



T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ÇOCUK CERRAHİSİ ANABİLİM DALI

RATLARDA DENEYSEL KOLİT MODELİNDE ALFA LİPOİK ASİT KULLANIMININ OKSİDATİF STRES ÜZERİNE ETKİSİ

UZMANLIK TEZİ

DR. MUSTAFA ONUR ÖZTAN

DANIŞMAN

Prof. Dr. Mustafa Harun GÜRSOY

AYDIN-2009

T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ÇOCUK CERRAHİSİ ANABİLİM DALI

**RATLARDA DENEYSEL KOLİT MODELİNDE
ALFA LİPOİK ASİT KULLANIMININ OKSİDATİF
STRES ÜZERİNE ETKİSİ**

UZMANLIK TEZİ

DR. MUSTAFA ONUR ÖZTAN

DANIŞMAN

Prof. Dr. Mustafa Harun GÜRSOY

AYDIN-2009

TEŞEKKÜR

Çocuk Cerrahisi uzmanlık eğitimim süresince yetişmemde bana sonsuz destek olan, mesleğimde en iyi beceri ve başarıyı kazanmamda çok büyük emek harcayan, eşsiz bilgi ve tecrübelerini benden esirgemeyen, bana olan desteklerini her zaman hissettiğim, ileriki yaşamımda da kendime örnek almaktan onur duyacağım; değerli hocalarım Çocuk Cerrahisi Anabilim Dalı Başkanı ve tez danışmanım Prof. Dr. Harun GÜRSOY'a, Çocuk Cerrahisi Anabilim Dalı Çocuk Ürolojisi Bilim Dalı Başkanı Doç. Dr. Mesut YAZICI'ya, Çocuk Cerrahisi Anabilim Dalı Öğretim Üyeleri Yard. Doç. Dr. Barlas ETENSEL ve Yard. Doç. Dr. Sezen ÖZKISACIK'a sonsuz teşekkür ederim...

Tezimin hazırlanmasında çok önemli katkılarını aldığım Patoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Doç. Dr. Nil ÇULHACI ve Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyesi Doç. Dr. Aslıhan KARUL'a, deneysel çalışmalarına olanak sağlayan Farmakoloji Anabilim Dalı öğretim üyeleri Prof. Dr. Mustafa BİRİNCİOĞLU, Yrd.Doç.Dr.Turhan DOST, Fizyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Doç.Dr. Rauf Onur EK ve Biyoistatistik Anabilim Dalı öğretim üyesi Doç. Dr. Mevlüt TÜRE'ye, poliklinikte-serviste- ameliyathanede her an bana yardımcı olan dostum Dr. Ali Onur ERDEM'e teşekkürleri sunarım...

Benim bu günlere gelmemi, bu başarıyı tatmamı sağlayan, bana her türlü güçlüğü altından nasıl kalkabileceğimi öğreten, gerek maddi gerekse manevi destekleri ile her zaman için yanımda olduklarından emin olduğum ve onlarla daima gurur duyup onlara layık olmaya çalışacağım sevgili annem, babam ve ablama sonsuz sevgi ve saygılarımı sunarım...

Sevgisini ve desteğini her zaman içimde hissettiğim, varlığı yaşamıma mutluluk ve başarı kaynağı olan biricik eşim Dr. Şule ÖZTAN'a yürek dolusu sevgilerimle...

İÇİNDEKİLER

1. GİRİŞ VE AMAÇ (S.1)

2. GENEL BİLGİLER (S.3)

2.1. Kolon Fizyolojisi ve Histolojisi (S.3)

2.2. Kolit (S.6)

2.3. Deneysel TNBS Koliti ve Özellikleri (S.7)

2.4. Etyolojilerine Göre Kolitlerin İncelenmesi : Nekrotizan Enterokolit, Hirschsprung İlişkili Enterokolit ve Enflamatuvar Barsak Hastalıkları (S.8)

2.4.1. Nekrotizan Enterokolit (S.8)

2.4.1.1. Giriş (S.8)

2.4.1.2. Patofizyoloji (S.8)

2.4.1.3. NEK histopatolojisi (S.9)

2.4.1.4. Bariyer fonksiyonu (S.9)

2.4.1.5. Tedavi (S.10)

2.4.1.6. Önleme (S.11)

2.4.2. Hirschsprung Hastalığı ve Enterokolit (S.12)

2.4.2.1. Giriş (S.12)

2.4.2.2. Etyoloji (S.12)

2.4.2.3. Hirschsprung ilişkili enterokolit (HİEK) (S.12)

2.4.2.4. HİEK histopatolojisi (S.13)

2.4.2.5. HİEK tedavisi (S.13)

2.4.3. Enflamatuvar Barsak Hastalıkları (S.14)

2.4.3.1 Giriş (S.14)

2.4.3.2. EBH patofizyolojisi (S.15)

2.4.3.3. EBH histopatolojisi (S.18)

2.4.3.4. Tedavi (S.19)

2.5. Alfa Lipoik Asit ve Antioksidanlar (S.20)

3. GEREÇ VE YÖNTEM (S.23)

3.1. Çalışma Grupları (S.23)

3.2. Kolitin Oluşturulması (S.23)

3.3. Deneyin Uygulanması (S.24)

3.4. Histopatolojik Değerlendirme (S.24)

3.4.1. Mikroskopik Kolonik Lezyonların Değerlendirilmesi (S.25)

3.4.2. Makroskopik Kolonik Lezyonların Değerlendirilmesi (S.26)

3.5. Biyokimyasal Analizler (S.26)

3.5.1. Serum Malondialdehid Düzeyinin Saptanması (S.26)

3.5.2. Serum Katalaz Düzeyinin Saptanması (S.26)

3.5.3. Serum Nitrik Oksit (NO) Düzeyinin Saptanması (S.27)

3.6. İstatistiksel Analizler (S.27)

4. BULGULAR (S.28)

4.1. Patolojik İnceleme (S.28)

4.1.1. Mikroskopik İnceleme Toplam Skorların Karşılaştırılması (S.28)

4.1.2. Mukozal Değişikliklerin Karşılaştırılması (S.28)

4.1.3. Kriptlerdeki Değişikliklerin Karşılaştırılması (S.29)

4.1.4. Lamina Propriadaki Değişikliklerin Karşılaştırılması (S.29)

4.1.5. Submukozadaki Değişikliklerin Karşılaştırılması (S.32)

4.1.6. Makroskopik Görünümlerin Karşılaştırılması (S.33)

4.2. Biyokimyasal Değerler (S.36)

4.2.1. MDA Değerleri (S.36)

4.2.2. NO Değerleri (S.37)

4.2.3. Katalaz Değerleri (S.37)

5. TARTIŞMA (S.39)

6. SONUÇ VE ÖNERİLER (S.44)

7. KAYNAKLAR (S.45)

Tablo Dizini

Tablo I : Mikroskopik kolon hasarının değerlendirilmesi **(S.25)**

Tablo II : Makroskopik kolon hasarının değerlendirilmesi **(S.26)**

Tablo III : Mikroskopik İnceleme Toplam Skorları **(S.28)**

Tablo IV : Mikroskopik İnceleme Toplam Skorların Karşılaştırılması **(S.28)**

Tablo V : Mukozal Değişiklikler **(S.29)**

Tablo VI : Mukozal Değişikliklerin Karşılaştırılması **(S.29)**

Tablo VII : Kriptlerdeki Değişiklik **(S.29)**

Tablo VIII : Kriptlerdeki Değişikliklerin Karşılaştırılması **(S.30)**

Tablo IX : Lamina Propriadaki Değişiklikler **(S.30)**

Tablo X : Lamina Propriadaki Değişikliklerin Karşılaştırılması **(S.30)**

Tablo XII : Submukozadaki Değişiklikler **(S.32)**

Tablo XII : Submukozadaki Değişikliklerin Karşılaştırılması **(S.32)**

Tablo XIII : Makroskopik Görünümler **(S.33)**

Tablo XIV : Makroskopik Görünümlerin Karşılaştırılması **(S.34)**

Tablo XV : MDA Değerleri **(S.36)**

Tablo XVI : MDA Değerlerinin Karşılaştırılması **(S.37)**

Tablo XVII : NO Değerleri **(S.37)**

Tablo XVIII : NO Değerlerinin Karşılaştırılması **(S.37)**

Tablo XIX : Katalaz Değerleri **(S.38)**

Tablo XX : Katalaz Değerlerinin Karşılaştırılması **(S.38)**

Tablo XXI : Tüm Gruplardaki Anlamlılık Değerlerine Genel Bakış **(S.38)**

Şekil Dizini

Şekil 1: İnce barsak ve kolon tabakalarının morfolojik karşılaştırılması **(S.4)**

Şekil 2: Barsak katmanları **(S.4)**

Şekil 3: Sıkı bağlantı **(S.5)**

Şekil 4: Bariyer hasarı ve T hücrelerin rolü **(S.6)**

Şekil 5: NEK'i meydana getiren etkenler **(S.9)**

Şekil 6: Enflamatuar barsak hastalığının oluşma mekanizması **(S.17)**

Şekil 7 : ALA moleküler yapısı **(S.20)**

Simgeler ve Kısaltmalar Dizini

- 5-ASA : 5-Aminosalisilik Asit
ALA : Alfa Lipoik Asit
CH : Crohn Hastalığı
DHHLA : Dihidrolipoik Asit
EBH : Enflamatuar Barsak Hastalığı
HİEK : Hirschprung İlişkili Enterokolit
HH : Hirschsprung Hastalığı
IFN- γ : İnterferon Gama
MDA : Malondialdehid
MÖY : Mısırözü Yağı
NEK : Nekrotizan Enterokolit
NO : Nitrik Oksit
PNL : Polimorfonükleer Hücreler
ROT : Reaktif Oksijen Türevleri
TAF : Platelet Aktive Edici Faktör
TNBS : 2,4,5-Trinitrobenzen Sülfonik Asit
TNF- α : Tümör Nekroz Faktör Alfa
ÜK : Ülseratif Kolit

Resim Dizini

Resim 1 : Lamina propriada mononükleer ve PNL hücre infiltrasyonu görülmektedir (H&E boyası, x400 büyütme) **(S.31)**

Resim 2: Enflamasyonun lamina propria ve ötesine de geçtiği görülmektedir (H&E boyası, x200 büyütme) **(S.31)**

Resim 3: Resimde tam kat enflamasyon görülmektedir (H&E boyası, x100 büyütme) **(S.33)**

Resim 4 : Kolit oluşmuş bir sıçanda anüsün dıştan görünümü**(S.34)**

Resim 5: Kontrol grubundan alınan örneklerde kolon makroskopik olarak normal (skor:0) görülmektedir. (Bu örneğin mikroskopik incelemedeki toplam skoru 2 olarak elde edilmiştir) **(S.35)**

Resim 6: Sham grubundan alınan örnekte makroskopik olarak 4 cm uzunluğunda ülser (skor:8) gözlenmektedir. (Bu örneğin mikroskopik incelemede skoru 19 olarak elde edilmiştir) **(S.35)**

Resim 7: ALA Gavaj grubundan alınan bir örnekte makroskopik olarak lokalize hiperemi (skor:1) görülmektedir. (Bu örneğin mikroskopik incelemede skoru 8 olarak elde edilmiştir) **(S.36)**

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Kolonun enflamasyonu olarak tanımlanan kolit, etyolojisindeki farklılığa bağlı olarak nekrotizan enterokolit, allerjik kolit, pseudomembranöz kolit, Hirschsprung ilişkili kolit, enflamatuvar barsak hastalıkları (ülseratif kolit ve Crohn hastalığı), bakteriyel, viral veya parazitik kolit, iskemik kolit, diversiyon koliti, radyasyon koliti gibi çeşitli isimler alır.

Tıp alanındaki teknolojik ilerlemeler ile tüm dünyada erken doğan bebeklerde ölüm oranı düşmüş ve bunun sonucunda barsak duvarının değişik uzunluk ve derinlikteki nekrozu ile seyreden nekrotizan enterokolit hastalığının insidansında artış gözlenmiştir. Tanı yöntemlerindeki ilerlemeler ve kentleşmedeki artış nedeniyle daha fazla çocuk enflamatuvar barsak hastalıkları tanısı almaya başlamıştır. Yine Hirschsprung ameliyatlarının sonrasındaki bakım şartlarının gelişmesiyle mortalite oranlarındaki gözlenen düşüş enterokolit insidansındaki artışı da beraberinde getirmiştir. Bu nedenlerden dolayı, son yıllarda kolit insidansında hızlı bir artış gözlenmiş fakat bu hastalıkların tedavilerinde aynı hızda çareler bulunamamıştır. Son yıllarda kullanılan yerleşik tedavilere alternatif veya destek olabilecek ilaç tedavileri üzerine geniş çapta araştırmalar yapılmaktadır.

DeneySEL kolit oluşturulması amacıyla rektal yoldan etanol içinde 2,4,5-trinitrobenzen sülfonik asidin (TNBS) verilmesi yıllardır kullanılan bir metottur (1). Etanolün mukozal bariyeri kırması sonrası, TNBS doza bağımlı olarak ülserasyon ve enflamasyon oluşturur. Ülserasyon ve barsak duvarında kalınlaşma yaklaşık 8 hafta kadar devam ettiğinden bu model kronik kolit oluşması istendiğinde de tercih edilebilir (2). İlk başta oluşan akut enflamasyon sırasında büyük miktarlarda nötrofil ve makrofaj dolaşımından geçerek kolon mukoza ve submukozasına gelirler. Bu hücrelerin TNBS ile haptene olan kolon yapılarına karşı verdiği reaksiyonlar sırasında yüksek miktarlarda reaktif oksijen türevleri (ROT) açığa çıkar ve hasar oluşur (3).

Alfa lipoik asit (ALA) iki sülfür molekülü içeren kısa zincirli ve doğal olarak oluşan bir yağ asitidir (4). Düşük redoks potansiyeli ve benzersiz redüksiyon kapasitesi sayesinde ROT'ların yakalanmasında ve diğer antioksidanların okside formlarının redüksiyonunda görev alan ALA'ya bu yüzden **“antioksidanların antioksidanı”** denilmektedir (5).

Literatürdeki yapılan çalışmaların ışığında biz de deneysel kolit modelinde ALA'yı kullanmayı tasarladık. Çalışmamızda amacımız ALA'yı gavaj ve lavman yolu ile vererek deneysel kolit modelinde ALA'nın antioksidan etkisini araştırmak idi. Beklentimiz gavaj yolu ile verilen ALA'nın kan yoluyla enflamasyon alanına ulaşarak sistemik etkiyle enflamasyonu geriletmesi, rektal olarak verdiğimiz ALA'nın ise direkt mukozaya uygulaması nedeniyle hem lokal hem de yüksek oranda emilerek sistemik etkiyle kolit ve kan MDA, katalaz ve NO değerleri üzerinde etkin iyileştirme göstermesiydi.

Deneysel kolit modelinde daha önce oral ve rektal yoldan ALA uygulanılmasına literatürde rastlamadığımız için yaptığımız çalışmanın bu konuda ilk olduğunu söyleyebiliriz.

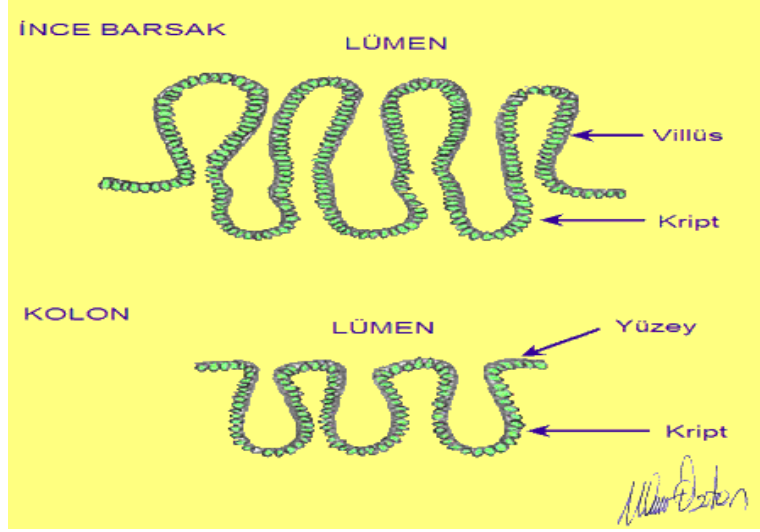
2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kolon Fizyolojisi ve Histolojisi

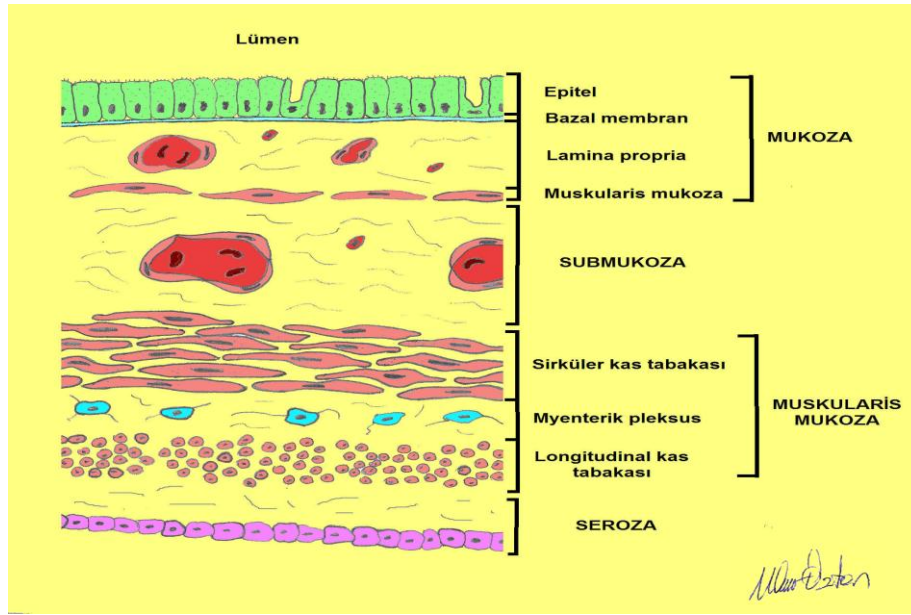
Yapısı itibari ile kolon başlıca fonksiyonları olan su emilimi, dışkı oluşturulması ve mukus üretimi için çok uygun bir düzene sahiptir. Mukus oldukça sulu bir jeldir ve sadece barsak yüzeyini kayganlaştırmakla kalmaz, bakteri ve partiküllerin üzerini de örter. Epitel hücrelerinin bazal yüzünden sodyumun aktif transportunu takiben su pasif olarak emilir (6). Kolon florası tarafından günlük ihtiyacının tamamını karşılayacak kadar K vitamini ve az miktarda tiamin, riboflavin, biotin ve folik asit sentezi yapılır (7).

Kolonda dış etkenlere karşı mukozal savunma ve tamir mekanizmaları bulunmaktadır. Bu mekanizmalar hızlı hücre yenilenme yeteneği, mukozal kan akımının iyi olması, yüzeyin sürekli mukus tabakası ile kaplı olması ve tamir mekanizmalarını uyarıcı düzenleyici peptidlerin bulunmasıdır (8).

Kolon lümeden barsak yüzeyine doğru sırasıyla mukoza, lamina propria, muskularis mukoza, submukoza, muskularis eksterna ve seroza tabakalarından oluşur. Lümene en yakın bölgede bulunan ve morfolojik olarak 2 ayrı bölüm fonksiyonel olarak da ayrılırlar: Kriptler ve villuslar. Kriptler ana olarak proliferasyonda görev alırlar, monoklonaldirler ve multipotent kök hücrelerce desteklenirler. Villuslar bu hücrelerin değişime uğramış kısmını temsil eder ve emilimde görevlidirler. Kolonda ince barsaklardan farklı olarak villuslar yok denecek kadar azdır ve lümen yüzeyi düz bir epitelle kaplıdır (Şekil 1) (8). İntestinal bezler uzundur ve bunlarda çok sayıda goblet hücresi ve abzorbtif hücre ile az sayıda enteroendokrin hücre bulunur. Lamina propriada bol miktarda bulunan lenfoid hücreler ve nodüller çoğunlukla submukozanın içine dek uzanır. Muskularis tabakası longitudinal ve sirküler düz kas demetlerinden oluşur. En dışta seroza katmanı bulunur (Şekil 2).



Şekil 1: İnce barsak ve kolon epitelyal tabakalarının morfolojik karşılaştırılması



Şekil 2: Barsak katmanları

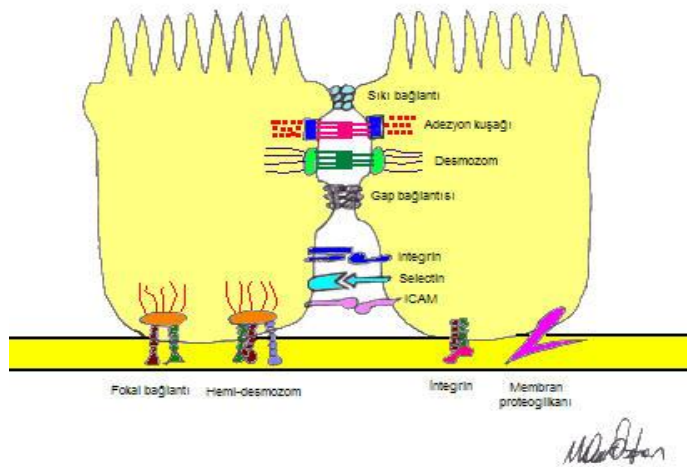
Barsak yaygın ve aktif bir barsak ile ilişkili lenfoid doku içerir. Hemen barsak epitelinin altında aralıklarla serpiştirilmiş olarak lenfoid doku birikimleri olan peyer plakları bulunur. Bu plaklar özel bölgelerde veya folikül ilişkili epitelyum denilen tepciklerde toplanmış B-lenfositler ve bu bölgelerin arasını dolduran T-lenfositlerden oluşurlar. Folikül ilişkili epitelyum görevi luminal antijenleri foliküllerin tepe bölgesine taşımak olan çok pencereli veya M hücresi denilen hücrelerden oluşur. Dendritik hücreler ise bekçi olarak görev yapan antijen sunucu hücrelerdir

ve barsak epitel hücreleri arasında görev yaparak sürekli komensal ve patojen bakterilerden örnekler toplar.

Barsak mukozasının en önemli fonksiyonu lümen içeriğini barsak interstisyumundan ayıran bir bariyer oluşturmaktır (9, 10). Bu bariyer statik değildir, fizyolojik ve patolojik uyarımlarla dinamik olarak düzenlenir (9, 11, 12).

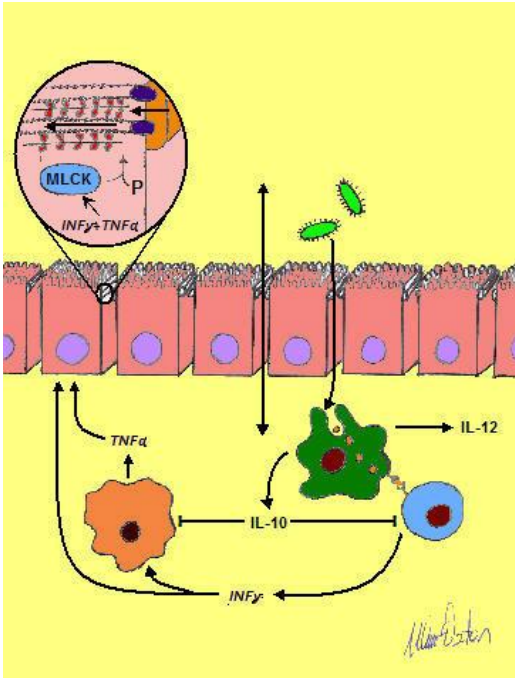
Kolunu döşeyen tek katlı silindirik epitel tabakası dairesel hücrelerarası bağlantılarla birbirine bağlıdır (4). İntestinal epitelyal hücreler arası sıvı/solüt geçişi bu bağlantılar aracılığıyla transsellüler veya parasellüler yollardan yapılır (9, 12). Luminal içeriğe selektif geçirgen bir bariyer oluşturan bu yapı sayesinde komensal organizmalara ve besin antijenlerine karşı oral tolerans cevabı yaratılabilir ve patojen mikroorganizmalara karşı konabilir (10). İstenmeyen sıvı, mikroorganizma ve luminal antijenlerin epitel tabakasını geçip vücuda girmesine engel olunur (12, 13). Bu bariyerin sadece fiziksel değil aynı zamanda sitokin, kemokin ve immünglobulin salımıyla immün sistem görevi olduğu da anlaşılmıştır (10).

Hücrelerarası bağlantıların en apikalinde bir sıkı bağlantı ve bir adherens bağlantıdan oluşan apikal bağlantı kompleksi bulunur (9). Sıkı bağlantılar lüminal sıvı ve solütlerin parasellüler yollardan pasif hareketini düzenleyen yarı geçirgen kapılardır (9, 14). Aynı zamanda protein ve lipidlerin apikal ve bazolateral plazma membranı arasındaki pasif difüzyonu da sınırlarlar. Bariyer fonksiyonunda önemli role sahip olan bu yapılar enflamasyon, kompleman faktörleri veya endotoksinlere cevap vermek için hızlı regülatuar değişimler yapma yeteneğine de sahiptirler (9) (Şekil 3).



Şekil 3: Sıkı bağlantı

Bariyer hasarı travma (iskemi, enfeksiyon), genetik yatkınlık veya altta yatan enflamasyon nedeniyle oluşur. Bunun sonucunda bakteri ve antijenlerden oluşan lümen içeriği lamina propriada anjen sunan hücrelerle karşılaşılır. Bu antijen sunucu hücreler antijenleri işlerler ve T hücelere sunarlar, aynı zamanda T hücelerinini uyararak üzere IL-12 de salgırlarlar. T hüceleri sunulan antijenleri tanırlar ve sitokin uyarısı sayesinde de Th1 cevabını başlatmak üzere IFN- γ salgırlarlar. Salgılanan IFN- γ makrofaj aktivasyonuna neden olur ve bu aktive makrofajlar enflamatuar reaksiyonu arttıran TNF- α salgılamasına neden olur. TNF- α ve IFN- γ aynı zamanda epitelyal bariyeri de etkilerler. Bu etkilerini bilinmeyen bir mekanizma ile miyozin hafif zincir kinazı (MLCK) aktive ederek gerçekleştirirler. Bu ise miyozin hafif zincirinin fosforilasyonuna, aktomiyozin kontraksiyonuna ve sıkı bağlantının açılmasına sebep olur. Bu ise bariyer fonksiyonunun daha da kaybına yol açarak hastalığın daha da ilerlemesine yol açar (6) (Şekil 4).



Şekil 4: Bariyer hasarı ve T hücelerin rolü

2.2. Kolit

Kolit terimi kolonun enflamasyonunu tanımlamak için kullanılır. Kolutin patofizyolojisi çeşitli etyolojilere bağılı olarak değışir: Nekrotizan enterokolit, allerjik kolit, pseudomembranöz kolit, enflamatuar barsak hastalıkları (ülseratif kolit ve Crohn hastalığı), bakteriyel, viral veya parazitik kolit, iskemik kolit, diversiyon koliti,

radasyon koliti gibi (15). İntestinal enflamasyonun en erken verilerinden biri nötrofillerin (PNL) transepitelyal göçüdür (14). Bunun sonucunda ise bariyerde defektler oluşur, klor ve sodyum sekresyonu etkilenir ve barsak epitelinde hasar meydana gelir (10).

2.3. Deneysel TNBS Koliti ve Özellikleri

Rektal yoldan verilen etanol içinde **2,4,5-Trinitrobenzen sülfonik asidin (TNBS)** indüksiyonu ile kolit oluşturulması yıllardır kullanılan bir metoddur (1). Etanolün mukozal bariyeri kırması sonrası, TNBS'nin kolonik otolog veya mikrobiyal proteinleri trinitrofenil gruplarıyla haptene ederek konağın savunma sistemine karşı immünojenik hale getirdiği gösterilmiştir (1, 16). T helper 1 aracılı olarak işleyen bu süreç sırasında doza bağımlı olarak ülserasyon ve enflamasyon gelişir. Ülserasyon ve barsak duvarında kalınlaşma yaklaşık 8 hafta kadar devam ettiğinden bu model kronik kolit oluşması istendiğinde de tercih edilebilir (2).

Bilindiği üzere mikrobiyal çevre ve konak arasındaki bir antlaşma çerçevesinde enflamasyon belli bir düzeyde tutulur ki buna "oral tolerans" denilir. TNBS uygulanması oral tolerans mekanizmasını bozarak veya bypass ettiği sanılmaktadır (16).

TNBS uygulanan ratlarda patolojik incelemede kolon mukozasının normal organizasyonu bozulmuştur. Bazı kriptlerde mukus birikimi ve dökülen hücre artıkları görülürken, lamina propria bazallerde daha fazla olmak üzere kalınlaşmıştır (17). Bu bölgelerde polimorfonükleer hücreler (PNL), lenfosit, eozinofil ve makrofaj infiltrasyonları yoğun olarak görülür (2). Epitelin bazı bölgelerinde ülserasyon ve desquamasyon görülürken bazı bölgelerde epitel sağlam kalmıştır. Enterositlerde elektron mikroskopu incelemelerinde tipik nekroz bulgularına rastlanır. Goblet hücrelerindeki musin granüllerinin membranları patlayarak birleşirler ve musin birikimi şeklinde görünürler. Hücrelerarası sıkı bağlantıların kırılması sonrası bazalden apikale doğru enflamatuar bir durum başlar (17). Lamina proprianın PNL ve diğer hücrelerle infiltrasyonu sonrası bu durum transmural enflamasyon-ödem-nekroza doğru ilerler (2).

2.4. Etyolojilerine Göre Kolitlerin İncelenmesi: Nekrotizan Enterokolit, Hirschsprung İlişkili Enterokolit ve Enflamatuvar Barsak Hastalıkları

2.4.1. Nekrotizan Enterokolit

2.4.1.1. Giriş

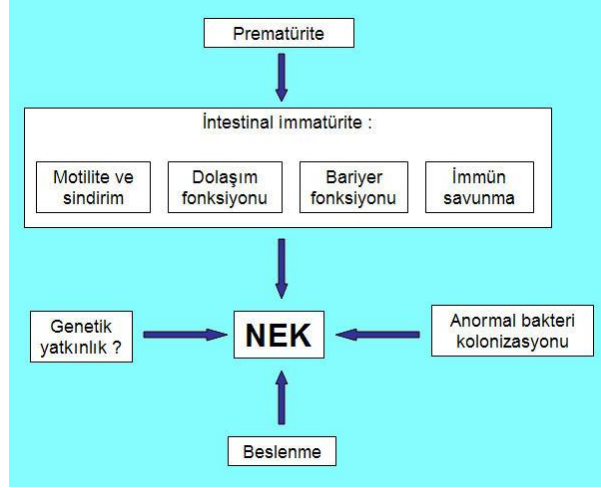
Nekrotizan enterokolit (NEK) yenidoğan yoğun bakım ünitelerinde en sık karşılaşılan kazanılmış cerrahi acildir (18). NEK insidansı tüm canlı doğumlar arasında % 0,5 ve düşük doğum ağırlıklı doğumlarda % 3-5 orandadır (19). Bildirilen NEK'e bağlı ölüm oranları %15-30 arasında değişmektedir (20). NEK'in karakteristik özelliği değişik uzunluk ve derinlikte barsak duvarı nekrozu ve etkilenen yenidoğanların üçte birinde eşlik eden barsak perforasyonudur (21).

NEK'in başlangıç belirti ve bulguları bradikardi, hipotansiyon, taşipne, hipo- veya hipertermi gibi ısı düzensizlikleri gibi vital bulgularda bozulma ve apne atakları ve letarji gibi nonspesifik bulgulardır (21, 22). Bunları abdominal distansiyon, batın duvarında ödem, eritem hatta krepitasyon, gaitada gros veya gizli kan, safralı kusma, beslenme intoleransı ve gastrik aspiratlarda artış gibi NEK'e daha özgül bulgular izler (22).

2.4.1.2. Patofizyoloji

NEK'te barsaklardaki klasik histolojik bulgu enflamatuvar hücre infiltrasyonu, mukozal ödem, ülserasyon ve koagülasyon nekrozudur. Bu bulgular NEK patogenezinde iskeminin de önemini göstermektedir (18, 23). Prematürelde hipoksi ve iskemi oluşmasının nedeni pulmoner immatürite, sepsiste görülen hipotansiyon, umbilikal arter kateterizasyonu, indometazin ile tedavi edilen patent duktus arteriosus olabilir (22). Term infantlarda görülen NEK ise genellikle eşlik eden konjenital kalp hastalığı, hipoksik iskemik olaylar, polisitemi veya in utero büyüme kısıtlanması gibi hastalıklarla birlikte. Bu nedenle ve term infanlarda NEK'in yaşamın ilk birkaç gününde görülürken, preterm infantlarda daha geç zamanda görülmesi NEK patogenezinde hipoksik iskemik olayların etkisinin daha az olduğunu düşündürmektedir. Yine yapılan çalışmalar hızlı beslenme, anormal

intestinal kolonizasyon ve intestinal araçların hipoksi veya iskemiden daha önemli olduğunu göstermektedir (Şekil 5) (20).



Şekil 5: NEC'i meydana getiren etkenler

2.4.1.3. NEC histopatolojisi

NEK'li barsaklar gros olarak incelendiğinde dilate, gri veya yeşilimsi gri ve geniş kanama alanlarında siyah olarak görünürler (24). Tutulum ağır ve transmural ise yumuşak ve frajil olan bölgeden perforasyon gelişebilir (24).

Mikroskopik olarak incelendiğinde patolojinin mukozadan başlayıp daha derin tabakalara ilerlediği gözlenir. Hastalığın erken safhasında çok az enflamatuvar hücrenin eşlik ettiği mukozal dökülme ve sıvanma izlenir (25). Bu tablo ilerleyerek transmural nekroz görülebilir. Eğer rejenerasyon başlamışsa mukozada hiperkromatik nükleusa sahip, mitotik aktivitesi yüksek ve henüz mukus üretmeyen küboid veya uzun epitel hücreleri gözlenir (24).

NEK'li hastaların %90'ında nekroz ve artan bakterilere karşı konak cevabı olarak intestinal enflamasyon gözleendiği bildirilmiştir. %10 hastada mikroabseler ve kript abseleri gözlenir (24).

2.4.1.4 Bariyer fonksiyonu

Barsaktaki bariyer fonksiyonunu sağlayan sıkı bağlantılar 10. haftada oluşmaya başlar. Bu bağlantıların sıvı sekresyonunu ve besin emilimini kontrol edebilmek için olgunlaşmaları amniyotik sıvının uyarımıyla 26. haftadan terme

kadar devam eder (26). Enterositlerin yüzeydeki patojenleri veya toksinleri yıkama amacıyla sekresyon fonksiyonu önem kazanmaktadır. 23-27. haftalar arasında goblet hücreleri tarafından üretilmeye başlayan glikoprotein mukus tabakası önceleri çok akışkandır ve doğuma kadar koyulaşarak daha etkin bir savunma tabakası oluşturur (27). İmmatür bir müsin tabakası intestinal geçirgenliğin ve bakteri adheransının artmasına neden olarak barsaktaki epitelyal bariyerin bozulmasına neden olmaktadır (20).

Yenidoğan barsağının immünolojik olarak immatür olması da NEC patogeneziye katkı sağlamaktadır (18). İmmatür barsak hasara karşı aşırı enflamasyon ile cevap vermektedir, bunun NEK patogeneziinde son ana yol olduğu düşünülmektedir (24). Enflame alandaki lökositlerin patojenleri yok etmek için salgıladıkları oksidanlar ve proteazlar intestinal bariyere daha fazla zarar vermektedir. Hasarlı bariyerden daha fazla patojen mukozanın daha derinlerine ulaşması sonrası süregelen bir kısır döngü oluşur ve klinik ağırlaşır (20).

Aktive T hücreleri proenflamatuar sitokin üretimi, direkt epitelyal hasar, enflamatuar araçların lokal salınımını artırıp enterositlerde apoptoza yol açarak, doku tamir mekanizmalarının (enterosit çoğalması ve göçü) baskılanması ve daha fazla kan kaynaklı enflamatuar hücrenin bölgeye gelmesi ile hasarın artmasına yol açabilirler (28).

Onarıcı doku değişiklikleri epitelyal rejenerasyon, granülasyon dokusu ve fibrozis oluşumu ve akut ve kronik enflamatuar değişikliklerin görüldüğü alanları içerir, ki bu bulgular NEK patogeneziinde hasar ve tamirin sürdüğü kronik bir sürecin olabileceğini düşündürür (29). Bu nedenle NEK patogeneziini aydınlatmak ve yeni önleyici mekanizmalar geliştirmek için moleküler mekanizmalar olduğu kadar çok miktarda enflamatuar aracı da incelenmiştir (21).

Lökosit adezyonu ve aktivasyonu, kompleman aktivasyonu, sitokin salınımı, ROT ve nitrik oksitten oluşan bu enflamatuar cevap barsaklarda fokal nekroz alanlarına ve tedavi edilemezse perforasyonlara yol açmaktadır (23).

2.4.1.5. Tedavi

NEK tedavisinin en önemli basamağı tanının hemen konulabilmesidir (22). Başlangıç tedavisi olan medikal tedavi oral alımın kesilerek gastrointestinal

sistemin en az 7-10 gün nazogastrik tüp ile dinlendirilmesi, total parenteral nütrisyonu başlanması, sepsisin ve peritonitin parenteral geniş spektrumlu antibiyotiklerle tedavisi, hipovolemi ve asidozun düzeltilmesi, gerekirse kan ürünleri transfüzyonu ve solunumsal yetmezliğin ventilatörle desteklenmesini içerir (18, 19, 30).

Lokalize NEK'in cerrahi tedavisinde kullanılan yöntemler primer peritoneal drenaj, etkilenen barsağın rezeksiyonu ve stoma oluşturulması, etkilenen barsağın rezeksiyonu ve primer anastomoz olarak sıralanabilir (19). Tüm barsakları tutan yaygın NEK'te proksimal jejunostomi açılarak barsakların dinlendirilmesi ve 6-8 hafta sonra ikinci kez laparotomi ile değerlendirilmesi; tüm gangrene barsakların çıkarılıp kalan barsakların klipslenip batına konulması ve 48-72 saat sonra tekrar değerlendirilmesi veya sadece iki taraflı dren konulup beklenmesi yaklaşımları uygulanabilir (19, 30).

2.4.1.6. Önleme

Literatürde NEK'i önlemede en sık değinilen metodlar minimal enteral beslenme, emzirme (anne sütünün içinde trombosit aktive edici faktör (TAF) asetilhidrolaz enzimi bulunur), oral sıvı alımının kısıtlanması, oral IgA and IgG ile pasif bağışıklama, antenatal ve erken postnatal deksametazon kullanımı ile intestinal olgunlaşmanın uyarılması, yumurta fosfolipidi içeren yenidoğan mamalarının kullanılması, nitrogliserin, magnezyum desteği, steroidler veya rekombinant enzim ile TAF asetilhidrolaz aktivitesinin artırılması ve TAF reseptör antagonisti WEB 2170 kullanımıdır (21, 23, 30). Bu yöntemlere daha araştırma ve sonuç alma safhasında olan insan rekombinan eritropoetin, insan rekombinan granülosit koloni stimulan faktör, epidermal büyüme faktörü, pentoksifilin, siklosporin, rapamisin, probiyotik kullanımı (Bifidobacterium infantis ve Lactobacillus acidophilus), L-arginin ve L-karnitin, A vitamini, diette çoklu doymamış yağ asitlerinin verilmesi ve bakteriyel aşırı çoğalmayı önlemek için beslenmelerin asidifikasyonu eklenebilir (21).

2.4.2. Hirschsprung Hastalığı ve Enterokolit

2.4.2.1. Giriş

Hirschsprung hastalığı (HH) ilk kez 1886'da Harald Hirschsprung tarafından büyük çocuklarda tanımlanmıştır ve sıklığı 5000 doğumda birdir (31, 32). Hastalığın en erken görülen bulguları mekonyum çıkışında gecikme, abdominal distansiyon, safralı kusma ve beslenme problemleri yaşanmasıdır (31). Daha büyük çocuklarda infant döneminde başlayan kronik ilerleyici konstipasyon, kilo alamama, fekal taşlaşma, malnütrisyon ve ilerleyici abdominal distansiyon göze çarpar (32).

2.4.2.2. Etiyoloji

HH hastalığının etyolojisinde enterik sinir sisteminin gelişmesinde ve nöral krest hücrelerinin göçündeki hücresel ve moleküler anormallikler rol oynamaktadır. Nöral krest kaynaklı nöroblastlar özofagusta gestasyonun 5. haftasında gözlenirler ve barsak gelişimi süresince gestasyonun 5-12. haftaları arasında kraniokaudal yönde göçe devam ederler (31) Bu migrasyonun durma zamanına göre hastalığın ağırlığı ve kliniği total aganglionozisten kısa segment HH'ya kadar değişim gösterir (33). Aganglionik segment bu nedenle anüsten başlar ve proksimale doğru uzanır (32).

HH'de parasempatik intrinsik ganglion hücrelerinin yokluğu nedeniyle peristaltik dalgaların ilerlemesini engelleyen daralmış kolon fonksiyonel bir obstrüksiyon oluşturur. Yaygın araştırmalara rağmen agangliyonik barsaktaki tonik kontraksiyonun nedeni tam olarak açıklanamamıştır. Aganglionozis, kolinerjik hiperinnervasyon, nitrik osit sentetaz üreten sinir hücrelerinin hatalı dağılımı ve interstisyel Cajal hücrelerindeki anormalliklerin patogeneizde yer aldığı düşünülmekteyse de HH'de görülen anormalliklerin tam nedeninin anlaşılması zor görülmektedir (31)

2.4.2.3. Hirschsprung ilişkili enterokolit (HİEK)

Enterokolit ve kolon rüptürü HH ile ilişkili en ciddi komplikasyondur ve hastalıktan ölümlerin en sık sebebidir (32, 34).

HH tanısı henüz konulmamış veya HH nedeniyle opere edilmiş hastalar postoperatif dönemde enterokolit ile başvurabilirler. HİEK hastalıktan etkilenen infantların %17-50'sinde, pull-through prosedürlerinden sonra ise %40'a varan oranlarda görülür (32, 35).

HİEK patofizyolojisi henüz tam olarak açıklanamamakla birlikte çeşitli teoriler ortaya atılmıştır: Proksimal barsağın fiziksel dilatasyonu, müsin içeriğinde ve yapımında bozukluk, rotavirüs, C. Difficile, artmış prostoglandin E1 aktivitesi, mukozal immünite bozukluğu protein duyarlılığı ve sukraz-izomaltaz eksikliğinin eşlik ettiği motilite bozukluğu gibi (36).

Pre- veya postoperatif dönemde oluşan intestinal stazın lümendeki patojenlerin fazlaca çoğalmasına ve sonrasında mukozal invazyonunu kolaylaştırdığı düşünülmektedir (37).

Barsağın enflamatuvar durumları ile mukus glikoproteinlerinin sülfatlanmasındaki eksiklik arasındaki ilişki iyi bilinmektedir ve bunun HİEK'te bozuk olduğu da gösterilmiştir (38). Bu müsinlerin hatalı olması sonrası C. difficile ve E. coli gibi enteropatik mikroorganizmaların enterositlere adheransı artmakta ve bu bakteriler barsak duvarına direkt veya toksinleri etkisiyle hasar vermektedirler (36).

Çeşitli histolojik ve immünolojik çalışmalar ile bazı hastaların barsaktaki persistan enflamasyon nedeniyle rekürren HİEK atağı geçirmeye yatkın oldukları da gösterilmiştir (36).

2.4.2.4. HİEK histopatolojisi

HİEK'in gros patolojisi Harald Hirschsprung tarafından tanımlanmıştır. Serozaya da ulaşan tam tabaka ülserasyon, submukozada ülser formasyonu ve püyle kaplı submukozal alanlar. Mikroskopik olarak ise HİEK intestinal kriptlerin PNL hücreler ile infiltrasyonu (kriptit), kript abseleri ve kriptlerin genişlemesi ile mukus birikimi olmasıdır. Zamanla kript abselerinde artış olur ve bu transmural ekroza ilerleyen mukoza ülserasyonuna dönüşür, ki bu geç safhaların görünümü ülseratif kolitten ayrılmayacak kadar benzerdir (38).

2.4.2.5. HİEK tedavisi

Enterokolit olan hastaların tedavisi sıvı resüstasyonu, rektal irrigasyon ve intravenöz geniş spektrumlu antibiyotikler ve hafif vakalarda oral metranidazol ile yapılır (31, 35). Postoperatif olarak yapılan seri rektal irrigasyonların mekanik obstrüksiyonu veya bakteriyel aşırı çoğalmayı önleyerek postoperatif HİEK insidansını ve şiddetini düşürdüğü gösterilmiştir (39). Mekanik obstrüksiyonu azaltmak amacı ile yapılacak anal dilatasyonların ve internal sfinkterotominin de yararı gösterilmiştir (37). Barsak başarıyla dekompresedilemezse laparotomi ve sonrasında geçiş zonunun proksimaline stoma açılması uygun olacaktır (38).

Antibiyotik tedavisine ek olarak çeşitli çalışmalarda ek olarak peroral verilen *Saccharomyces boulardii*, kolestramin ve sodyum kromoglikatın yararlı etkilerinden bahsedilmiştir (38).

2.4.3. Enflamatuar Barsak Hastalıkları

2.4.3.1 Giriş

Enflamatuar barsak hastalığı (EBH) adı altında incelenen Crohn hastalığı (CH) ve ülseratif kolit (ÜK), etkilediği kişilerde tüm yaşam boyunca relaps ve remisyonlar ile seyreden kronik bir hastalıktır (40-42). ABD'de yaklaşık bir milyon EBH hastası bulunmaktadır ve bunun %10-25'ini pediatrik hastalar oluşturmaktadır (43). Erişkin EBH hastalarının %20-30'unda ilk belirtiler pediatrik veya adölesan dönemde gözlenmektedir (44).

Etyolojileri gizli kalsa da CH ve ÜK kronik enflamasyonun iki ayrı formunu oluştururlar ve neden ve doku hasarı mekanizmaları ayrıdır (45). Bu iki hastalığın belirtilerinin farklı olmasına rağmen, aynı ad altında incelenmelerinin nedeni bu hastalıkların birbirine kimi zaman bir patoloğun bile ayırdemeyeceği kadar benzemesidir (46).

Yeni bir düşünce olarak EBH'nin çocuk ve erişkinlerde farklı olabileceği, ve pediatrik EBH'nin ayrı hassaslık ve enflamatuar mekanizmalar yoluyla kendine ait bir patogenezi olduğu düşünülmektedir (45, 47).

2.4.3.2. EBH patofizyolojisi

EBH'nın patogenezi her ne kadar tam olarak anlaşılmadıysa da, patogeneizde genetik özellikler, çevresel faktörler, mikrobiyal flora, bariyer disfonksiyonu ve immünolojik anormalliklerin etkisinin olduğu kabul edilmektedir (10, 42, 48, 49).

Şu anki klinik ve deneysel çalışmalar intestinal bariyer fonksiyonunun bozulmasının, zararlı moleküllerin kolon mukozası altındaki lamina propriaya geçmesine ve mukozal immün sistemin sürekli uyarılarak intestinal enflamasyonun başlamasına neden olduğunu göstermişlerdir (50, 51). EBH hastalarından alınan barsak biyopsilerinin analizinde sıkı bağlantıların yapısında bulunan E-kaderin ve β -katenin gibi proteinlerin azaldığı gözlenmiştir (11).

Parasellüler permeabilitenin barsaktaki hem akut hem de kronik enflamasyon hallerinde artmış olduğu gösterilmiştir (52). Bu epitelyal permeabilite artışının düzenlenmesinde sadece enfeksiyon veya antijenler gibi dış faktörlerin değil, aynı zamanda immün sistem gibi iç faktörlerin de önemli bir rol oynadığı gösterilmiştir (12).

EBH hastalığında asıl etkenlerden biri enterik komensal bakterilere toleransta azalma sonrası hem doğal (makrofaj, PNL) hem de kazanılmış (T ve B lenfositler) immün cevapta artış gözlenmesidir (42). Lamina propriada bulunan makrofajlar ve dentritik hücreler sayıca artarlar ve bu hücrelerden yapılan proenflamatuar sitokin ve kemokinlerin ve adezyon molekülleri ve yardımcı uyarıcı moleküllerin miktarı da artar (42, 53). CH ve ÜK'da doğal savunmada IL-1 β , tümör nekroz faktör alfa (TNF- α), IL-6, IL-8, IL-18 artarken, CH'da IL-12, IL-23 ve IL-27 de artar. T hücre cevabında ise CH'da IFN- γ , IL-17, IL-21 artarken ÜK'da IL-5 ve IL-13 artar (42). Yine EBH hastalarından alınan biyopsilerde enflame kolon mukozasındaki vasküler endotelde E-selektin, hücrelerarası adezyon molekülü-1, vasküler hücre adezyon molekülü-1 gibi çeşitli adezyon moleküllerinde artışın gösterilmesi bu mekanizmanın da PNL göçünde rol oynadığını düşündürmektedir (54).

Mukozal enflamasyonlar sırasında salınan TNF- α veya IFN- γ gibi proenflamatuar sitokinler sıkı bağlantıları etkileyerek epitelyal geçirgenliğin artmasına yol açabilirler (9, 10, 41). Bu iki sitokine EBH ile etkilenmiş intestinal

mukozalarda yüksek oranlarda rastlanmıştır. Yine bu iki sitokinin hücre kültüründe üretilen tek tabakalı intestinal epiteldeki bariyer fonksiyonunu azalttığı gösterilmiştir refini bul (12).

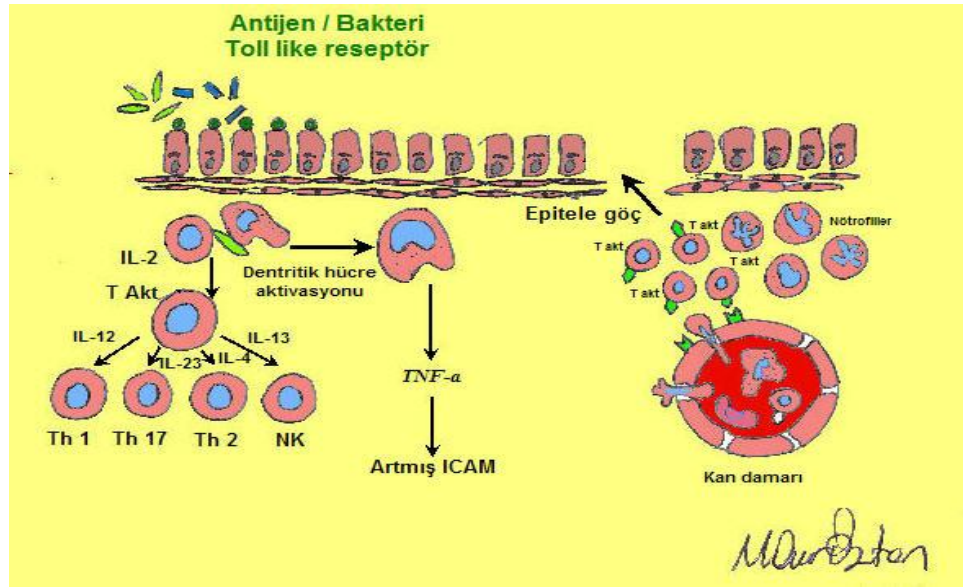
İnsanlarda EBH'da makromoleküllere karşı geçirgenliğin arttığı gösterilmiştir. EBH'da gözlenen bozulmuş epitelyal bariyer fonksiyonunun sadece makromoleküllere karşı geçirgenliğin artması değil aynı zamanda apoptozisin de sonucu olduğu düşünülmektedir. ÜK ve CH'daki enflame kolondaki apoptoz oranları hafif veya orta ölçekli olarak artmıştır (yaklaşık %5). Bu artış iyon ve su kaybına yol açar ve küçük antijenlerin de girişine olanak tanır (10).

EBH hastalarında görülen diarenin nedeninin başlarda sitokin ve diğer enflamatuar mediatörlere bağlı aşırı klor sekresyonuna bağlı olduğu düşünülse de son zamanlardaki hayvan modellerinde sodyum emilimindeki defektin diareye yol açtığı gösterilmiştir. Bunun sonucunda gaita kolonda kuruyamamakta ve motilitenin de bozukluğunda diare oluşmaktadır. EBH hastalarında ise başlıca kriptlerden yapılan klor sekresyonu azalır ve bunun sonucunda bakterilerin kriptlerden "yıkanması" mümkün olamamaktadır. Böylece bakteriler kript lümenlerinde toplanarak epitele toksik etkilerde bulunurlar (55). Yine bu bakteriler nedeniyle PNL'ler mukoza epiteline olan transepitelyal olar göç ederler (kriptit) ve intestinal lümende kript abseleri oluşur (14, 54). PNL'lerin epitel tabakalarına parasellüler yoldan ulaştıkları gösterilmiştir. Epitelyal hücreler arasından olan bu göçün sıkı bağlantılarda geçici ve hızlı bir bozulma yaptığı görülmektedir (14). Ayrıca EBH patogenezinde rol oynayan proenflamatuar sitokinlerin burada daha önce de bulunan ve salınım kapasitesi sınırlı makrofajlar tarafından değil daha çok enflamatuar odağa göç eden PNL'ler tarafından salındığı düşünülmektedir (42).

Epiteldeki diğer bir koruma mekanizması ise immünglobulin salınımıdır (10). İntraluminal IgA intrasellüler virüsleri ve lipopolisakkaridleri epitel hücresinden geçerken nötralize ederken, IgG ve IgE CD23 üzerinden antijen-spesifik örnekleme mekanizmasında görev alırlar (10, 53). Sekrete edilen bu immünglobulinler varlığındaki bu gözlemler epitelyal bariyer boyunca uptake'in antijen seçici olduğunu düşündürmektedir. Fakat bu mekanizmanın EBH'nın enflamatuar durumunda bozuk olduğu düşünülmektedir (10).

EBH'da tedavi yaklaşımında epitelyal bariyer fonksiyonunu düzeltme girişimi giderek artmaktadır. Anti TNF tedavisinin epitelyal bariyer fonksiyonunu tamir ettiği, epitelyal apopitozisi azalttığı yakın zamanda gösterilmiştir (10).

Toll-like reseptörlerin artması ve diğer genetik faktörlerin kontrolünde barsak lümenindeki antijenlerin samplinginde bir defekt oluşur. Antijenlere karşı verilen aşırı cevap sonrası dendritik hücreler stimüle olurlar ve çeşitli T-hücre alt gruplarının üretimini başlatırlar. Bu T hücre grubu mukozal enflamasyona yol açan immünolojik bir döngü başlatırlar. ICAM-1 gibi intersellüler adezyon molekülleri dolaşan mono ve polinükleer hücreler için enflame barsak mukoasına adhere olmada önemlidir. CH daha baskın olarak Th1 ve Th17 hücreleri üzerinden ÜK daha baskın olarak Th2 ve NK T-hücreleri üzerinden başlıyor gözükmektedir (Şekil 6) (41, 42, 53).



Şekil 6: Enflamatuar barsak hastalığının oluşma mekanizması

Hayvan modellerinden sağlanan bilgiler sayesinde EBH'da deneysel kolit modellerinde barsak enflamasyonunun gelişmesi için enterik floranın olması gerektiği gösterilmiştir (42, 45). Germ-free hayvanlarda intestinal enflamasyon gelişmediği bir çok çalışmada gösterilmiştir (10, 41, 45, 53). Bu hayvanlara bakteri verilmesinden sonra ise hemen makrofaj ve Th1 immün aktivasyonu sonrası kolit

gözlenmiştir (11, 53). EBH hastalarında barsak mukozası ile ilişkide artmış sayıda bakteri olduğu gösterilmiştir (45).

Sağlıklı bireylerde, kommensal barsak bakterileri ve mukozal immün sistem arasında özel ve sıkı denetlenen bir etkileşim vardır ve bu karşılıklı etkileşim immün toleransın gelişmesinde rol oynar. Çoğu EBH hastasında ise barsak bakteriyel antijenlerine karşı artmış bir immünolojik reaktivite gösterilir (45). Bu geniş antibakteriyel reaktivitenin otolog enterik floraya karşı “tolerans kaybı” sonucu geliştiği ve bunun ÜK ve CH’ya tipik olan kronik enflamasyona yol açan uygunsuz immün cevaba yol açtığı kabul edilmektedir (45, 53). Toleransın neden kaybolduğu ve alışlagelen barsak bakterilerine verilen anormal cevabın nedeni ise hala kesin değildir (45).

2.4.3.4. EBH histopatolojisi

EBH açısından değerlendirilen tüm çocuklara özoagogastro duodenoskopi ve ileokolonoskopi yapılmaktadır. Kolonoskopi yapılan çocuklarda mukozada hiperemi, ülserasyon, polip, darlık, vasküler patern, dokunma ile kanama ve ödem varlığı araştırılır (43).

Çıkarılan örneklerde ağırlıklı olarak mukozayı etkileyen ÜK’da serozal yüzey normal gözlenirken, CH’da transmural enflamasyon olduğu hallerde serozal anormallikler gözlenebilir. Hastalık ilerledikçe yağ ile kaplanma, striktür, fistül veya abseler görülebilmektedir (56).

Alınan biyopsilerin veya operasyon materyallerinin incelenmesinde kronik ÜK’da kolondaki mukozal çizgi ve kriptlerin şeklinde bozulma meydana gelirken, mukus salgısında azalma ve lamina propria da yoğun lenfosit ve plazma hücreleri ve değişken miktarlarda eozinofil infiltrasyonu gözlenir (56, 57). Hastalığın aktif dönemlerinde ise kriptlerde abse formasyonu ve yoğun PNL infiltrasyonu gözlenir (56).

CH’da ise ÜK’dan farklı olarak “fokal” enflamasyon gözlenir : Aralarında normal alanların da olduğu PNL infiltrasyonu içeren kriptler, granülomalar, transmural lenfosit birikimleri, muskularis mukozada kalınlaşma, submukozal fibrozis, vaskülit (56).

2.4.3.5. Tedavi

Hastalıkta kullanılan ilaçlar 5-aminosalisilatlar, kortikosteroidler, immün sistem düzenleyicileri, biyolojik terapi, beslenme terapisi, antibiyotik ve probiyotiklerdir.

Çocuklardaki başlangıç tanıda ÜK ve CH ayrımı yapılması ileriki tedavi rejimlerinde de farklılık olduğu için önemlidir. İnce barsak tutulumu olan hastalar kolon tutulumu olan hastalara göre prednizon tedavisine daha çok cevap verirler. Distal ÜK'da topikal tedavi yeterli olabilirken, lokalize (ileoçekal) CH'da cerrahi ilk seçenek olabilir (44).

Çocuklarda CH'nın başlangıç tedavisi ÜK'ya benzer değildir. Pediatrik CH'da beslenme tedavisi ilk seçenek olarak önerilirken, sulfasalazin veya mesalamin ve kortikosteroidler (gerektiğinde) çocuklarda ÜK'da ilk düşünülmesi gereken tedavidir (44).

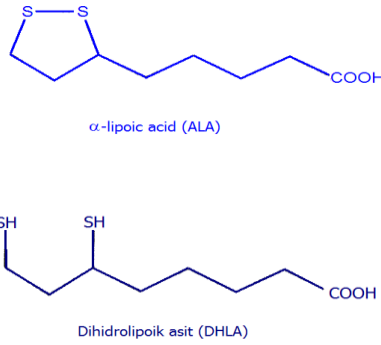
Sulfapiridine azo bağıyla bağlanmış 5-aminosalisilik asitten (5-ASA) oluşan sulfasalazin ve sadece 5-ASA'dan oluşan mesalamin, araşidonik asit metabolizması lipooksijenaz yoluyla lökotrien biyosentezini inhibe ederek ve daha sonra myeloperoksidaz aktivitesini inhibe ederek, nötrofillerin doku hasarı yapmasına ve serbest radikal oluşumuna engel olarak antienflamatuar etki gösterir.

Bu ilaçlara cevap vermeyen hastalarda kortikosteroidler kullanılır. Bu ilaçlar PNL migrasyonunu baskılar ve artmış kapiler permeabiliteyi geri çevirerek enflamasyonu azaltırlar. Fakat yan etkileri nedeniyle idamede değil akut durumlarda kullanılırlar. Kortikosteroidlerin dozunu azaltmada sorun yaşanması halinde üçüncü basamak 6-merkaptoprin veya azatioprin gibi immünomodülatör ilaçlardır. Bu ilaçlar kullanılmaya başlandıktan en erken 2-3 ay sonra lenfosit sayısını düşürerek etki gösterdiklerinden dolayı akut alevlenmelerde değil remisyonda kullanılırlar.

EBH'nın ileri dönemlerinde infüzyon yoluyla bir anti-TNF- α monoklonal antikoru olan infliximab kullanılabilir. Son yıllarda subkutan enjeksiyonla verilebilen formları olan adalimumab ve certolizumab da geliştirilmiştir. EBH'da son yıllarda insan hastalarda deneysel olarak metotreksat, talidomid, interlökin-11, siklosporin, nikotin patch, bütirat enema ve heparin de kullanılmış, fakat çok fazla kontrendikasyon, etkileşim ve alınması gereken önlemler bildirilmiştir.

2.5. Alfa Lipoik Asit ve Antioksidanlar

Alfa lipoik asit (ALA) doğal olarak oluşan ve iki sülfür molekülü içeren kısa zincirli bir yağ asitidir (Şekil 7) (4). Düşük redoks potansiyeli ve benzersiz redüksiyon kapasitesi sayesinde reaktif oksijen türevlerinin yakalanmasında ve diğer antioksidanların okside formlarının redüksiyonunda görev alan ALA'ya bu yüzden “**antioksidanların antioksidanı**” denilmektedir (5).



Şekil 7 : ALA moleküler yapısı

ROT, oksijenin metabolize edilmesi sırasında sürekli olarak küçük miktarlarda üretilen oksijen metabolitleridir. Vücutta hem yararlı (enfeksiyöz ajanlara karşı savunma ve hücrel sinyal sistemlerinde görev alması), hem de zararlı (oksidatif stresi artırarak hücrel lipidlere, proteinlere ve DNA'ya zarar vermesi) etkileri mevcuttur (58). Travma, iskemi veya enfeksiyon nedeniyle oluşabilecek doku hasarı sonrası bir çok mekanizma ile oluşan ROT ise vücuttaki oksidatif stresi artırırlar (59). Antioksidanlar ise bu serbest radikallerle etkileşen ve onların yarattığı hasarı engelleyen maddelerdir. Antioksidanlar bu etkilerini oksidan maddelerin biyolojik hedeflere ulaşmasından önce bu maddelerle etkileşerek, zincirleme reaksiyonları önleyerek veya oksijenin daha yüksek reaktif maddelere aktivasyonunu önleyerek gösterirler (60).

Çeşitli kaynaklardan gelen serbest radikallere maruziyet nedeniyle organizmamızda bir seri savunma mekanizmaları gelişmiştir (61). Serbest radikaller nedeniyle oluşan oksidatif strese karşı savunma mekanizmaları önleyici mekanizmalar, tamir mekanizmaları, fiziksel savunmalar ve antioksidan mekanizmaları içerir. Enzimatik antioksidanlar süperoksit dismutaz (SOD),

glutasyon peroksidaz (GPx) ve katalazı içerirken, enzimatik olmayan antioksidanlar askorbik asit (C vitamini), α -tokoferol (E vitamini), glutasyon (GSH), karotenoidler, flavonoidler ve diğere antioksidanları içerir (58).

Deneysel kolit PNL, makrofaj, lenfosit ve mast hücrelerinin transmural infiltrasyonu ile karakterize, mukozal hasarlanma ve ülserasyon gösteren enflamatuvar bir durumdur. İnfiltrasyon gösteren ve aktive olan PNL'ler reaktif oksijen ve nitrojen türevlerinin önemli kaynaklarıdır (62). Her ne kadar bu türevlerin yapımı bakteriyel enfeksiyon ve dış etkenlere karşı etkili bir konak savunma mekanizması olsa da; sürekli ve aşırı üretildikleri zaman nükleik asitler, lipid ve proteinlerin oksidatif stres altında bozulmalarına yol açarak hücrel disfonksiyon ve hasara neden olurlar (62, 63). Oksidatif stres ve sonrasında izleyen lipid peroksidasyonu zincirleme serbest radikal reaksiyonları, mukozal bariyerin bozulması ve enflamatuvar mediatörlerin aktivasyonuna yol açabilir. Bu nedenle hem hasta insanlarda hem de deneysel kolit modellerinde malondialdehid (MDA) içeriği artış gösterir. Bu MDA düzeyleri genellikle oksidatif hasarın bir göstergesidir ve serbest radikallerce indüklenen lipid peroksidasyonunun bir belirteçidir. Daha önceki bilgilerimiz kolitte antienflamatuvar ve antioksidan kullanımı ile MDA düzeylerinde düşme olduğunu göstermiştir (64).

ALA'yı da içeren antioksidan ilaçlar patolojik süreçlerin başlamasını önleyebilir, yavaşlamasını sağlayabilir hatta sonrasında tamirde de görev alırlar. ALA metal şelasyonu, reaktif oksijen radikallerini yakalama, NF- κ B transkripsiyon faktör aktivitesini düzenleyici etkisi, tamir sistemlerindeki görevi ve ubikinon, C vitamini, E vitamini ve glutasyon gibi endojen antioksidanların rejenerasyonu yolu ile etki gösteren çok etkili bir antioksidandır (4, 65). ALA hem suda hem de yağda çözündüğü için hayvanlardaki ve bitkilerdeki hücrel membranlar ve sitozolde çözünebilmektedir (66). Tüm prokaryotik ve ökaryotik hücrelerde bulunan bu molekül enerji sentezinde görevli mitokondrial solunumsal enzimler olan pirüvat dehidrogenaz ve α -keto-glutarat dehidrogenaz enzimlerinin temel kofaktörüdür (4). Açıl gruplarını bağlar ve onları bir enzim kompleksinden diğere transfer eder. Bu arada dihidrolipoik asite (DHLA) redükte olur, DHLA daha sonra lipoamid dehidrogenaz ile NAD⁺dan NADH oluşturarak okside olur (4).

Bir çok deneysel çalışmada hem ALA hem de DHLA'nın çeşitli formlarda oksidatif stres karşısında dokudaki antioksidan kapasiteyi arttırdığı gösterilmiştir (4). ALA'nın yapısını oluşturan 6,8-dithio-octanic acid molekülü direkt olarak ROT ile reaksiyona girerken, indirgenmiş formu olan DHLA diğer endojen antioksidanlarla etkileşime girerek ve intrasellüler glutatyonu arttırarak etki eder (67).

Vücutta yüksek metabolik aktivite olan dokular yüksek oranda ALA içermektedirler (4). Hayvanların özellikle böbrek, kalp ve karaciğer dokularında, ıspanak, brokoli ve patatesten yüksek oranda bulunan endojen bir ajandır (68). Oral yoldan diet desteği olarak yaygın kullanımı olan ALA'nın tedavide kullanılan intravenöz formu da bulunmaktadır. Oral olarak alındıktan sonra lipolizin olarak yüksek oranda emilir fakat karaciğer tarafından izomer ve formülüne bağlı olarak büyük oranda metabolize edilerek % 20-38 oranında biyoyararlanım değerine ulaşır. Bu düşük biyoyararlanım nedeniyle ratlarda %50 ölümcül doz değerleri ağızdan 1130 mg/kg, intraperitoneal 200 mg/kg, subkutaneal 230 mg/kg ve intravenöz yolla 180 mg/kg olarak ölçülmüştür (4). Yapılan hayvan çalışmalarında ALA'nın dozunun %80'inin renal ekskresyon ile atıldığı gösterilmiştir (67).

İnsanlarda yapılan çalışmalarda ALA'nın in vivo olarak; endojen antioksidan seviyelerinde artış sağladığı, T helper lenfositler üzerine olan olumlu etki gösterdiği ve lipid peroksidasyon ürünlerini azalttığı gösterilmiştir. Hayvan çalışmalarında ise eritrositlerdeki Na/K-ATPaz ve Ca-ATPaz aktivitelerini etkilediği, etanol plazma seviyesini düşürdüğü, lokomotor aktivite üzerine olumlu etki gösterdiği, hipokampal hücre hasarını azalttığı, beyindeki GSH seviyesini düşürdüğü, cilt enflamasyonu azalttığı, sinir iletimini hızlandırdığı ve sinir kan akımını arttırdığı, katarakt oluşumunu azalttığı, astımda havayollarındaki enflamasyonu azalttığı gösterilmiştir (4, 65). Bu etkileri nedeniyle AIDS, renal lithiazis, etanol intoksikasyonu, beyin iskemi, felç, Parkinson hastalığı, deri enflamasyonu, diabetik nöropati, radyasyon hasarı ve katarakt hastalığında prelinik çalışmalarda ve klinikte kullanılmaktadır (4, 5, 68). Oral olarak kullanılan ALA sindirim sisteminden kolayca emilir ve biyoyararlanımı iyidir (65, 67). Diabetik nöropatinin tedavisinde yaygın olarak kullanılan bu ilaçta önemli yan etki de görülmemiştir (65).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Çalışma Grupları

Çalışma Adnan Menderes Üniversitesi Hayvan Araştırma Etik Komitesinden izin alındıktan sonra, National Institute of Health'in hayvan çalışmaları yönetmeliğine (NIH publication No.86-23, revised 1985) uygun olarak, oda sıcaklığında, %65-70 nem oranındaki ortamda 12 saat aydınlık, 12 saat karanlıkta tutulan, sınırsız su ve standart pellet yem ile beslenen 10 haftalık dişi 42 Wistar Albino rat (250-300 gr) ile gerçekleştirildi.

Çalışmada toplam 42 adet Wistar albino rat kullanıldı. Ratlar beş gruba ayrıldı ve gruplar şu şekilde oluşturuldu;

- 1) Kontrol grubu (n=8); İntrakolonik mısırözü yağı (MÖY) verilen ratlar
- 2) Sham grubu (n=8); Kolit yapıldıktan sonra oral yoldan mısırözü yağı verilen ratlar
- 3) ALA Gavaj grubu (n=9); Kolit yapıldıktan sonra oral yoldan Alfa Lipoik Asit verilen ratlar
- 4) ALA Lavman grubu (n=9); Kolit yapıldıktan sonra intrakolonik Alfa Lipoik Asit verilen ratlar
- 5) MÖY Lavman grubu (n=8); Kolit oluşturulan ve intrakolonik mısırözü yağı verilen ratlar

3.2. Kolitin Oluşturulması

Kontrol grubu dışındaki tüm ratlarda kolit oluşturuldu. Hayvanlar kolit yapılmadan önceki gece aç bırakıldılar, ve daha sonraki gün kolonları kuyruk refleksi ile boşaltıldılar. Ratlar kas içine verilen 5 mg/kg Xylazine ve 50 mg/kg Ketamin ile uyutuldu (69). Dış çapı 6 French olan fleksibl polipropilen kateter, ucu anüsten 8 cm içeri girecek şekilde kolona yerleştirildi (70). TNBS'nin (50 mg/ml) 0.63 ml'si 0.37 ml %100 absolü alkol içinde çözüldü. Bu karışımdan 0.8 ml (%37 alkol + 25 mg TNBS) kolona kateter yardımı ile verildi (69). İşlem sonrası ratlar 15 dakika sırt üstü Trendelenburg pozisyonunda bekletildiler (71).

3.3. Deneyin Uygulanması

Kontrol grubundaki ratlara 7 gün boyunca her gün ve günde bir kez 1 ml mısırözü yağı intrakolonik olarak verildi.

İkinci gruptaki (Sham grubu) ratlarda kolit yapıldıktan sonra günde 1 kez olmak üzere 7 gün boyunca oral yoldan 1 ml mısırözü yağı verildi.

Üçüncü grupta (ALA gavaj grubu) kolit oluşturulmasından bir gün sonra başlanarak 7 gün boyunca her gün ve günde 1 kez olmak üzere 1 ml mısırözü yağı içinde çözülmüş halde 200 mg/kg/gün ALA ağızdan verildi (72).

Dördüncü grupta (ALA Lavman grubu) 7 gün boyunca her gün ve günde 1 kez olmak üzere 200 mg/kg/gün ALA 1 ml mısırözü yağı çözeltisi içinde çözülüp kolona verildi.

Beşinci grupta (Mısırözü lavman) kolit oluşturuldu ve 1 gün sonra başlanarak her gün günde 1 kez olmak üzere 1 ml mısırözü yağı intrakolonik olarak verildi.

Uygulamanın başlamasından 8 gün sonra tüm ratlara genel anestezi altında orta hat kesi ile laparotomi yapıldı. Anüsün 10 cm proksimalindeki kolon bölgeleri histolojik inceleme için alındı. Alınan parçalar longitudinal olarak açıldılar ve steril salin solüsyonu ile irrigate edildiler. Bu parçalar patolog tarafından makroskopik lezyonlar açısından derecelendirildikten sonra formaldehid solüsyonuna koyuldular ve histopatolojik değerlendirme amacıyla patoloji laboratuvarına gönderildiler. Her rattan intrakardiyak olarak alınan 2 cc kan örneği inceleme amacıyla biyokimya laboratuvarına gönderildi. Daha sonra tüm ratlar anestezi altında iken dekapitasyon ile sakrifiye edildiler.

ALA, Solgar Vitamins and Herb Company (Leonia, NJ)'den, TNBS Sigma Kimyasalları A.Ş.'den sağlandı.

3.4. Histopatolojik değerlendirme

Patoloji laboratuvarına gönderilen doku örnekleri öncelikle %10'luk tamponlanmış formalin solüsyonunda fikse edildi. Kolon dokusundan tam kat alınan örnekler kasetlendi ve rutin doku takibi sonrasında parafine gömüldü. Parafin bloklardan 4 mikronluk kesitler hazırlandı ve hematoksilin-eozin ile boyandı. Boyanan preparatlar ışık mikroskopu altında değerlendirildi ve kolon hasarını

belirlemek için mukoza epiteli, lamina propria ve submukozadaki değişiklikler skorlandı.

3.4.1 Mikroskopik kolonik lezyonların değerlendirilmesi

Histolojik hasar, deney gruplarını bilmeyen bir patolog tarafından daha önce Peran ve ark. (73) tarafından tanımlanan kriterlere göre değerlendirildi ve mukoza epiteli, kriptler, lamina propria, submukoza ve bunların tümünün toplamı olan toplam mikroskopik skor olarak skorlandırıldı (Tablo I).

Tablo I : Mikroskopik kolon hasarının değerlendirilmesi *

Değerlendirilen bölge	Skor			
	0	1	2	3
<u>Mukoza epitelyumu</u>				
Ülserasyon	Yok	Hafif- Yüzeysel	İlımlı	Ağır–Tam kat
<u>Kriptler</u>				
Mitotik aktivite	Alt 1/3	Hafif orta 1/3	İlımlı orta 1/3	Üst 1/3
Mukus birikimi	Yok	Hafif	İlımlı	Ağır
<u>Lamina propria</u>				
Vaskülarite	Yok	Hafif	İlımlı	Ağır
Granülosit hücre birikimi	Yok	Hafif	İlımlı	Ağır
Mononükleer hücre birikimi	Yok	Hafif	İlımlı	Ağır
<u>Submukoza</u>				
Ödem	Yok	Hafif	İlımlı	Ağır
Granülosit hücre birikimi	Yok	Hafif	İlımlı	Ağır
Mononükleer hücre birikimi	Yok	Hafif	İlımlı	Ağır

* Maksimum skor: 27

3.4.2. Makroskopik kolonik lezyonların değerlendirilmesi

Kolon örnekleri makroskopik olarak görülebilen hasarlar açısından Bell ve ark.'ın (74) tanımladığı kriterlere göre değerlendirildiler (Tablo II).

Tablo II : Makroskopik kolon hasarının değerlendirilmesi *

Skor	Görünüm
0	Hasar yok
1	Lokalize hiperemi (Ülser yok)
2	Ülserasyon (Hiperemi yok, barsak duvar kalınlaşması yok)
3	Ülserasyon (bir bölgede enflamasyon ile)
4	İki veya daha fazla bölgede ülser veya enflamasyon
5	1 cm'i geçen majör bölgelerde hasar
6-10	Hasar 2 cm'i geçiyorsa her 1 cm için ek 1 puan verilir

* Maksimum skor 10

3.5. Biyokimyasal Analizler

3.5.1. Serum Malondialdehid Düzeyinin Saptanması

Serum MDA konsantrasyonu tiyobarbitürik asitin tepkime sonrası oluşan yan ürünlerinin spektrofotometrik olarak incelenmesi esasına göre ölçüldü. Serum örneklerinin her birinden 125 µ alındı ve içerisine 250 µl (%0.67'lik) tiyobarbitürik asit ve 625 µl (%20'lik) trikloroasetik asit eklendi. Bu karışım 95° C'de 30 dakika kaynatıldı. Hemen sonra buz dolu kapta soğutulan karışıma 1 ml n-Butanol eklenip 10 dakika boyunca 3000 RPM'de santrifüje edildi. Üstte kalan kısım spektrofotometrede 535 nm'de havaya karşı okundu. MDA konsantrasyonu hesaplanırken MDA-tiyobarbitürik asit kompleksinin 535 nm'deki tükenme katsayısı olarak $1.56 \times 10^5 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ kullanıldı (75).

3.5.2. Serum Katalaz Düzeyinin Saptanması

Alınan örneklerde katalaz değerlendirilmesi için önce Tampon A 1000 ml'sinde 6.81 g KH_2PO_4 olacak şekilde ve Tampon B 1000 ml'sinde 8.90 gr $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ olacak şekilde hazırlandı. Daha sonra Tampon A:B = 1:1,5 olacak

şekilde karıştırıldı. Bu tampon A+B karışımının 25 ml'sine 85 µl %30'luk H₂O₂ eklenerek H₂O₂ tamponu oluşturuldu.

EDTA'lı tüpe alınmış olan kan örnekleri 3 kez soğuk serum fizyolojik ile yıkandı. 200 µl eritrosit ve 800 µl distile su ile hemolizat hazırlandı. Cam tüpe 10 ml tampon A+B koyularak içine 10 µl hemolizat eklendi. Bu hemolizattan 2 ml alındı, içine 1 ml H₂O₂ konuldu ve spektrofotometrede 240 nm'de +20°C'de 15 saniyede bir 9 kez okunarak A1 değeri elde edildi. Hemolizattan 2 ml alınarak içine 1 ml tampon A+B konuldu ve aynı şartlarda spektrofotometrik olarak değerlendirilerek A2 değeri elde edildi. Alınan kan örneklerinde hemoglobin değerleri gr/100ml cinsinden ölçüldü. Daha sonra katalaz değerleri $[\log_{10} (A1/A2)] \times 0.153 \times DF / \text{Hemolizat Hb}$ formülü ile U / gr Hb cinsinden hesaplandı (76).

3.5.3. Serum Nitrik Oksit (NO) Düzeyinin Saptanması

Örnekler her 400 µl örnek içine konulan 80 µl %30 ZnSO₄ ile deproteinize edildi. Santrifüje edilerek süpernatant ayrıldı. Kadmium önce distile su, sonra Glisin NaOH (pH:9.2) tamponunda hazırlanmış C₄SO₄ solusyonunda 1-2 dakika bekletildi. Sonra Glisin-NaOH ile tekrar yıkandı. 200 µl deproteinize süpernatant, 200 µl Glisin-NaOH, 400 µl H₂O ve 20-30 mg kadmium tüpte 90 dk inkübe edildikten sonra santrifüje alındı. 10000 rpm'de 10 dakika santrifüje edildi ve süpernatantı ayrıldı. 100 µl süpernatant, 50 µl N-Naphylene dramine ve 50 µl sülfonamid eklenerek plakta 45 dakika inkübe edildi. 540 nm dalga boyunda NaNO₂ MA:69,0 ile hazırlanan standarta karşı okutuldu (77).

3.6. İstatistiksel analizler

Gruplara göre normal dağılım uygunluğu Kolmogorov-Smirnov testi ile test edildi. Tüm sonuçlar normal dağılıma uygun bulunmadığı için tüm sonuçlar ortalama ± SD ve median (minimum-maximum) olarak ortaya konuldu. Veriler Kruskal-Wallis ANOVA ve Dunn multipl karşılaştırma postest'i ile analize edildi. İstatistiksel analiz GraphPad InStat 3.0 (San Diego, CA, USA) ve SPSS 16.0 istatistik yazılımı kullanılarak yapıldı. P<0.05 değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. Patolojik İnceleme

4.1.1 Mikroskopik İnceleme Toplam Skorların Karşılaştırılması

Tablo III kolonun histopatolojik incelemesini göstermektedir. Mikroskopik inceleme toplam skorlarının istatistiksel değerlendirilmesinde Sham grubunda Kontrol grubuna göre anlamlı yüksek değerler saptanmıştır ($p<0.01$). ALA Gavaj grubundaki toplam skor oldukça düşük olarak elde edilmiş ve bu değer ile kontrol grubu arasında istatistiksel fark gözlenmemiştir ($p>0.05$). ALA Lavman ($p<0.05$) ve MÖY Lavman ($p<0.01$) gruplarında Kontrol grubuna göre anlamlı yüksek değerler gözlenmiştir (Tablo IV).

Tablo III : Mikroskopik İnceleme Toplam Skorları

Grup	Ortalama \pm SD	Median	Minimum-maksimum
Kontrol	2.38 \pm 0.91	2.00	1.00 - 4.00
Sham	11.38 \pm 6.16	7.00	3.00 - 19.00
ALA Gavaj	6.33 \pm 1.73	11.00	3.00 - 8.00
ALA Lavman	10.22 \pm 6.40	10.00	2.00 - 19.00
MÖY Lavman	11.38 \pm 5.10	11.00	3.00 - 19.00

Tablo IV : Mikroskopik İnceleme Toplam Skorlarının Karşılaştırılması

Gruplar arası karşılaştırma	Ortalama sınıf farkı	p değeri	Anlamlı
Kontrol ile Sham	-22.06	$p<0.01$	**
Kontrol ile ALA Gavaj	-13.33	$p>0.05$	
Kontrol ile ALA Lavman	-19.06	$p<0.05$	*
Kontrol ile MÖY lavman	-22.88	$p<0.01$	**
ALA Gavaj ile Sham	8.73	$p>0.05$	
ALA Gavaj ile ALA Lavman	-5.72	$p>0.05$	
ALA Gavaj ile MÖY lavman	-9.54	$p>0.05$	
ALA Lavman ile Sham	3.01	$p>0.05$	
ALA Lavman ile MÖY lavman	-3.82	$p>0.05$	
Sham ile MÖY lavman	-0.81	$p>0.00$	

4.1.2. Mukozal Değişikliklerin Karşılaştırılması

Mikroskop ile değerlendirildiğinde Kontrol ve ALA Gavaj grubunda mukozal değişikliğe rastlanmamıştır (Tablo V). Kontrol ve ALA Gavaj gruplarında tüm

değerlerin 0 olması nedeniyle bu gruplar diğer gruplarla karşılaştırılamamıştır. Diğer 3 grup arasında istatistiksel fark gözlenmemiştir ($p>0.05$) (Tablo VI).

Tablo V : Mukozal Değişiklikler

Grup	Ortalama \pm SD	Median	Minimum-maksimum
Kontrol	0.00 \pm 0.00	0.00	0.00 - 0.00
Sham	1.13 \pm 1.55	0.00	0.00 - 0.00
ALA Gavaj	0.00 \pm 0.00	0.00	0.00 - 3.00
ALA Lavman	1.22 \pm 1.48	0.00	0.00 - 3.00
MÖY Lavman	0.88 \pm 1.25	0.00	0.00 - 3.00

Tablo VI : Mukozal Değişikliklerin Karşılaştırılması

Gruplar arası karşılaştırma	Ortalama sınıf farkı	p değeri	Anlamlı
Kontrol ile Sham		-	-
Kontrol ile ALA Gavaj	Kontrol ve ALA Gavaj gruplarında değerlerin 0 olması nedeniyle karşılaştırılamadı	-	-
Kontrol ile ALA Lavman		-	-
Kontrol ile MÖY lavman		-	-
ALA Gavaj ile Sham		-	-
ALA Gavaj ile ALA Lavman		-	-
ALA Gavaj ile MÖY lavman		-	-
ALA Lavman ile Sham	-0.09	$p>0.05$	
ALA Lavman ile MÖY lavman	0.35	$p>0.05$	
Sham ile MÖY lavman	0.25	$p>0.05$	

4.1.3. Kriptlerdeki Değişikliklerin Karşılaştırılması

Tablo VII kriptlerdeki değişiklikleri göstermektedir. Kriptlerde yapılan patolojik incelemede kontrol ile MÖY Lavman grupları arasında anlamlı fark bulunmuştur ($p<0.05$). Sham, ALA Gavaj ve ALA Lavman gruplarındaki değerler ile kontrol grubu arasında ise istatistiksel fark gözlenmemiştir ($p>0.05$) (Tablo VIII).

Tablo VII : Kriptlerdeki Değişiklikler

Grup	Ortalama \pm SD	Median	Minimum-maksimum
Kontrol	0.00 \pm 0.00	0.00	0.00 - 0.00
Sham	1.63 \pm 1.41	1.00	0.00 - 3.00
ALA Gavaj	0.67 \pm 0.71	2.00	0.00 - 3.00
ALA Lavman	1.00 \pm 1.00	1.00	0.00 - 2.00
MÖY Lavman	1.75 \pm 1.39	2.00	0.00 - 4.00

Tablo VIII : Kriptlerdeki Değişikliklerin Karşılaştırılması

Gruplar arası karşılaştırma	Ortalama sınıf farkı	p değeri	Anlamlı
Kontrol ile Sham	-15.50	p>0.05	
Kontrol ile ALA Gavaj	-10.33	p>0.05	
Kontrol ile ALA Lavman	-10.28	p>0.05	
Kontrol ile MÖY lavman	-16.44	p<0.05	*
ALA Gavaj ile Sham	-5.17	p>0.05	
ALA Gavaj ile ALA Lavman	0.06	p>0.05	
ALA Gavaj ile MÖY lavman	-6.10	p>0.05	
ALA Lavman ile Sham	5.22	p>0.05	
ALA Lavman ile MÖY lavman	-0.94	p>0.05	
Sham ile MÖY lavman	-6.16	p>0.05	

4.1.4. Lamina Propriadaki Değişikliklerin Karşılaştırılması

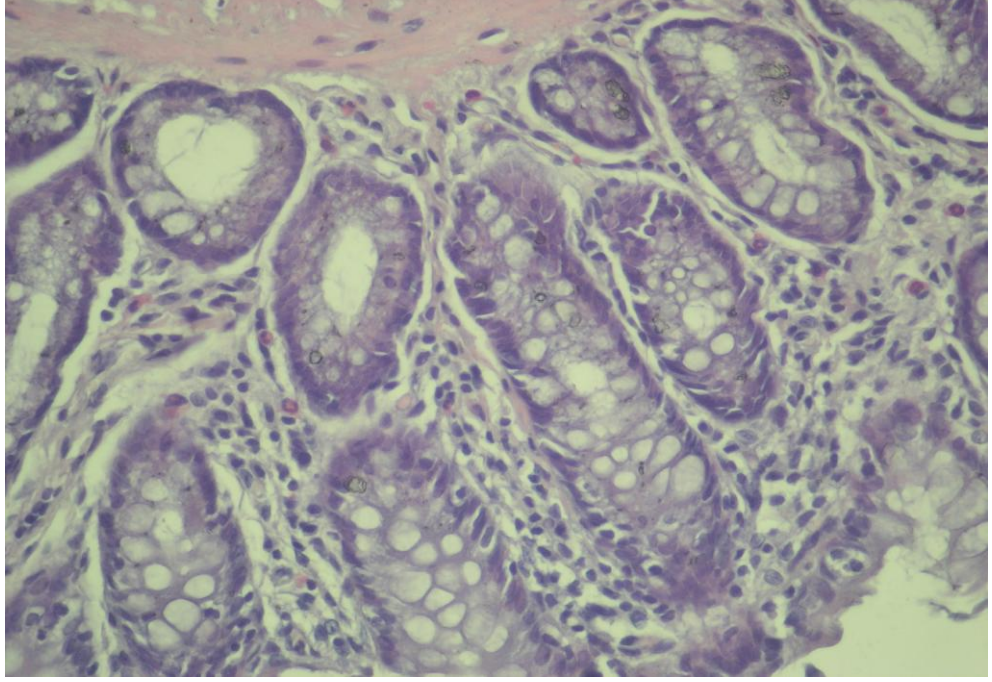
Kontrol - Sham ve Kontrol - MÖY Lavman grupları arasında anlamlı fark bulunmuştur (p<0.05) (Tablo IX ve Tablo IX). Resim 1 ve resim 2'de lamina propriada yoğun enflamasyon gözlenmektedir.

Tablo IX : Lamina Propriadaki Değişiklikler

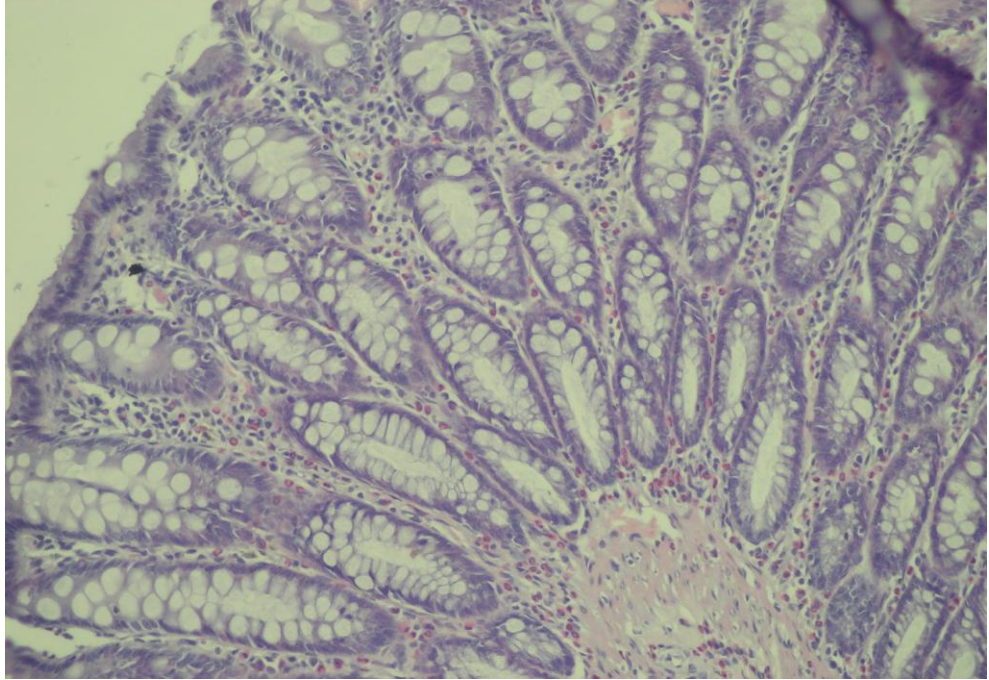
Grup	Ortalama ± SD	Median	Minimum-maksimum
Kontrol	2.38 ± 0.74	2.00	1.00 - 3.00
Sham	5.00 ± 1.78	3.00	2.00 - 4.00
ALA Gavaj	3.00 ± 0.71	4.50	3.00 - 7.00
ALA Lavman	4.56 ± 2.07	5.00	2.00 - 7.00
MÖY Lavman	5.00 ± 1.19	5.50	3.00 - 6.00

Tablo X : Lamina Propriadaki Değişikliklerin Karşılaştırılması

Gruplar arası karşılaştırma	Ortalama sınıf farkı	P değeri	Anlamlı
Kontrol ile Sham	-20.44	p<0.05	**
Kontrol ile ALA Gavaj	-6.90	p>0.05	
Kontrol ile ALA Lavman	-15.40	p>0.05	
Kontrol ile MÖY lavman	-20.75	p<0.05	**
ALA Gavaj ile Sham	-13.54	p>0.05	
ALA Gavaj ile ALA Lavman	-8.50	p>0.05	
ALA Gavaj ile MÖY lavman	-13.85	p<0.05	
ALA Lavman ile Sham	5.04	p>0.05	
ALA Lavman ile MÖY lavman	-5.34	p>0.05	
Sham ile MÖY lavman	-0.32	p>0.05	



Resim 1: Lamina propriada mononükleer ve PNL hücre infiltrasyonu görülmektedir (H&E boyası, x400 büyütme).



Resim 2: Enflamasyonun lamina propria ve ötesine de geçtiği görülmektedir (H&E boyası, x200 büyütme)

4.1.5. Submukozadaki Değişikliklerin Karşılaştırılması

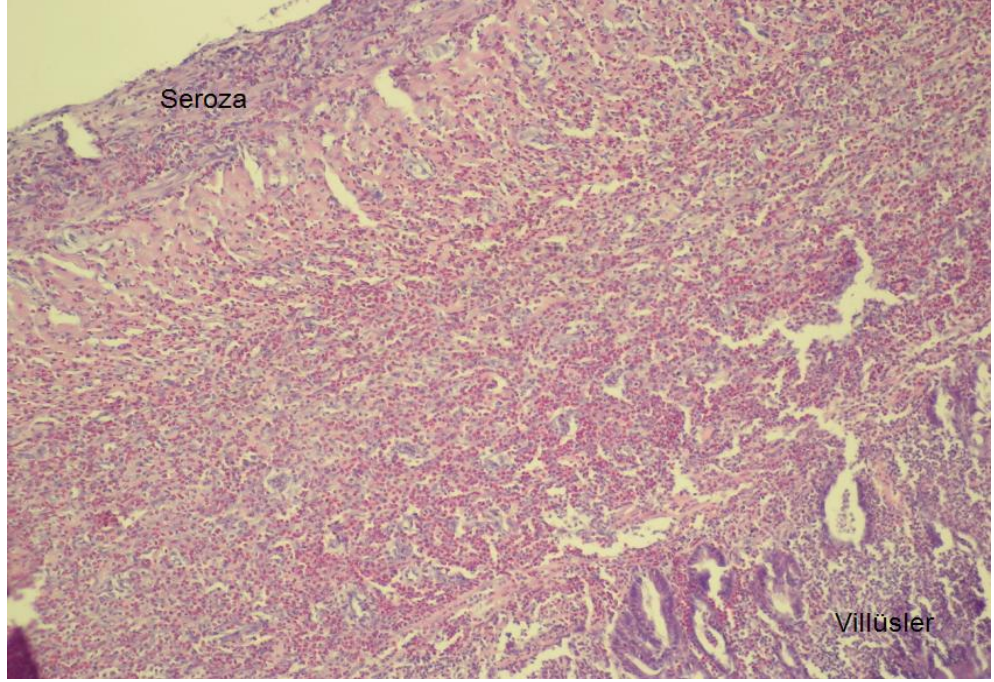
Submukozanın incelenmesinde kontrol grubu ile karşılaştırıldığında Sham ($p<0.05$), ALA Lavman ($p<0.05$) ve MÖY Lavman ($p<0.01$) gruplarındaki değerler yüksek bulunmuştur. ALA Gavaj ve Kontrol grubu arasında fark gözlenmemiştir ($p>0.05$) (Tablo XII ve Tablo XIII). Resim 3'te tam kat enflamasyon görülmektedir.

Tablo XII : Submukozadaki Değişiklikler

Grup	Ortalama \pm SD	Median	Minimum-maksimum
Kontrol	0.13 \pm 0.35	0.00	0.00 - 1.00
Sham	3.63 \pm 2.13	3.00	0.00 - 4.00
ALA Gavaj	2.67 \pm 1.12	3.50	0.00 - 7.00
ALA Lavman	3.44 \pm 2.19	3.00	0.00 - 7.00
MÖY Lavman	3.75 \pm 1.98	3.50	0.00 - 6.00

Tablo XII : . Submukozadaki Değişikliklerin Karşılaştırılması

Gruplar arası karşılaştırma	Ortalama sınıf farkı	p değeri	Anlamlı
Kontrol ile Sham	-19.69	$p<0.05$	*
Kontrol ile ALA Gavaj	-14.69	$p>0.05$	
Kontrol ile ALA Lavman	-17.97	$p<0.05$	*
Kontrol ile MÖY lavman	-21.00	$p<0.01$	**
ALA Gavaj ile Sham	4.99	$p>0.05$	
ALA Gavaj ile ALA Lavman	-3.28	$p>0.05$	
ALA Gavaj ile MÖY lavman	-6.31	$p>0.05$	
ALA Lavman ile Sham	1.72	$p>0.05$	
ALA Lavman ile MÖY lavman	-3.03	$p>0.05$	
Sham ile MÖY lavman	-1.31	$p>0.05$	



Resim 3: Resimde tam kat enflamasyon görülmektedir (H&E boyası, x100 büyütme).

4.1.6. Makroskopik Görünümlerin Karşılaştırılması

Kontrol grubunun makroskopik değerlendirilmesinde herhangi bir lezyona rastlanmamıştır (Tablo XIII). Makroskopik görünülerin değerlendirilmesinde Kontrol ve Sham grupları arasında istatistiksel olarak fark gözlenmiştir ($p>0.05$). ALA Gavaj grubunda ise Sham grubuna oranla istatistiksel olarak anlamlı düşük değerler elde edilmiştir ($p<0.05$) (Tablo XIV). Resim 4'te Sham grubunda kolit oluşmuş bir ratta anüsün dıştan görünümü yer almaktadır. Resim 5'te Kontrol grubundan alınan normal bir kolon dokusu gözlenmektedir. Resim 6'da Sham grubundan alınan ülserli kolon dokusu gözlenmektedir. Resim 7'de ALA Gavaj grubundaki bir örneğin makroskopik skoru 1 olarak ölçülmüştür.

Tablo XIII : Makroskopik Görünümler

Grup	Ortalama \pm SD	Median	Minimum-maksimum
Kontrol	0.00 \pm 0.00	0.00	0.00 - 0.00
Sham	2.63 \pm 3.46	1.00	0.00 - 8.00
ALA Gavaj	0.56 \pm 0.53	0.50	0.00 - 1.00
ALA Lavman	1.78 \pm 2.28	1.00	0.00 - 6.00
MÖY Lavman	0.88 \pm 1.36	0.00	0.00 - 3.00

Tablo XIV : Makroskopik Görünümlerin Karşılaştırılması

Gruplar arası karşılaştırma	Ortalama sınıf farkı	p değeri	Anlamlı
Kontrol ile Sham	-3.75	p<0.05	*
Kontrol ile ALA Gavaj	-0.56	p>0.05	
Kontrol ile ALA Lavman	-1.78	p>0.05	
Kontrol ile MÖY lavman	-0.88	p>0.05	
ALA Gavaj ile Sham	-3.19	p<0.05	*
ALA Gavaj ile ALA Lavman	-1.22	p>0.05	
ALA Gavaj ile MÖY lavman	-0.32	p>0.05	
ALA Lavman ile Sham	1.97	p>0.05	
ALA Lavman ile MÖY lavman	0.90	p>0.05	
Sham ile MÖY lavman	2.88	p>0.05	



Resim 4 : Koliit oluşmuş bir ratta anüsün dıştan görünümü



Resim 5 : Kontrol grubundan alınan örneklerde kolon makroskopik olarak normal (skor:0) görülmektedir. (Bu örneğin mikroskopik incelemedeki toplam skoru 2 olarak elde edilmiştir).



Resim 6 : Sham grubundan alınan örnekte makroskopik olarak 4 cm uzunluğunda ülser (skor:8) gözlenmektedir. (Bu örneğin mikroskopik incelemede skoru 19 olarak elde edilmiştir).



Resim 7: ALA Gavaj grubundan alınan bir örnekte makroskopik olarak lokalize hiperemi (skor:1) görülmektedir. (Bu örneğin mikroskopik incelemede skoru 8 olarak elde edilmiştir).

4.2. Biyokimyasal Değerler

4.2.1. MDA Değerleri

Tablo XV'te serum MDA değerleri gözlenmektedir. Biyokimyasal olarak kanda bakılan MDA düzeyleri Sham grubunda kontrol grubuna oranla yüksek olarak bulunmuştur ($p < 0.05$) (Tablo XVI). MDA düzeyi ALA Gavaj grubunda Sham grubuna oranla daha düşük bulunmuştur ($p < 0.05$). MÖY Lavman grubundaki değerler de Sham grubuna oranla anlamlı düşük olarak ölçülmüştür ($p < 0.05$).

Tablo XV : MDA Değerleri

Grup	Ortalama \pm SD (nmol/ml)
Kontrol	0.58 \pm 0.03
Sham	0.86 \pm 0.42
ALA Gavaj	0.54 \pm 0.05
ALA Lavman	0.62 \pm 0.04
MÖY Lavman	0.59 \pm 0.06

Tablo XVI : MDA Değerlerinin Karşılaştırılması

Gruplar arası karşılaştırma	Ortalama fark	p değeri	Anlamlı
Kontrol ile Sham	-0.28	p<0.05	*
Kontrol ile ALA Gavaj	0.04	p>0.05	
Kontrol ile ALA Lavman	-0.04	p>0.05	
Kontrol ile MÖY lavman	-0.01	p>0.05	
ALA Gavaj ile Sham	-0.32	p<0.01	**
ALA Gavaj ile ALA Lavman	-0.08	p>0.05	
ALA Gavaj ile MÖY lavman	-0.05	p>0.05	
ALA Lavman ile Sham	-0.24	p>0.05	
ALA Lavman ile MÖY lavman	0.04	p>0.05	
Sham ile MÖY lavman	0.28	p<0.05	*

4.2.2. NO Değerleri

NO değerleri gruplar arasında istatistiksel olarak fark göstermemiştir (p>0.05).

Tablo XVII : NO Değerleri

Grup	Ortalama ± SD (nmol/L)
Kontrol	7.83 ± 0.69
Sham	9.47 ± 2.40
ALA Gavaj	8.33 ± 0.96
ALA Lavman	9.55 ± 1.53
MÖY Lavman	7.66 ± 0.97

Tablo XVIII : NO Değerlerinin Karşılaştırılması

Gruplar arası karşılaştırma	Ortalama fark	p değeri	Anlamlı
Kontrol ile Sham	-1.64	p>0.05	
Kontrol ile ALA Gavaj	-0.49	p>0.05	
Kontrol ile ALA Lavman	-1.72	p>0.05	
Kontrol ile MÖY lavman	0.17	p>0.05	
ALA Gavaj ile Sham	-1.15	p>0.05	
ALA Gavaj ile ALA Lavman	-1.22	p>0.05	
ALA Gavaj ile MÖY lavman	0.67	p>0.05	
ALA Lavman ile Sham	0.08	p>0.05	
ALA Lavman ile MÖY lavman	1.89	p>0.05	
Sham ile MÖY lavman	1.81	p>0.05	

4.2.3. Katalaz Değerleri

Katalaz değerleri incelenmesinde sadece ALA Lavman grubunda ALA Gavaj grubuna oranla yüksek değerler elde edilmiştir (p<0.05).

Tablo XIX : Katalaz Değerleri

Grup	Ortalama ± SD (U/gr Hb)
Kontrol	1.13 ± 0.21
Sham	1.12 ± 0.29
ALA Gavaj	1.03 ± 0.27
ALA Lavman	1.59 ± 0.46
MÖY Lavman	1.42 ± 0.39

Tablo XX : Katalaz Değerlerinin Karşılaştırılması

Gruplar arası karşılaştırma	Ortalama fark	p değeri	Anlamlı
Kontrol ile Sham	0.01	p>0.05	
Kontrol ile ALA Gavaj	0.10	p>0.05	
Kontrol ile ALA Lavman	- 0.47	p>0.05	
Kontrol ile MÖY lavman	- 0.29	p>0.05	
ALA Gavaj ile Sham	- 0.09	p>0.05	
ALA Gavaj ile ALA Lavman	- 0.57	p<0.05	*
ALA Gavaj ile MÖY lavman	- 0.39	p>0.05	
ALA Lavman ile Sham	0.47	p>0.05	
ALA Lavman ile MÖY lavman	0.17	p>0.05	
Sham ile MÖY lavman	- 0.29	p>0.05	

Çalışmamızdaki tüm grupların istatistiksel karşılaştırmalarında bulunan anlamlı sonuçlar Tablo XXI'de görülmektedir.

Tablo XXI : Tüm Gruplardaki Anlamlılık Değerlerine Genel Bakış

Gruplar arası karşılaştırma	Mikro. değ.	Mukoza	Kript	Lam. Prop.	Sub-mukoza	Makro. değ.	MDA	NO	Katalaz
Kontrol ile Sham	**	∅		**	*	*	*		
Kontrol ile ALA Gavaj		∅							
Kontrol ile ALA Lavman	*	∅			*				
Kontrol ile MÖY Lavman	**	∅	*	**	**				
ALA Gavaj ile Sham		∅				*	**		
ALA Gavaj ile ALA lavman		∅							
ALA Gavaj ile MÖY lavman		∅							
ALA Lavman ile Sham									
ALA Lavman ile MÖY lavman									
MÖY gavaj ile MÖY lavman							*		

∅ : Skor sıfır

* : p<0.05

** : p<0.01

5. TARTIŞMA

Enflamasyon dokuların patojenler, hasarlanmış hücreler veya iritanlar gibi zararlı uyarılara verdiği kompleks biyolojik bir cevaptır (78).

İnsan vücudundaki en büyük lenfoid organ olan barsaklarda, diyetle alınan ve barsaklarda bulunan bakteriyel antijenlere karşı belli düzeyde bir enflamatuvar cevap oluşmuştur. Bu nedenle normal şartlar altında dahi intraepitelyal ve subepitelyal kompartmanlarda “fizyolojik enflamasyon” nedeniyle bol miktarda lökosit bulunmaktadır (79). Bu koruyucu cevapta amaç organizmanın zararlı uyarıyı uzaklaştırması olduğu kadar doku için iyileşme sürecini de başlatmasıdır (78). Fakat durum “patolojik enflamasyon” haline dönünce barsak ağırlıklı olarak aktive olmuş PNL, makrofaj ve sitotoksik T lenfositlerce istila edilir. Bu hücrelerin verdiği cevap direkt kontakt ile veya reaktif oksijen ve nitrojen metabolitlerinin, sitotoksik proteinlerin, litik enzimlerin veya sitokinlerin salınımı yoluyla indirekt olarak gerçekleşir (79).

Nekrotizan enterokolit, Hirschsprung hastalığı ilişkili enterokolit ve enflamatuvar barsak hastalıklarının etyoloji ve patofizyolojileri hakkında bir çok teori ve gerçek ortaya konulmuş olsa da hala tam açıklanamayan noktalar mevcuttur. Bu hastalıklar hakkında ortak bilinenler ise patofizyolojilerinde nötrofil infiltrasyonu olduğu ve proenflamatuvar mediatörlerin aşırı üretildiğidir.

Bu bilgiler ışığında ratlarda çeşitli modeller tasarlanıp, kolit oluşturulmuş ve bu deney modelleri ile kullanılan ilaçların kolonik enflamasyon üzerine olan etkileri incelenmiştir. Deneysel kolit modellerinin oluşturulmasında şimdiye kadar en sık dört kimyasal kullanılmaktadır: TNBS, asetik asit, oksazolon ve dekstran sodyum sülfat. Wirtz ve ark.'ın (1) 2007 yılında yayınladıkları protokol oluşturma amaçlı makalede TNBS'nin kolit oluşturma mekanizması araştırılmıştır. Bu modelde TNBS'nin intrakolonik verilmesi sonrası otolog proteinleri ve luminal antijenleri haptene etmesini takiben T hücre ilişkili bir cevap ile etki ettiği gösterilmiştir. Bu modellerde 1 haftada akut kolit oluşurken, kronik kolit oluşması 2 aylık bir süre almaktadır. Jurjus ve ark.'ın (80) makalesinde TNBS modelindeki kolitin insanlardaki kolit hastalığı ile benzerliğine değinilmiş ve hastalığın tedavisinde kullanılabilecek ilaçların geliştirilmesi ve denenmesinde çok kullanışlı bir model

olduğuna dikkat çekilmiştir. Torres ve ark.'ın (17) çalışmasında TNBS koliti incelenmiş ve oluşan histopatolojik bulgular ortaya konulmuştur. Bu çalışmaya göre TNBS verilmesi sonrası mukoza epitelinde ülserasyon ve deskuamasyon, lamina propriada PNL infiltrasyonu, ödem, transmural enflamasyon ve çeşitli derecelerde lenfosit infiltrasyonu gözlenmektedir. Bu bulgulara ek olarak kriptit ve goblet hücrelerinde mukus salgısında artma da gözlenmiştir. Galvez ve ark.'ın (81) yaptıkları çalışmada ratlara 30 mg TNBS'nin intrakolonik verilmesinden 1 hafta sonra alınan örneklerin histolojik analizinde, TNBS Sham grubundaki skorların TNBS Kontrol grubuna oranla anlamlı yüksek olduğu gözlenmiştir.

Bizim çalışmamıza bakıldığında da toplam mikroskopik ve makroskopik lezyon skorlarında ve serum MDA değerlerinde Sham grubunda Kontrol grubuna oranla yüksek değerler saptanması kullandığımız modelin kolit oluşturmada etkin bir model olduğu ve çalışmamızın bulgularının geçerliliğine olumlu ya da olumsuz yönde etkisi olmayacağını düşündürmektedir.

Kolonik enflamasyonda çeşitli yollardan verilen antienflamatuar ajan uygulamaları ile ilgili deneyler mevcuttur. Mustafa ve ark.'ın (82) antienflamatuar etkisi gösterilmiş olan ginkgo bilobanın oral yolla verilmesinin kolit oluşması üzerine koruyucu yönde olumlu etkileri olduğunu yayınlaması, Lubbad ve ark.'ın (83) antienflamatuar bir madde olan curcuminin oral yolla verilmesinin kolitte hem koruyucu hem de oluşan kolitte görülen histolojik değişiklikleri geri çevirdiğini yayınlamaları, ve yine herkesçe bilinen ve antienflamatuar özellikleri olan bir steroid olan prednizolonun Bilsel ve ark.'ın (84) çalışmasında oluşturulmuş olan kolitin ardından verildiğinde üzerine olumlu etkiler göstermesi TNBS kolitinde antienflamatuar ilaçların kullanımını gündeme getirmiştir.

Kolonik enflamasyonda ayrıca çeşitli yollardan verilen antioksidan ajan uygulamaları ile ilgili deneyler de mevcuttur. Örneğin Yavuz ve ark.'ın (85) 1999 yılında yaptıkları çalışmada ratlarda kolonik enflamasyonda subkütan verilerek yapılan sistemik antioksidan tedavinin koruyuculuğunu araştırmışlardır. Ratlara TNBS ile kolit indüksiyonu yapmadan önce etkili antioksidanlar olan süperoksit dismutaz ve katalazı subkütan olarak uygulamışlardır. Çalışmanın sonucunda antioksidan ajan ile koruma yapılmasının ratlarda kolonik enflamasyonun yaygınlığının azaltılmasında yararlı etkilerinin olduğunu ortaya koymuşlardır.

Ademoğlu ve ark.'ın (86) deneysel TNBS kolit modelinde antioksidan etkisi olduğu bilinen vitamin E ve selenyumunu birlikte intraperitoneal olarak kullanmaları sonrası kolitteki enflamasyonu azattığını göstermeleri, Isozaki ve ark.'ın (87) suda çözünen vitamin E derivesiyle TNBS koliti üzerinde olumlu sonuçlar alması ve ALA'nın E vitamini eksikliği bulgularını tedavi ettiği düşünöldüğünde kolitte ALA kullanımını mantıklı gözökmektedir (4, 86, 87).

Yapılan bu ve benzeri çalışmaların ışığında biz de deneysel kolit tedavisinde hem güçlü bir antioksidan olan hem de antienflamatuar etkileri olan ALA'yı kullanmayı tasarladık. Deneysel kolit modelinde daha önce oral ve rektal yoldan ALA uygulanmasına rastlamadığımız için yaptığımız çalışmanın bu konuda ilk olduğunu söyleyebiliriz.

Deneysel kolit modelinde ALA kullanılması hakkında yapılan tek çalışma Kolgazi ve ark.'a (88) aittir. Bu çalışmada TNBS koliti sonrası 25 mg/kg ALA üç gün boyunca intraperitoneal olarak verilmiş ve kolit üzerine etkileri incelenmiştir. Kolgazi ve ark. tarafından yapılan çalışmadaki kontrol grubunda mikroskopik incelemede düzenli kolon epiteli ve morfoloji, sham grubunda yüzey epitelinde ağır kayıp, kriptlerde dejenerasyon, lamina propriada aşınma, ağır submukozal ödem ve tüm tabakalarda ağır enflamatuar hücre infiltrasyonu ve vaskülitte rastlanırken, ALA'nın intraperitoneal olarak verildiği grupta düzenli epitel ve kriptler, hafif submukozal ödem, enflamatuar hücre infiltrasyonu ve vaskülitte rastlanmıştır.

Bizim çalışmamızda da bu çalışmaya benzer olarak ALA Gavaj grubundaki morfolojik değişikliklerin çok olumlu olduğu gözlenmiştir. Toplam mikroskopik ve makroskopik lezyon skorlarında ALA Gavaj grubundaki değerler ve Kontrol grubu arasında istatistiksel olarak fark görülmemiştir. ALA'nın etkisi özellikle mukoza üzerine çok iyi olarak gözlenmiş, hiçbir denekte mukozada ülsere rastlanmamıştır (skorlar Kontrol grubu ile eşit ve sıfır olarak saptanmıştır). Yine Sham grubu ile karşılaştırıldığında makroskopik değerlendirme skorları ve serum MDA değerlerinde anlamlı iyileşme sağlaması bize bu tedavinin kolit tedavisinde etkin olduğunu düşöndürmektedir. Kolgazi ve ark.'ın (88) çalışmasıyla benzer sonuçlar elde etmemizi de her iki deney modelinde de verilen ALA'nın sistemik yoldan etki yapmasıyla açıklayabiliriz. Yukarıda bahsedilen ALA haricindeki oral

yada parenteral yoldan verilen antioksidan ajanlar da benzer sistemik yoldan etki yapmaktadır.

Kim ve ark.'ın (89) özel bir ek taktıkları steroid preparatını oral olarak verdiklerinde kolona kadar bu ilacın ulaştığını ve bu nedenle daha faydalı olduğunu iddia etmektedirler. Bunu da kolit tedavisinde daha önceden klinikte kullanılmakta olan kolona lokal etkili antienflamatuar ilaçların üst gastrointestinal sistemden emildiği için kolondaki enflamasyon alanına sadece sınırlı bir etki göstermesine dayandırmaktadırlar. Önerilerinden biri bu tip ilaçların kolona spesifik formlarının üretilmesi veya rektal yolla verilmesidir. Dundar ve ark.'ın (90) origanum onites yağını, Butzner ve ark.'ın (91) bütiratu ve Chen ve ark.'ın (92) muskovit maddesini intrakolonik uygulamaları ve kolit üzerinde başarılı sonuçlar almaları lokal tedavilerin etkinliğine gösterebileceğimiz örneklerdendir.

ALA'nın intrakolonik olarak uygulanması ile ilgili bir çalışmaya ise rastlamadık. Yukarıdaki çalışmaların ışığında beklentimiz ALA'yı lavman olarak verdiğimizde direkt kolonik mukozaya temas eden ALA'nın, hem lokal hem de yüksek oranda emilerek sistemik etkiyle kolit üzerinde etkin iyileştirme göstermesiydi.

Ancak ALA Lavman grubundaki bulgularımızın literatürün ve öngörümüzün doğrultusunda çıkmamasının yani ALA Lavman grubuyla Kontrol grubu arasında total mikroskopi skoru yönünden belirgin fark olmasının ve ALA Lavman grubundaki total mikroskopi skorlarının Sham grubundan farklı olmamasının birkaç nedeni olabileceğini düşünmekteyiz.

Öncelikle ALA'nın kendisinden daha güçlü olan metaboliti olan DHLA'ya redüksiyonu hücre içinde bulunan enzimlere bağımlıdır (93). Podda ve ark.'ın (94) farelere beş hafta boyunca verdikleri 1.65 gr/kg eksojen ALA emilmiş, dokulara taşınmış ve DHLA'ye redükte edilmiştir. ALA'yı hücre içinde redükte eden enzimler, dokulardaki NADH bağımlı hücresel mitokondriyal dihidrolipoamid redüktaz ve eritrositler gibi mitokondrisi olmayan hücrelerde NADPH bağımlı çalışan sitozolik glutatyon redüktaz enzimidir (95). Bu yüzden ALA'nın etkisi mitokondri içeren hücrelerin içinde daha da artmakta ve ihtiyacın veya tüketiminin arttığı gerekli durumlarda eritrositler ile bölgeye ulaşabilmektedir (93). Süperoksit dismutaz, katalaz, glutatyon ve peroksidazlar gibi oksidan savunma mekanizmalarının

karaciğer ile karşılaştırıldığında kolonda daha az olduğu gösterilmiştir (85). Bu yüzden eğer ALA yeterince hücre içine taşınabilirse en kuvvetli etkiyi gösterecektir.

Bizim çalışmamızda ALA'nın sistemik antioksidan etkisinin sağlanıp, lokal etkisinin sağlanamamasının sebebinin; enflamasyon nedeniyle mukus tabakasının artıp barsak epitelı üzerinde kalın bir katman oluşturması, mukozal hasar nedeniyle kolonda emilimin azalması ve oluşan diare nedeniyle kolonik pasajın hızlanması sonrası ALA'nın kolon epitel hücrelerinin yeterince içine alınamaması olabileceğini düşünöyoruz.

Kontrol grubu ile ALA Lavman grubu arasında MDA değerleri açısından Kontrol grubu ile Sham grubu arasında olana benzer bir fark göstermemektedir. ALA Lavman grubunda MDA değerleri Sham grubuna oranla rakamsal olarak düşmüş, fakat anlamlı farklılığa ulaşmamıştır. MDA'nın oksidatif stres ile artan bir biyokimyasal parametre olduğu düşünöldüğünde lavman ile verilen ALA'nın kolit oluştuktan sonra kısmen enflamasyonun azaltılabilmesini sağladığını ancak daha kesin bir sonuca daha geniş denek sayısı ile ulaşılabilceğini düşünmekteyiz.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamızda deneysel kolit modelinde oral ALA kullanımı sonrası histopatolojik ve biyokimyasal değerler üzerinde olumlu etkiler sağladık. Fakat ALA'yı lavman olarak uyguladığımızda olumlu etkileri aynı ölçüde göremedik.

ALA gibi güçlü antioksidan etkileri kanıtlanmış ve vücutta zaten doğal olarak üretilen bir maddenin; EBH hastalarında remisyonun devamına yardımcı olabileceğine, Hirschsprung hastalarında postoperatif HİEK sıklığını azaltabileceğine ve NEK kolitini önlemede profilaktik olarak kullanılabileceğini düşünmekteyiz. Fakat bu hastalarda kullanılmadan önce insan ve hayvan deney çalışmaları yapılması gerekmektedir.

7. ÖZET

Başlık: Ratlarda Deneysel Kolit Modelinde Alfa Lipoik Asit Kullanımının Oksidatif Stres Üzerine Etkisi

Amaç ve Hipotez: Çalışmamızda amacımız ALA'yı gavaj ve lavman yolu ile vererek deneysel kolit modelinde ALA'nın antioksidan etkisini araştırmak idi. Beklentimiz gavaj yolu ile verilen ALA'nın kan yoluyla enflamasyon alanına ulaşarak sistemik etkiyle enflamasyonu geriletmesi, rektal olarak verdiğimiz ALA'nın ise direkt mukozaya uygulaması nedeniyle hem lokal hem de yüksek oranda emilerek sistemik etkiyle kolit ve kan MDA, katalaz ve NO değerleri üzerinde etkin iyileştirme göstermesiydi.

Yöntem: Çalışmada toplam 42 adet Wistar albino rat 5 gruba ayrıldı. Birinci gruptaki (Kontrol grubu) ratlara 7 gün boyunca günde 1 kez 1 cc intrakolonik mısırözü yağı verildi. Diğer 4 gruptaki ratlarda intrakolonik 25 mg TNBS + etanol uygulaması ile kolit oluşturuldu. Kolit oluşturulmasından 1 gün sonra başlanarak 7 gün boyunca ve günde 1 kez olmak üzere; ikinci gruba (Sham grubu) oral yoldan mısırözü, üçüncü gruba (ALA Gavaj grubu) oral yoldan 200 mg/kg/gün Alfa Lipoik Asit, dördüncü gruba (ALA Lavman grubu) intrakolonik 200 mg/kg/gün Alfa Lipoik Asit ve beşinci gruba (MÖ Lavman grubu) ise intrakolonik 1 cc mısırözü yağı verildi. Ratlar uygulamanın başlamasından 8 gün sonra sakrifiye edildiler ve anüsün 10 cm proksimalindeki kolon bölgeleri alındı. Bu örnekler patolojik tarafından mikroskopik ve makroskopik lezyonlar açısından değerlendirilip skor verildi. Alınan kan örneklerinde MDA, katalaz ve NO değerleri çalışıldı.

Bulgular: Toplam mikroskopik değerlendirme skorlarında Sham ve MÖ Lavman grubundaki değerler Kontrol grubuna oranla yüksek saptandı ($p<0.05$). ALA Gavaj grubundaki değerlerin tümü Kontrol grubuna oranla yüksek saptanmadı ($p>0.05$). ALA Gavaj grubunda hiçbir mukozal patolojiye rastlanmazken, Sham grubu ile karşılaştırıldığında makroskopi ve MDA değerlerinde anlamlı düşüklük saptandı ($p<0.05$).

Sonuç: Çalışmamızda deneysel kolit modelinde oral ALA kullanımı sonrası histopatolojik ve biyokimyasal değerler üzerinde olumlu etkiler sağladık. Fakat ALA'yı lavman olarak uyguladığımızda aynı olumlu etkileri göremedik. Bu nedenle oral olarak verilecek ALA'nın EBH hastalarında remisyona yardımcı olabileceğine, Hirschsprung hastalarında postop HİEK sıklığını azaltabileceğine ve NEK kolitini önlemede profilaktik olarak kullanılabileceğini düşünmekteyiz. Fakat bu hastalarda kullanılmadan önce insan ve hayvan deney çalışmaları yapılması gerekmektedir.

Anahtar Kelimeler: Alfa Lipoik Asit, Antioksidan, Kolit, Rat

İletişim Adresi: Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi
Çocuk Cerrahisi Anabilim Dalı, Merkez/AYDIN Tel:05324413671

8. SUMMARY

Title: The effect of alpha lipoic acid on oxidative stress in experimental colitis model of rats

Aim and hypothesis: The aim of our study was to investigate the antioxidant effect of ALA administered via gavage or colonic enema. Our expectation was regression of the inflammation by hematogenous –systemic effect of ALA on inflammation in gavage administration and both positive local and systemic effects on colitis and blood MDA, catalase and NO levels by a transmucosal high absorbance ratio through colon when administered rectally.

Method: Fortytwo Wistar Albino rats were divided into five groups. Intracolonic corn oil one cc once a day was administered in the first group (Control group). Colitis was created in the other four groups by intracolonic TNBS 25 mg+ ethanol administration. The following day following formation of colitis, corn oil by gavage administration (Sham group), ALA 200 mg/kg/day via gavage administration (ALA gavage group), ALA 200 mg/kg/day intracolonic administration (ALA enema group) and intracolonic corn oil administration (corn oil enema group) were given once a day for seven days. On the eighth day of the experiment, the rats were sacrificed and colonic specimens obtained from location 10 cm proximal to the anus were evaluated and scored by a pathologist for macroscopic and microscopic lesions.

Results: In total microscopic evaluation , scores of Sham and corn oil enema groups were higher than score of control group ($p < 0.05$). Score of ALA Gavage group was not different from control group ($p > 0.05$). No significant mucosal pathological changes were detected in ALA Gavage group and significantly lower macroscopic score and blood MDA level were found when compared to Sham Group ($p < 0.05$).

Conclusion: We detected positive effects of ALA when administered via gavage on histopathological and biochemical parameters in experimental colitis model. However, we have not found out similar effect when we administered ALA intrarectally. As a conclusion we can suggest that ALA when administered orally may be helpful for prolonged remission in patients with inflammatory bowel disease, for decreasing the frequency of enterocolitis in patients with Hirschsprung disease and

for prevention of necrotising enterocolitis following more detailed experimental studies.

Key Words: Alpha lipoic acid, antioxidant, colitis, rat

Correspondence: Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi
Çocuk Cerrahisi Anabilim Dalı, Merkez/AYDIN Tel:05324413671

9. KAYNAKLAR

- (1) Wirtz S, Neufert C, Weigmann B, Neurath MF. Chemically induced mouse models of intestinal inflammation. *Nat Protoc* 2007; 2: 541-46.
- (2) 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.
- (3) Sener G, Aksoy H, Sehirli O, Yuksel M, Aral C, Gedik N. Erdosteine prevents colonic inflammation through its antioxidant and free radical scavenging activities. *Dig Dis Sci* 2007; 52: 2122-32.
- (4) Biewenga GP, Haenen GR, Bast A. The pharmacology of the antioxidant lipoic acid. *Gen Pharmacol* 1997; 29: 315-31.
- (5) Bilaska A, Wlodek L. Lipoic acid - the drug of the future? *Pharmacol Rep* 2005; 57: 570-77.
- (6) Junqueira LC, Carneiro J, Kelley RO (eds). *Basic Histology*, 8th ed. Michigan: Lange; 1998: 288-98.
- (7) Scanlon VC, Sanders T (eds). *Essentials of Anatomy and Physiology*, 5th ed. Philadelphia: F. A. Davis Company; 2007: 385-86.
- (8) Pinto D, Clevers H. Wnt control of stem cells and differentiation in the intestinal epithelium. *Exp Cell Res* 2005; 306: 357-63.
- (9) Laukoetter MG, Bruewer M, Nusrat A. Regulation of the intestinal epithelial barrier by the apical junctional complex. *Curr Opin Gastroenterol* 2006; 22: 85-9.
- (10) Kucharzik T, Maaser C, Lugering A, Kagnoff M, Mayer L, Targan S. Recent understanding of IBD pathogenesis: implications for future therapies. *Inflamm Bowel Dis* 2006; 12: 1068-83.

- (11) Xavier RJ, Podolsky DK. Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature* 2007; 448: 427-34.
- (12) Clayburgh DR, Shen L, Turner JR. A porous defense: the leaky epithelial barrier in intestinal disease. *Lab Invest* 2004; 84: 282-91.
- (13) Watson AJ, Chu S, Sieck L, Gerasimenko O, Bullen T, Campbell F. Epithelial barrier function in vivo is sustained despite gaps in epithelial layers. *Gastroenterology* 2005; 129: 902-12.
- (14) Kucharzik T, Walsh SV, Chen J, Parkos CA, Nusrat A. Neutrophil transmigration in inflammatory bowel disease is associated with differential expression of epithelial intercellular junction proteins. *Am J Pathol* 2001; 159: 2001-9.
- (15) Nielsen OH, Vainer B, Rask-Madsen J. Non-IBD and noninfectious colitis. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* 2008; 5: 28-39.
- (16) Neurath M, Fuss I, Strober W. TNBS-colitis. *Int Rev Immunol* 2000; 19: 51-62.
- (17) Torres MI, Garcia-Martin M, Fernandez MI, Nieto N, Gil A, Rios A. Experimental colitis induced by trinitrobenzenesulfonic acid: an ultrastructural and histochemical study. *Dig Dis Sci* 1999; 44: 2523-9.
- (18) Henry MC, Moss RL. Current issues in the management of necrotizing enterocolitis. *Semin Perinatol* 2004; 28: 221-33.
- (19) Pierro A, Hall N. Surgical treatments of infants with necrotizing enterocolitis. *Semin Neonatol* 2003; 8: 223-32.
- (20) Lin PW, Nasr TR, Stoll BJ. Necrotizing enterocolitis: recent scientific advances in pathophysiology and prevention. *Semin Perinatol* 2008; 32: 70-82.
- (21) Kafetzis DA, Skevaki C, Costalos C. Neonatal necrotizing enterocolitis: an overview. *Curr Opin Infect Dis* 2003; 16: 349-55.

- (22) Yost CC. Neonatal necrotizing enterocolitis: diagnosis, management, and pathogenesis. *J Infus Nurs* 2005; 28: 130-4.
- (23) Lee JS, Polin RA. Treatment and prevention of necrotizing enterocolitis. *Semin Neonatol* 2003; 8: 449-59.
- (24) Hsueh W, Caplan MS, Qu XW, Tan XD, De P, I, Gonzalez-Crussi F. Neonatal necrotizing enterocolitis: clinical considerations and pathogenetic concepts. *Pediatr Dev Pathol* 2003; 6: 6-23.
- (25) Boston VE. Necrotising enterocolitis and localised intestinal perforation: different diseases or ends of a spectrum of pathology. *Pediatr Surg Int* 2006; 22: 477-84.
- (26) Lebenthal A, Lebenthal E. The ontogeny of the small intestinal epithelium. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 1999; 23: S3-S6.
- (27) Buisine MP, Devisme L, Savidge TC, Gespach C, Gosselin B, Porchet N. Mucin gene expression in human embryonic and fetal intestine. *Gut* 1998; 43: 519-24.
- (28) Yurdakok M. What next in necrotizing enterocolitis? *Turk J Pediatr* 2008; 50: 1-11.
- (29) Ballance WA, Dahms BB, Shenker N, Kliegman RM. Pathology of neonatal necrotizing enterocolitis: a ten-year experience. *J Pediatr* 1990; 117: 6-13.
- (30) Fell JM. Neonatal inflammatory intestinal diseases: necrotising enterocolitis and allergic colitis. *Early Hum Dev* 2005; 81: 117-22.
- (31) Haricharan RN, Georgeson KE. Hirschsprung disease. *Semin Pediatr Surg* 2008; 17: 266-75.
- (32) Kessmann J. Hirschsprung's disease: diagnosis and management. *Am Fam Physician* 2006; 74: 1319-22.

(33) Gershon MD, Ratcliffe EM. Developmental biology of the enteric nervous system: pathogenesis of Hirschsprung's disease and other congenital dysmotilities. *Semin Pediatr Surg* 2004; 13: 224-35.

(34) Teitelbaum DH, Qualman SJ, Caniano DA. Hirschsprung's disease. Identification of risk factors for enterocolitis. *Ann Surg* 1988; 207: 240-4.

(35) Engum SA, Grosfeld JL. Long-term results of treatment of Hirschsprung's disease. *Semin Pediatr Surg* 2004; 13: 273-85.

(36) Murphy F, Puri P. New insights into the pathogenesis of Hirschsprung's associated enterocolitis. *Pediatr Surg Int* 2005; 21: 773-9.

(37) Hackam DJ, Filler RM, Pearl RH. Enterocolitis after the surgical treatment of Hirschsprung's disease: risk factors and financial impact. *J Pediatr Surg* 1998; 33: 830-3.

(38) Vieten D, Spicer R. Enterocolitis complicating Hirschsprung's disease. *Semin Pediatr Surg* 2004; 13: 263-72.

(39) Marty TL, Seo T, Sullivan JJ, Matlak ME, Black RE, Johnson DG. Rectal irrigations for the prevention of postoperative enterocolitis in Hirschsprung's disease. *J Pediatr Surg* 1995; 30: 652-4.

(40) Podolsky DK. Inflammatory bowel disease. *N Engl J Med* 2002; 347: 417-29.

(41) Shih DQ, Targan SR. Immunopathogenesis of inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 390-400.

(42) Sartor RB. Mechanisms of disease: pathogenesis of Crohn's disease and ulcerative colitis. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* 2006; 3: 390-407.

(43) Carvalho R, Hyams JS. Diagnosis and management of inflammatory bowel disease in children. *Semin Pediatr Surg* 2007; 16: 164-71.

- (44) Escher JC, ten KF, Lichtenbelt K, Schornagel I, Buller H, Derkx B. Value of rectosigmoidoscopy with biopsies for diagnosis of inflammatory bowel disease in children. *Inflamm Bowel Dis* 2002; 8: 16-22.
- (45) Kugathasan S, Fiocchi C. Progress in basic inflammatory bowel disease research. *Semin Pediatr Surg* 2007; 16: 146-53.
- (46) Karlinger K, Gyorke T, Mako E, Mester A, Tarjan Z. The epidemiology and the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Eur J Radiol* 2000; 35: 154-67.
- (47) Bousvaros A, Sylvester F, Kugathasan S, Szigethy E, Fiocchi C, Colletti R. Challenges in pediatric inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 2006; 12: 885-913.
- (48) Beattie RM, Croft NM, Fell JM, Afzal NA, Heuschkel RB. Inflammatory bowel disease. *Arch Dis Child* 2006; 91: 426-32.
- (49) Kawada M, Hachiya Y, Arihiro A, Mizoguchi E. Role of mammalian chitinases in inflammatory conditions. *Keio J Med* 2007; 56: 21-7.
- (50) Sartor RB. Intestinal microflora in human and experimental inflammatory bowel disease. *Curr Opin Gastroenterol* 2001; 17: 324-30.
- (51) Laukoetter MG, Nava P, Nusrat A. Role of the intestinal barrier in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 401-7.
- (52) Meddings JB, Sutherland LR, May GR. Intestinal permeability in patients with Crohn's disease. *Gut* 1994; 35: 1675-6.
- (53) Sartor RB. Bacteria in Crohn's disease: Mechanisms of inflammation and therapeutic implications. *J Clin Gastroenterol* 2007; 41: 37-43.
- (54) Gulubova MV, Manolova IM, Vlaykova TI, Prodanova M, Jovchev JP. Adhesion molecules in chronic ulcerative colitis. *Int J Colorectal Dis* 2007; 22: 581-9.
- (55) Barrett KE. New ways of thinking about (and teaching about) intestinal epithelial function. *Adv Physiol Educ* 2008; 32: 25-34.

(56) Gramlich T, Petras RE. Pathology of inflammatory bowel disease. *Semin Pediatr Surg* 2007; 16: 154-63.

(57) Le BN, Heresbach D, Kerbaol M, Caulet S, Bretagne JF, Chaperon J. Histological discrimination of idiopathic inflammatory bowel disease from other types of colitis. *J Clin Pathol* 1995; 48: 749-53.

(58) Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 2007; 39: 44-84.

(59) Oldham KM, Bowen PE. Oxidative stress in critical care: is antioxidant supplementation beneficial? *J Am Diet Assoc* 1998; 98: 1001-8.

(60) Azzi A, Davies KJ, Kelly F. Free radical biology - terminology and critical thinking. *FEBS Lett* 2004; 558: 3-6.

(61) Cadenas E. Basic mechanisms of antioxidant activity. *Biofactors* 1997; 6: 391-7.

(62) Villegas I, La CC, Orjales A, Arcon de la LC. Effects of dosmalfate, a new cytoprotective agent, on acute and chronic trinitrobenzene sulphonic acid-induced colitis in rats. *Eur J Pharmacol* 2003;460:209-18.

(63) Galvez J, de Souza GJ, Camuesco D, Galvez J, Vilegas W, Monteiro Souza Brito AR, et al. Intestinal antiinflammatory activity of a lyophilized infusion of *Turnera ulmifolia* in TNBS rat colitis. *Fitoterapia*; 2006: 77; 515-20.

(64) Zhou YH, Yu JP, Liu YF, Teng XJ, Ming M, Lv P, et al. Effects of Ginkgo biloba extract on inflammatory mediators (SOD, MDA, TNF-alpha, NF-kappaBp65, IL-6) in TNBS-induced colitis in rats. *Mediators Inflamm* 2006; 2006: 92642.

(65) Cho YS, Lee J, Lee TH, Lee EY, Lee KU, Park JY, et al. alpha-Lipoic acid inhibits airway inflammation and hyperresponsiveness in a mouse model of asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2004; 114: 429-35.

(66) Wada H, Shintani D, Ohlrogge J. Why do mitochondria synthesize fatty acids? Evidence for involvement in lipoic acid production. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 9: 1591-6.

(67) Teichert J, Tuemmers T, Achenbach H, Preiss C, Hermann R, Ruus P, et al. Pharmacokinetics of alpha-lipoic acid in subjects with severe kidney damage and end-stage renal disease. *J Clin Pharmacol* 2005; 45: 313-28.

(68) Karakoyun B, Yuksel M, Ercan F, Erzik C, Yegen BC. Alpha-lipoic acid improves acetic acid-induced gastric ulcer healing in rats. *Inflammation* 2009; 32: 37-46.

(69) Ek RO, Serter M, Ergin K, Yildiz Y, Cecen S, Kavak T, et al. The effects of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) on TNBS-induced colitis in ovariectomized rats. *Dig Dis Sci* 2008; 53: 1609-17.

(70) Wengrower D, Zanninelli G, Pappo O, Latella G, Sestieri M, Villanova A, et al. Prevention of fibrosis in experimental colitis by captopril: the role of tgf-beta1. *Inflamm Bowel Dis* 2004; 10: 536-45.

(71) Latella G, Sferra R, Vetuschi A, Zanninelli G, D'Angelo A, Catitti V, et al. Prevention of colonic fibrosis by *Boswellia* and *Scutellaria* extracts in rats with colitis induced by 2,4,5-trinitrobenzene sulphonic acid. *Eur J Clin Invest* 2008; 38: 410-20.

(72) Sharma M, Gupta YK. Effect of alpha lipoic acid on intracerebroventricular streptozotocin model of cognitive impairment in rats. *Eur Neuropsychopharmacol* 2003; 13: 241-7.

(73) Peran L, Camuesco D, Comalada M, Nieto A, Concha A, az-Ropero MP, et al. Preventative effects of a probiotic, *Lactobacillus salivarius* ssp. *salivarius*, in the TNBS model of rat colitis. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 5185-92.

(74) Bell CJ, Gall DG, Wallace JL. Disruption of colonic electrolyte transport in experimental colitis. *Am J Physiol* 1995; 268: G622-G630.

(75) Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 1979 Jun; 95: 351-8.

(76) Aebi H, Bergmeyer HU (eds). *Methods of Enzymatic Analysis*. 1th ed. Birmingham: Academic Press, 1974: 124-34.

(77) Cortas NK, Wakid NW. Determination of inorganic nitrate in serum and urine by a kinetic cadmium-reduction method. *Clin Chem* 1990; 36: 1440-3.

(78) Kelsall BL. Innate and adaptive mechanisms to control [corrected] pathological intestinal inflammation. *J Pathol* 2008; 214: 242-59.

(79) Fiocchi C. Intestinal inflammation: a complex interplay of immune and nonimmune cell interactions. *Am J Physiol* 1997; 273: G769-G775.

(80) Jurjus AR, Khoury NN, Reimund JM. Animal models of inflammatory bowel disease. *J Pharmacol Toxicol Methods* 2004; 50: 81-92.

(81) Galvez J, Coelho G, Crespo ME, Cruz T, Rodriguez-Cabezas ME, Concha A. Intestinal anti-inflammatory activity of morin on chronic experimental colitis in the rat. *Aliment Pharmacol Ther* 2001; 15: 2027-39.

(82) Mustafa A, El-Medany A, Hagar HH, El-Medany G. Ginkgo biloba attenuates mucosal damage in a rat model of ulcerative colitis. *Pharmacol Res* 2006; 53: 324-30.

(83) Lubbad A, Oriowo MA, Khan I. Curcumin attenuates inflammation through inhibition of TLR-4 receptor in experimental colitis. *Mol Cell Biochem* 2009; 322: 127-35.

(84) Bilsel Y, Bugra D, Yamaner S, Bulut T, Cevikbas U, Turkoglu U. Could honey have a place in colitis therapy? Effects of honey, prednisolone, and disulfiram on inflammation, nitric oxide, and free radical formation. *Dig Surg* 2002; 19: 306-11.

(85) Yavuz Y, Yuksel M, Yegen BC, Alican I. The effect of antioxidant therapy on colonic inflammation in the rat. *Res Exp Med* 1999; 199: 101-10.

(86) Ademoglu E, Erbil Y, Tam B, Barbaros U, Ilhan E, Olgac V, et al. Do vitamin E and selenium have beneficial effects on trinitrobenzenesulfonic acid-induced experimental colitis. *Dig Dis Sci* 2004; 49: 102-8.

(87) Isozaki Y, Yoshida N, Kuroda M, Takagi T, Handa O, Kokura S, et al. Effect of a novel water-soluble vitamin E derivative as a cure for TNBS-induced colitis in rats. *Int J Mol Med* 2006; 17: 497-502.

(88) Kolgazi M, Jahovic N, Yuksel M, Ercan F, Alican I. Alpha-lipoic acid modulates gut inflammation induced by trinitrobenzene sulfonic acid in rats. *J Gastroenterol Hepatol* 2007; 22: 1859-65.

(89) Kim I, Kong H, Lee Y, Hong S, Han J, Jung S, et al. Dexamethasone 21-sulfate improves the therapeutic properties of dexamethasone against experimental rat colitis by specifically delivering the steroid to the large intestine. *Pharm Res* 2009; 26: 415-21.

(90) Dundar E, Olgun EG, Isiksoy S, Kurkcuoglu M, Baser KH, Bal C. The effects of intra-rectal and intra-peritoneal application of *Origanum onites* L. essential oil on 2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid-induced colitis in the rat. *Exp Toxicol Pathol* 2008; 59: 399-408.

(91) Butzner JD, Parmar R, Bell CJ, Dalal V. Butyrate enema therapy stimulates mucosal repair in experimental colitis in the rat. *Gut* 1996; 38: 568-73.

(92) Chen Y, Chen Y, Liu WL, Zhou TH, Cai JT, Du Q, et al. Therapeutic effects of rectal administration of muscovite on experimental colitis in rats. *J Gastroenterol Hepatol* 2009; 22: 654-71.

(93) Jones W, Li X, Qu ZC, Perriott L, Whitesell RR, May JM. Uptake, recycling, and antioxidant actions of alpha-lipoic acid in endothelial cells. *Free Radic Biol Med* 2002; 33: 83-93.

(94) Podda M, Tritschler HJ, Ulrich H, Packer L. Alpha-lipoic acid supplementation prevents symptoms of vitamin E deficiency. *Biochem Biophys Res Commun* 1994; 204: 98-104.

(95) Moini H, Packer L, Saris NE. Antioxidant and prooxidant activities of alpha-lipoic acid and dihydrolipoic acid. *Toxicol Appl Pharmacol* 2002; 182: 84-90.