu $NADP^+$ üretimi artar ve heksoz monofosfat yolu aktive olur (Segal ve Abo 1993).

Nötrofil ve monositler, primer lizozomal granüllerinde bir hem enzimi olan MPO içerirler. Nötrofiller; kompleman fragmanları, HO , reaktif oksijen radikalleri, ve sitokinler tarafından aktive edilirler. Dokuya gelen aktive lökositler MPO, elastaz, proteaz, kollojenaz, laktoferrin ve katyonik proteinler gibi enzimleri açığa çıkarırlar. Bu enzimler hem dokudaki hasarı arttırır, hem de daha fazla radikal oluşmasına neden olur. İnflamasyon durumunda MPO ekstrasellüler ortama salınır. Bu nedenle nötrofil birikiminin göstergesi olarak MPO aktivitesinin ölçülmesi duyarlı bir testtir (Krawisz ve ark 1984).

MPO aracılıklı antimikrobial sistem, çeşitli bakteri, mantar, virus, mikoplazma, çok hücreli organizmalar ve memeli hücrelerine karşı etkilidir. MPO çeşitli bileşikleri okside edebilen bir enzim substrat kompleksi oluşturmak için substratı olan hidrojen peroksit ile birleşir. MPO, H_2O_2 ile Cl^- , I^- , Br^- gibi iyonların oksidasyonunu katalize eder. Bu reaksiyon sonucu, çeşitli yollarla mikroorganizmayı etkileyebilen hipoklorik asit ($HOCl$) gibi toksik ajanlar meydana gelir ve bunlar hücre ölümüne yol açar (Hampton ve ark 1998).



Şekil 1.4.7 MPO' nun etki mekanizması (Hampton 1998).

1.4.8. İBH Patogenezinde Serbest Radikallerin Rolü

Doku iskemisinin ülseratif kolit patogenezindeki rolü ilk defa Grisham ve Granger (1988) tarafından ortaya konulmuştur. Strese bağlı olarak sempatik sinir sisteminin aktivasyonu sonucu kolon kan akımının azalması, bağırsak ksantin oksidaz enziminin aktivasyonuna neden olmaktadır. Bunun sonucunda da ortama bir dizi ROS serbestlenmektedir. Süperoksit radikali (O_2^-), hidroksil radikali (OH^-), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve hipoklorik asit (HOC_1) gibi ROS'lar hem mikrovasküler ve mukozal geçirgenliği arttırmakta hem de kolon epitelinin uç kısmında bulunan müsün tabakasını bozarak mukozal bariyeri ortadan kaldırmaktadırlar. Buna bağlı olarak, bakteri ürünleri ve fagositik lökositlerin daha derin bağırsak tabakalarına geçişleri kolaylaşmaktadır.

İBH'de inflamatuvar reaksiyon, kolonda polimorfonükleer lökosit infiltrasyonu ile karakterizedir. Birçok deneysel kolit modelinde (Higa ve ark 1997, Carter ve Wallace 1995) ve İBH'de (Hallgren ve ark 1989) aktive olmuş nötrofillerin ve makrofajların varlığı gösterilmiştir. Kolonik inflamasyonda özellikle nötrofillerin bol miktarda ROS üretiminden sorumlu oldukları gösterilmiştir (Wallace ve ark 1998). Bu bulgu, farklı

deneysel kolit modellerinde anti-ROS ajanlarına bağı olarak hasar derecesindeki azalma ile de desteklenmiş (Keshavarzian ve ark 1990) ve inflamasyonlu dokuda ROS artışı ile inflamasyonun şiddeti arasında pozitif korelasyon olduğu saptanmıştır (Keshavarzian ve ark 1999). Ülseratif kolitli hastalardan alınan biyopsi örneklerinde ROS kaynağının nötrofiller olduğu kemilüminisans yöntemi ile gösterilmiştir (Sedghi ve ark 1993).

1.5. Antioksidanlar

Serbest radikallerin zararlı etkilerine karşı organizmada koruyucu mekanizmalar vardır. Bu mekanizmaların bir kısmı serbest radikal oluşumunu bir kısmı ise, oluşmuş serbest radikallerin zararlı etkilerini önlemektedir. Bu işlevi yapan maddelerin tümüne birden genel olarak antioksidanlar denir (Ames ve ark 1993, Frei 1994, Halliwell ve Gutteridge 1990).

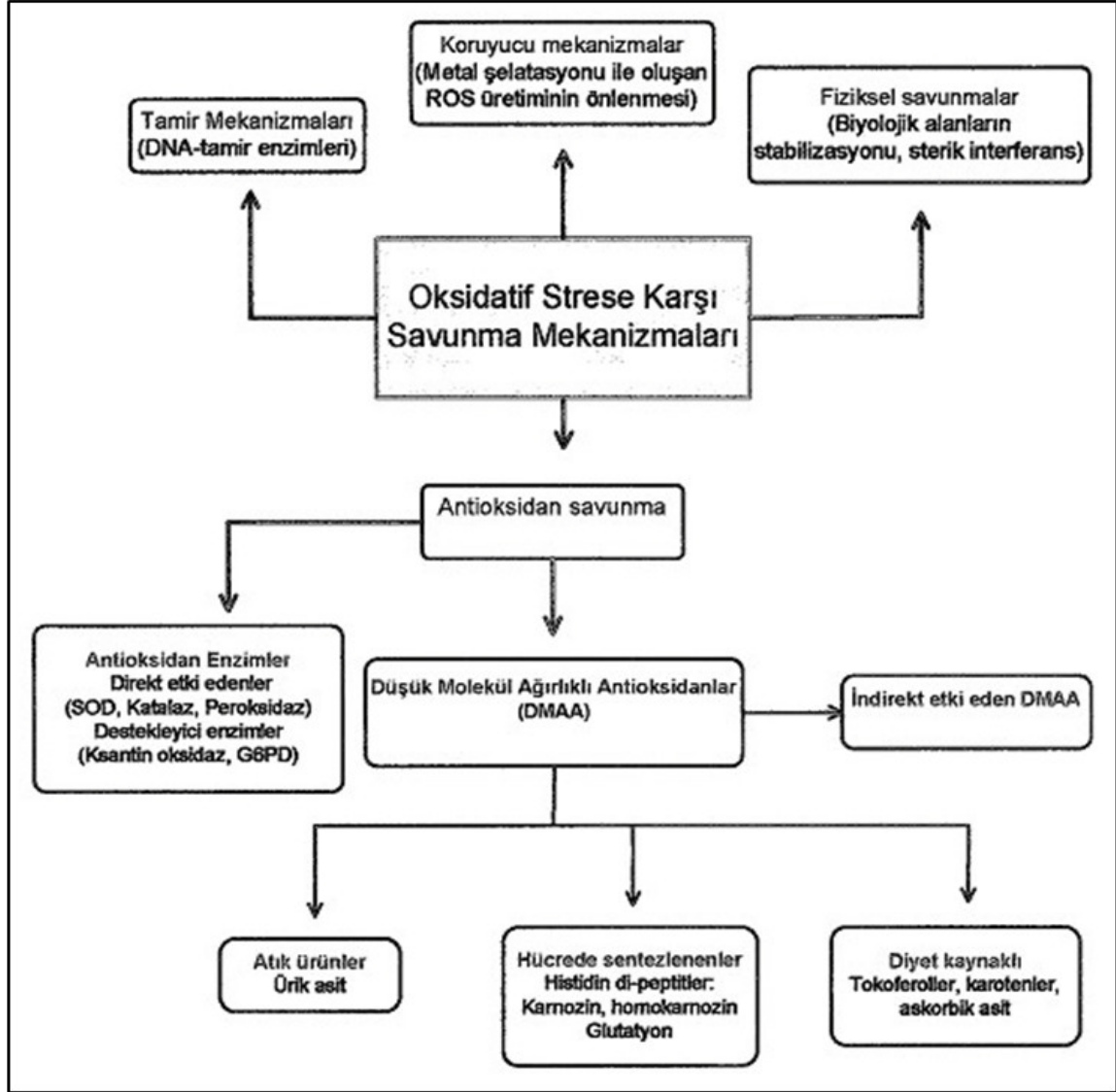
Antioksidanlar etkilerini farklı mekanizmalarla gösterirler (Halliwell ve Gutteridge 1990, Yanbeyi 1999).Bunlar;

- 1) Lokal oksijen konsantrasyonunu azaltarak ,
- 2) Hidroksil radikallerini temizleyip lipid peroksidasyonunun başlamasını önleyerek,
- 3) Geçiş metal iyonlarını bağlayıp etkisizleştirerek peroksitlerin alkol gibi nonradikal ürünlere dönüşümünde etkin rol oynarak,
- 4) Zincir reaksiyonlarına neden olan tüm radikallerle reaksiyona girip zinciri kırarak,
- 5) Peroksitleri radikal olmayan ürünlere çevirerek,
- 6) Membran lipitlerini güçlü şekilde etkileyerek peroksit oluşturan singlet oksijeni temizleyerek.

Antioksidanlar intrasellüler ve ekstrasellüler olmak üzere iki grupta incelenir. Eksojen ve endojen kaynaklı olarak ikiye ayrılarak da bir sınıflama yapılabileceği gibi fonksiyonlarına göre de;

- 1) Radikallerin dokudaki etkilerini önleyen enzimatik olmayan antioksidanlar (E vitamini, ubikinon, retinoikasit, glutatyon, urat)
- 2)Radikal oluşumunu önleyen enzimatik antioksidanlar (SOD, katalaz, metal şelatörler ve glutatyon peroksidaz) olarak ikiye ayrılabilirler (Halliwell ve Gutteridge 1990, Yanbeyi 1999).

En belirgin özellikleri okside olan substratlara oranla çok daha az konsantrasyonlarda bile, substratın oksidasyonunu geciktirmeleri ve inhibe etmeleridir (Halliwell ve Gutteridge 1990).



Şekil 1.5. Oksidatif hasara karşı koruyucu mekanizmalar ve antioksidan sistem (Ames ve ark 1993)

1.5.1. Enzimatik Olmayan Antioksidanlar (Radikal tutucular):

Glutasyon (GSH):

Metabolizmada önemli rol oynayan glutasyon, bir tripeptid (gamaglutamil sisteinilglisin) olup birçok hücrede bulunmaktadır. Glutasyon, genetik bilgiye gerek

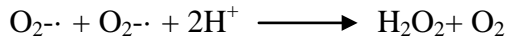
olmadan karaciğerde sistein, glisin ve glutamattan sentezlenebilir. Glutamat, sisteine gama-karboksil aracılığı ile bağlanır. Molekülün aktif kısmı sisteinin sülfidril grubudur. Gama-glutamil kısmı hücre için stabiliteyi ve peptidazlara direnci sağlamaktadır. Glutasyon, hücre zarında aminoasitlerin taşınmasında rol alır ve koenzim olarak enzim yapısına girer. Glutasyon, peroksit ve serbest radikallerle reaksiyona girerek onları zararsız ürünlere çevirir. Ayrıca, proteinlerdeki sülfidril (-SH) gruplarını da indirgenmiş halde tutarak onların okside olmasını engeller (Akkuş 1995).

B karoten, E vitamini, C vitamini, seruloplazmin, transferrin, **übibin**, albümin, glukoz, pirüvat, taurin, sistein, hemoglobin oksidanları ve melatoninin de serbest radikalleri bağlayıcı ve temizleyici etkilerinin olduğu bilinmektedir (Akkuş 1995).

1.5.2. Enzimatik Antioksidanlar

1.5.2.1. Süperoksit Dismutaz (SOD)

SOD, bir metalloenzimdir. Aslında tek bir enzim değil, bir enzim grubudur. Oksijeni metabolize eden bütün hücrelerde bulunur. SOD, McCord ve Fridovich(1969) tarafından bulunmuştur ve süperoksidin hidrojen perokside dönüşümü reaksiyonunu katalizler.



SOD, bu reaksiyonda hem oksidan hem de redüktan olarak hareket eder. Oksijen radikalleriyle oluşan hasara karşı SOD, CAT ve glutasyon enzim sistemiyle birlikte çalışan bir savunma mekanizmasıdır. Böylece oluşan hidrojen peroksit, katalaz veya glutasyon peroksidaz enzimleri tarafından su ve oksijene indirgenmektedir. Peroksit radikalinin dismutasyonu ile oluşan hidrojen peroksit doku için biyolojik avantaj sağlar. SOD'un görevinin aerobik organizmaları, süperoksidin zararlı etkilerine karşı korumak olduğu sanılmaktadır (Akkuş 1995).

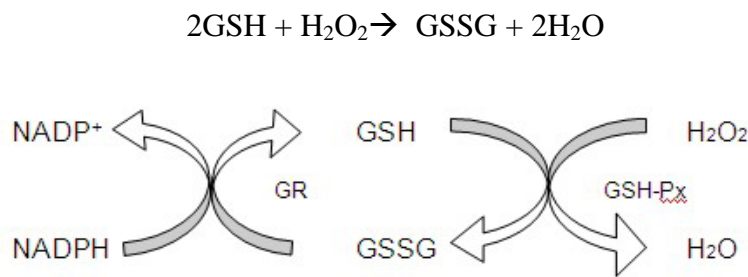
Bu enzim grubunun ökaryot canlılarda, canlıda bulunduğu bölgeye göre değişiklik gösteren üç farklı izoformu tespit edilmiştir. Eğer enzim ekstrasellüler alanda bulunuyorsa ekstrasellüler SOD (ec-SOD), sitoplazma içerisinde bulunuyorsa sitoplazmik SOD (Cu, Zn-SOD) ve mitokondride bulunuyorsa mitokondriyal SOD (Mn-SOD)'dur (Fan ve ark 1999). Hücrenin sitoplazmasında bulunan Cu, Zn-SOD'un molekül ağırlığı 32.000

daltondur. İki alt ünitesi bulunan bu SOD izoformunun bir ünitesinde Cu atomu, diğer ünitesinde ise Zn atomu bulunmaktadır (Akkuş 1995).

Hücrenin mitokondrisi içinde bulunan Mn-SOD ise 23.000 dalton ağırlığındadır ve iki alt biriminden her birisi bir Mn atomu içermektedir. Bu birimlerdeki Mangan atomları +3 değerliklidir. Enzimin bu izoformu prokaryotların sitozolünden elde edilebilmektedir. İlk olarak Keele ve ark (1970) tarafından yılında izole edilmiştir.

1.5.2.2. Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px)

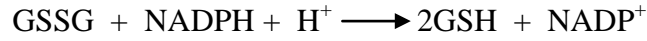
Glutasyon peroksidaz (GSH-Px) enzimi ilk defa Siddons ve Mills (1981) tarafından memeli eritrositlerinde gösterilmiştir. GSH-Px enzimi de, bir metal olan selenyumu yapısında bulundurduğu için metalloenzim grubunda değerlendirilir. Spesifik hidrojen verici olarak glutasyonu kullanır. Eritrositlerde ve diğer dokularda, redükte glutasyon (GSH) 'un okside glutasyon (GSSG) haline dönüştüğü reaksiyonda hidrojen peroksidi yüksek spesifite ile suya indirger. Okside glutasyon daha sonra, glutasyon redüktaz enziminin katalizlediği reaksiyon ile NADPH harcanarak tekrar redükte glutasyon haline dönüştürülür (Halliwell ve ark 1999; Halliwell 1974). Bu enzim, aynı şekilde lipid peroksidlerinin indirgenmesini de katalizler (Halliwell 1994). Böylece membran lipidlerini ve hemoglobini, peroksidlerin oksidasyonuna karşı korur. Hidrojen peroksitin özellikle düşük konsantrasyonlarda bulunduğu durumlarda, peroksi radikallerine afinitesi katalazdan daha fazladır (Halliwell 1974). Reaksiyon şu şekildedir:



Şekil 1.5.2.2 Glutasyonun okside ve redükte formları arasındaki dönüşümü. (GSH=Redükte glutasyon, GSSG=Okside glutasyon, GSH-Px=Glutasyon peroksidaz, GR=Glutasyon redüktaz, H₂O₂=Hidrojen peroksit)

1.5.2.3. Glutasyon Redüktaz

Okside haldeki glutasyonun, indirgenmiş glutatyona dönüşümünü katalizler. Böylece, redükte glutasyon kullanan antioksidan enzimlerin redükte glutasyon ihtiyacını karşılayarak indirekt yolla antioksidan etki göstermektedir. Glutasyon redüktaz, bir flavin enzimidir ve koenzimi NADPH ve prostetik grubu FAD'dir. Hem sitozol hem de mitokondride bulunmaktadır. Okside glutasyon hücreyi antioksidanlara karşı koruyamaz. Hücre, elektron kaynağı olarak NADPH'ı kullanan glutasyon redüktazın katalizlediği bir reaksiyon ile indirgenmiş glutasyonu tekrar oluşturmaya çalışır. NADPH, hidrojen peroksidin indirgenmesinde indirekt olarak elektronları sağlar. Oluşan NAD⁺ ise Glukoz 6-fosfat dehidrogenaz enzimi yardımıyla NADPH' a dönüştürülür (Montgomery 1996).



1.5.2.4. Katalaz (CAT)

CAT, her biri ferriprotoporfirin grubu içeren dört alt üniteden oluşmuştur. Ferriprotoporfirin, prostetik grubunda +3 değerlikli Fe atomu bulunan protoporfirin IX halkasıdır. Dolayısıyla bu haliyle, dört hem proteini içeren bir hemoproteindir. Kan, kemik iliği, karaciğer, böbrek ve müköz membranlarda en yüksek, destek dokularında ise en düşük seviyede bulunmakla birlikte hemen hemen bütün memeli hücrelerinde bulunur (Chance ve ark 1979). Enzim dokularında başlıca mitokondri ve peroksizom partiküllerine bağlı olarak bulunmaktadır. Buna ek olarak endoplazmik retikulumda ve sitoplazmada da aktivite göstermektedir. Katalaz, iki hidrojen peroksit molekülünden birini elektron vericisi, diğerini de elektron alıcısı olarak kullanarak direkt olarak su ve oksijen meydana getirir (Aebi 1984).

Bu enzimin aktivitesi, ortamdaki hidrojen peroksit konsantrasyonunun çok fazla arttığı durumlarda belirgin olarak artar. Ortamdaki H₂O₂ konsantrasyonunun düşük olduğu hallerde ise hidrojen peroksiti substrat olarak kullanan diğer antioksidan enzimler (glutasyon peroksidaz gibi) devreye girerek hidrojen peroksiti ortamdan uzaklaştırırlar (Agar ve ark 1986). Aynı etkileri gösteren katalaz ve glutasyon peroksidaz enzimleri, hücre içindeki yerleşim ve etki yerleri bakımından farklılık göstermektedirler. Katalaz enzimi peroksizomlarda daha etkin iken, GSH-Px enzimi başlıca sitozol ve mitokondride daha etkindir. Katalaz enziminin katalizlediği reaksiyon şu şekildedir:



1.5.2.5. Glutasyon-S-transferaz

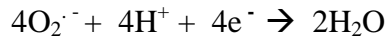
Bu grup enzimler, elektrofilik ve hidrofilik bileşiklerin glutasyon ile etkileşimlerini sağlayarak, hücrel makromolekülleri reaktif elektrofillere karşı koruyan Faz-II detoksifikasyon enzim ailesidir. İlk kez sıçan karaciğerinde Boyland ve arkadaşları tarafından tanımlanmıştır (Hayes ve ark 2005).

Glutasyon-S-transferazlar (GST) kataliz reaksiyonlarında GSH'ın nükleofilik atağını kataliz ederler. Ayrıca oksidasyon ürünlerinin veya eksojen toksik maddelerin, vücuttaki makromoleküller ile birleşmesini önleyerek, hücre komponentlerine zarar vermeden atılmasına aracılık ederler (Stevens ve ark 1998).

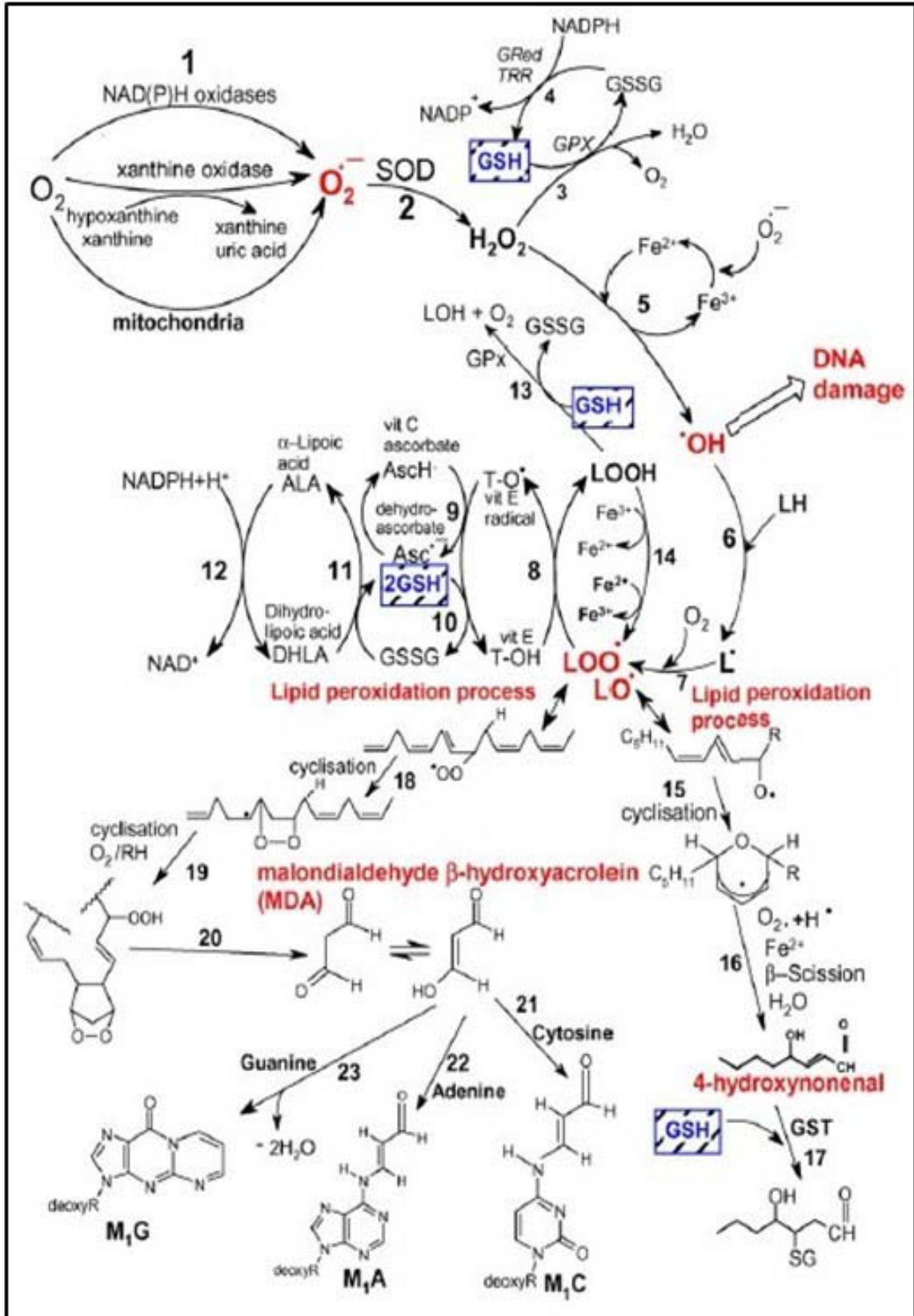
GST'lerin indirgeme özelliği, membran bileşenlerini lipit peroksidasyonlarından korur. GST'ler herbisid, pestisid, antikanser ilaçlar, kimyasal kanserojenler ve çevresel kirlilikler gibi elektrofilik ksenobiyotiklerin detoksifikasyonunda da önemli bir role sahiptir (Gyamfi ve ark 2004).

1.5.2.6. Mitokondrial Sitokrom Oksidaz

Süperoksit radikali in vivo olarak başlıca mikrozomal ve mitokondrial elektron transport sistemlerinde üretilmektedir. Mitokondrial elektron transport sisteminde normal şartlarda bir O₂ molekülüne 4 elektron aktarılarak 2 molekül su oluşturulur (Akkuş 1995).



Sitokrom oksidaz, bu elektronlanmış oksijen moleküllerini kendi aktif merkezinde sıkıca tutarak bu elektronların ortama sızmasını engeller. Elektron sızıntısını önleyerek ortamdaki diğer moleküllerin oksidasyona uğramasına engel olmasından dolayı antioksidan etkisi vardır denilmektedir (Akkuş 1995).



Şekil 1.5.2.6 ROS oluşum yolları, lipid peroksidasyonu ve oksidatif stres yönetiminde GSH ve diğer antioksidanların (Vitamin E, Vitamin C, lipoik asid) rolü (Valko, 2007).

Şekil 1.5.2.6

Reaksiyon 1: Süperoksit anyon radikali, NAD(P)H oksidaz ve ksantin oksidaz aracılı moleküler oksijenin indirgenmesi veya mitokondrial elektron transport zincirinin semi-ubiquinone bileşiği gibi redoks reaktif bileşikleriyle non enzimatik olarak oluşturulur.

Reaksiyon 2: Süperoksit radikali süperoksit dismutaz (SOD) tarafından hidrojen peroksite (H_2O_2) dismute edilir (aynı anda oksidasyon ve redüksiyona uğratılır).

Reaksiyon 3: H_2O_2 , elektron vericisi olarak glutatyon (GSH) isteyen glutatyon peroksidaz (GPx veya GSH Px) enzimi tarafından etkili bir şekilde temizlenir.

Reaction 4: Okside glutatyon (GSSG), elektron vericisi olarak NADPH'ı kullanan glutatyon reduktaz (GRed veya GR) tarafından geri GSH'a indirgenir.

Reaksiyon 5: Bazı geçiş metalleri (örn. Fe^{2+} , Cu^+ ve diğerleri), H_2O_2 'i reaktif $\cdot OH$ radikaline dönüştürür (Fenton reaksiyonu).

Reaksiyon 6: $\cdot OH$ radikali, poliansatüre yağ asidinden (LH) bir karbon merkezli lipid radikali ($L\cdot$) oluşturmak üzere bir elektron çekebilir.

Reaksiyon 7: Lipid radikali ($L\cdot$), bir lipid peroksil radikali ($LOO\cdot$) vermek üzere moleküler oksijenle daha fazla etkileşebilir. Sonuçta oluşan lipid peroksil radikali ($LOO\cdot$) antioksidanlarla indirgenmezse, lipid peroksidasyon süreci meydana gelir (Reaksiyonlar 18-23 ve 15-17).

Reaksiyon 8: Lipid peroksil radikali ($LOO\cdot$) membran içinde Vitamin E'nin indirgenmiş formu (T-OH) tarafından indirgenir. Bu da bir lipid hidroperoksit ile bir Vitamin E radikalinin (T-O \cdot) oluşumunu netice verir.

Reaksiyon 9: Vitamin C ile Vitamin E'nin rejenerasyonu: Vitamin E radikali (T-O \cdot), geride askorbil radikali (Asc \cdot) bırakacak şekilde askorbik asit (askorbatın fizyolojik formu askorbat monoanyon AscH $^-$) tarafından Vitamin E'nin indirgenmiş formuna (T-OH) geri indirgenir.

Reaksiyon 10: GSH tarafından Vitamin E'nin rejenerasyonu: Okside Vitamin E radikali (T-O \cdot) GSH tarafından indirgenir.

Reaksiyon 11: Okside glutatyon (GSSG) ve askorbil radikali (Asc \cdot), daha sonra kendiliğinden lipoik aside (ALA) dönüşen dihidrolipoik asit (DHHLA) tarafından geri GSH ve askorbat monoanyona (AscH $^-$) indirgenir.

Reaksiyon 12: NADPH kullanarak ALA'dan DHHLA'nın rejenerasyonu.

Reaksiyon 13: Lipid hidroperoksitler, elektron vericisi olarak GSH'ı kullanan GPx (veya GSH Px) tarafından alkollere ve dioksijene indirgenir.

Lipid peroksidasyon prosesi: Reaksiyon 14: Lipid hidroperoksitler, lipid alkokil radikalleri ($LO\cdot$) oluşturmak üzere Fe^{2+} ile hızla reaksiyona girebilir veya lipid peroksil radikalleri ($LOO\cdot$) oluşturmak üzere Fe^{3+} ile hızla reaksiyona girebilir.

Reaksiyon 15: Örneğin, araşidonik asitten elde edilen lipid alkokil radikali ($LO\cdot$) altı üyeli halka hidroperoksit oluşturmak üzere cyclisation (siklizasyon) reaksiyonuna uğrar.

Reaksiyon 16: Altı üyeli halka hidroperoksit, 4-hidroksi-nonenal oluşturmak üzere kesme, bölme ve ayırmayı içine alan daha ileri reaksiyonlara girer.

Reaksiyon 17: 4-hidroksinonenal; zararsız glutathiyl adduct'a (GST, glutathione S-transferase) sunulur (adduct=birlikte yan yana olan).

Reaksiyon 18: Yağ asidinin iç kısmında lokalize bir peroksil radikali, karbon merkezli bir radikale bitişik siklik bir peroksit oluşturmak üzere siklizasyonla reaksiyona girebilir. *Reaksiyon 19:* Bu radikal daha sonra ya hidroperoksit oluşturmak üzere (reaksiyon gösterilmemiştir) indirgenir ya da bicyclic peroksit (daha sonra dioksijenle birleşen ve yapısal olarak endoperoksite analog bir molekül veren bir indirgenmeye tabi olan) oluşturmak üzere ikinci bir siklizasyona gidebilir.

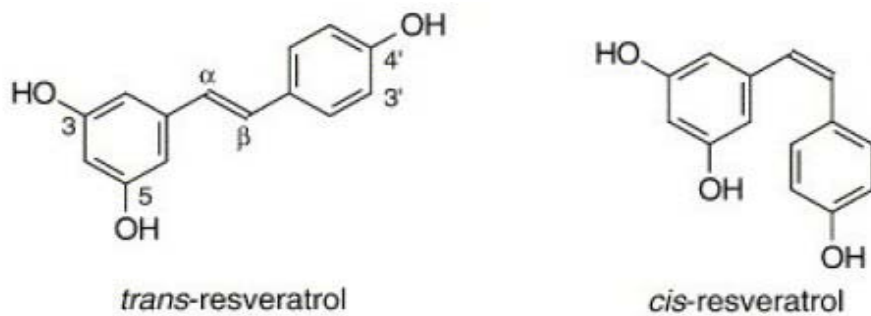
Reaksiyon 20: Oluşan bileşik, malondialdehid (MDA) üretimi için bir ara üründür. *Reaksiyonlar 21, 22, 23:* MDA; sırasıyla M1C, M1A ve M1G adduktlarını (ilgili bazlarla oluşan ürünler) vermek üzere DNA bazları sitozin, adenin ve guanin ile reaksiyona girebilir.

1.6. Resveratrol (RSV)

Polifenoller; antosiyanin, fenolik asit, ligand, flavonoidler ve stilbenleri içeren geniş bir antioksidan sınıfıdır. Polifenoller bitkilerin sekonder metabolitleridir ve bitki polifenollerini radikal yok ediciler olup çok etkili antioksidanlardır. Bu bileşiklerin hepsi fenilalanin'den sentezlenirler ve reaktif hidroksil grubu ile aromatik bir halka taşırlar (Pazourek ve ark 2005).

Flavonoidler, bitkilerdeki polifenolik sekonder metabolitlerin en geniş ve yaygın grubunu oluşturur. Yosunlardan angiospermlere kadar bitkiler aleminin her bölümünde yaygın olarak bulunmaktadır ve geniş fonksiyonları bulunur. Örneğin; çiçekler, meyveler ve tohumlar için pigmentasyonun sağlanmasında, tohum dağıtıcılar ve tozlaştırıcıları çekici özelliğın sağlanmasında, ultraviyole ışığa karşı korumada, patojenik mikroorganizmalara karşı bitki savunmasında, bitkilerde verimlilik ve polen çimlenmesinden başka bitki-mikrop etkileşimlerinde sinyal molekülü olarak rol oynarlar (Koes ve ark. 1994)

Fitoaleksinler grubu, flavonoidlerin alt gruplarından biridir. Fitoaleksinlerin sentezi bitkilerde aktif savunma mekanizmalarından birini kapsamaktadır. Stilbenler, fitoaleksinlerin birçok sınıfından birini temsil ederler (Serazetdinova ve ark 2005). Stilben'in alt sınıfı içinde 3, 5, 4- hidrokstilben için yaygın olarak RSV terimi kullanılır. RSV'nin cis ve trans formları mevcuttur.



Şekil 1.6. RSV'nin trans ve cis izoformları

RSV, antitrombositler ve antiinflamatuvar özellikleri olan, biyokimyasal ve fizyolojik olaylarda rol alan doğal bir polifenol fitoaleksin'dir (trans 3, 4, 5- trihidroksi stilben) (Bertelli ve ark 1996). İlk olarak *Polygonum cuspidatum* kuru köklerinde bulunmuştur ve geleneksel olarak Çin ve Japonya'da alternatif tıpta antiinflamatuvar etken madde olarak kullanılmıştır.

RSV (trans-3, 5, 4'- trihidroksistilben), yer fıstığı, üzüm, dut ve kızılçık gibi yaklaşık 70 bitki türünde bulunur ve üzümün kabuk kısmında yüksek orandadır (Signorelli ve Ghidoni 2005, Burns ve ark 2002, Rimando ve ark 2004, Creasey ve Coffee 1988, Romero-Perez ve ark 1999).

1.6.1. Resveratrolün Metabolizması

Bütün trans-resveratroler insanlar tarafından oral olarak alındığında emilimleri yüksek olmasına karşın hızlı şekilde metabolize edilmesi ve atılmasından dolayı biyoyararlanımı düşüktür. Sağlıklı bireyler tarafından alındığında plazmadaki maksimum pik aralığına 30-60 dakika arasında ulaşır (Walle ve ark. 2004). Maksimum pike ulaşıktan sonra 2 µm/l düzeyinde seyrederek. Özellikle kalp, karaciğer ve böbrekte aşırı miktarda birikmektedir (Goldberg ve ark. 2003, Meng ve ark. 2004). Daha çok glukozit-resveratrol (piceid) içeren üzüm suyunun biyoyararlanımının trans-resveratrole göre daha düşük olabileceği ileri sürülmüştür (Meng ve ark. 2004).

1.6.2. Resveratrolün Biyolojik Etkileri

Birçok çalışmada, RSV'nin cAMP oluşumunu arttırdığı (El-Mowafy ve Alkhalaf 2003), protein kinaz C (Atten ve ark 2001, Woo ve ark 2004) ve siklooksijenaz aktivitesini azalttığı (Shin ve ark 1998) ve eikosanoid oluşumunu sınırladığı gösterilmiştir (Shin ve ark 1998, Jang ve Pezzuto 1998).

Fransızlarda yüksek yağlı beslenmeye rağmen koroner kalp hastalığına düşük oranda rastlanılması Fransız paradoksu olarak adlandırılmış ve kırmızı şarap tüketiminin dolayısıyla RSV tüketiminin fazla olmasına bağlanmıştır (Kopp 1998).

RSV'nin etki mekanizmaları ve biyolojik faydaları üzerindeki çalışmalarda;

1) RSV'nin kardiyovasküler faydalı etkilere sahip olduğu bildirilmiştir. Bu etkilerin;

i) LDL oksidasyonuna karşı koruma sağlamasına (Frankel 1993).

ii) Perfüze edilmiş kalpte adenosin oluşumunu artırarak koroner akışı arttırmasına

(Hung ve ark 2004, Gresele ve ark 2008, Rakici ve ark 2005)

iii) Trombosit agregasyonunu azaltmasına (Pace-Asciak1995).

iv) İskemi geçiren ratlarda artmış büyüme faktörleri ile angiogenesisi artırmasına (Das ve ark 2005).

v) COX-2 ve nükleer faktör-B aktivitesini inhibe ederek prostaglandin üretimi ve inflamasyonu azaltmasına bağlı olabileceği ileri sürülmüştür (Martí'nez ve Moreno 2000, Martí'n ve ark 2004, Szewczuk ve Penning 2004).

2) RSV'nin antikarsinojen özelliği de gösterilmiştir. Bunu protein tirozin kinaz ve sitokrom P450 1A1 aktivasyonunu azaltarak yaptığı düşünülmektedir. Ayrıca prostoglandin sentezinin inhibisyonu ile de tümör gelişiminin yavaşladığı rapor edilmiştir. (Chun ve ark 1999, Bishayee 2009, Udenigwe ve ark 2008, Rocha-Gonzalez ve ark 2008)

3) Son zamanlarda RSV'nin iskemi-perfüzyon çalışmalarında böbrek, kalp ve beyinde koruyucu özelliği olduğu gösterilmiştir (Giovanni 2001, El-Mowafy ve ark 2003, Hung ve ark 2004, Das ve ark 2005, Liew ve ark 2005). Böbrek hücrelerinde koruyucu etkisini ise NO miktarını arttırarak oluşturduğu belirlenmiştir (Giovanni 2001).

4) RSV'nin ayrıca anti-aging özellikleri tespit edilmiştir (Baxter 2008). Bunu, yine kendisi gibi anti-aging özelliği olan melatoninle hücre metabolizmasının santral regülatörü ve yaşam ve ölüm yolları arasındaki ince dengenin kontrolörü gibi gözüken AMP-activated protein kinazı (AMPK) module ederek yaptığı ileri sürülmüştür (Motilva ve ark 2011).

5) Orta derecede antifungal aktivitesi de bildirilmiştir (Serazetdinova ve ark 2005).

1.6.3. Resveratrolün Antioksidan Etkisi

RSV'nin etkin bir şekilde serbest oksijen radikalleri ile diğer oksidan molekülleri temizlediği ve LDL oksitlenmesini önlediği ifade edilmiştir. RSV, oral olarak alındıktan sonra vitamin C, vitamin E ve glutatyon gibi önemli antioksidanlara göre hücre içi miktarı daha az olmaktadır (Bradamante ve ark 2004).

Trans-resveratrolün LDL'ye eklenmesiyle bakır kataliz oksidasyonunun azaldığı saptanmıştır. LDL oksidasyonu sırasında doymamış yağ asitinden bozulma ürününün oluşumunun ölçülmesiyle, trans resveratrolün bakır şelasyonunu etkilediği gözlemlenmiştir. RSV kaynağı ve quersetinin LDL'ye eklenmesiyle, doza bağlı bir şekilde oksidasyondan önceki gecikme zamanının uzadığı saptanmıştır (Kim ve ark 1990, Nigdikar ve ark 1998). RSV'nin yüksek bakır şelasyon kapasitesi önemlidir, çünkü LDL

'nin bakır bağlama kapasitesinin yüksek olduğu bilinmektedir. Cis izomerin şelasyon kapasitesi trans izomerinin yarısı kadardır. Bu durum OH gruplarının konumundan kaynaklanmaktadır (Nigdikar ve ark 1998).

RSV'nin doza bağımlı bir şekilde 2-deoksiriboz degradasyonunu inhibe ettiği saptanmıştır (Kim ve ark 1990). Bir başka çalışmada RSV'nin kolesterol sentezini, kolesterol biyosentezinde limit oranlayan enzim olan squalen monoksijenaz enzimini inhibe ederek azalttığı bildirilmiştir (Laden ve ark 2001).

Chanvitagaporgs ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada (1997) RSV'nin, LDL oksidasyonunun önlenmesinde E ve C vitamininden daha güçlü bir antioksidan etkiye sahip olduğu görülmüştür.

2.GEREÇ VE YÖNTEM

2.1.Gereç

2.1.1.Deney Hayvanları

Bu çalışmaya, Adnan Menderes Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulundan 7 Ekim 2011 tarih ve 2011/095 sayılı etik kurul onayı alınarak başlandı. Tüm hayvan deneyleri, Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Deney Hayvanları ünitesinde Kasım-Aralık 2011 tarihlerinde gerçekleştirildi. Çalışmada, ağırlıkları 200-300g arasında değişen toplam 35 adet dişi Wistar-Albino türü rat kullanıldı. Hayvanlar 20-22 °C sabit sıcaklık ve onikişer saatlik aydınlık-karanlık siklusu sağlanan kontrollü bir odada kafeslerde tutuldu. Sınırsız miktarda standart pelet yem ve suya ulaşmaları sağlandı. Ratlar bu şekilde, bir hafta boyunca kafeslerinde dinlendirilerek ortama uyumları sağlandıktan sonra deneylere başlandı. Laboratuvar analizleri Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı Laboratuvarı'nda çalışıldı. Histopatolojik incelemeler Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarı'nda gerçekleştirildi.

2.1.2. Deney Grupları ve Uygulama Protokolü

Ağırlıkları 200-300 g arasında değişen, toplam 35 Wistar Albino cinsi dişi rat, eşit sayıda (n=7) olarak 5 deney grubuna ayrıldı. Gruplar aşağıdaki şekilde oluşturuldu;

1. **RSV kontrol grubu** : Kolit yapılmadı. Sadece RSV verildi.
2. **Sham grubu** : Kanülle serum fizyolojik verildi.
3. **TNBS grubu** : Kanülle TNBS verilerek kolit yapıldı.
4. **TNBS+DMSO (çözücü) grubu** : TNBS ile kolit ve profilaktik DMSO verildi.
5. **TNBS+RSV (tedavi) grubu** : TNBS ile kolit ve profilaktik RSV verildi.

Kontrol ve tedavi grubu hayvanlara 10mg/kg/gün dozda Resveratrol (RSV) vermek için 100 mg RSV (Santa Cruz Biotechnology, ABD, sc-200808), 10ml dimetil sülfat (DMSO)'da çözüldü. Elde edilen 10mg/ml'lik RSV solüsyonu, her hayvana 0,2-0,3 ml içinde periton içi olarak uygulandı.

Kolit uygulanmasından önce, kontrol, tedavi (TNBS+RSV) ve çözücü (TNBS+DMSO) grubu hayvanlara, profilaktik olarak 5 gün boyunca sırasıyla RSV (10 mg/kg/gün) ve (DMSO) tedavisi verildi. Beşinci ve son doz uygulamalardan önce hayvanlar 24 saat aç bırakıldı. Ertesi gün son doz RSV verildikten sonra, ilaç kontrol grubu dışındaki tüm hayvanların bağırsakları boşaltıldı. Bağırsak boşaltma işlemi, defekasyon refleksini uyarmak üzere hayvanı kuyruğundan tutup arka ayakları üzerinde zıplattırılarak yapıldı. Her hayvan, yaklaşık 20 dk bu işleme tabi tutuldu. Bu işlem bittikten sonra, kolit yapılacak hayvanlara %37 alkolde çözünmüş 25 mg TNBS, eter anestezisi altında, bir kanülle anal orifisten 8 cm içeriye girilerek verildi. Sham grubu hayvanlara ise aynı işlemler yapıldı. Fakat kanülle TNBS yerine serum fizyolojik verildi.

Kolitten 24 saat sonra eter anestezisi altında, kalp içi kan örnekleri alındıktan sonra, servikal dislokasyon ile ötenazi uygulandı. Daha sonra batın orta hattın açılarak anüsten içeriye doğru kolonun son 10 cm'lik segmenti çıkartıldı. Kolon segmenti longitudinal olarak açıldı ve serum fizyolojik ile yıkandı. Bağırsak segmenti makroskopik olarak skorlandı. (Çizelge 2.3.) Longitudinal olarak ikiye bölünen kolon segmentinin bir yarısı histopatolojik incelemeye tabi tutulmak üzere direkt formol solusyonuna konurken, geri kalan diğer longitudinal yarım barsak dokusu ve kanlardan elde edilen plazma örneklerinden MPO, serum örneklerinden MDA düzeyleri belirlenmek üzere -20°C'ye konuldu.

2.1.3. Kullanılan Cihazlar

Analizler sırasında Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı Laboratuvarında bulunan;

-20°C'lik derin dondurucu (Bosch, Türkiye);

Santrifüj (Nüve NF800R, Türkiye);

Homojenizatör (IKA-Werke, Ultra Turrnax, Almanya);

Spektrofotometre (Shimadzu UV-16001, Avusturalya);

ELISA Okuyucu (Optic Ivyman System, İspanya);

Vorteks (Velp, İtalya);

Manyetik karıştırıcı (Velp, İtalya);

Etüv (Mettler, Almanya);

Hassas terazi (Sartorius, Almanya);

pH metre (pH 211, Hanna, Amerika);

Otomatik pipetler (İsolab 2-20µl, İsoTerm 20-200 µl, Brand 5-50µl, İsoTerm 100-1000 µl) kullanılmıştır.

2.1.4 Kullanılan Kimyasal maddeler

Bovine serum albumin (SIGMA, A2153);

TNBS (SIGMA, P2297);

Resveratrol (Santa cruz Biotechnology, sc-200808);

GSH Px kiti (Sigma, OGP1, USA);

MPO ELİSA kiti (Wuhan EIAAB Science, E0601r, Çin);

Trikloroasetik asit (Merck, K36929507);

Tiyobarbitürik asit (Merck, L55063680);

Na₂HPO₄·2H₂O (disodyumhidrojen fosfat dihidrat) (Merck,6580);

KH₂PO₄ (potasyum dihidrojen fosfat) (Merck, 4871);

NaCl (sodyum klorür) (Merck, 6400);

HCl (Hidroklorik asit, Sigma 07102);

EDTA (Sigma, E5134);

NBT (Nitroblu tetrazolium) (Sigma, N1630);

Na₂CO₃ (Sodyum karbonat) (Horasan Kimya);

CuCl₂ (Carlo Erba 36450);

Ksantin oksidaz (Sigma X1875 25U);

Ksantin (Sigma, X0626);

Tert-bütilhidroksit (Merck, S344612);

KCl (Potasyum klorür)(Merck K25612535);

H₂O₂ (Hidrojen peroksit) (Merck 108579);

CuSO₄ (Bakır sülfat) (Merck A894987);

Sodyum potasyum tartarat (Merck 64271);

NaOH (Sodyum hidroksit) (Carlo Erba 480507);

Eter (Carlo Erba 447522);

n-bütanol (Sigma 21124);

Amonyum molibdat (Carlo Erba 420236);

Kloroform (Sigma, 24216);

NaCl (Sodyum klorür) (Merck 109927)

2.1.5. Kullanılan Çözeltiler

2.1.5.1. Doku Homojenizasyonunda Kullanılan Çözeltiler

-0.1 M Fosfat Tamponlu Tuz Çözeltisi:

12,636 g Na₂HPO₄ x 2H₂O

0,2 g KH₂PO₄

8,06 g NaCl

0,201g KCl

Yukarıdaki kimyasal maddelerin hepsi tartılıp, 800 ml distile su içinde manyetik karıştırıcıda çözüldürüldü. Çözeltinin pH 7,4'e ayarlandı. Distile su kullanılarak hacmi 1 litreye tamamlandı.

2.1.5.2. Protein Miktarını Ölçmek İçin Kullanılan Çözeltiler

-Stok Solüsyonu:

A reaktifi (% 1 Cu_2SO_4): 0,5 gramı 50 ml distile suda çözdürüldü.

B reaktifi (% 2 Na-K-tartarat): 1 gramı 50 ml distile suda çözdürüldü.

C reaktifi (0,2 M NaOH): 0,4 gramı 50 ml distile suda çözdürüldü.

D reaktifi (% 4 Na_2CO_3): 2 gramı 50 ml distile suda çözdürüldü.

-Lowry 1 Solüsyonu:

Bir beher içine önce D reaktifiyle hazırlanmış solüsyondan 49 ml konuldu. Sonra sırasıyla C'den 49 ml, A'dan 1 ml, B'den 1 ml eklenerek Lowry 1 çözeltisi hazırlandı.

-Lowry 2 Solüsyonu:

Folin Ciocalteu ayıracağı su ile eşit oranda karıştırıldı.

2.1.5.3 Doku Malondialdehid (MDA) Tayininde Kullanılan Çözeltiler

-Stok Çözelti:

% 30 HCl'den 2,07 ml, TBA dan 0,37 g ve TCA' dan 15 g bir balon jöje içine eklendikten sonra distile su ile 100 ml'ye tamamlandı.

2.1.5.4. Serum Malondialdehid (MDA) Tayininde Kullanılan Çözeltiler

-% 20 lik Trikloroasetik asit çözeltisi (TCAA)

20 mg TCAA distile su ile 100 ml'ye tamamlandı.

- %0.67 lik Tiyobarbitürik asit çözeltisi (TBA)

0.67 mg TBA distile su ile 100 ml'ye tamamlandı.

2.1.5.5. Doku Süperoksit Dismutaz (SOD) Tayininde Kullanılan Çözeltiler

-Fosfat Tamponlu Tuz (PBS):

12,636 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 0,2 g KH_2PO_4 ; 8,06 g NaCl ve 0,201g KCl tartılıp, 800 ml distile su içinde manyetik karıştırıcıda çözüldürüldü. pH 7,4'e ayarlandı. Distile su kullanılarak hacmi 1 litreye tamamlandı.

-Ksantin Stok Solüsyonu

23 mg Ksantin 5 ml NaOH ile bir balon joje içinde karıştırılıp, distile suyla 50 ml'ye tamamlandı.

-EDTA Çözeltisi

0,249 g EDTA 1 litre distile su içinde çözdürülerek elde edildi.

-Nitroblue tetrazolium (NBT) Çözeltisi

12,3mg NBT 100 ml distile suda çözüldürüldü.

-Na₂CO₃ Çözeltisi

4,2 g Na₂CO₃ ile 100 ml distile suda çözelti elde edildi.

-BSA Çözeltisi

100ml distile su içinde 100 mg BSA çözümlenerek hazırlandı.

-CuCl₂ Çözeltisi

10,7 mg CuCl₂ 100 ml distile suda çözdürülerek hazırlandı.

-Ksantin Oksidaz Çözeltisi

2M Amonyum sülfat çözeltisi içinde 20 U/ml ksantin oksidazdan 2 ml çözdürülerek hazırlandı.

2.1.5.6 Doku Katalaz (CAT) Tayininde Kullanılan Çözeltiler

-Sodyum-Potasyum-Fosfat Tamponu:

A- KH₂PO₄'den 3,522 g alındı ve 1 litre distile su içinde çözdürüldü.

B- Na₂HPO₄'den 7,268 g alındı ve 1 litre distile su içinde çözdürüldü.

Daha sonra 3,3 ml A çözeltisinden alınarak B çözeltisi ile 100 ml'ye tamamlandı ve pH: 7 olacak şekilde pH metrede ayarlandı.

-Substrat solüsyonu:

% 30 H₂O₂ den 0,16 ml alınıp, fosfat tamponun 100 ml'si ile seyreltildi.

- 32.4 mmol/l amonyum molibdat ((NH₄)₆Mo₇O₂₄ 4H₂O) çözeltisi:

Bunun için, 8 g amonyum molibdat 200 ml distile suda çözülerek hazırlandı. Her zaman taze olarak kullanıldı ve kısa süreli beklemlerde çökelti oluşmuşsa vorteksten geçirildi.

2.2.Yöntemler

2.2.1. Dokuların homojenizasyonu

Dokuların yaş ağırlıkları saptandı. Bistüri ile daha küçük parçalara ayrılarak, bir miktar distile su ile yıkandı. 10 ml'lik homojenizatör tüplerine aktarılıp ağırlıklarının 10 katı kadar soğuk PBS (150mM pH:7,4) ile sulandırıldı ve yüksek devirde, +4 °C'de 10 dakika homojenize (IKA Overhead Stirrer; Almanya) edildi. Ependorflara aktarıldı. Homojenizatlar bekletilmeden +4 °C de 10 dakika 8000 devirde santrifüje (Nüve- NF 800R, Türkiye) edilip üstteki süpernatant kısımları analiz için alınarak -20 °C de saklandı

2.2.2. Protein Miktarının Ölçümü

Protein tayini Lowry metodu uygulanarak yapıldı (Lowry 1951).

Prensip: Fosfomolibdik/fosfotungstik asit (Folin Ciocalteu) çözeltisinin alkali koşullarda proteinlerdeki fenolik aminoasitlere verdiği reaksiyona dayanır. İlk reaksiyonda peptid bağları ile Cu⁺² arasında biüre reaksiyonu sonucu indirgenmiş bakır oluşur. İkinci reaksiyonda Folin-Ciocalteu ayırıcı, tirozin ve triptofan aminoasitleri ile tepkimeye girerek indirgenir ve mavi renkli kompleks oluşturur (Lowry 1951).

Testin Yapılışı:

1- 2,5 ml Lowry I ve 0,5 ml örnek karıştırıldı.

2 -Oda ısısında 5 dakika beklendi.

3- 0,25 ml Lowry II eklendi.

4- Oda ısısında 30 dakika beklendi ve 650 nm de suya karşı absorbanları UV spektrofotometrede okundu (Ninfa ve Ballou 1998).

Hesaplama:

100mg/dl stok albümin çözeltisinden hazırlanan standart eğriye göre örneklerin konsantrasyonları hesaplandı.

2.2.3. Dokuda ve Plazmada Miyeloperoksidaz (MPO) Ölçümü

Rat Miyeloperoksid, MPO ELISA Kit'i (EIAab, EIAAB, Catalog No: E0601r, Çin) ile üretici firmanın verdiği protokol ve açıklamalara göre yapıldı.

Prensip:

Kit içinde sağlanan pleyt önceden MPO'ya spesifik antikor ile kaplanmıştır. Reaksiyon boyunca örnek veya standarttaki MPO, pleyte önceden yerleştirilmiş MPO'ya spesifik monoklonal antikordaki yerler için, biotin bağlı MPO'nun sabit miktarı ile yarışır. Fazla konjugat ve bağlı olmayan örnek veya standart pleytden yıkanır. Sonra, Horseradish Peroxidase'a (HRP) bağlanmış Avidin, her kuyucuğa eklenir ve inkübe edilir. Daha sonra her kuyucuğa TMB (tetrametilbenzidin) substrat solüsyonu eklenir. Enzim-substrat reaksiyonu, sülfürik asit solüsyonu ilavesiyle sonlandırılır ve renk değişimi 450 nm dalga boyunda ELISA cihazında ölçülür.

Yapılışı:

Standart stok solüsyonu sampil dilüent ile sulandırıldı. 50 ng/ml standart stok solüsyonu üzerine 1ml sample dilüent eklendi. 7 tüp hazırlandı. Her tüpe 500 µl Örnek sulandırıcı kondu. Standarttan başlayarak son tüpe kadar her birinden 500 µl alıp diğerine eklendi. Daha sonra A ve B ayırıcıları 1/100 oranında sulandırıldı. Aşağıdaki işlemlerle devam edildi;

- 1) Kuyucuklara 50 µl örnek kondu.
- 2) 50 µl A ayırıcı üzerine kondu ve 37 °C de 1 saat bekletildi.
- 3) Üç kez yıkandı.
- 4) 100 µl B ayırıcı kondu. Yine 37 °C de 1saat bekletildi.
- 5) Tekrar yıkama yapıldı.
- 6) 90 µl substrat ilave edilip, 37 C de ışıktan koruyarak 30 dakika bekletildi.
- 7) 50 µl stop solüsyonu kuyucuklara eklendi
- 8) 450 nm'de okutuldu.

Hesaplama:

Örneklerdeki MPO konsantrasyonu, örnek absorbansının standart eğrisine kıyaslanmasıyla belirlendi.

2.2.4. Doku malondialdehid (MDA) ölçümü

Dokularda MDA üretimi, Ohkawa ve arkadaşları (1979) tarafından tanımlanan yöntem ile ölçüldü.

Prensip:

MDA'nın asidik pH ve sıcak ortamda, TBA ile 532 nm'de ölçülebilen tespit edilebilen pembe renkli bir kompleks oluşturur.

Yapılışı:

Analiz için % 30 HCl, TBA, TCA'dan oluşan 100 ml distile suda stok solüsyon hazırlandı. Vidalı kapaklı cam tüpler içine 300 µl numune konduktan sonra 600 µl stok solüsyon eklendi. Tüplerin ağızları kapatılıp 20 dakika kaynatıldıktan sonra buzlu suda soğutuldu. 3000 rpm de 10 dakika santrifüj edildi. 535 nm'de havaya karşı okutuldu. Absorbans, Shimadzu UV-160 spektrofotometresi ile ölçüldü (Ohkawa ve ark 1979).

Hesaplama: Sonuçlar 1,56 ile çarpıldı ve mg doku proteinine oranlandı.
 $\Sigma_{\Delta 535} = 1,56 \times 10^5 \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1} \quad 0,156 = 1 \mu\text{M}$

2.2.5. Serum Malondialdehit (MDA) Ölçümü

Serum MDA düzeyi ölçümünde Yoshioka ve ark (1979) tarafından bildirilen yöntem kullanıldı.

Prensip:

Bu yöntemin prensibi TBA (tiyobarbitürik asit) ile MDA'nın asidik pH ve sıcak ortamda birleşmesi ile oluşan stabil kırmızı-pembe renkli pigmentin 532-535 nm'de elde edilmesine dayanır. Bu rengi MDA molekülü ile İki TBA molekülünün birleşmesi sonucu oluşan kromojen verir. MDA'nın bir kısmı peroksidasyon sırasında oluşurken büyük kısmı ısıtma işlemi sırasında lipid peroksitlerin yıkımıyla açığa çıkmaktadır.

Testin yapılışı:

Analiz için kör ve test olarak işaretlenen iki kapaklı deney tüpü alındı. Kör tüpüne % 20'lik TCA'dan 1,5 ml, %0.67'lik TBA'dan 0,5 ml konuldu. Test tüpüne 250 µl numune

konup üzerine 1250 µl TCA, 0,5 ml TBA ilave edildi. Tüplerin ağızları sıkıca kapatılıp 30 dakika kaynar su banyosunda inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda tüpler buz banyosunda hemen soğutuldu. Üzerlerine 2 ml n-butanol konularak 3000 rpm’de 10 dakika santrifüj edildi. Daha sonra n-butanol tabakası başka bir tüpe aktarılarak spektrofotometrede 535 nm dalga boyunda köre karşı testin absorbansı okutuldu.

Hesaplama:

Sonuçlar 1,56 ile çarpıldı.

$$\Sigma_{\Delta 535}=1,56 \times 10^5 \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$$

$$0,156= 1\mu\text{M}$$

2.2.6. Dokuda Süperoksit Dismutaz (SOD) Aktivitesi Ölçümü:

Sun ve arkadaşlarının (1988) bildirdiği yöntemle yapıldı.

Prensip:

Reaksiyon ortamında enzimatik bir reaksiyon ile üretilen süperoksit radikallerinin, ortamda bulunan nitroblue tetrazolium’u (NBT) indirgemesinin örnekteki SOD tarafından engellenmesi prensibine dayanmaktadır. Yöntemde süperoksit radikali üretimi ksantin-ksantin oksidaz enzimatik reaksiyonu ile sağlanır. Bu şekilde üretilen süperoksit radikallerinin, NBT ile reaksiyona girerek bu maddeyi indirgemesi sonunda maksimum absorbansını 560 nm’de veren formazon oluşur. Ortama ilave edilen enzimin, üretilen radikalleri dismutasyona uğratması nispetinde, NBT redüksiyon reaksiyonu yavaşlar ve sonuçta spektrofotometrede okunan absorbans değerleri düşer. Dolayısıyla formazon oluşumunun inhibisyonun tayin edilmesiyle SOD miktarı indirek olarak saptanmaktadır.

Testin Yapılışı:

20 ml	Ksantin Stok Solüsyonu (1/10 sulandırıldı.)
10 ml	EDTA
10 ml	NBT
6 ml	Na ₂ CO ₃
3 ml	BSA

Yukarıda belirtilen ayıraçlar bir balon jodede karıştırılarak 20 testlik reaktif çözelti oluşturuldu. Kör ve test tüpleri hazırlandı. Tüm tüplere 2,45 ml deney reaktifi konuldu. Kör tüpüne 0,5 ml distile su ilave edildi. Başka bir deney tüpüne homojenizattan 1 ml alınıp üzerine 0,3 ml kloroform ve etanol ilave edilerek 3000 rpm' de 10 dakika santrifüj edildi. Üstte kalan berrak kısımdan 0,5 ml alınarak test tüplerine ilave edildi. Daha sonra her tüpe 50 µl ksantin oksidaz ilave edilip karıştırıldı. Arkasından 20 dakika 25⁰C de benmari usulüyle ısıtarak inkübasyonda bırakıldı. Sonra, her tüpe 1 ml CuCl₂ eklenmesiyle reaksiyon durduruldu. Formazon oluşumu spektrofotometre ile 560 nm'de köre karşı okundu.

Hesaplama:

Bir ünite SOD, NBT indirgenme hızını %50 oranında inhibe eden protein miktarı olarak tanımlanır. Sonuçlar, U/g protein olarak ifade edildi. Aşağıdaki formül kullanıldı

$$\% \text{ İnhibisyon} = \frac{\text{Körün absorbansı} - \text{Testin absorbansı}}{\text{Körün absorbansı}}$$

2.2.7. Dokuda GSH-Px Aktivitesi Ölçümü

Glutathione Peroxidase Cellular Activity Assay Kit (Sigma CGP1, ABD) kullanılarak yapıldı.

Prensip: Bir GSH-Px ünitesi, redükte glutatyon (GSH), glutatyon redüktaz ve *tert*-butilhidroperoksid varlığında pH 8,0 ve 25 °C 'de her dakika NADPH'dan 1,0 µmol NADP oluşumuna neden olan GSH-Px miktarı olarak tanımlanır.

Yapılışı:

Kör kontrol için 940 µl, örnek için 890 µl GSH-Px analiz tampon solüsyonu kendilerine ait 1ml kuvartz küvetlere alındı. Her birine 50 µl NADPH analiz ayırıcı eklendi. Numune küvetine ayrıca toplam hacim 1ml oluncaya kadar 60 µl doku homojenatı eklendi. Toplam hacmi 1ml olan küvetler ters çevrilerek içindekilerin karışması sağlandı. Daha sonra her küvete 10 µl, kitle sağlanan 30 mM *tert*-Butil Hidroperoksid (t-Bu-OOH) solüsyonu ilave edilerek reaksiyon başlatıldı ve ters çevrilerek karışması sağlandı. Kinetik program seçilerek kit prosedüründe önerildiği şekilde; 340 nm'de, başlangıçtan sonra 15 sn geçmesi beklenerek ilk okuma yapıldı. Ardından okuma aralığı 10 sn olacak şekilde 6 okuma daha yapıldı. Sonuçlar kaydedildi.

Hesaplama:

Örnekteki GSH-Px aktivitesi (mmol/min/ml) aşağıdaki formüle göre hesaplandı ve g proteine oranlandı.

$$\text{Mmol/min/ml} = \text{Units/ml} = \Delta A_{340} \times \text{DF} / 6.22 \times V$$

$$\Delta A_{340} = A_{340}/\text{min}_{(\text{kör})} - A_{340}/\text{min}_{(\text{örnek})}$$

$$6.22 = \text{NADPH için } \epsilon^{\text{mM}} \text{ faktörü}$$

DF= reaksiyona eklemeyen önce örneğin dilüsyon faktörü,

V= ml olarak örnek hacmi

2.2.8. Doku katalaz (CAT) aktivitesi ölçümü

Doku katalaz aktivitesi Goth (1991) bildirdiği metod ile spektrofotometrik olarak belirlendi.

Prensip: Katalaz, hidrojen peroksidi enzimatik olarak parçalar ve oluşan reaksiyon ürünü amonyum molibdat 405 nm ölçülebilen kompleks oluşturur.

Testin Yapılışı:

Blank 1: 1 ml substrat, 1 ml molibdat, 0,2 ml serum

Blank 2: 1 ml substrat, 1 ml molibdat, 0,2 ml tampon

Blank 3: 1 ml tampon, 1 ml molibdat, 0,2 ml tampon

Test: 0,2 ml serum 1 ml substrat ile 37°C’de 1 dk inkübe edildi, 1 ml amonyum molibdat ile reaksiyon durduruldu.

Hesaplanması:

Katalaz aktivitesi= $A(\text{test}) - A(\text{Blank1}) / A(\text{Blank2}) - A(\text{Blank3}) \times 271 = \text{kU/L}$

Sonuçlar g dokuya oranlandı.

2.3. Makroskopik Skorlama

Makroskopik skorlama, Çizelge 2.3’ deki kriterlere göre yapıldı.

Çizelge 2.3. Kolon mukozasının makroskopik skorlama kriterleri (Millar ve ark 1996)

Kolit Skoru	Gözle Görülen Morfoloji
0	Makroskobik değişiklik yok
1	Sadece mukozal eritem mevcut
2	Hafif mukozal ödem, yüzeysel kanama ya da küçük erozyonlar
3	Orta derecede ödem, kanayan ülserler ya da erozyonlar
4	Ciddi ülserasyon, erozyonlar, ödem ve doku nekrozu

2.4. Histolojik (Mikroskopik) Skorlama

Histopatolojik incelemede kalın bağırsakta değerlendirilen parametreler şunlardı: Hasar/ Nekroz, İnflamatuar hücre infiltrasyonu, Submukozal ödem, Mukozal hemoraji (Gonzalez ve ark 1999, Gué ve ark 1997). Hematoksilen-Eozin ile boyanmış kalın bağırsak dokularını mikroskopta değerlendirirken bakılan kısma göre sıfırdan üçe kadar derecelendirme yapılarak veriler kaydedildi. Etkilenme yok (0), hafif etkilenme (1), orta düzeyde etkilenme (2), şiddetli etkilenme (3) olmak üzere değerlendirildi ve ışık mikroskopunda incelendi. Değerlendirilen dokuların ışık mikroskopunda (Olympus BX 20) fotoğrafları çekildi.

Çizelge 2.4. Kolon mukozasının mikroskopik skorlama kriterleri

(Gonzalez ve ark 1999, Gué ve ark 1997)

Skor	Etkilenme Düzeyi
0	Etkilenme yok
1	Hafif etkilenme
2	Orta düzeyde etkilenme
3	Şiddetli etkilenme

2.5. İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analizin yapılmasında istatistik programı olarak SPSS 14,0 ve GraphPad InStat 3,0 programları kullanıldı. Sayısal değişkenler 'ortalama \pm standart hata' şeklinde sunuldu. p değerinin 0.05'den küçük olması istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Biyokimyasal analizlerde, gruplar arası farklılığı saptamada one-way ANOVA (analysis of variance), histopatolojik incelemede ise Kruskal-Wallis testleri kullanıldı; $p < 0.05$ değerleri anlamlı olarak kabul edildi.

3. BULGULAR

3.1. Biyokimyasal Bulgular

Çizelge 3.1.1. Ortalama Doku MPO, MDA, SOD, GSH- Px ve CAT düzeyleri

Aynı sütunda farklı harf taşıyan gruplar arası istatistiki fark önemli.

***: p<0,001; **: p<0,01; ÖD: İstatistiki önem yok

	MPO (ng/mg) X±Sx	MDA (nmol/mg) X±Sx	SOD (U/g) X±Sx	GSH-Px (mmol/min/g) X±Sx	CAT (KU/g) X±Sx
RSV Kontrol	0,81±0,11 ^a	10,97± 1,06 ^a	0,26± 0,02 ^a	46,8±1,66 ^b	13,38± 2,69
Sham	0,60±0,14 ^a	11,45±1,80 ^a	0,30 ±0,06 ^a	42,70 ±2,35 ^{ab}	19,24 ±4,61
TNBS	1,29 ±0,20 ^a	25,3±3,62 ^c	0,66 ±0,07 ^b	47,54 ±3,68 ^b	10,36 ±2,78
TNBS+DMSO	2,13± 0,36 ^b	26,61± 3,97 ^c	0,78± 0,13 ^b	47,89 ±2,34 ^b	11,49 ±4,76
TNBS+RSV	2,34± 0,26 ^b	19,40 ±4,54 ^b	0,55± 0,05 ^{ab}	57,35 ±2,24 ^c	12,02± 4,04
P	***	**	**	***	ÖD

Çizelge 3.1.2. Ortalama Plazma MPO ve serum MDA düzeyleri

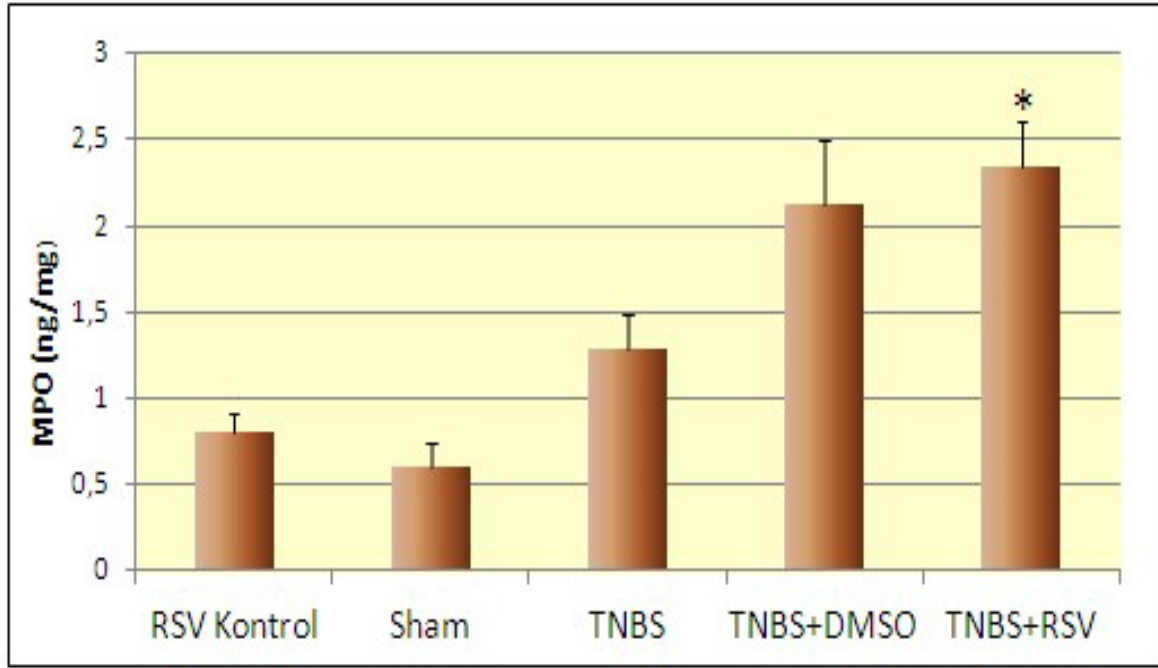
	MPO (ng/ml)	MDA (nmol/ml)
RSV Kontrol	6,05 ±0,31 ^a	30,26 ±1,73
Sham	5,86 ±0,37 ^a	27,99± 2,31
TNBS	6,82± 0,26 ^{ab}	27,43± 2,55
TNBS+DMSO	7,18± 0,47 ^b	17,88 ±1,71
TNBS+RSV	7,12± 0,21 ^b	25,38 ±3,84
P	**	ÖD

Aynı sütunda farklı harf taşıyan gruplar arası istatistiki fark önemli.

***: p<0,001; **: p<0,01; ÖD: İstatistiki önem yok

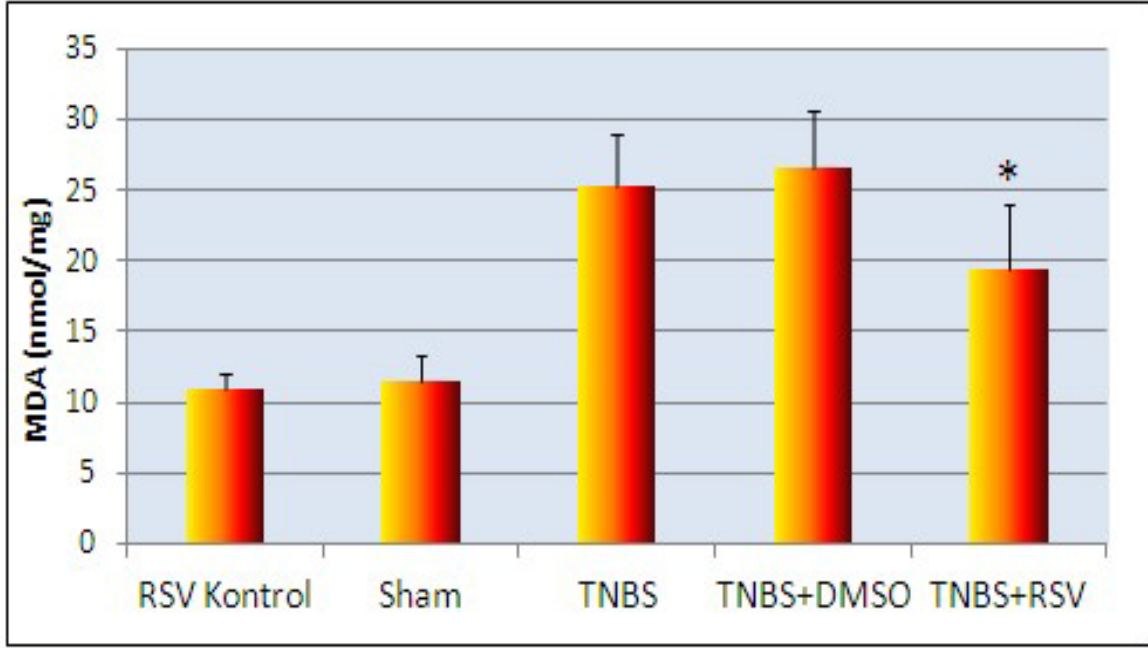
Plazma MPO değerlerinde Resveratrol grubunda kontrol ve sham grubuna göre anlamlı artış izlenirken DMSO grubuna göre fark izlenmemiştir. MDA düzeylerinde ise istatistiki açıdan önemli bir değişiklik belirlenmemiştir.

Doku MPO düzeyi sonuçları Çizelge 3.1.1. ve Şekil 3.1.'de gösterilmiştir. Miyeloperoksidaz (MPO) düzeylerinin Resveratrol verilen grupta, ilaç kontrol ve Sham kontrol gruplarına göre istatikselsel olarak anlamlı artışı görüldü ($p<0,001$). TNBS grubunda MPO düzeyleri RSV verilen gruba göre anlamlı düşük bulundu ($p<0,001$). MPO düzeyleri açısından, TNBS ile birlikte DMSO verilmiş grupta, TNBS grubuna göre daha fazla MPO düzeyi bulunurken, RSV verilen gruba göre daha az MPO düzeyi olduğu görüldü.



Şekil 3.1.1. Doku MPO düzeyleri

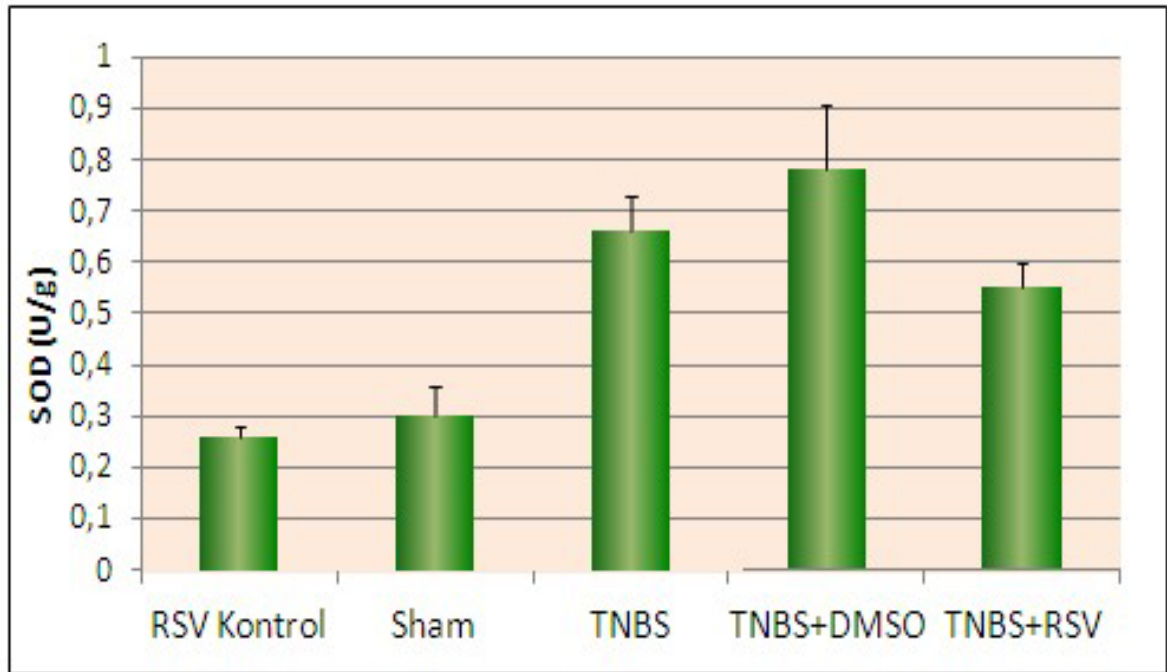
Doku MDA düzeyleri Çizelge 3.1.1. ve Şekil 3.1.2 de gösterilmiştir. MDA düzeylerinin TNBS grubunda, RSV kontrol ve Sham kontrol gruplarına göre anlamlı seviyede arttığı izlendi ($p < 0,01$). RSV verilen grupta MDA sonuçlarının TNBS ve çözücü (TNBS + DMSO) gruplarına göre anlamlı düzeyde azalma gösterdiği bulundu.



Şekil 3.1.2. Doku MDA düzeyleri

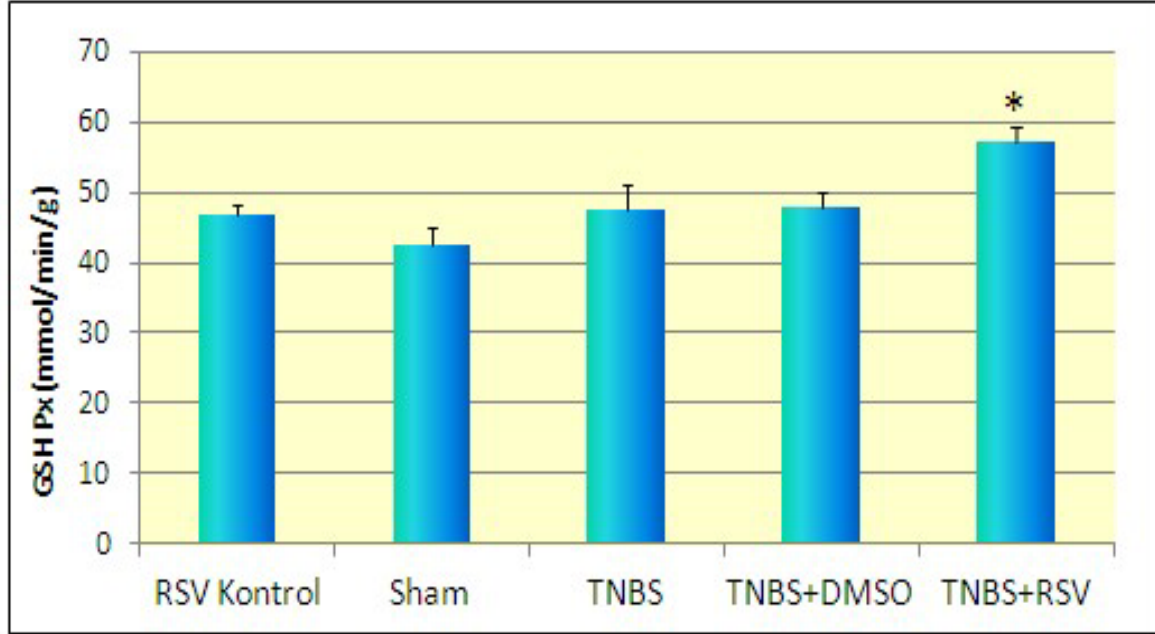
Doku SOD düzeylerinde en yüksek değer TNBS ile birlikte DMSO uygulanmış çözücü grupta izlendi. TNBS uygulanarak kolit oluşturulan grupta ise kontrol ve sham kontrol gruba göre anlamlı artış olmasına rağmen DMSO uygulanmış gruba göre anlamlı değişiklik saptanmadı.

TNBS ile kolit oluşturulmadan önce profilaktik olarak RSV verilmiş grubun SOD değerleri kontrol ve sham kontrol gruplarına göre anlamlı artış gösterdi ($p < 0,01$). Ancak Resveratrol verilen grubun SOD değerlerindeki artış TNBS ve TNBS+DMSO gruplarındaki artıştan istatistiksel olarak daha düşüktü ($p < 0,01$). (Çizelge 3.1.1., Şekil 3.1.3.)



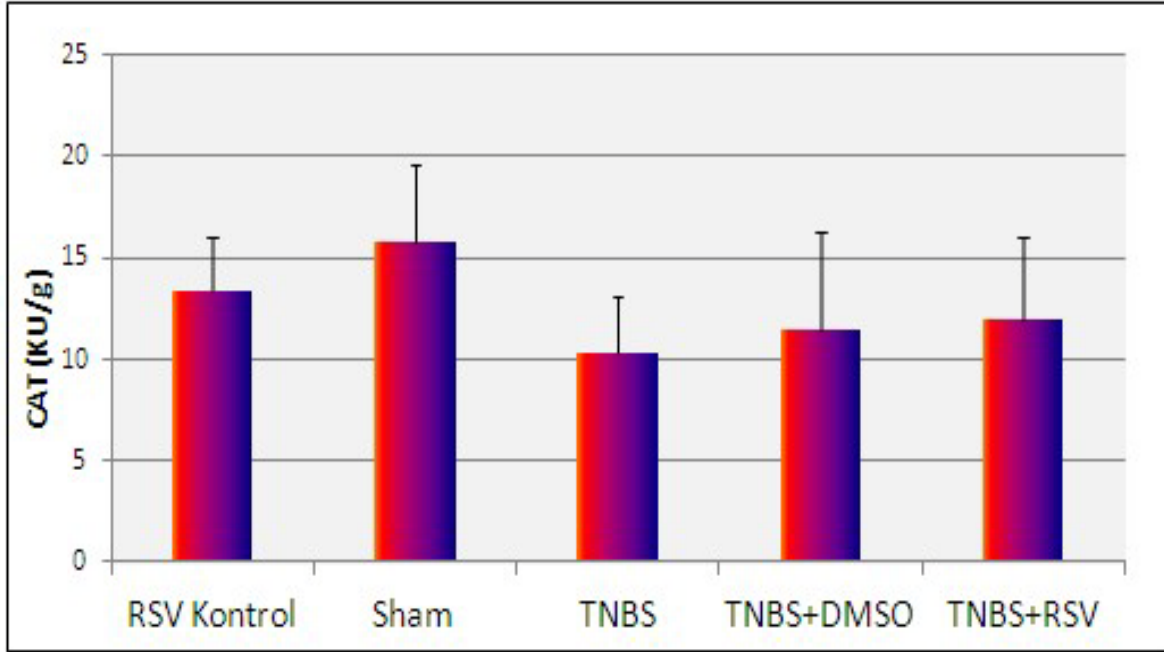
Şekil 3.1.3. Doku SOD aktivite düzeyleri

RSV verilen grupta GSH- Px değerlerindeki artış en yüksek düzeydeydi. Kontrol, TNBS, DMSO verilmiş olan gruplardaki GSH-Px düzeyleri arasında anlamlı fark bulunamadı. RSV grubu GSH-Px değerleri, diğer tüm gruplarla anlamlı olarak farklı görüldü ($p < 0,001$).



Şekil 3.1.4. Doku GSH- Px aktivite düzeyleri

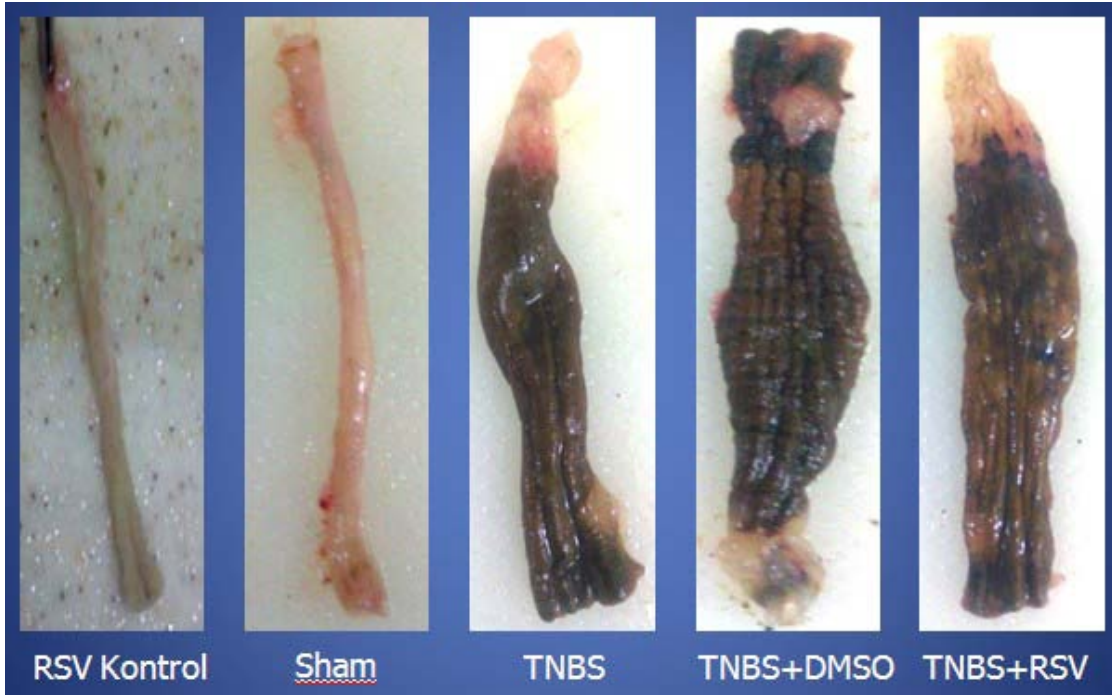
Doku CAT düzeyleri kontrol gruplarında en yüksek seviyede görüldü. En düşük seviyede ise TNBS ile kolit oluşturulmuş grupta izlendi. Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark gözlenmedi. RSV verilen gruptaki CAT düzeyleri, TNBS ve TNBS + DMSO gruplarındaki CAT düzeylerinden yüksekti.(Çizelge 3.1.1., Şekil 3.1.5.)



Şekil 3.1.5. Doku CAT aktivite düzeyleri

3.2. Makroskopik Skorlama

TNBS koliti oluşturulduktan 24 saat sonra açılan hayvanlarda kolon mukozasının makroskopik skorlaması Çizelge 2.3.'deki kriterlere göre yapıldı. Fakat tedavi ve DMSO grubuyla TNBS kolit grubu arasında makroskopik olarak bir fark görünmesine rağmen istatistiki olarak anlamlı fark belirlenemedi.(Çizelge 2.3., Şekil 3.2.)

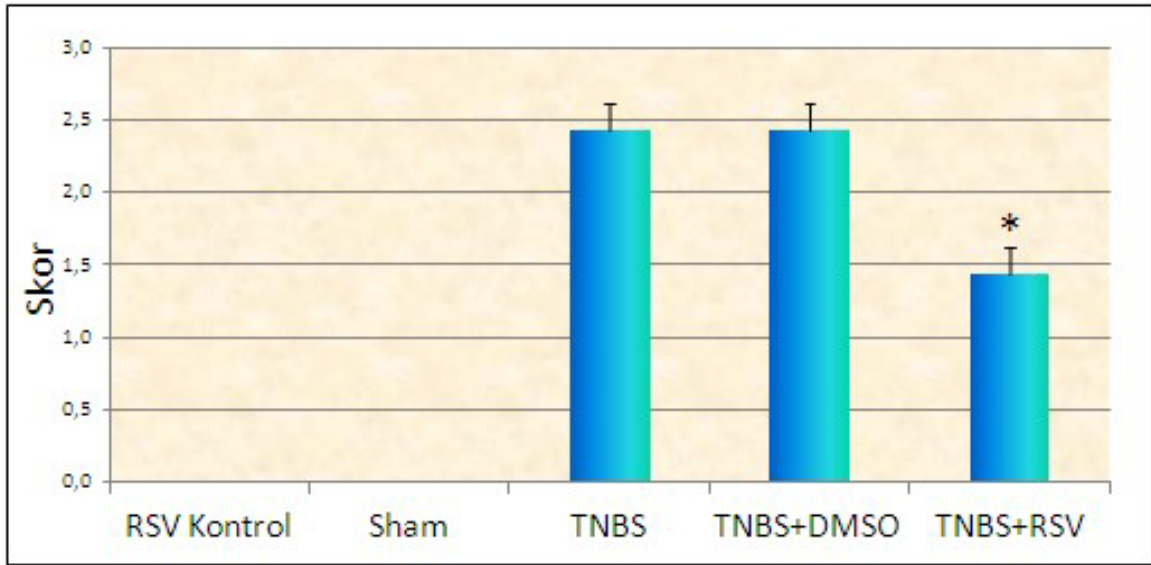


Şekil 3.2. Gruplara ait kolon segmentlerinin makroskopik görünüşleri

3.3. Histolojik Bulgular

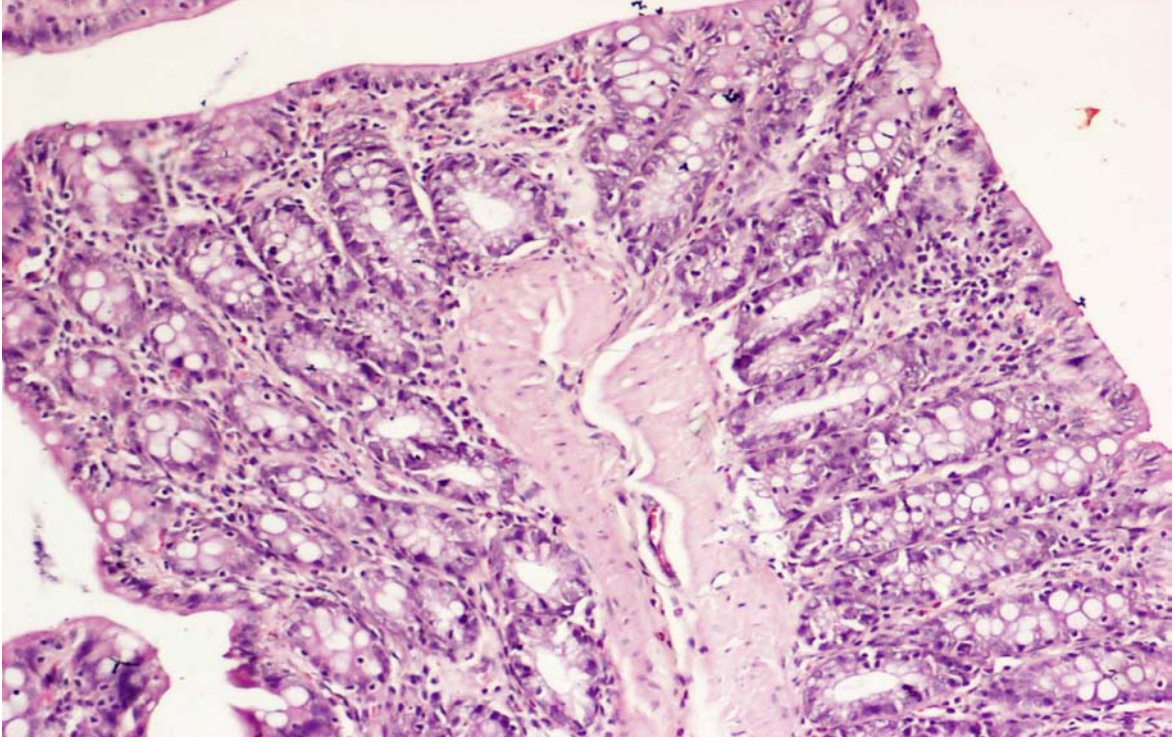
3.3.1 Histolojik (mikroskopik) Skorlama

Mikroskopik skorlama Çizelge 2.4.'de verilen kriterlere göre yapıldı. Şekil 11'de görülen histolojik skorlama sonucunda, profilaktif olarak RSV verilen grupta görülen doku hasarı ve nekrozun, TNBS kolit grubu ve DMSO kullanılan çözücü grubuna göre önemli düzeyde azaldığı tespit edildi

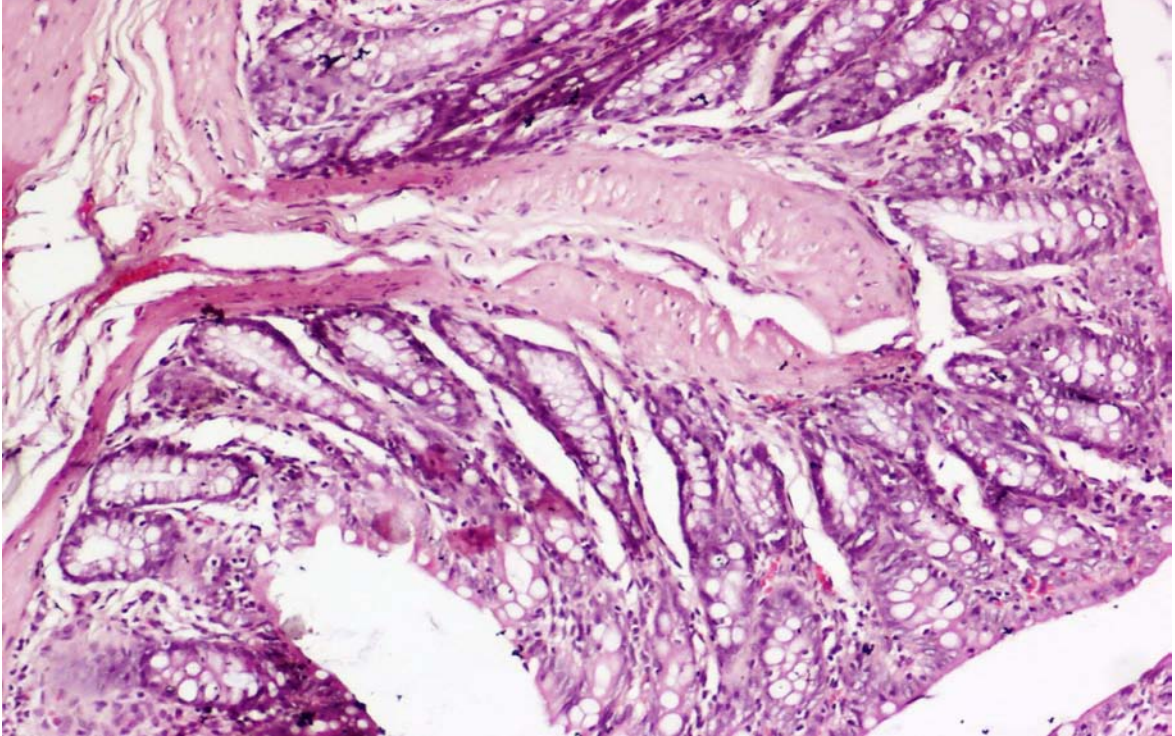


Şekil 3.3.1. Doku hasarı / Nekrozla ilgili mikroskopik skorların istatistiksel analizi

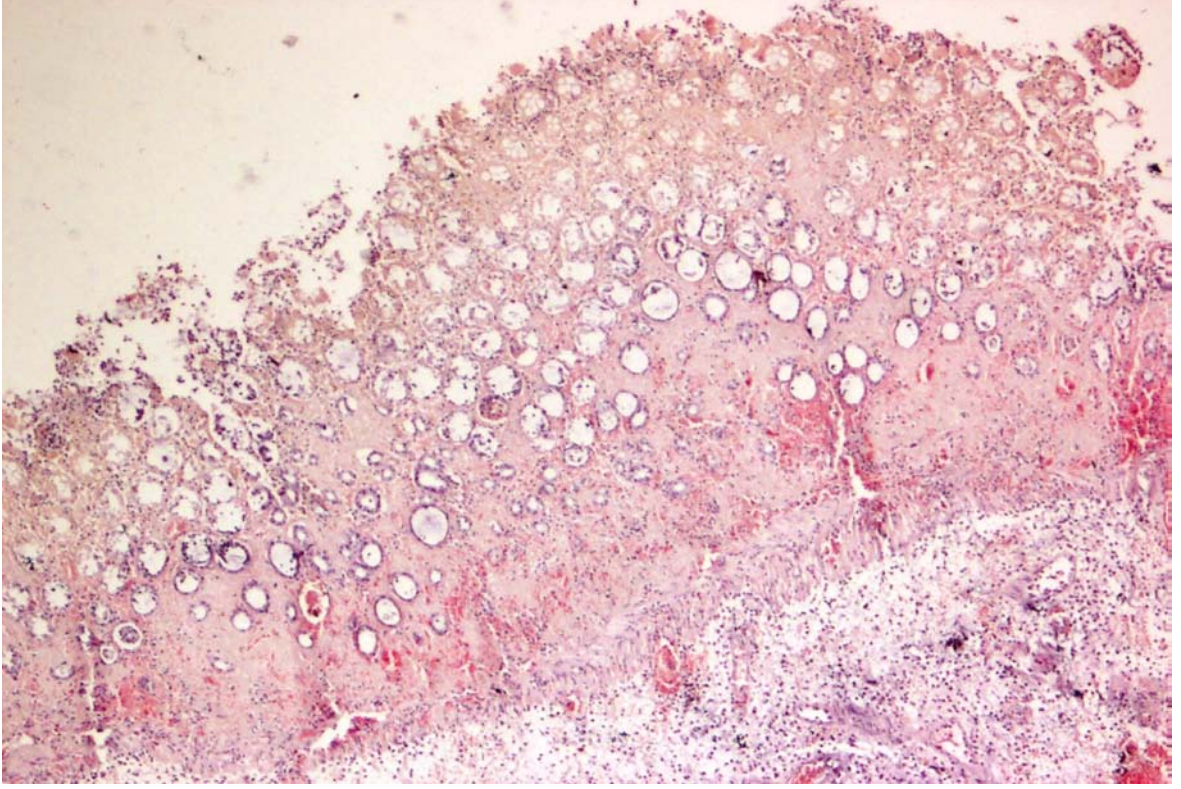
3.4. Histolojik Sonuçlar



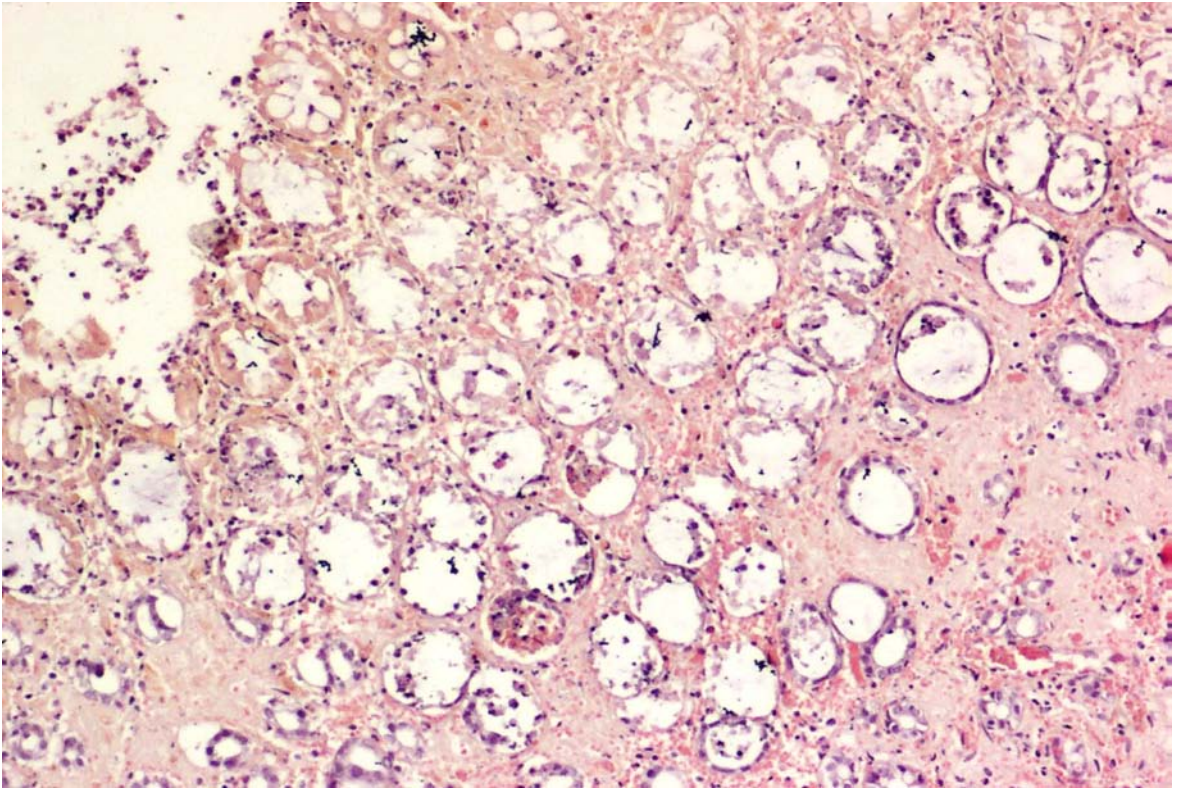
Resim 3.4.1. Kontrol grubunda kalın bağırsağın normal görünümü (H-E x 10).



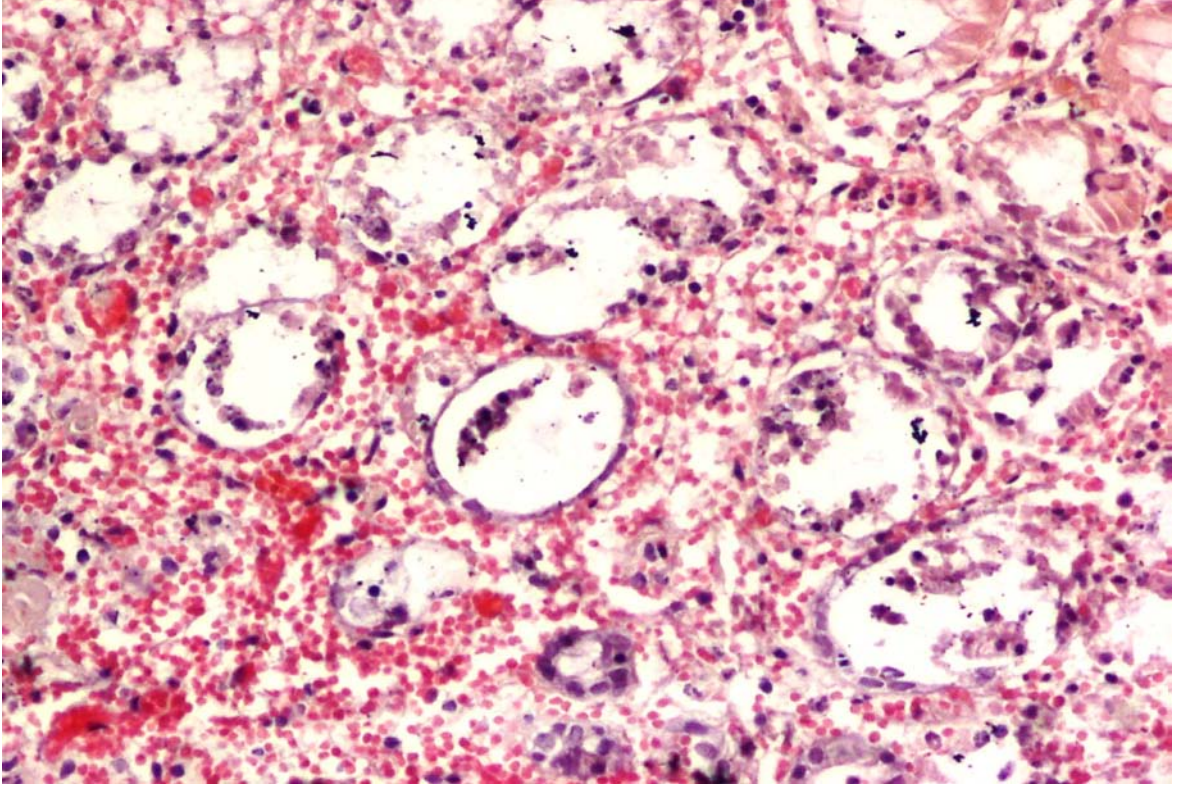
Resim 3.4.2. Sham grubunda kalın bağırsaktaki yapıların görünümü (H-E x 10).



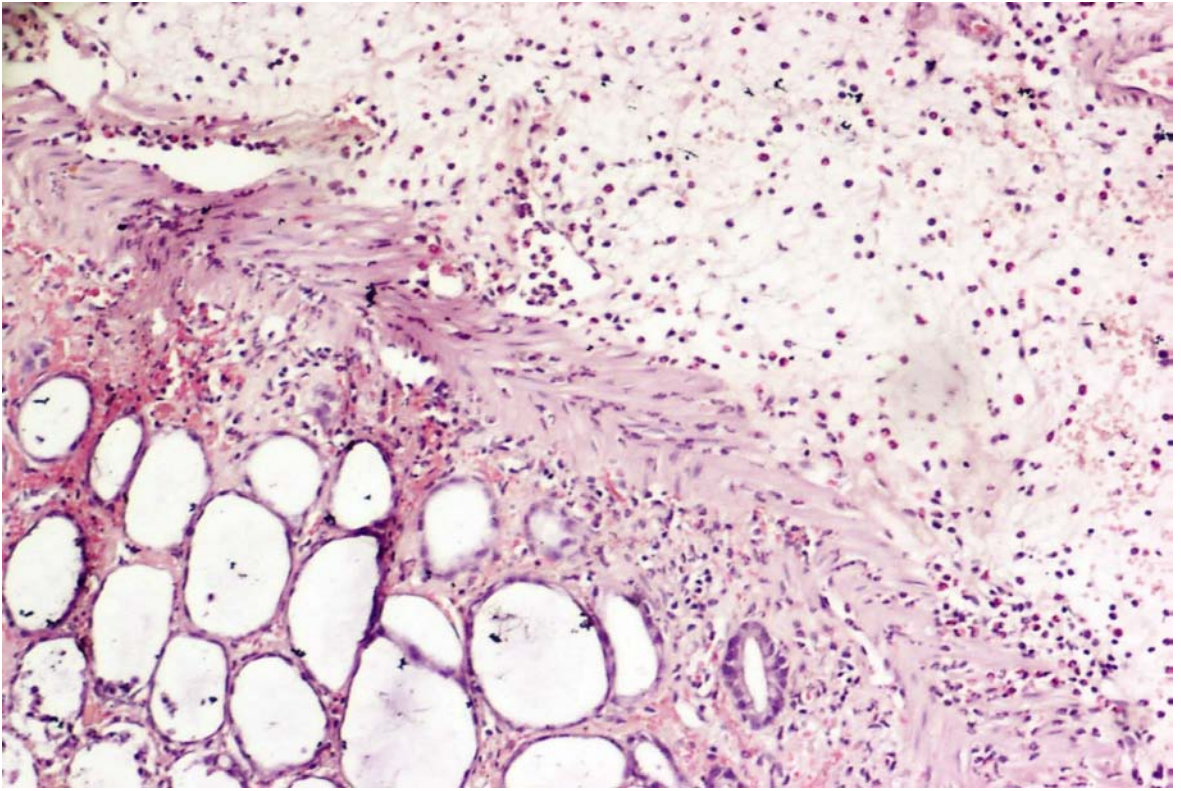
Resim 3.4.3. TNBS grubunda kalın bağırsakta oluşturulmuş hasarın görünümü (H-E x4).



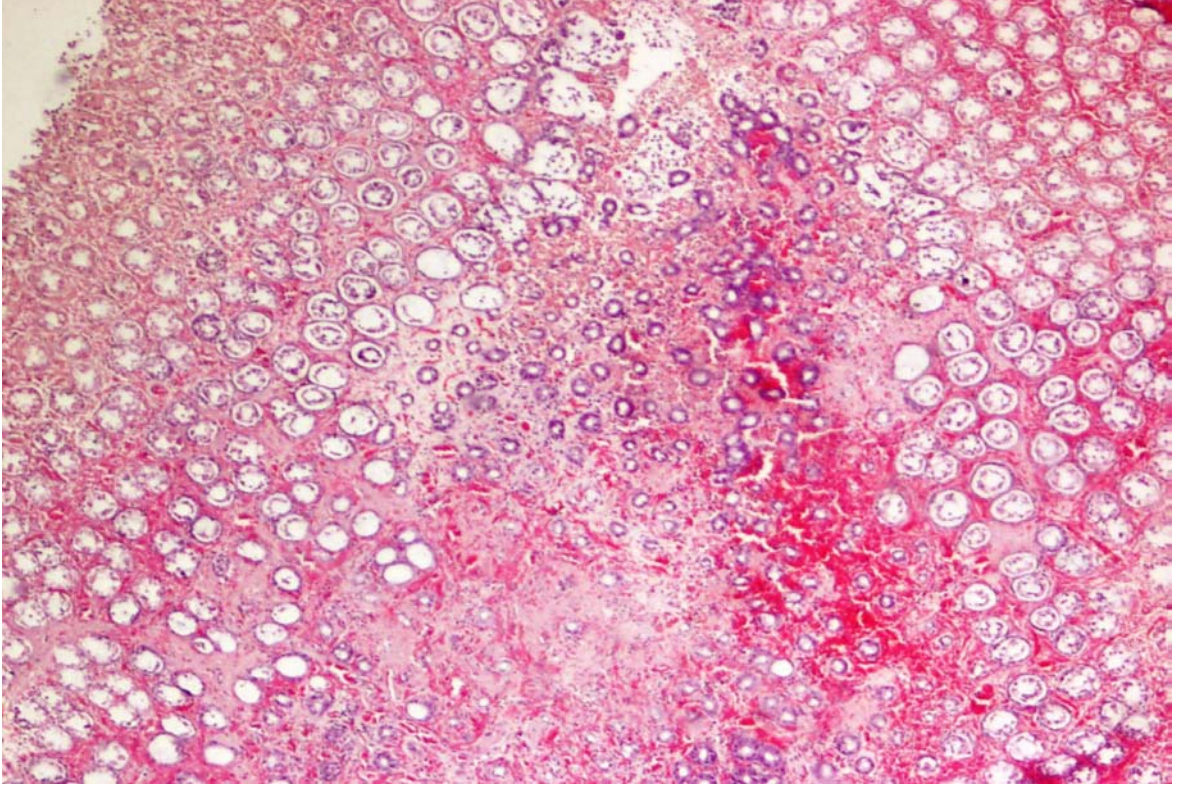
Resim 3.4.4 TNBS grubunda kalın bağırsakta kolit görünümü (H-E x 10).



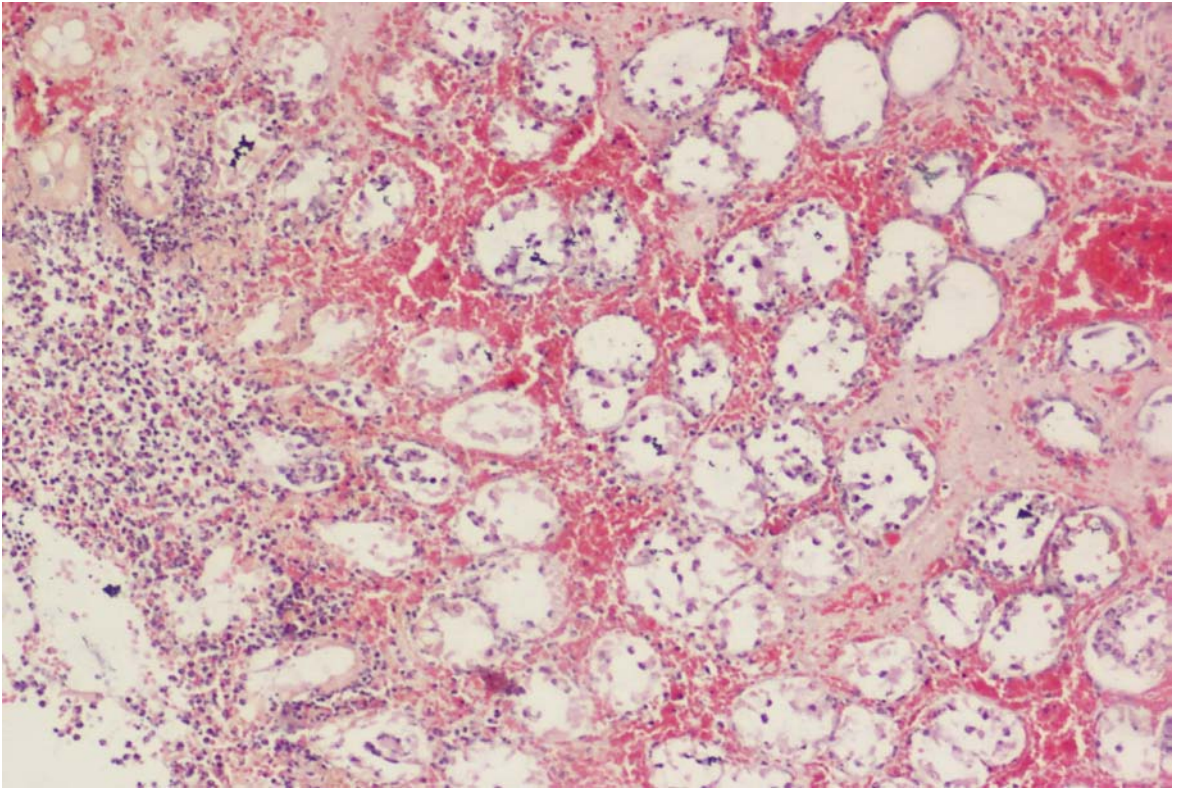
Resim 3.4.5. TNBS grubunda kalın bağırsakta mukozal hemoraji görünümü (H-E x20).



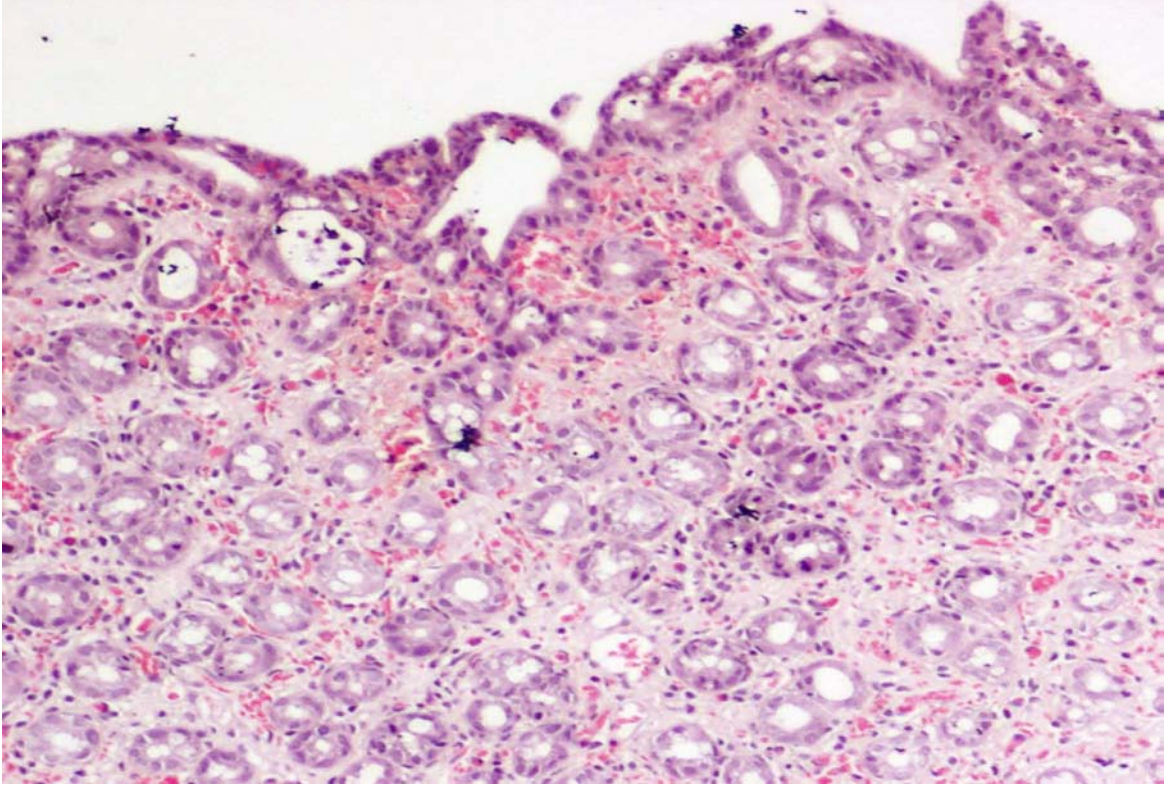
Resim 3.4.6. TNBS grubunda submukozal ödem görünümü (H-E x 10).



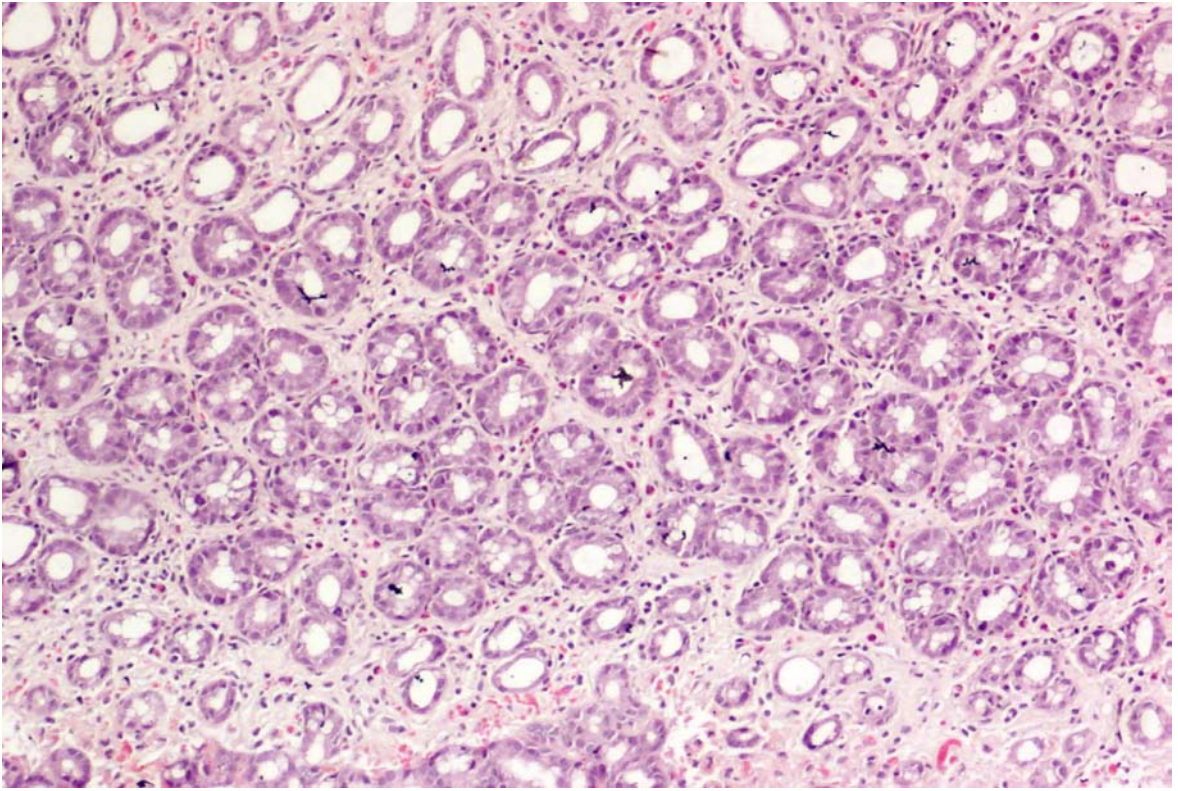
Resim 3.4.7. TNBS+ DMSO grubunda kolit görünümü (H-E x 4)



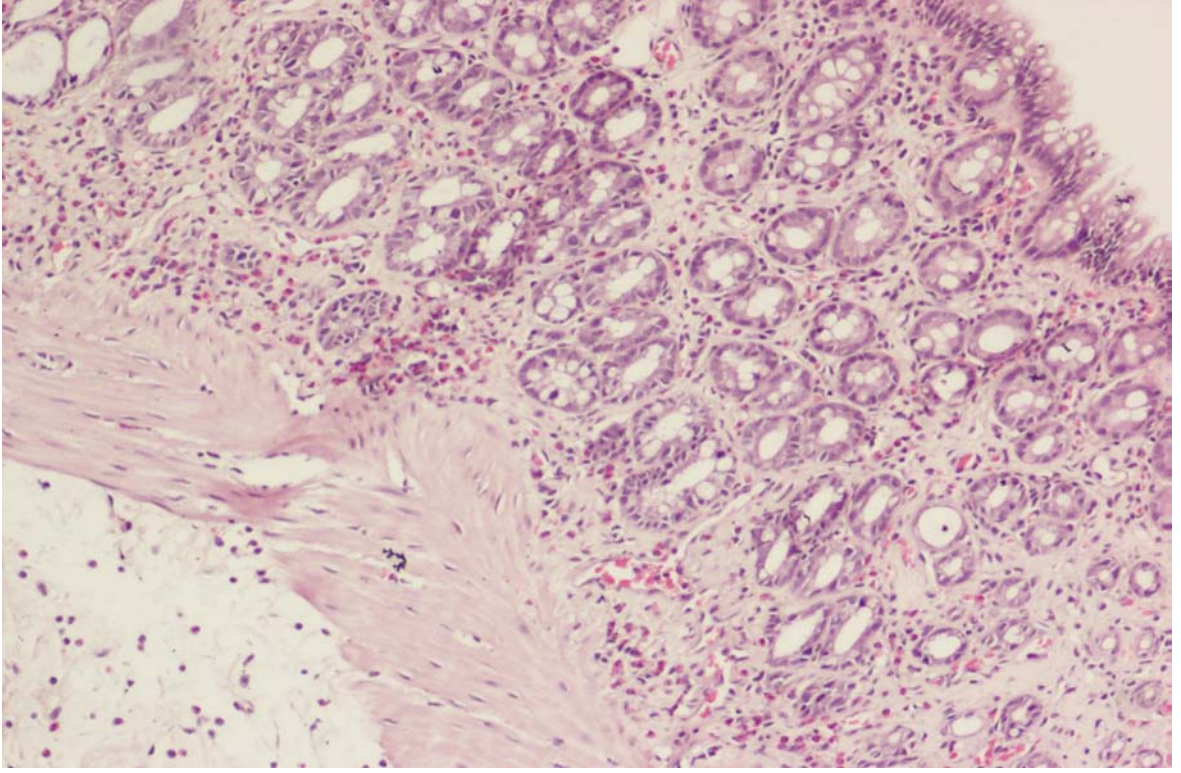
Resim 3.4.8. TNBS+DMSO grubunda inflamatuvar hücre infiltrasyonu (H-E x 10).



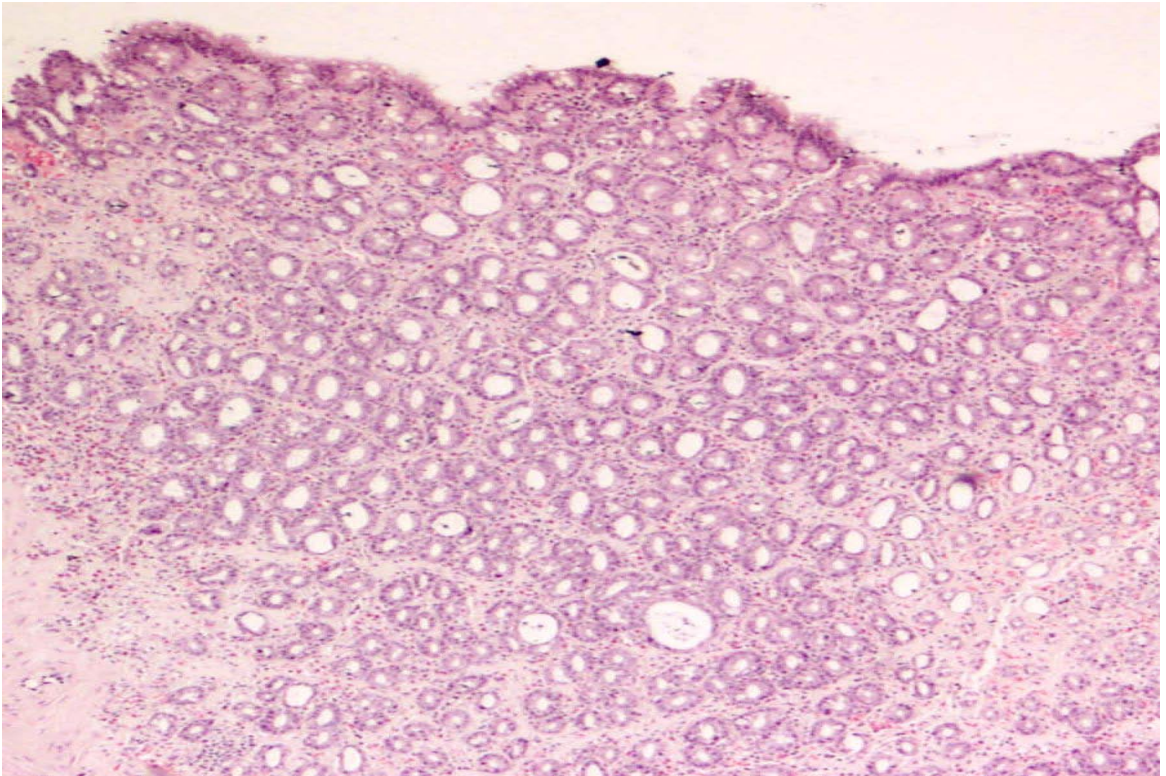
Resim 3.4.9. TNBS+ RSV grubunda kısmen etkilenmiş kalın barsak görünümü (H-Ex 10)



Resim 3.4.10. TNBS+ RSV grubunda mukoza görünümü (H-E x 10).



Resim 3.4.11. TNBS+ RSV grubunda kalın bağırsak görünümü (H-E x 10).



Resim 3.4.12. TNBS+RSV grubunda kısmen düzelmiş bulgular (H-E x 4).

4. TARTIŞMA

Ülseratif kolit ve Crohn Hastalığı, İBH'nin iki ana formudur. İBH, gelişmiş ülkelerde daha yaygındır ve patogenezi multifaktöryel olan bir hastalıktır. İlgili en erken faktörlerden biri, güncel araştırma ve tartışmaların da odağı olan, bilinmeyen mekanizmalarla intestinal epitelyal bariyerin yıkılmasıdır (Schmidt ve Stallmach 2005, Thompson-Chagoyan ve ark 2005). Daha sonra öne çıkan nokta ise, aktive olmuş nötrofiller, monositler ve makrofajlar aracılığıyla gerçekleştirilen ve artmış reaktif oksijen ve nitrojen türleri ile karakterize anormal immun ve inflamatuvar cevap meydana gelmesidir. İnterlökin (IL)-1, IL-6 ve tümör nekrozis faktör alfa (TNF- α) gibi değişik proinflamatuvar sitokinler, kemokinler ve adhezyon moleküllerinin İBH patogeneziye katkıda bulunduğu bilinmektedir (Sandborn ve Yednock 2003, Kurtovic ve Segal 2004).

Oksidatif stres, serbest radikal zincir reaksiyonları ve lipid peroksidasyonu intestinal mukozal bariyeri bozar. İ inflamatuvar mediatörler aktive olur ve bu da lipid peroksidasyonunun göstergesi olan MDA'nın kolonik düzeylerinde artma ile sonuçlanır. Bu durum insan ve hayvanlarda yapılmış çeşitli deneysel çalışmalarda gösterilmiştir (Verspaget ve ark 1988, Girgin ve ark 2000). İBH'li hastalarda bazı antioksidan ve antiinflamatuvar ajanların uygulandığı çeşitli çalışmalarda MDA düzeylerinin azaldığı bildirilmiştir (Kuralay ve ark 2003, Zhou ve ark 2006). Bizim çalışmamızda profilaktik olarak RSV uygulanmasının MDA düzeylerinde anlamlı derecede ($p < 0,01$) azalmaya neden olduğu belirlenmiştir (Şekil 3.1.2.). RSV verilen grupta doku MDA düzeyinin azalması TNBS ile oluşturulmuş kolitte RSV'nin lipid peroksidasyonunu engellediği sonucunu ortaya koymuştur.

Oksidan ve antioksidan sistem arasındaki denge İBH patogenezi ve özellikle doku hasarının ilerlemesi yönünden önemlidir. GSH-Px, SOD ve CAT gibi enzimatik antioksidanlar hücreleri oksidan hasardan koruyan savunma mekanizmalarıdır (Ek ve ark. 2008). Yaptığımız çalışmada GSH-Px düzeyleri tüm kolit oluşturulan gruplarda kontrol ve sham grubuna göre anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur. Profilaktik olarak RSV uygulanan grubun GSH-Px düzeylerinin diğer kolit gruplarından yüksek olduğu ($p < 0,001$) da saptanmıştır. Deneysel koşullarımızda antioksidan sistemin devrede olduğunu gösteren en iyi enzim GSH-Px olarak saptanmıştır. Benzer şekilde Tüzün ve ark (2002) deneysel olarak kolit oluşturdukları bir çalışmada doku GSH-Px düzeylerinin antioksidan grupta

daha yüksek olduğunu ve antioksidan kullanımının kolitte ortaya çıkan semptomların azalmasında etkili olabileceğini söylemişlerdir.

SOD, oksidatif strese karşı dokunun korunmasında en önemli antioksidan enzimlerden biridir. CAT enzimi de SOD ile katalizlenen reaksiyon sırasında açığa çıkan H_2O_2 yi detoksifike etmekten sorumlu bir diğer enzimdir (Ek ve ark. 2008). Dong ve ark (2003) asetik asit ile kolit oluşturdukları bir çalışmada doku SOD düzeylerinin azaldığını rapor etmişlerdir. Liu ve ark. (2003) TNBS ile oluşturulmuş deneysel kolitte SOD düzeylerinin azaldığını bildirmişlerdir. Tersine Kuralay ve ark (2003) asetik asit ile oluşturdukları kolit modelinde SOD düzeylerinin arttığını ve tedavi ile birlikte bu düzeylerin azaldığını ve CAT aktivitesinin kolit ile birlikte değişmediğini bildirmişlerdir. Araştırmacılar CAT düzeylerinde değişiklik saptanamayışının nedeninin muhtemelen H_2O_2 nin diğer hücrel antioksidan mekanizmalarla ortadan kaldırılması olduğunu söylemişlerdir. Benzer şekilde yaptığımız çalışmada da SOD düzeylerinin kolit oluşturulan gruplarda arttığı; CAT aktivitesinin ise etkilenmediği bulunmuştur. Çalışmamızda SOD düzeylerinin RSV tedavi grubunda diğer kolit gruplarına göre anlamlı düzeyde düşük ($p<0,01$) olduğu görülmüştür. Tedavi grubunda SOD düzeyinin düşük olması bu deney şartlarında RSV'nin antioksidan etkisinin olduğunun bir göstergesi olarak kabul edilmiştir (Şekil 3.1.3 ve 3.1.5). CAT düzeyinde değişiklik belirlenememesinin ise diğer hücrel antioksidan sistemlerin daha aktif çalışması nedeniyle olabileceği kanısına varılmıştır.

Bu çalışmada MPO düzeyine kolonik nötrofil aktivasyonu ve inflamasyonun göstergesi olarak bakılmıştır. Tüm kolit gruplarında MPO aktivitesinin anlamlı düzeyde arttığı belirlenmiştir. Benzer şekilde Sakr ve ark (2012) doku MPO düzeylerinin kolitle birlikte anlamlı düzeyde arttığını ve tedavi amaçlı polifenol verilen gruplarda azaldığını rapor etmişlerdir. Ek ve ark (2008) de kolit oluşturdukları ratlarda antioksidan ile tedavi verilen grubun MPO düzeylerinin azaldığını bildirmişlerdir. Ancak bizim bulgularımızda doku MPO düzeyi, tedavi (TNBS+RSV) grubunda diğer gruptakilere göre artış ($p<0.001$) göstermiştir (Şekil 3.1.1). MPO düzeyinin TNBS kolit grubunda en yüksek olması beklenirken, tedavi grubunda en yüksek olması, RSV'nin etkilerini göstermede, inflamasyon sonrası (post treatment) yolun daha etkili olmasına veya kullanılan dozun yetersiz olmasına bağlı olabileceği düşünülmüştür. Bu konuda, Fukuda ve ark (2006) benzer şekilde bir Japon ilacı Strong Wakamto'yu (WT), TNBS kolitinde %1 dozunda kullandıklarında tedavi grubu MPO düzeyinin TNBS kolit grubuna göre arttığını

gözlemlemişler ve ancak %5 gibi bir doz artırımına gittiklerinde MPO'da bir azalma elde etmişlerdir (Fukuda ve ark 2006). Dolayısıyla farklı dozlarda ya da doz artırılarak yapılacak yeni çalışmalarda RSV'nin MPO düzeyi üzerine benzer etki gösterebileceği düşünülebilir. Sonuç olarak RSV uygulanan grupta MPO düzeylerinde görülen artışın nedenin temelinde ilacın verilme yolu farklılığı (intragastrik yerine intraperitoneal verilmesi), ilacın verildiği zaman dilimi farklılığı (tamamen profilaktik olarak) ile kullanılan dozun yetersizliğinden olabileceği düşünülmüştür.

Yaptığımız çalışmada plazma MPO düzeylerinin tüm kolit oluşturulan gruplarda kontrol ve sham grubuna göre istatistiksel olarak önemli ($p < 0,01$) düzeyde arttığı bulunmuştur. Profilaktik olarak RSV verilen grubun MPO düzeyinin ise diğer kolit gruplarından farklı olmadığı belirlenmiştir. Benzer şekilde Mäkitalo ve ark (2012) pediatrik İBH'li hastalarda plazma MPO düzeylerinin sağlıklı kontrollerden yüksek olduğunu rapor etmiştir. Grulke ve ark (2008) gastrointestinal rahatsızlıkları (İBH veya peritonitis) belirlenen atlarda plazma MPO düzeylerinin sağlıklı kontrollerden anlamlı düzeyde yüksek olduğunu bildirmişlerdir. En şiddetli artışın ise İBH'li hayvanlarda olduğu görülmüştür. MPO düzeylerindeki artışın nedeni, kolite bağlı gelişen aşırı nötrofil aktivasyonu, ve degranülasyonu olarak açıklanmıştır. Bu çalışmada da benzer bulgular elde edilmiştir. Plazma MPO düzeyleri ile hastalığın veya ortaya çıkan hasarın şiddeti arasında ilişki olduğu daha önceki yayınlarda bildirilmiştir (Grulke ve ark 2008). Dolayısıyla profilaktik olarak RSV verilen grupta MPO düzeyinin diğer kolitli gruplardan farklı olmasının nedeninin ise RSV tedavi grubunda kolonda değişen nötrofil aktivasyonunun ve MPO seviyesinin artışının dolaşıma yansımamış olması nedeniyle olduğu kanısına varıldı.

Yaptığımız çalışmada serum MDA düzeylerinin gruplar arası farklı olmadığı belirlenmiştir. Benzer şekilde Tüzün ve ark (2002) ve Alzoghaybi ve ark (2007) İBH'li hastalarda serum MDA düzeylerinin kontrol grubundan farklı olmadığını rapor etmişlerdir. Kan MDA seviyelerinde değişiklik oluşmamasının sebebinin farklı deneysel çalışmalarda oluşan İBH'nin etkilerinin mukozal antioksidan kapasiteye bağlı olarak farklı şekillerde ortaya çıkabileceği ve doku MDA düzeylerindeki değişikliğin kan MDA düzeylerine yansımamış olabileceği kanısına varılmıştır.

Bu çalışmada TNBS ile kolit oluşturulan tüm deneme gruplarında belirgin makroskobik değişiklikler saptanmasına rağmen yapılan istatistiki değerlendirmede anlamlı bir farka rastlanmamıştır (Şekil 3.2.). TNBS koliti konusunda Jurjus ve ark (2004), mukozal bariyerin etanol ile ortadan kaldırıldığını ve sonrasında doza bağımlı olarak ülserasyon ve inflamasyon geliştiğini ileri sürmüştür. Zhou ve ark da (2006) ülserasyon ve barsak duvarında kalınlaşmanın yaklaşık 8 hafta kadar devam ettiğini bildirmiştir. Bu nedenle TNBS koliti, kronik kolit için uygun bir modeldir. Fakat akut inflamasyon için de kullanılmıştır (Marti'n ve ark 2004). Yaptığımız çalışmada makroskobik skorlamada istatistiki olarak anlamlı fark belirlenmemesinin nedenin, mikroskopide görülen iyileşme sürecinin 5 günlük süre içinde makroskopiye yansımaması ve bunun için daha uzun bir süreye gerek olmasından kaynaklanabileceği düşünülmüştür (Şekil 3.2.).

Bu çalışmada TNBS ile kolit oluşturulan 3 grupta mikroskobik olarak doku hasarı ve nekroz skorunun RSV kontrol ve Sham grubuna göre istatistiki olarak yüksek olduğu belirlenmiştir (Şekil 3.3.1). Kolitli grupların barsak dokusu histolojik preparatlarında mukozada ödem, yüzey epitel hücrelerinin kaybı, ülserasyonlar, kanama odakları, lamina propriyada yaygın polimorfonükleer lökosit (PMNL) infiltrasyonu ve kript abseleri dikkati çekmiştir. (Resim 3.4.3-10). Benzer şekilde, TNBS kolit modeli kullanılarak yapılmış çeşitli çalışmalarda, histolojik olarak mukoza ve submukozada PMNL, makrofaj, lenfosit, bağ dokusu, mast hücreleri ve fibroblastlardan oluşmuş inflamatuvar cevabın olduğu bildirilmiştir. TNBS kolit modelinde mukozal ödem, kanama odakları, segmental ülserasyon ve nekrotik alanlar yaygın olarak görülmektedir (Zhou ve ark 2006, Morris ve ark 1989). Yaptığımız çalışmada profilaktik amaçlı RSV uygulanmış ve TNBS ile kolit oluşturulmuş grupta mikroskobik olarak diğer iki gruba göre inflamasyonun daha sınırlı olduğu, PMNL'lerin daha az oranda bulunduğu ve hücrelerin doğal konfigürasyonlarını koruduğu gözlenmiştir. Çalışmamız histoloji sonuçlarında görülen RSV'nin koliti baskılayıcı etkisi (Şekil 3.3.1 ve Resim 3.4.1-12), antioksidan etkinin yanında çok kuvvetli olasılıkla antiinflamatuvar etkiye bağlıdır. Bu antiinflamatuvar etki, MPO üzerinden olduğu kadar, makrofajlardan salınan IL-1, IL-6, TNF- α gibi sitokinlerin inhibisyonu, prostaglandin üretimi ve COX inhibisyonu, iNOS ekspresyonu ve onu takip eden NO üretimi inhibisyonu ile apoptosis gibi çok değişik yollar üzerinden de meydana gelebilir. Profilaktik RSV'nin faydalı etkileri mikrofloranın dengelenmesi, barsak makrofajlarında immunomodülatör etkiler ve kolon dokusunda antioksidan aktivitenin artırılması gibi etkilerin kombinasyonundan da kaynaklanabilir (Fukuda ve ark 2006).

Son yıllarda çeşitli çalışmalar, RSV'nin güçlü antioksidan ve anti-inflamatuar etki ortaya koyduğunu göstermiştir (Manna ve ark 2000, Surh ve ark 2001). Ayrıca nöro (Han ve ark 2004) ve kardiyoprotektif (Hung ve ark 2000) bir ajan olduğu da bildirilmiştir. Bileşiğin lipid peroksit üretiminde (lipid oksidasyonu) güçlü bir inhibitör etki gösterdiği ve lipoprotein metabolizmasını modüle ettiği de gösterilmiştir (Belguendouz ve ark 1998). TNBS kolitinde RSV'nin etkisi, Martı'n ve ark tarafından (2004, 2006) hem akut ve hem de kronik kolonik inflamasyonda çalışılmış ve TNBS kolitine karşı son derece koruyucu olduğu gösterilmiştir. Martı'n ve ark (2004), akut inflamasyon çalışmalarında RSV'yi, kolitten 48, 24 ve 1 saat önce ile kolitten 24 saat sonra 10 mg/kg dozunda intragastrik (i.g.) olarak verirken, kronik inflamasyon çalışmalarında (2006) ise tamamı kolit sonrası ve günde tek doz olarak 14 gün boyunca i.g. olarak vermişlerdir. Bu çalışmada ise RSV aynı dozda kolitten 96, 72, 24 ve 1 saat önce yani tamamı profilaktik olarak intraperitoneal (i.p.) olarak verilmiştir. Martı'n ve ark (2004, 2006) tarafından yapılan iki çalışmada, RSV'nin TNBS ile yapılan deneysel kolitte etkili olduğu kesin bir şekilde gösterilmiştir. Akut dönemdeki deney kurgusu, kolitin hem önce ve hem de sonrasını kapsamaktadır. Bu çalışmanın kolitten önceki kısmı, çalışmamız kurgusuna çok benzemekte ve sadece 48 saat kadar öncesine uzanma ve kolit sonrası 24 saatlik dönemi de kapsaması ile farklılık arz etmektedir. Ayrıca her iki çalışmanın da incelediği parametreler çok fazla olduğu için bu araştırma grubu literatürde RSV için bahsedilen etkilerin çoğunun kolit için de geçerli olduğunu göstermiştir.

İBH üzerine yapılan çalışmalardan elde edilen sonuçlar, İBH temelindeki mekanizmaların tahmin edilenlerden daha karmaşık olduğunu göstermektedir (Mizoguchi ve Mizoguchi 2010). İBH'de bir molekülün rolü, ilgili hücre tipi, hedeflenen doku ve maruz kalınan çevre şartları gibi çeşitli faktörlere bağlı olarak farklılık arz eder. Bu yüzden gelecekte İBH'li hastaların yaşamlarını daha etkili ve güvenli iyileştirebilmek için, genetiği değiştirilmiş laktik asid bakterileri (Kelsall 2009), nanopartiküller (Peer ve ark 2008), kolonoskopi rehberli gen tedavisi veya kapsül endoskopi aracılı gen tedavisi (Sugimoto ve ark 2008) gibi hücre spesifik, doku spesifik veya bireye özgü tedaviler gerekli olabilir (Mizoguchi ve ark 2010).

5. SONUÇ

Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar doğrultusunda, profilaktik olarak kullanılan RSV'nin kolit üzerinde antioksidan etkisi olduğu söylenebilir. RSV'nin kolitteki anti-inflamatuar etkisi de bu konuda yapılmış benzer çalışmalardaki sonuçlardan hareketle kuvvetle muhtemeldir. Fakat histoloji sonuçlarına dayanarak, hangi mekanizma ile olursa olsun profilaktik RSV'nin de kolit üzerinde, inflamasyon sonrası tedavilerdeki gibi etkili olduğu ortaya konmuştur.

Bu özellikleri ile RSV, gelecekte İBH tedavisinde geliştirilecek olan hücreye, dokuya veya bireye özgü tedavilerde, bu tedavilere katkıda bulunan tamamlayıcı terapötik bir ajan olarak kullanılabilir.

ÖZET

Yıldız G. TNBS ile Oluşturulan Deneysel Kolit Modelinde Resveratrol'ün Antioksidan Metabolizmaya Etkileri

Bu çalışmada antiinflamatuvar ve antioksidan özellikleri gösterilmiş olan RSV'nin TNBS koliti üzerindeki etkileri, kolitten önce verilerek araştırıldı. Araştırmada, 35 adet erkek Wistar-Albino rat, RSV Kontrol, Sham, TNBS Kolit, TNBS + DMSO ve TNBS+RSV olarak 5 gruba bölündü. Kolit uygulanmasından önce, tedavi ve çözücü grubu hayvanlar 5 gün boyunca sırasıyla RSV (10 mg/kg/gün), DMSO ile tedavi edildi. Kolit, 24 saat aç bırakılmış ve barsakları boşaltılmış ratlara, bir kanülle anal orifisten 8 cm içeriye %37 alkolde çözülmüş TNBS verilmesiyle gerçekleştirildi. Kolitten 24 saat sonra hayvanlar sakrifiye edilip 10 cm'lik kolon segmenti çıkartıldı. Longitudinal olarak ikiye ayrılan kolon segmentleri biyokimyasal ve histopatolojik incelemeye tabi tutuldu. Sonuçların istatistiksel analizi SPSS programı kullanılarak yapıldı.

TNBS ve TNBS+DMSO gruplarının MDA seviyeleri Drug ve Sham kontrol gruplarından yüksekti ($p<0.01$). RSV tedavisi, MDA seviyelerini TNBS grubuna göre azalttı ($p<0.01$). Yine RSV tedavi grubunda, GSH-Px aktivitesi tüm diğer gruplara göre artarken ($p<0.001$), CAT aktivitesi de TNBS ve TNBS+DMSO gruplarına göre arttı. Fakat CAT'deki bu artış, anlamlı düzeyde değildi ($p>0.05$). TNBS ve TNBS+DMSO gruplarının doku MPO aktiviteleri Drug ve Sham kontrol gruplarından yüksek iken, tedavi grubunda ise tüm gruplara göre anlamlı derecede yüksekti ($p<0.001$). Histopatolojik incelemede doku hasarı ve nekroz tedavi grubunda, kolit ve çözücü kontrol grubuna göre belirgin şekilde azaldı ($p<0.05$).

Çalışmamızda profilaktik RSV'nin kolit üzerinde antioksidan etkili olduğu görülmüştür. Bununla birlikte, deney şartlarımızda MPO üzerinden anti-inflamatuvar etkinin olmaması, RSV'nin etkilerini göstermede, inflamasyon sonrası yolun daha etkili olmasına veya kullanılan dozun yetersiz olmasına bağlı olabilir.

Anahtar Kelimeler: Resveratrol, TNBS, Kolit, antioksidan, antiinflamatuvar

SUMMARY

Yıldız G. The Effects of Resveratrol Over Antioxiant Metabolism on TNBS-Induced Experimental Colitis

In this study, the effects of prophylactic resveratrol on TNBS induced colitis were investigated, which has anti-inflammatory and antioxidant effects. Thirty-five Wistar-Albino male rats were divided into 5 groups: Drug Control, Sham Control, TNBS, TNBS+DMSO (Vehicle Control) and TNBS+RSV (n=7). Before induction of colitis, animals in vehicle and treatment groups were treated intraperitoneally by Dimethyl sulfate (DMSO) and Resveratrol (RSV) (10 mg/kg/day) respectively.

After fasting the animals overnight and emptying the colons on the morning of experiment, inflammation was induced in the colon by the intrarectal administration of 0,8 ml of a 25-mg TNBS solution dissolved in 37% ethanol in saline using an 8-cm-long cannula under ether anesthesia. Animals were sacrificed by toxic dose ether 24 hours following induction of colitis. After decapitation, the last 10 cm of the colon was excised, opened longitudinally. Longitudinal colon segments were subjected to biochemical and histopathological examination. Statistical analyses of data were carried out using the SPSS program.

MDA levels of TNBS and TNBS+DMSO groups were higher than Drug and Sham control groups ($p<0.01$). RSV treatment decreased MDA levels compared to TNBS group ($p<0.01$). GSH-Px activity in treatment group were higher than all other groups ($p<0.001$). CAT activity in treatment group was also higher compared to TNBS and TNBS+DMSO groups. However, this increase in CAT was not significant ($p>0.05$). While MPO activities of TNBS and TNBS+DMSO groups were higher than Drug and Sham Controls, there was no decrease in MPO activity in TNBS+RSV group by RSV treatment. In histological examination, tissue injury and necrosis was significantly decreased in the treatment group compared to TNBS colitis and vehicle group ($p<0.05$).

In Conclusion, it has been observed that prophylactic RSV has antioxidant activity on TNBS colitis. However, failure of anti-inflammatory effects through MPO activity could be due to that RSV dose is lower or that post treatment way is much effective than pretreatment way.

Keywords: Resveratrol, TNBS, Colitis, antioxidant, anti-inflammatory.

KAYNAKLAR

1. Abraham C, Cho JH. Inflammatory bowel disease. *The New England Journal of Medicine* 2009; 361:2066–2078.
2. Aebi H. Catalase in vitro. *Methods in Enzymology* 1984; 105:121-6.
3. Agar NS, Sadrzadeh SM, Hallaway PE, Eaton JW. Erythrocyte catalase. A somatic oxidant defense? *The Journal of Clinical Investigation* 1986; 77:319-321.
4. Akkuş İ. Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri. Konya: Mimoza Yayınları; 1995. p.1-132.
5. Aktan ÖA, Yalçın SA. Ischemia-reperfusion injury, reactive oxygen metabolites and the surgeon. *Turkish Journal of Medical Sciences* 1998; 28:1-5
6. Akyol Ö. Beyin tümörlerinde doku superoksit dismutaz, katalaz ve glutatyon peroksidaz aktiviteleri. Uzmanlık Tezi. Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye. 1994.
7. Alzoghaibi MA, Al Mofleh IA, Al-Jebreen AM. Lipid peroxides in patients with inflammatory bowel disease. *Saudi Journal of Gastroenterology* 2007; 13(4):187-190
8. Ames BN, Shigenaga MK, Hagen TM Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1993; 90(17):7915-22.
9. Angel MF, RamasastrySS, Swartz WM, Basford RE and Putreli JE. Free radicals: Basic concepts concerning their chemistry, pathophysiology and relevance to plastic surgery. *PlasticReconstructive Surgery* 1987; 79: 990-997.
10. Anonim 2012. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Inflammatory Bowel Disease (IBD). National Center for Chronic Disease Prevention and Health Promotion, Atlanta, GA, USA. <http://www.cdc.gov/ibd/>. Page last reviewed: May 1, 2012.

11. Atten MJ, Atar BM, Milson T, Holian O. Resveratrol-induced inactivation of human gastric adenocarcinoma cells through a protein kinase C-mediated mechanism. *Biochemical Pharmacology* 2001; 62:1423–1432.
12. Baxter RA. Anti-aging properties of resveratrol: review and report of a potent new antioxidant skin care formulation. *Journal of Cosmetic Dermatology* 2008;7: 2–7.
13. Belguendouz L, Fremont L, Gozzelino MT. Interaction of trans resveratrol with plasma lipoproteins. *Biochemical Pharmacology* 1998; 55(6): 811- 816.
14. Bernstein CN, Kraut A, Blanchard JF, Rawsthorne P, Yu N, Walld R. The relationship between inflammatory bowel disease and socioeconomic variables. *American Journal Gastroenterology* 2001; 96(7):2117–25.
15. Bertelli AAE, Giovannini DE, Caterina RL, Bernini W, Migliori M, Fregoni M. et al, Antiplatelet activity of cis-resveratrol. *Drugs under Experimental and Clinical Research* 1996; 22: 61–63.
16. Bishayee A, Darvesh AS, Politis T, McGory R. Resveratrol and liver disease: from bench to bedside and community. *Liver International* 2010; 30 (8): 1103-1114.
17. Bishayee A. Cancer prevention and treatment with resveratrol: from rodent studies to clinical trials. *Cancer Prevention Research* 2009; 2: 409-418.
18. Borm MEA, Bouma G. Animal models of inflammatory bowel disease. *Drug Discovery Today: Disease Models*. 2004; 1 (4): 373-464.
19. Bradamante S, Barengi L, Villa A. Cardiovascular protective effects of resveratrol. *Cardiovascular Drug Reviews* 2004; 22(3):169-188.
20. Burns J, Yokota T, Ashihara H, Lean ME, Crozier A. Plant foods and herbal sources of resveratrol. *Journal of Agricultural Food and Chemistry* 2002; 50(11):3337-3340.
21. Buset M, Lipkin M, Winawer S, Swaroop S, Friedman E. Inhibition of human colonic epithelial cell proliferation in vivo and in vitro by calcium. *Cancer Research* 1986; 46 (10): 5426-30
22. Canturk NZ, Sayek I. *Cerrahi Araştırma Kitabı. Nobel Kitabevi; 2005.*

23. Carter L, Wallace JL. Alterations in rat peripheral blood neutrophils function as a consequence of colitis. *Dig Dis Sci* 1995; 40: 192-197
24. Ceyhan A, Günal S, Çıkan T, Bababalım M, Ünal N. Serbest radikaller ve anestezi. *Sendrom Dergisi* 1996; 12: 65-69.
25. Chance B, Sies H, Boveris A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiological Reviews* 1979; 59:527-605.
26. Chanvitagapongs S, Draesynska-Lwiak B, Sun A. Amelioration of oxidative stress by antioxidants and resveratrol in PC12 cells. *Neuro Report* 1997; 8: 1499–1502.
27. Chun YJ, Kim MY, Geungerich FP. Resveratrol Is a Selective Human Cytochrome P450 1A1 Inhibitor. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1999; 262(1):20 -24.
28. Cotran RS, Kumar V, Robbins SL. Cellular injury and cellular death. In: Schoen FJ (ed), *Pathologic basis of disease*. 5thEd. London: WB Saunders; 1994. p. 1-34.
29. Creasey LL, Coffee M. Phytoalexin production potential of grape berries. *Journal of American Society for Horticultural Science* 1988; 113(2): 230-234.
30. Das S, Alagappan VKT, Bagchi D, Sharma HS, Maulik N, Das DK .Coordinated induction of iNOS-VEGF-KDR-eNOS after resveratrol consumption. A potential mechanism for resveratrol preconditioning of the heart, *Vascular Pharmacology* 2005; 42: 281–289.
31. Dong WG, Liu SP, Yu BP, Wu DF, Luo HS, Yu JP. Ameliorative effects of sodium ferulate on experimental colitis and their mechanisms in rats. *World Journal of gastroenterology* 2003; 9: 2533-2538
32. Dröge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological Reviews* 2002;82: 47–95.
33. Ek RO, Serter M, Ergin K, Yildiz Y, Cecen S, Kavak T, Yenisey C. The Effects of Caffeic Acid Phenethyl Ester (CAPE) on TNBS-induced Colitis in Ovariectomized Rats. *Digestive Disease and Sciences* 2008; 53: 1609–1617.

34. El-Mowafy AM, Alkhalaf M. Resveratrol activates adenylyl-cyclase in human breastcancer cells: a novel, estrogen receptor-independent cytostatic mechanism. *Carcinogenesis* 2003; 24(5): 869-873.
35. Esterbauer H, Zollner H, Schaur RJ. Hydroxyalkenals: cytotoxic products of lipid peroxidation. *Institute for Scientific Information (ISI) Atlas of Science* 1988; 1:311-317
36. Esterbauer H, Cheeseman K. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde on related aldehydes. *Free Radical Biology and Medicine* 1991; 11:81-128
37. Fan C, Zwacka RM, Engelhardt JF. Therapeutic approaches for ischemia/reperfusion injury in the liver. *Journal of Molecular Medicine* 1999; 77: 577-592.
38. Feldman M, Friedman LS, Brandt LJ. Sleisenger and Fordtran's *Gastrointestinal and Liver Disease: Pathophysiology, Diagnosis, and Management*. 8thEd. Philadelphia: Publisher Saunders an imprint of Elsevier; 2006.
39. Fogh, J, Wright WC, Loveless JD. Absence of HeLa cell contamination in 169 cell lines derived from human tumors. *Journal of the National Cancer Institute* 1977; 58: 209–214.
40. Frankel EN, Waterhouse AL, Kinsella JE. Inhibition of human LDL oxidation by resveratrol. *Lancet* 1993;341: 1103–1104.
41. Freeman BA, Crapo TD. Biology of disease free radicals and tissue injury. *Laboratory Investigation* 1982; 47(5): 412-25.
42. Frei B. Reactive oxygen species and antioxidant vitamins: mechanisms of action. *The American Journal of Medicine*. 1994; 97(3A):5S-13S; discussion 22S-28S.
43. Fridovich I. The biology of oxygen radicals. *Science* 1978; 201: 875-879.
44. Fukuda Y, Tao Y, Tomita T, Hori K, Fukunaga K, Noguchi T, Hayashi T, Shimoyama T, Takahashi R. A traditional Japanese medicine mitigates TNBS-induced colitis in rats. *Scandinavian Journal of Gastroenterology* 2006; 41: 1183-1189.

45. Gagliano N, Aldini G, Colombo G, Rossi R, Colombo R, Gioia M, Milzani A, Dalle-Donne I. The potential of resveratrol against human gliomas. *Anti-Cancer Drugs*. 2010; 21: 140-150.
46. Giovannini L, Migliori M, Longoni BM, Das DK, Bertelli AA, Panichi V, Filippi C, Bertelli A. Resveratrol, a polyphenol found in wine, reduces ischemia reperfusion injury in rat kidneys. *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 2001; 37: 262–270.
47. Girgin F, Karaoğlu O, Erkus M, Tüzün S, Özütemiz O, Dinçer C, Batur Y, Tanyalçın T. Effects of trimetazidine on oxidant / antioxidant status in trinitrobenzenesulfonik acid-induced chronic colitis. *Journal of Toxicology Environmental Health Part A* 2000; 59: 641-652.
48. Goldberg DM, Yan J, Soleas GJ. Absorption of three wine-related polyphenols in three different matrices by healthy subjects. *Clinical Biochemistry* 2003; 36(1):79-87.
49. Goth L. A simple method for determination of serum catalase activity and revision of reference range. *Clinica chimica Acta*, 1991, 196: 143-152.
50. González R, Rodríguez S, Romay C, Ancheta O, González A, Armesto J, Ramirez D, Merino N. Anti-inflammatory activity of phycocyanin extract in acetic acid-induced colitis in rats. *Pharmacological Research* 1999; 39: 55-59
51. Grace PA. Ischaemia-reperfusion injury. *The British Journal of Surgery* 1994;81(5):637-47.
52. Greenwald RA. Oxygen radicals, inflammation, and arthritis: pathophysiological considerations and implications for treatment. *Seminars in Arthritis and Rheumatism* 1991; 20 (4):219-240.
53. Gresele P, Pignatelli P, Guglielmini G, Carnevale R, Mezzasoma AM, Ghiselli A, Momi S, Violi F. Resveratrol, at concentrations attainable with moderate wine consumption, stimulates human platelet nitric oxide production. *The Journal of Nutrition* 2008; 138: 1602–8.
54. Grisham MB, Granger N. Neutrophil mediated mucosal injury. *Digestive Diseases and Sciences* 1988; 33(3): 6S-15S.

55. Grisham MB, Volkmer C, Tso P, Yamada T. Metabolism of trinitrobenzene sulfonic acid by the rat colon produces reactive oxygen species. *Gastroenterology* 1991; 101:540–547.
56. Grulke S, Franck T, Gangl M, Péters F, Salciccia A, Deby-Dupont G, Sertejn D. Myeloperoxidase assay in plasma and peritoneal fluid of horses with gastrointestinal disease. *Canadian Journal of Veterinary Research*. 2008 ; 72(1): 37-42.
57. Gué M, Bonbonne C, Fioramonti J, Moré J, Del Rio-Lachèze C, Coméra C, Buéno L.
58. Stress-induced enhancement of colitis in rats: CRF and arginine vasopressin are not involved. *The American Journal of Physiology* 1997; 272:G84–91
59. Gyamfi MA, Ohtani II, Shinno E, Aniya Y. Inhibition of glutathione S transferases by Thonningianin A, isolated from the African medicinal herb, *Thonningia sanguinea*, in vitro. *Food Chemical Toxicology* 2004; 42: 1401-1408.
60. Hallgren R, Colombel JF, Dahl R, et al. Neutrophil and eosinophil involvement of the small bowel in patients with celiac disease and Crohn's disease: Studies on the secretion rate and immunohistochemical localization of granulocyte granule constituents. *Am J Med* 1989; 86: 56-64.
61. Halliwell B. Superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase: solutions to the problem of lung with oxygen. *New Phytologist* 1974; 73:1075-1086.
62. Halliwell B. Free radicals, antioxidants and human disease; curiosity, cause or consequence? *Lancet* 1994; 344:721-724.
63. Halliwell B: Oxidative stress, nutrition and health. Experimental strategies for optimization of nutritional antioxidants intake in humans. *Free Radical Research* 1996; 25: 57-74.
64. Halliwell B, Gutteridge JM. The antioxidants of human extracellular fluids. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 1990;280(1):1-8.
65. Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free Radicals in Biology and Medicine*. 3rdEd. New York: Oxford University Pres; 1999.

66. Hampton MB, Kettle AJ, Winterbourn CC. Inside the Neutrophil Phagosome: Oxidants, Myeloperoxidase and Bacterial Killing *Blood journal* 1998; 92: 3007-3017.
67. Han YS, Zheng WH, Bastianetto S, Chabot JG, Quirion R. Neuroprotective effects of resveratrol against beta-amyloid-induced neurotoxicity in rat hippocampal neurons: involvement of protein kinase C. *British Journal of Pharmacology* 2004; 141: 997–1005.
68. Hanauer SB. Inflammatory Bowel Disease: epidemiology, pathogenesis and therapeutic opportunities. *Inflammatory Bowel Diseases* 2006;12 Suppl 1:S3-9.
69. Hayes JD, Flanagan JU, Jowsey IR. Glutathione Transferases. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 2005; 45: 51-88.
70. Higa A, Eto T, Nawa Y. Evaluation of the role of neutrophils in the pathogenesis of acetic acid- induced colitis in mice. *Scan Journal of Gastroenterology* 1997; 32: 564-568
71. Hildebrand H, Karlberg J, Kristiansson B. Longitudinal growth in children and adolescents with inflammatory bowel disease. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* 1994; 18(2):165-173.
72. Hung LM, Chen JK, Huang SS, Lee RS, Su MJ. Cardioprotective effect of resveratrol, a natural antioxidant derived from grapes. *Cardiovascular Research* 2000; 47: 549–555.
73. Hung LM, Su MJ, Chen JK. Resveratrol protects myocardial ischemiareperfusion injury through both NO-dependent and NO-independent mechanisms. *Free Radical Biology and Medicine* 2004; 36: 774–781.
74. Hyams J. Crohn's disease. In: Wyllie/Hyams (ed) s. *Pediatric Gastrointestinal Disease*. Second edition. Philadelphia: W.B. Saunders C 1999: 401-18.
75. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans / World Health Organization, International Agency for Research on Cancer (IARC). Hydrogen peroxide. 1999; 71 Pt2: 671-89.

76. Jang M, Pezzuto JM. Effects of resveratrol on 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced oxidative events and gene expression in mouse skin. *Cancer Letters* 1998; 134: 81-89.
77. Jurjus AR, Khoury NN, Reimund JM. Animal models of inflammatory bowel disease. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*.2004; 50: 81–92.
78. Kaymakoğlu S. İnflamatuvar Barsak Hastalıkları. ed. Ökten A. *Gastroenterohepatoloji, Nobel Tıp Kitabevi: İstanbul*. 2001:189-211
79. Keele BB, McCord JM, Fridovich I. Superoxide dismutase from escherichia coli B. A new manganese-containing enzyme. *JrThe Journal of Biological Chemistry* 1970; 245:6176-6181.
80. Kelsall B. Interleukin-10 in inflammatory bowel disease. *The New England Journal of Medicine* 2009; 361:2091–2093.
81. Keshavarzian A, Morgan G, Sedghi S. Role of reactive oxygen metabolites in experimental colitis. *Gut* 1990; 31: 786-790.
82. Keshavarzian A, Konofsky JR, Ibrahim JM, Doria MI. Excessive generation of reactive oxygen metabolites by colonic mucosa in experimental colitis. *FASEB Journal* 1990; 4: 761.
83. Kim HJ, Chang EJ, Cho SH, Chung SK, Park HD, Choi SW. Antioxidative activity of resveratrol and its derivatives isolated from seeds of *Paenonia lactiflora*. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 1990; 66(9): 1990–93.
84. Koç M. Ratlarda indometazin ile oluşturulan gastrik hasar üzerine askorbik asitin gastroprotektif etkileri ve bu etkilerin antioksidan sistem ile ilişkisi. Yüksek lisans tezi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Veteriner Fakültesi, Erzurum, Türkiye. 2007
85. Koes RE, Quattrocchio F, Mol JNM. The flavonoid biosynthetic pathway in plants: Function and evolution. *BioEssays* 1994; 16 (2): 123-132.
86. Kopp P. Resveratrol, a phytoestrogen found in red wine. A possible explanation for the conundrum of the 'French paradox'? *European Journal of Endocrinology* 1998; 138(6): 619-620.

87. Kovacic P, Jacintho JD. Mechanisms of carcinogenesis: Focus on oxidative stress and electron transfer. *Current Medicinal Chemistry* 2001;8: 773–796.
88. Kraft SC, Fitch FW, Kirshner JB. Histologic and immunohistochemical features of the Auer “Colitis” in rabbits. *The American Journal of Pathology* 1963; 43: 913–927.
89. Krawisz JE, Sharon P, Stenson WF. Quantitative assay for acute intestinal inflammation based on myeloperoxidase activity. Assay of inflammation in rat and hamster models. *Gastroenterology* 1984; 87: 1344-1350
90. Kufer TA, Banks DJ, Philpott DJ. Innate immune sensing of microbes by Nod proteins. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2006;1072: 19–27.
91. Kuralay F, Yildiz C, Ozutemiz O, Islekel H, Caliskan S, Bingol B, Ozkal S. Effects of trimetazidine on acetic acid-induced colitis in female Swiss rats. *Journal of Toxicology Environmental Health A*. 2003; 24;66(2):169-79.
92. Kurtovic J, Segal I. Recent advances in biological therapy for inflammatory bowel disease. *Tropical Gastroenterology* 2004; 25: 9–14.
93. Laden BP, Porter TD. Resveratrol inhibits human squalene monooxygenase. *Nutrition Research* 2001; 21: 747–53.
94. Lakatos PL. Recent trends in the epidemiology of inflammatory bowel diseases: up or down? *World Journal of Gastroenterology* 2006;12(38): 6102–6108.
95. Li X, Sundquist J, Sundquist K. Educational level and occupation as risk factors for inflammatory bowel diseases: a nationwide study based on hospitalizations in Sweden. *Inflammatory Bowel Diseases* 2009;15(4):608–615.
96. Liew R, Staqq MA, Macleod KT, Collins P. The red wine polyphenol, resveratrol, exerts acute direct actions on guinea-pig ventricular myocytes. *European Journal of Pharmacology* 2005;519:1–8.
97. Liu SP, Dong WG, Wu DF, Luo HS, Yu JP. Protective effect of angelica sinensis polysaccharide on experimental immunological colon injury in rats. *World Journal of Gastroenterology* 2003; 9(12): 2786-90.

99. Loftus EV. Clinical epidemiology of inflammatory bowel disease: incidence, prevalence, and environmental influences. *Gastroenterology* 2004; 126(6): 1504–17.
100. Long CA, Bielski BHJ. Rate of reaction of superoxide radical with chloride-containing species. *The Journal of Physical Chemistry* 1980; 84: 555-557.
101. Lowry OH, Risebrough NJ, Farr AL, Randal RJ. Protein measurement with folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry* 1951; 193:265–270
102. MählerM, Bristol IJ, Sundberg JP, Churchill GA, Birkenmeier EH, Elson CO, Leiter EH.
103. Genetic analysis of susceptibility to dextran sulfate sodium-induced colitis in mice. *Genomics* 1999; 55: 147–156
104. Mäkitalo L, Rintamäki H, Tervahartiala T, Sorsa T, Kolho K-L. Serum MMPs 7–9 and their inhibitors during glucocorticoid and anti-TNF- α therapy in pediatric inflammatory bowel disease. *Scandinavian Journal Of Gastroenterology* 2012; 47 (7): 785-794
105. Manna SK, Mukhopadhyay A, Aggarwal BB. Resveratrol suppresses TNF-induced activation of nuclear transcription factors NF-kappa B, activator protein-1, and apoptosis: potential role of reactive oxygen intermediates and lipid peroxidation. *Journal of Immunology* 2000; 164:6509–6519.
106. Martín AR, Villegas I, La Casa C, de la Lastra CA. Resveratrol, a polyphenol found in grapes, suppresses oxidative damage and stimulates apoptosis during early colonic inflammation in rats. *Biochemical Pharmacology* 2004; 67: 1399–1410.
107. Martinez J, Moreno JJ. Effect of resveratrol, a natural polyphenolic compound, on reactive oxygen species and prostaglandin production. *Biochemical Pharmacology* 2000; 59: 865–870.
108. Martín AR, Villegas I, Sánchez-Hidalgo M, de la Lastra CA. The effects of resveratrol, a phytoalexin derived from redwines, on chronic inflammation induced in an experimentally induced colitis model. *British Journal of Pharmacology*. 2006;147(8): 873-885.

109. Mc Cord JM, Fridovich I. Superoxide Dismutase: An enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *The Journal of Biological Chemistry* 1969; 244(22): 6049-6055.
110. Meng X, Maliakal P, Lu H, Lee MJ, Yang CS. Urinary and plasma levels of resveratrol and quercetin in humans, mice, and rats after ingestion of pure compounds and grape juice. *Journal of Agricultural Food Chemistry* 2004; 52(4):935-942.
111. Millar AD, Rampton DS, Chander CL, Claxson AW, Blades S, Coumbe A, Panetta J, Morris CJ, Blake DR. Evaluating the antioxidant potential of new treatments for inflammatory bowel disease using a rat model of colitis. *Gut* 1996; 39: 407-415.
112. Mizoguchi A, Mizoguchi E. Animal models of IBD: linkage to human disease. *Current Opinion in Pharmacology* 2010; 10 (5): 578-587.
113. Montgomery R, Conway TW, Spector AA, Chappell D. *Biochemistry A Case-oriented Approach* 1996 Sixth edition, Mosby-Year Book, Inc.
114. Morris GP, Beck PL, Herridge MS, Depew WT, Szewczuk MR, Wallace JL. Hapten-induced model of chronic inflammation and ulceration in the rat colon. *Gastroenterology* 1989; 96: 795-803.
115. Motilva V, García-Mauriño S, Talero E, Illanes M. New paradigms in chronic intestinal inflammation and colon cancer: role of melatonin. *Journal of Pineal Research* 2011; 51: 44-60.
116. Nakazawa H, Genka C, Fujishima M: Pathological aspects of active oxygens/free radicals. *The Japanese Journal of Physiology* 1996; 46: 15-32.
117. Nigdikar SV, Williams NR, Griffin BA, Howard AN. Consumption of red wine polyphenols reduces the susceptibility of low-density lipoproteins to oxidation *in vivo*. *The American Journal of Clinical Nutrition* 1998; 68: 258-65.
118. Ninfa AJ, Ballou DP. *Fundamental Laboratory Approaches for Biochemistry and biotechnology*. Bethesda, Maryland: Fitzgerald Science Press Inc; 1998. pp. 80-85.

119. Norris AA, Lewis AJ, Zeitlin IJ. Changes in colonic tissue levels of inflammatory mediators in a guinea-pig model of immune colitis. *Agents and Actions*. 1982; 12(1-2):243-6.
120. Nosál'ová V, Cerná S, Bauer V. Effect of N-acetylcysteine on colitis induced by acetic acid in rats. *General Pharmacology* 2000; 35 (2):77–81.
121. O'Garra A, Vieira P. Regulatory T cells and mechanisms of immune system control. *Nature Medicine* 2004; 10: 801–805
122. Ogura Y, Inohara N, Benito A, Chen FF, Yamaoka S, Nunez G. Nod2, a Nod1/Apaf-1 family member that is restricted to monocytes and activates NF-kappaB. *The Journal of Biological Chemistry* 2001; 276 (7): 4812–8.
123. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical Biochemistry* 1979; 95 (2): 351-358.
124. Onderdonk AB, Cisneros RL, Bronson RT. Enhancement of experimental ulcerative colitis by immunization with *Bacteroides vulgatus*. *Infection and Immunity* 1983;42: 783–788.
125. Pace-Asciak CR, Hahn S, Diamandis EP, Soleas G and Goldberg DM. The red wine phenolics trans-resveratrol and quercetin block human platelet aggregation and eicosanoid synthesis: Implications for protection against coronary heart disease. *Clinica Chimica Acta* 1995; 235:207-219.
126. Pazourek J, Gajdosová D, Spanilá M, Farková M, Novotná K, Havel J. Analysis of polyphenols in wines: correlation between total polyphenolic content and antioxidant potential from photometric measurements. Prediction of cultivars and vintage from capillary zone electrophoresis fingerprints using artificial neural network. *Journal of Chromatography A* 2005; 1081: 48-54.
127. Peer D, Park EJ, Morishita Y, Carman CV, Shimaoka M. Systemic leukocyte-directed siRNA delivery revealing cyclin D1 as an anti-inflammatory target. *Science*. 2008; 319 (5863):627–630.

128. Pentney PT, Bubenik GA. Melatonin reduces the severity of dextran-induced colitis in mice. *Journal of Pineal Research* 1995; 19: 31–39.
129. Rakici O, Kiziltepe U, Coskun B, Aslamaci S, Akar F. Effects of resveratrol on vascular tone and endothelial function of human saphenous vein and internal mammary artery. *International Journal of Cardiology* 2005; 105: 209–15.
130. Rath HC, Schultz M, Freitag R, Dieleman LA, Li F, Linde HJ, Schölmerich J, Sartor RB.
131. Different subsets of enteric bacteria induce and perpetuate experimental colitis in rats and mice. *Infection and Immunity* 2001; 69: 2277–2285.
132. Ridnour LA, Isenberg JS, Espey MG, Thomas DD, Roberts DD, Wink DA. Nitric oxide regulates angiogenesis through a functional switch involving thrombospondin-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2005; 102 (37): 13147–13152.
133. Rimando AM, Kalt W, Magee JB, Dewey J, Ballington JR. Resveratrol, pterostilbene and piceatannol in vaccinium berries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2004; 52(15):4713-4719.
134. Rocha-González HI, Ambriz-Tututi M, Granados-Soto V. Resveratrol: a natural compound with pharmacological potential in neurodegenerative diseases. *CNS Neuroscience and Therapeutics* 2008; 14: 234–47.
135. Romero-Pérez AI, Ibern-Gómez M, Lamuela-Raventós RM, de La Torre-Boronat MC. Piceid, the major resveratrol derivative in grape juices. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 1999; 47(4):1533-1536.
136. Rutgeerts P. Medical therapy of inflammatory bowel disease. *Digestion* 1998; 59: 453-69.
137. Sakr LY, Senesse P, Laurent C, Cristol J-P, Rouanet J-M, Rugani N, Gaillet S. Validation of a surgical technique for rat intestinal irradiation: potential side effects prevention by dietary grape phenolics. *Digestive diseases and sciences* 2012; 57(10):2562-70.

138. Sandborn WJ, Yednock TA. Novel approaches to treating inflammatory bowel disease: targeting alpha-4 integrin. *The American Journal of Gastroenterology* 2003; 98: 2372–2382.
139. Schmidt C, Stallmach A. (Etiology and pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Minerva Gastroenterologica e Dietologica* 2005; 51: 127–145.
140. Sedghi S, Fields JZ, Klamut M, et al. Increased production of luminol enhanced chemiluminescence by the inflamed colonic mucosa in patients with ulcerative colitis. *Gut* 1993; 34: 1191-1197
141. Segal AW, Abo A. The biochemical basis of the NADPH oxidase of phagocytes. *Trends Biochem Sci* 1993; 18: 43.
142. Selve N. Chronic intrajejunal TNBS application in TNBS-sensitized rats: a new model of chronic inflammatory bowel diseases. *Agents and Actions* 1992; Spec No:C15-17.
143. Serazetdinova L, Oldach KH, Lörz H. Expression of transgenic stilbene synthases in wheat causes the accumulation of unknown stilbene derivatives with antifungal activity. *Journal of Plant Physiology* 2005; 162(9): 985-1002.
144. Shigematsu S, Ishida S, Hara M, Takahashi N, Yoshimatsu H, Sakata T, Korthuis RJ.
145. Resveratrol, a red wine constituent polyphenol, prevents superoxide-dependent inflammatory responses induced by ischemia/reperfusion, platelet-activating factor, or oxidant. *Free Radical Biology and Medicine* 2003; 34: 810-817.
146. Shin NH, Ryu SY, Choi EJ, Kang SH, Chang IM, Min KR, Kim Y. Oxyresveratrol as the Potent Inhibitor on Dopa Oxidase Activity of Mushroom Tyrosinase. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1998; 243: 801–803
147. Siddons RC, Mills CF. Glutathione peroxidase activity and erythrocyte stability in calves differing in selenium and vitamin E status. *The British Journal of Nutrition* 1981; 46:345-355.

148. Signorelli P, Ghidoni R. Resveratrol as an anticancer nutrient: molecular basis, open questions and promises. *The Journal of Nutritional Biochemistry* 2005; 16 (8): 449-466
149. Simmonds NJ, Millar AD, Blake DR, Rampton DS. Antioxidant effects of aminosalicylates and potential new drugs for inflammatory bowel disease: assessment in cell-free systems and inflamed human colorectal biopsies. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics* 1999;13: 363–372.
150. Sonnenberg A. Disability from inflammatory bowel disease among employees in West Germany. *Gut* 1989; 30(3): 367–70.
151. Southey A, Tanaka S, Murakami T, Miyoshi H, Ishizuka T, Sugiura M, Kawashima K, Sugita T. Pathophysiological role of nitric oxide in rat experimental colitis. *International Journal of Immunopharmacology* 1997; 19: 669–676.
152. Stenson WF. Inflammatory bowel disease. In: Yamada T (ed). *Textbook of Gastroenterology*. 3rd ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 1999. p. 1699-1759
153. Stevens JM, Hornby JA, Armstrong RN, Dirr HW. Class sigma glutathione transferase unfolds via a dimeric and a monomeric intermediate: impact of subunit interface on conformational stability in the superfamily. *Biochemistry* 1998; 37(44): 15534-41.
154. Stojanović S, Sprinz H, Brede O. Efficiency and mechanism of the antioxidant action of trans-resveratrol and its analogues in the radical liposome oxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 2001; 391(1):79-89.
155. Sugimoto K, Ogawa A, Mizoguchi E, Shimomura Y, Andoh A, Bhan AK, Blumberg RS, Xavier RJ, Mizoguchi A. IL-22 ameliorates intestinal inflammation in a mouse model of ulcerative colitis. *The Journal of Clinical Investigation* 2008; 118 (2): 534–544.
156. Sun Y, Oberley LW, Li Y. A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clinical Chemistry* 1988; 34(3): 497–500.

157. Surh YJ, Chun KS, Cha HH, Han SS, Keum YS, Park KK, Lee SS. Molecular mechanisms underlying chemopreventive activities of anti-inflammatory phytochemicals: down-regulation of COX-2 and iNOS through suppression of NF-kappa B activation. *Mutation Research* 2001; 480-481: 243–268.
158. Sutherland L, Singleton J, Sessions J, et al. Double blind, placebo controlled trial of metronidazole in Crohn's disease. *Gut* 1991; 32:1071-1075.
159. Szewczuk LM, Penning TM. Mechanism-based inactivation of COX-1 by red wine m-hydroquinones: a structure–activity relationship study. *Journal of Natural Products* 2004; 67: 1777–1782.
160. Taurog JD, Richardson JA, Croft JT, Simmons WA, Zhou M, Fernández-Sueiro JL, Balish E, Hammer RE. The germfree state prevents development of gut and joint inflammatory disease in HLA-B27 transgenic rats. *The Journal of Experimental Medicine* 1994; 180, 2359–2364.
161. Terzioglu T, Yalti T, Tezelman S. The effect of prostaglandin E1 on experimental colitis in the rat. *International Journal of Colorectal Diseases* 1997; 12(2): 63-6.
162. Thompson-Chagoyán OC, Maldonado J, Gil A. Aetiology of inflammatory bowel disease (IBD): role of intestinalmicrobiota and gut-associated lymphoid tissue immune response. *Clinical Nutrition* 2005; 24(3): 339–352.
163. Tüzün A, Erdil A, İnal V, Aydın A, Bağcı S, Yeşilova Z, Sayal A, Karaeren N, Dağalp K. Oxidative stress and antioxidant capacity in patients with inflammatory bowel disease. *Clinical Biochemistry* 2002; 35(7): 569-572
164. Udenigwe CC, Ramprasath VR, Aluko RE, Jones PJ. Potential of resveratrol in anticancer and anti-inflammatory therapy. *Nutrition Reviews* 2008; 66 (8):445–54.
165. Uysal M. Serbest radikaller, lipit peroksitleri ve organizmada prooksidan-antioksidan dengesini etkileyen koşullar. *Klinik Gelişim* 1998; 11: 336-41.
166. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 2007; 39 (1): 44-84.

167. Valko M, Morris H, Mazur M, Raptá P, Bilton RF. Oxygen free radical generating mechanisms in the colon: Do the semiquinones of Vitamin K play a role in the aetiology of colon cancer? *Biochimica et Biophysica Acta* 2001;1527(3): 161–166.
168. Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico Biological Interactions* 2006; 160: 1–40.
169. Verspaget HW, Pena AS, Weterman IT, Lamers CBHW. Diminished neutrophil function in Crohn's disease and ulcerative colitis identified by decreased oxidative metabolism and low superoxide dismutase content. *Gut* 1988; 29: 223-228
170. Wallace JL, McKnight W, Asfaha S, Liu DY. Reduction of acute and reactivated colitis in rats by an inhibitor of neutrophil activation. *Am J Physiol* 1998; 274: 802-808.
171. Walle T, Hsieh F, DeLegge MH, Oatis JE Jr, Walle UK. High absorption but very low bioavailability of oral resveratrol in humans. *Drug Metabolism and Disposition: The Biological Fate of Chemicals* 2004; 32(12):1377-1382.
172. Watanabe T, Kitani A, Murray PJ, Strober W. NOD2 is a negative regulator of Toll-like receptor 2-mediated T helper type 1 responses. *Nature Immunology* 2004; 5(8): 800–808
173. White MJ, Heckler FR. Oxygen free radicals and wound healing. *Clinics in Plastic Surgery* 1990; 17(3):473-84.
174. Wright JS, Shadnia H, Chepelev LL. Stability of carbon-centered radicals: Effect of functional groups on the energetics of addition of molecular oxygen. *Journal of Computational Chemistry* 2009; 30 (7):1016-1026.
175. Woo JH, Lim JH, Kim YH, Suh SI, Min DS, Chang JS, Lee YH, Park JW, Kwon TK. Resveratrol inhibits phorbol myristate acetate-induced matrix metalloproteinase-9 expression by inhibiting JNK and PKC delta signal transduction. *Oncogene* 2004; 23(10): 1845–1853
176. Yanbeyi S. Aspirin ve antioksidant butylated hydroxyanisole'ün tavşanlarda eritrosit katalaz, süperoksit dismutaz ve glutatyon peroksidaz aktiviteleri üzerine

etkileri. Doktora tezi. Ondokuz Mayıs Üniversitesi Biyoloji Anabilim Dalı Samsun, Türkiye. 1999.s.88.

177. Yavuz Y, Yüksel M, Yeğen BC, Alican I. The effect of antioxidant therapy on colonic inflammation in the rat. *Researchin Experimental Medicine (Berlin)* 1999; 199(2):101–110.
178. Yoshiko T, Kawada K, Shimada T. Lipid peroxidation in maternal and cord blood and protective mechanism against active oxygen toxicity in blood. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 1979; 135: 372-376.
179. Zhou Q, Caudle RM, Price DD, Del Valle-Pinero AY, Verne GN. Selective up-regulation of NMDA-NR1 receptor expression in myenteric plexus after TNBS induced colitis in rats. *Molecular Pain* 2006; 2: 3.
180. Zhou YH, Yu JP, Liu YF, Teng XJ, Ming M, Lv P, An P, Liu SQ, Yu HG. Effects of Ginkgo biloba extract on inflammatory mediators (SOD, MDA, TNF-alpha, NF-kappaBp65, IL-6) in TNBS-induced colitis in rats. *Mediators of Inflammation* 2006; 2006(5):92642

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı:

Gülserap YILDIZ

Doğum Yeri ve Yılı:

Sungurlu / 20.03.1973

Eğitim:

1990-1996 Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, İstanbul Üniversitesi, İstanbul, Türkiye

Mesleki Tecrübe:

2012-halen Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Asistanlığı

2010-2011 Atatürk Devlet Hastanesi Acil Hekimliği, Aydın, Türkiye

2009-2010 Sağlık Müdürlüğü Evde Bakım Sorumlu Hekimliği, Aydın, Türkiye

2009-halen Adnan Menderes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Dalında Doktora Öğrenciliği

2008-2009 Çeştepe Sağlık Ocağı Hekimliği, Aydın, Türkiye

2004-2008 Salavatlı Sağlık Ocağı Hekimliği, Sultanhisar, Aydın, Türkiye

2003-2004 Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Asistanlığı

1997-1998 Özyurt Sağlık Ocağı Hekimliği, Zile, Tokat, Türkiye

1996-1997 Zile Devlet Hastanesi Acil Hekimliği, Zile, Tokat, Türkiye

Adres: Adnan Menderes Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Biyokimya Anabilim Dalı

E-mail: yserap@hotmail.com

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim boyunca ve tez çalışmalarım esnasında deneyimlerini ve bilgi birikimini benden esirgemeyen, yardımlarıyla bana yol gösteren çok değerli danışman hocam Doç. Dr. Pınar Alkım ULUTAŞ'a teşekkürü bir borç bilirim.

Çalışmalarım ve eğitimim esnasındaki tüm katkılarından dolayı başta Anabilim Dalı başkanımız Prof.Dr. Ayşegül BİLDİK'e, Öğretim Üyesi Prof.Dr Funda KIRAL ve Yrd. Doç.Dr. Serap ÜNÜBOL AYPAK'a, Balıkesir Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof.Dr. Kamil SEYREK'e, ADÜ Tıp Fakültesi Histoloji Anabilim Dalı Asistanı Aslı YAYLALI'ya ve çalışmalarım esnasında yardımlarını esirgemeyen Yüksek Lisans Öğrencisi Mürüvet URAL'a teşekkürlerimi sunarım.

Son olarak, yetişmemde çok büyük emekleri olan annem ve babam ile bu proje de her zaman bana destek olan sevgili eşime sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.



T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU
(ADÜ-HADYEK)



Aydın, 7 Ekim 2011

Oturum : Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu 2011 Yılı VII. Oturumu
Sayı : B.30.2.ADÜ.0.00.00.00/050.04/2011/095
Proje Başlığı : TNSB ile oluşturulmuş deneysel kolit modelinde resveratrolün antioksidan metabolizmaya etkisi
Proje Yürütücüsü : Pınar ALKIM ULUTAŞ
Proje Ekibi : Gülserap YILDIZ

Bu çalışmanın hiçbir bölümünde:

İnsan embriyosu ve fötüsü kullanılması
İnsan embriyosu ve fötüsü dokularının kullanılması
Diğer insan doku ve hücrelerinin kullanılması

Hayvan Çalışması : İnsanlarda araştırma
İnsan olmayan primatların kullanılması
Transgenik hayvanların kullanılması
Hayvanlarda genetik modifikasyon öngörülmemiştir.

Bu çalışmanın yapılmasında etik açıdan bir sakınca bulunmamaktadır.

Doç. Dr. Muharrem BALKAYA

(Başkan)

İzinli

Prof. Dr. Mustafa BİRİNCİOĞLU

(Üye)

Prof. Dr. Fevzi BARDAKÇI

(Üye)

Doç. Dr. İbrahim CEMAL

(Üye)

Vet. Hek. Ufuk SAYIN

(Üye)

Dr. Nurten ATALAY

(Üye)

Yrd. Doç. Dr. Cengiz ÜNSAL

(Üye)

Şevket AKYOL

(Raportör)