

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

Tez Yöneticisi
Doç. Dr. Sevgi ESKİOCAK

**ASETİK ASİT İLE KOLİT GELİŞTİRİLMİŞ
SIÇANLARDA N-ASETİLSİSTEİNİN PROTEİN
OKSİDASYONU ÜZERİNE ETKİSİ**

(Yüksek Lisans Tezi)

Aylin YILMAZ

EDİRNE – 2009

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

Tez Yöneticisi
Doç. Dr. Sevgi ESKİOCAK

**ASETİK ASİT İLE KOLİT GELİŞTİRİLMİŞ
SIÇANLARDA N-ASETİLSİSTEİNİN PROTEİN
OKSİDASYONU ÜZERİNE ETKİSİ**

(Yüksek Lisans Tezi)

Aylin YILMAZ

Destekleyen Kurum : TÜBAP

Tez No :

EDİRNE – 2009

T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürlüğü

O N A Y

Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Anabilim Dalı yüksek lisans programı çerçevesinde ve Doç. Dr. Sevgi ESKİOCAK danışmanlığında yüksek lisans öğrencisi Aylin YILMAZ tarafından tez başlığı “**Asetik asit ile kolit geliştirilmiş sıçanlarda N-asetilsisteinin protein oksidasyonu üzerine etkisi**” olarak teslim edilen bu tezin tez savunma sınavı 02/11/2009 tarihinde yapılarak aşağıdaki jüri üyeleri tarafından “**Yüksek Lisans Tezi**” olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Erol ÇAKIR
JÜRİ BAŞKANI

Doç. Dr. Sevgi ESKİOCAK
ÜYE

Prof. Dr. Ahmet TEZEL
ÜYE

Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

Prof. Dr. Levent ÖZTÜRK
Enstitü Müdürü

TEŐEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim süresince bilgi ve birikimlerinden faydalandığım, tez çalışmam sırasında desteklerini esirgemeyerek önerileriyle beni yönlendiren sayın hocam Doç. Dr. Sevgi ESKİOCAK başta olmak üzere Anabilim dalı başkanımız sayın Prof. Dr. Erol ÇAKIR'a, sayın Prof. Dr. Selma Süer GÖKMEN'e ve sayın Doç. Dr. Hakan ERBAŐ'a ve çalışmamıza mali destek sağlayan Trakya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri'ne teşekkürler ederim.

İÇİNDEKİLER

GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
GENEL BİLGİLER.....	3
SERBEST RADİKALLER.....	3
ANTİOKSİDANLAR.....	15
İNFLAMATUVAR BARSAK HASTALIKLARI.....	17
GEREÇ VE YÖNTEMLER.....	21
DENEY HAYVANLARI.....	21
BİYOKİMYASAL ÖLÇÜMLER.....	23
HİSTOPATOLOJİK DEĞERLENDİRME.....	29
İSTATİSTİKSEL DEĞERLENDİRME.....	30
BULGULAR.....	31
TARTIŞMA.....	46
SONUÇLAR.....	54
TÜRKÇE ÖZET.....	56
İNGİLİZCE ÖZET.....	58
KAYNAKLAR.....	60
RESİMLEMELER LİSTESİ.....	64
ÖZGEÇMİŞ.....	67
EKLER.....	68

SİMGE VE KISALTMALAR

AOPP	: İleri oksidasyon protein ürünleri
CH	: Crohn hastalığı
DNA	: Deoksiribonükleik asit
DNTB	: 2,2'-dinitro-5,5'ditiobenzoik asit
GSH	: Glutatyon (indirgenmiş)
GSSG	: Glutatyon (yükseltgenmiş)
HLA	: Human lökosit antijen
H ₂ O ₂	: Hidrojen peroksit
H ₂ O	: Su
HOCl	: Hipokloröz asit
İBH	: İnflamatuvar barsak hastalıkları
İp	: İntraperitoneal
MPO	: Myeloperoksidaz
NAC	: N-asetilsistein
NAD ⁺	: Nikotinamid adenin dinükleotid (yükseltgenmiş)

NADP ⁺	: Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (yükseltgenmiş)
NADPH	: Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (indirgenmiş)
NO [•]	: Nitrik oksit
Np-SH	: Nonprotein-SH
NT	: Nitrotirozin
•OH	: Hidroksil radikali
ONOO [•]	: Peroksinitrit
O ₂ ^{•-}	: Süperoksit radikali
¹ O ₂	: Singlet oksijen
MDA	: Malondialdehit
PC	: Protein karbonil
P-SH	: Protein-SH
PNL	: Polimorfonükleer lökosit
RO [•]	: Alkoksil
ROM	: Reaktif oksijen metabolitleri
SOD	: Süperoksit dismutaz
T-SH	: Total-SH
ÜK	: Ülseratif kolit
XO	: Ksantin oksidaz
¹ Δg O ₂	: Delta singlet oksijen
¹ Σg O ₂	: Sigma singlet oksijen

GİRİŞ VE AMAÇ

İnflamatuvar barsak hastalıkları (İBH), gastrointestinal sistem ile birlikte tüm sistemleri tutarak hastanın yaşam kalitesini etkileyen hastalıklardır. Son yıllarda bu hastalıkların görülme sıklığında belirgin bir artış dikkati çekmektedir. Ülseratif kolit (ÜK) ve Crohn hastalığı (CH), İBH olarak değerlendirilmekte ve benzerliklerinden ötürü aynı grupta incelenmektedir.

İnflamatuvar barsak hastalıklarının başlama, ilerleme ve kronikleşme aşamalarının açıklanması için yapılan çalışmaların çoğunluğu B ve T lenfositler, makrofajlar, nötrofiller, sitokinler ve inflamasyon medyatörleri üzerine yoğunlaşmıştır. Son yıllarda ise reaktif oksijen metabolitlerinin (ROM) inflamasyon üzerindeki etkisi ile ilgili giderek artan sayıda çalışma bulunmaktadır (1). Reaktif oksijen metabolitlerinin doku hasarı ile ilgisini gösteren çalışmalara da rastlanmaktadır. Birçok dokudaki inflamatuvar hastalıklarda, hasarın ortaya çıkması ROM ile ilişkili bulunmuştur ve gastrointestinal sistemin bu metabolitleri oluşturduğu gösterilmiştir (2).

Biyolojik sistemlerdeki ROM; süperoksit radikal anyonu ($O_2^{\cdot-}$), hidroksil radikali ($\cdot OH$), peroksil radikali (ROO^{\cdot}) ve radikal olmayan hidrojen peroksit (H_2O_2) gibi moleküllerdir. Serbest radikal; moleküler ya da atomik yörüngesinde eşleşmemiş elektron bulunduran genelde çok reaktif olan kimyasal bir üründür (3).

Reaktif oksijen metabolitleri direkt ya da indirekt olarak protein, lipid, deoksiribonükleik asit (DNA) ve karbohidrat gibi biyomoleküllerin hasarlanmasına yol açabilirler. Proteinler tüm hücre ve dokularda yer almaları ve oksidatif modifikasyona duyarlı olmaları nedeniyle oksidatif hasarın ana hedefleri arasındadır. Proteinlerde in vivo olarak meydana gelen oksidatif değişiklikler proteinlerin rol oynadığı çeşitli hücresel fonksiyonları etkilemektedir. Protein oksidasyonu; iyonize radyasyon, metal iyon katalizli reaksiyonlar,

fotokimyasal ürünler ve enzim katalizli redoks reaksiyonları tarafından oluşturulan ROM ile proteinlerin reaksiyonu sonucu oluşmaktadır. Aminoasit yan zincirlerinin hidroksil veya karbonil derivelelerine modifikasyonu, protein-protein çapraz bağlarının oluşumu ve polipeptid zincirlerinin fragmantasyonu proteinlerin oksidatif reaksiyonlarının sonuçlarındandır. Enzimlerin ve yapısal proteinlerin oksidatif modifikasyonları da çok sayıda hastalığın etiyojisi ve ilerlemesinde önemli rol oynamaktadır. Oksidatif olarak modifiye olan proteinlerin inflamatuvar hastalıklar, aterosklerozis, nörolojik hastalıklar, iskemi-reperfüzyon hasarı ve karsinogenezisi içeren farklı patolojik şartlarda biriktiği bilinmektedir (4).

Reaktif oksijen metabolitlerine karşı korunmada, serbest radikal zincir reaksiyonlarını inhibe edebilen antioksidanlar denilen bazı bileşikler rol almaktadır. Glutatyon (GSH) sentezinde bir substrat olan N-Asetilsistein (NAC) de bu antioksidanlar arasında yer almaktadır. N-Asetilsistein, hücrelerde tiyol (-SH) gruplarının kaynağı olup, $\cdot\text{OH}$ gibi oksijen kaynaklı radikallerle etkileşerek serbest radikalleri etkin şekilde temizleyebilmekte, apoptozu önleyebilmekte, çeşitli proteinlerin aktivitelerini düzenleyerek hücrenin yaşam sürecini uzatmaktadır. Ayrıca, endotelial disfonksiyonunu azaltmakta, inflamasyon, fibroz, invazyon, kartilaj erozyonu, asetaminofen detoksifikasyonu ve transplantasyon ihtiyacının geciktirilmesini sağlamaktadır (5).

Literatürde asetik asit ile oluşturulmuş deneysel kolit modellerinde NAC'in etkilerini inceleyen araştırmalara rastlanmıştır. Çetinkaya ve ark. (6) kolit grubunda lipid peroksidasyonunun arttığını, antioksidan enzim aktivitelerinde değişiklik olduğunu, NAC uygulaması ile lipid peroksidasyonunun önlendiğini ve dokudaki hasar şiddetinin azaldığını bildirmişlerdir. Akgün ve ark. (7) uzun süre NAC kullanımının oksidatif ve nitrozatif stres parametresi olan nitrik oksit ($\text{NO}\cdot$) düzeyleri üzerinde etkinliği olduğunu bildirmişlerdir. Nosál'ová ve ark. (8) NAC tedavisinin oksidatif hasardan korunmada başarılı bir antioksidan etki gösterdiğini bildirmişlerdir.

Literatürdeki kolit olgularında NAC kullanımının, lipid peroksidasyonuna karşı yararlı etkisi bulunduğunun gösterildiği ancak protein oksidasyonu konusunda araştırma yapılmadığı dikkati çekmektedir. Ayrıca, olgularda sınırlı sayıda oksidan parametrenin çalışıldığı görülmektedir. Nitrotirozin (NT) ve ileri oksidasyon protein ürün (AOPP) düzeylerinin ise değerlendirildiği hiçbir çalışmaya rastlanmamıştır.

Çalışmamızda önemli bir antioksidan etkinliği olan NAC'in, deneysel olarak geliştirilmiş ÜK'in neden olduğu protein oksidasyonu üzerine etkisini araştırmayı amaçlamaktayız.

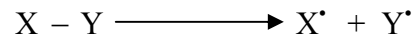
GENEL BİLGİLER

SERBEST RADİKALLER

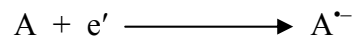
Atomlar orbital adı verilen uzaysal bölge üzerinde birbirine zıt yönde hareket eden iki elektrona sahiptir. Atomlar arası etkileşimler ile oluşan bağlar, moleküler yapıyı meydana getirmektedir. Serbest radikaller, bir veya daha fazla eşleşmemiş elektron içeren kısa ömürlü, reaktif, kararsız, molekül ağırlığı düşük atom veya moleküllerdir (3, 9).

Serbest radikaller 2 yolla oluşmaktadır (10);

1) Homolitik bölünme: Kovalent bağlı bir molekülün her bir parçasında ortak elektronlardan birisinin kalmasıyla sonuçlanan bağ kırılması ile reaktif özellikte atom veya moleküller meydana gelir:



2) Normal bir moleküle tek bir elektronun eklenmesi: Biyolojik sistemlerde serbest radikaller en çok elektron transferi sonucu oluşur:



Serbest radikaller pozitif yüklü, negatif yüklü veya elektriksel olarak nötr halde bulunabilir ve organik veya inorganik moleküller şeklinde olabilirler (10, 11).

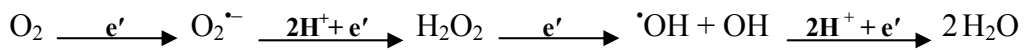
İki serbest radikalın reaksiyona girmesi sonucu radikal olmayan bir bileşik oluşurken serbest radikaller ortadan kalkar. Bir serbest radikal, radikal olmayan bir yapıyla reaksiyona

girdiğinde ise bir başka serbest radikali meydana getirir. Bu özellik, serbest radikallerin zincir reaksiyonları oluşturmalarını sağlamaktadır (12).

Serbest radikaller, organizmada normal metabolik yolların işleyişi sırasında oluştuğu gibi, çeşitli dış etkenlerin etkisiyle de meydana gelebilir. Biyolojik sistemlerde serbest radikallerin zararlı etkilerini engelleyerek etkisizleştirilmelerini sağlayan güçlü savunma sistemleri bulunur. Serbest radikallerin oluşum hızı ile etkisizleştirilme hızı dengede olduğu sürece, organizma serbest radikallerden etkilenmemektir. Ancak, savunma azalır veya serbest radikallerin oluşum hızı, sistemin savunma gücünü aşarsa denge bozulur. Bu durumda, biyolojik moleküllerde oksidatif hücre hasarına kadar giden birçok patolojik değişiklik ortaya çıkmaktadır (13, 14).

Serbest Radikal Türleri

Biyolojik sistemlerdeki en önemli serbest radikaller, oksijenden oluşmaktadır. Oksijen atomu toplam sekiz elektron içerir. Moleküler oksijen (O_2), dış orbitalinde iki tane eşleşmemiş elektron bulundurduğundan kendisi de bir radikaldir. Ancak, her iki atomu denge halinde olduğundan reaktif özelliği bulunmaz. Oksijen molekülü bu özelliği sayesinde diğer serbest radikallerle kolayca reaksiyona girerken, radikal olmayan moleküllerle ise daha yavaş reaksiyon verir. Mitokondrial elektron transport zinciri tarafından gerçekleştirilen bu süreçte, % 1-2 oranında O_2 kaçağı meydana gelir. Oksijenin indirgenmesi ile açığa çıkan; süperoksit radikali ($O_2^{\cdot-}$), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve hidroksil radikali ($\cdot OH$) gibi reaktif ürünler oksijenin toksik etkisinin nedenini oluştururlar (12, 14). Moleküler oksijene elektronların adım adım eklenmesiyle ROM'nin oluşumu:



Serbest radikalleri, oksijen merkezli ve oksijen merkezli olmayan serbest radikaller olmak üzere iki sınıfa ayırmak mümkündür.

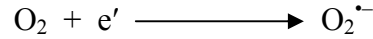
Reaktif Oksijen Metabolitleri

Reaktif oksijen metabolitleri, radikaller ve radikal olmayanlar olmak üzere iki grup altında toplanırlar (Tablo 1) (13).

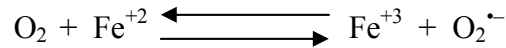
Tablo 1. Reaktif Oksijen Metabolitleri (13)

Radikaller		Radikal Olmayanlar	
Süperoksit	(O ₂ ^{•-})	Singlet oksijen	(¹ O ₂)
Hidroksil	(•OH)	Hidrojen peroksit	(H ₂ O ₂)
Peroksil	(RO ₂ [•])	Ozon	(O ₃)
Hidroperoksil	(HO ₂ [•])	Hipokloröz asit	(HOCl)
Alkoksil	(RO [•])	Hipobromöz asit	(HOBr)
Organik peroksit	(ROO [•])	Organik hidroperoksit	(ROOH)
		Peroksinitrit	(ONOO)
		Peroksinitrat	(O ₂ NOO)
		Peroksinitröz asit	(ONOOH)
		Peroksimonokarbonat	(HOOCO ₂)

1. Süperoksit radikali: Tüm aerobik hücrelerde O₂'in bir elektron alarak indirgenmesi sonucu, O₂^{•-} meydana gelir. Süperoksit radikalının önemli kaynağı mitokondri ve endoplazmik retikulumdaki elektron transport zincir reaksiyonudur.

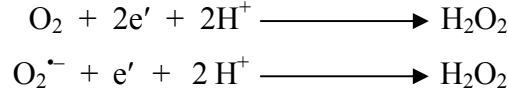


Cu⁺², Fe⁺³, Mn⁺² ve Mo⁺⁵ gibi geçiş metali iyonları, eşlenmemiş elektronları bulunduğu halde, serbest radikal olarak kabul edilemezler. Fakat reaksiyonlardaki katalizör rollerinden dolayı, serbest radikal oluşumunda önemli yer tutarlar. İndirgenmiş geçiş metallerinin otooksidasyonu O₂^{•-} meydana getirebilir. Geçiş metali iyonlarının, O₂ ile verdikleri reaksiyonlar geri dönüşümlü olduğundan redoks reaksiyonları olarak düşünülebilir.

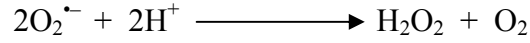


Süperoksit radikali, bir serbest radikal olmakla birlikte diğer radikallere oranla reaktivitesi çok az olduğundan kendisi direkt olarak fazla zarar vermez. H₂O₂'in kaynağı olması ve geçiş metali iyonlarının indirgeyicisi olması bakımından önemlidir (3, 13, 15).

2. Hidrojen peroksit: Hidrojen peroksit, eşlenmemiş elektronu bulunmadığından bir serbest radikal olmadığı halde, serbest radikal biyokimyasında önemli rol oynar. Oksijen molekülünün çevresindeki moleküllerden iki elektron veya O₂^{•-}'nin bir elektron alması sonucu oluşan peroksit molekülü, iki hidrojen atomu ile birleşerek H₂O₂'i meydana getirir.

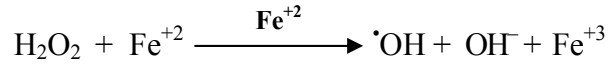


İki süperoksit radikali anyonunun iki proton alarak radikal olmayan ürünler olan H₂O₂ ve O₂'ni oluşturması dismutasyon reaksiyonu olarak adlandırılır. Dismutasyon reaksiyonu kendiliğinden ya da süperoksit dismutaz (SOD) enzimi kataliziyle oluşabilmektedir. Biyolojik sistemlerde H₂O₂ genellikle O₂^{•-}'nin dismutasyonu ile meydana gelir (3, 15).

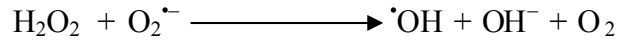


Hidrojen peroksit, O₂^{•-} veya geçiş metalleri ile reaksiyona girerek, [•]OH oluşturmak üzere kolaylıkla yıkılabilmesi bakımından önemlidir.

3. Hidroksil radikali: Reaktif oksijen metabolitleri içinde en reaktif ve en zarar verici olanı [•]OH'dir. Yarılanma ömrü çok kısadır. Haber-Weiss ve Fenton reaksiyonları [•]OH oluşumundaki en önemli reaksiyonlardır. Fenton reaksiyonunda H₂O₂'nin geçiş metalleri ile indirgenmesiyle [•]OH meydana gelir.

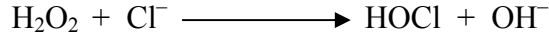


Haber-Weiss reaksiyonunda ise, H₂O₂'nin geçiş metalleri varlığında O₂^{•-} tarafından indirgenmesi [•]OH oluşumuna yol açar (3, 15).



4. Singlet oksijen (¹O₂): Singlet oksijen, eşlenmemiş elektronu bulunmadığı için radikal olmayan çok reaktif bir oksijen molekülüdür. Serbest radikal reaksiyonları ile meydana gelerek yeni serbest radikal reaksiyonlarını başlatabilir. Oksijenin elektronlarından birinin enerjisi alarak kendi spininin ters yönündeki başka bir orbitale yer değiştirmesiyle oluşur. Delta (¹Δg O₂) ve sigma (¹Σg O₂) olmak üzere iki formu vardır. Delta singlet oksijenin ömrü, ¹Σg O₂'den daha uzun olmakla birlikte suda 2 mikrosaniye kadardır. Singlet oksijen, uyarılmış elektronlarının daha düşük enerji seviyelerine inmesiyle ışık yaymaktadır (3, 13).

5. Hipokloröz Asit (HOCl): Nötrofil lökositlerinin granüllerinden fagozom içine bırakılan myeloperoksidaz (MPO) enzimi, H₂O₂ ve klor (Cl) kullanarak HOCl'i oluşturur. Hipokloröz asit, mikrobisid etkiye sahip en önemli oksidandır (3, 13).



Oksijen Merkezli Olmayan Serbest Radikaller

Çoğu serbest radikal oksijen merkezli olmasına rağmen organizmada oksijen türevi serbest radikallerin dışında azot, brom, klor, karbon, kükürt, hidrojen ve demir merkezli radikaller de meydana gelir (Tablo 2) .

Tablo 2. Oksijen Merkezli Olmayan Serbest Radikaller (13)

Azot Merkezli Olanlar	
Nitrik oksit	NO [•]
Nitrojen dioksit	NO ₂ [•]
Nitrat radikali	NO ₃ [•]
Brom Merkezli Olanlar	
Atomik bromin	Br [•]
Klor Merkezli Olanlar	
Atomik klorin	Cl [•]
Karbon Merkezli Olanlar	
Lipid radikalleri	L [•]
Aloksi radikalleri	R [•]
Kükürt Merkezli Olanlar	
Thiyl	R-S [•]
Hidrojen Merkezli Olanlar	
Hidrojen atomu	H [•]
Demir Merkezli Olanlar	
Perferri radikali	Fe ⁺⁺⁺ -O ₂ -Fe ⁺⁺⁺

Serbest Radikallerin Kaynakları

Biyolojik sistemlerde serbest radikal oluşturan kaynaklar endojen ve ekzojen olmak üzere iki gruba ayrılabilir. Ekzojen kaynaklar şöyle sıralanabilir (10, 12):

1- Çevresel faktörler

- a) Hiperoksi
- b) Hava kirliliği (NO₂, O₃, SO₂)
- c) Alışkanlık yapan maddeler (sigara, alkol, uyuşturucu)
- d) Böcek ilaçları (pestisitler)
- e) Metaller (Ti, Al, Pb, Mo, Ni, Co, Hg, Ca, Ar)

2- Toksik kimyasallar

- a) Halojenlenmiş hidrokarbonlar (kloroform, bromobenzen, halotan)
- b) Redoks potansiyelli maddeler (paraquat, alloksan, difenoller, kinonlar)
- c) Karbontetraklorür

3- Stres

4- Radyasyon

- a) Elektromanyetik radyasyon
- b) Partiküler radyasyon

5- İlaçlar

- a) Antineoplastik ajanlar (bleomisin, doksorubusin, adriamisin)
- b) Antibiyotikler (kinolon, tetrasiklin, aminoglikozid)
- c) Anestezikler

Normal metabolizmada da, bazı biyokimyasal olayların çeşitli basamaklarında serbest radikaller oluşmaktadır. Serbest radikal yapısına sahip maddelerin organizmaya zarar verme potansiyelleri varsa da, bazı metabolik olayların ilerleyebilmesi için oluşumları kaçınılmazdır. Endojen kaynaklar sekiz ana başlık altında toplanabilir (10, 11)

- 1) Mitokondrial elektron taşıma sistemi
- 2) Endoplazmik retikulum ve nükleer membran elektron taşıma sistemleri
- 3) Peroksizom
- 4) Oksidan enzimler
- 5) Araşidonik asit metabolizması
- 6) Otoksidasyon reaksiyonları
- 7) Fagositik hücreler

1) Mitokondrial elektron taşıma sistemi: Aerobik hücrelerdeki en önemli serbest radikal kaynağı, mitokondrial elektron transport zincirinde oluşan sızıntıdır. Mitokondri iç zarında yerleşmiş oksidatif fosforilasyon zinciri bileşenleri büyük oranda indirgenmiş mitokondrial $O_2^{\cdot-}$ üretimi artmaktadır. Bu olay, mitokondrideki oksijen konsantrasyonu arttığında, mitokondrial oksidatif fosforilasyon hızı moleküler oksijenin tek elektron oksidasyonu ile gerçekleşir. Solunum zincirinde hidrojen peroksit de meydana gelmektedir. Mitokondrial $O_2^{\cdot-}$ elektron transport zincirinde şu yolla üretilir: Ubikinondan, sitokrom c_1 basamağına geçerken oluşan ara ürün semiubikinon'dur. Semiubikinon, O_2 'i $O_2^{\cdot-}$ 'ne indirger. Dismutazlar ise H_2O_2 oluştururlar (10, 11).

2) Endoplazmik retikulum ve nükleer membran elektron taşıma sistemleri: Endoplazmik retikulum ve nükleer membrandaki serbest radikal üretimi, membrana bağlı sitokromların oksidasyonundan kaynaklanır. Endoplazmik retikulum ve nükleer membranda üretilen serbest radikaller organellerin içine girebilir ve sitosolik reaksiyonlara katılabilir. Endoplazmik retikulum membranına bağlı sitokrom P_{450} komplekslerinin ayrışması H_2O_2 ve diğer peroksit ara ürünlerinin oluşmasına neden olmaktadır. Nükleer membranda oluşan serbest radikaller özellikle DNA da hasar oluştururlar (11).

3) Peroksizomlar: Peroksizomlar H_2O_2 'in hücredeki en önemli kaynağıdır. Peroksizomlardaki D-aminoasit oksidaz, urat oksidaz, yağ açıl-CoA oksidaz ve L- α -hidroksi asit oksidaz gibi oksidazlar, süperoksit radikali üretilmeden bol miktarda hidrojen peroksit üretimine neden olurlar. Ancak peroksizomlarda, H_2O_2 'in suya ayrışmasını katalizleyen katalaz enziminin aktivitesi çok yüksek olduğundan peroksizomlardan sitosole ne kadar H_2O_2 geçtiği bilinmemektedir (11).

4) Oksidan enzimler: Oksidan enzimlerin katalitik etkinliği serbest radikal oluşumuna yol açmaktadır. Ksantin oksidaz (XO), indolamin dioksigenaz, triptofan dioksigenaz, galaktoz oksidaz, siklooksigenaz, lipooksigenaz ve monoamino oksidaz oksidan enzimler olarak sıralanabilir. Oksidan enzimlerin başlıcalarından olan XO, hasarlanmamış dokularda pürinlerin yıkılım yolunda dehidrogenaz olarak görev yapar. İskemi-reperfüzyon hasarı durumunda ise enzim proteolitik modifikasyon sonucu oksidaz gibi davranarak O_2 'in, H_2O_2 'e indirgenmesini katalizler (11).

5) Otooksidasyon: Çözünebilir özelliği olan ve nötral sıvı ortamda oksidasyon-redüksiyon reaksiyonlarına girebilen hücre bileşenlerinden pek çoğu intraselüler olarak serbest radikalleri açığa çıkarabilirler. Koenzimler, hemoglobin, miyoglobin, indirgenmiş sitokrom c, indirgenmiş ferrodoksinler, askorbik asit, tiyoller, flavinler, hidrokinonlar, tetrahidropterinler ve katekolaminler gibi bileşiklerin otooksidasyonu ile O_2 indirgenirken $O_2^{\cdot-}$ oluşmaktadır (10, 11).

6) Araşidonik asid yolu: Plazma membranına bağlı enzimlerden siklooksijenaz ve lipoksijenaz prostaglandin ve lökotrien biyosentezi için araşidonik asidin oksidasyonunu katalizledikleri sırada karbon ve oksijen merkezli serbest radikaller açığa çıkmaktadır. Oluşan serbest radikaller, enzimlerin kendileri ve diğer hücre komponentleri ile reaksiyona girme yeteneğindedir (10, 11).

7) Fagositik hücreler: Fagositik hücreler immunojenik veya partiküler bir uyarıcıyla uyarıldıklarında ROM'nin oluşumuyla birlikte mitokondri dışında oksijen tüketiminde patlama gösterirler. Solunumsal patlama sırasında elektron vericisi olarak nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH) kullanımını sonucu O_2 'nin $O_2^{\cdot-}$ 'e indirgenmesi ile $NADP^+$ üretimi artar ve heksoz monofosfat yolu aktive olarak glukozun oksidasyonunda artışa neden olur. Fagositik hücrelerin lizozomal granüllerinde bulunan MPO enzimi uyarıcıların etkisiyle ekstrasellüler aralıktaki fagositik vakuol içine boşaltılır. MPO, H_2O_2 varlığında Cl, iyodür ve bromürün oksidasyonunu katalizleyerek HOCl, hipoiyodik asit ve HOBr oluşturur. Fagosite edilmiş bakteri, solunumsal patlama ürünlerinin etkisiyle öldürülür. Fagositik hücreler ROM'nin zararlı etkilerinden kendilerini sahip oldukları antioksidan sistemleriyle koruyabilirler. Ancak oluşan oksidan ürünler hücrelerin antioksidan savunma güçlerini aştığında ototoksik, immünosüpresif ve mutajenik etkiler göstererek normal konak hücrelere zarar verebilir ve çeşitli hastalıkların patogeneğinde rol alırlar (10, 16).

Serbest Radikallerin Etkileri

Serbest radikallerin hücrelerdeki zararlı etkileri şöyle sıralanabilir (9, 10, 12);

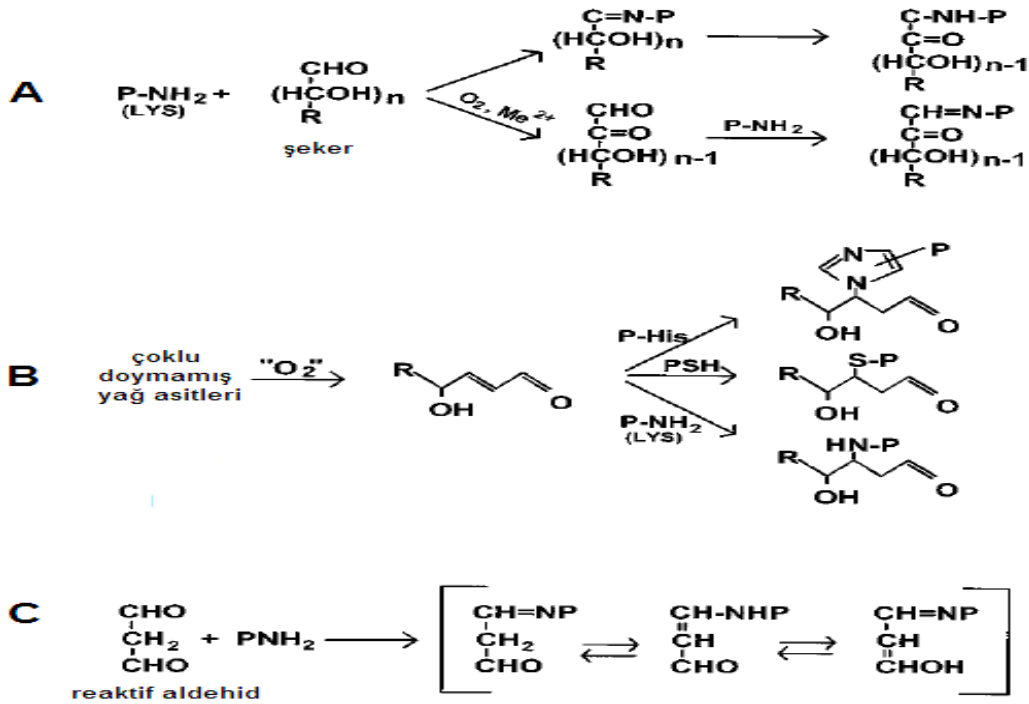
- a) Tiyollere bağımlı enzimlerin yapı ve fonksiyonlarının bozulması, hücre ortamının tiyol/disülfit oranının değişmesi,
- b) Protein ve lipidlerde kovalent bağlantılar yapması,
- c) Proteinlerin tahrip olması ve protein döngüsünün artması,

- d) Zar proteinlerinin tahribi, taşıma sistemlerinin bozulması,
- e) Kollajen ve elastin gibi uzun ömürlü proteinlerdeki oksido-redüksiyon olayları bozularak kapilerde aterofibrotik değişikliklerin oluşması.
- f) Lipid peroksidasyonu, zar yapısı ve fonksiyonunun değişimi,
- g) Lipid metabolizmasındaki değişiklikler,
- h) Mukopolisakkaritlerin yıkımı,
- ı) Seroid ve yaş pigmenti denilen bazı maddelerin birikimi,
- i) Nükleotid yapıllı koenzimlerin yıkımı,
- j) DNA' nın tahrip olması.

Proteinlere etkisi: Protein oksidasyonu, proteinlerin ROM ile kovalent modifikasyonu sonucu meydana gelir. Proteinlerde yapısal değişikliğe yol açan başlıca moleküler mekanizmalar protein karbonil oluşumu (PC) ile karakterize edilen metal katalizli protein oksidasyonu, protein tiyol (P-SH) gruplarının kaybı, NT ve AOPP oluşumu olarak sıralanmaktadır (17).

Protein karbonil türevlerinin oluşumuna yol açan primer modifikasyon reaksiyonları aminoasitlerin α -karbon atomlarının veya R yan zincirlerinin oksidatif modifikasyonlarından ve modifikasyonları takiben meydana gelen reaktif oksijen-aracılı peptid ayrılması reaksiyonundan oluşmaktadır (Şekil 1). Reaktif oksijen metabolitlerinin proteinlerle etkileşimi sonucunda, histidin, prolin, arginin ve lizin gibi çok sayıda aminoasit kalıntısında veya proteinlerin peptid omurgasında oluşan oksidatif hasara bağlı olarak PC meydana gelir (4, 18).

Suyun χ ve γ ışınlarıyla radyolizi veya H_2O_2 'nin metal katalizli yıkımı ile $\cdot OH$ oluşur (reaksiyon a ve b). Polipeptid omurgasındaki α -karbon atomundaki α -hidrojen atomunun $\cdot OH$ tarafından çıkarılması sonucunda aminoasit kalıntısı karbon merkezli radikal haline dönüşür (reaksiyon c). Karbon merkezli radikal, O_2 ile reaksiyona girerek (reaksiyon d) alkil peroksiti verecek olan alkilperoksili oluşturur. Alkil peroksit, $RO\cdot$ (reaksiyon h) üzerinden hidroksi protein türevini verir (reaksiyon j). Bu metabolik yolda oluşan alkil, alkilperoksil ve $RO\cdot$ aynı veya farklı protein molekülündeki R yan zincirleri ile yan reaksiyonlar ile etkileşerek yeni karbon merkezli radikallerin oluşumuna yol açar (şekil 1).



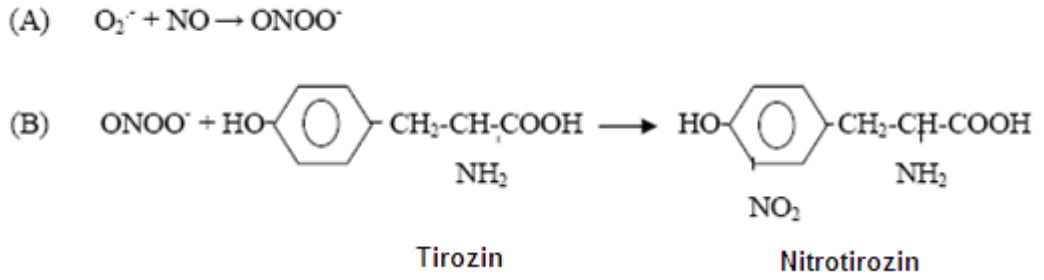
Şekil 2. Protein karbonil oluşumuna yol açan sekonder modifikasyon reaksiyonları (18)

Lipid peroksidasyonu sırasında oluşan 4-hidroksi-2-nonenal ve MDA, indirgen şekerler veya bu şekerlerin oksidasyon ürünlerinin proteinlerdeki P-NH₂ kalıntıları ile reaksiyonu (glifikasyon ve gliksidasyon reaksiyonları) sonucu oluşan reaktif karbonil türevleri (ketoaminler, ketoaldehitler, deoksiozonlar) protein yapısına karbonil gruplarının katılmasına yol açar. Lipidlerden türetilen aldehitler veya otooksidasyona uğramış şekerler Schiff bazı oluşumu yolu ile proteinlerdeki amino gruplarına bağlanır. Schiff bazı oluşumu geri dönüşümlü bir reaksiyon olmakla birlikte, sıklıkla geri dönüşümsüz bir reaksiyon olan Amodori düzenlemesine uğrar (4, 18-20).

Serbest radikaller proteinlerdeki -SH gruplarının oksidasyonuna da yol açmaktadır. Sisteinin -SH grubu oksidatif atağa oldukça yatkındır ve -SH gruplarından değişik mekanizmalarla oluşan -S[•] proteinlerdeki disülfid bağlarının oluşumuna öncülük eder. Tiyol gruplarının disülfidlere ve oksiasitlere dönüşümü, radikal aracılı protein oksidasyonunun en erken gözlenebilen belirtisidir. Peroksinitritin -SH grupları ile reaksiyonu sonucu -S[•] oluşur. Tiyol gruplarının diğer bir oksidasyon şekli; 4-hidroksinonenalin, proteinlerdeki -SH gruplarına Michael reaksiyonu sonucunda tioeter bağıyla bağlanmasıyla gerçekleşmektedir (Şekil 2B), (19, 21).

Nitrotirozin oluşum reaksiyonları iki basamakta gerçekleşmektedir. Peroksinitrit, NO[•] ve O₂^{•-}'nin in vivo reaksiyonu sonucunda oluşan sitotoksik bir tüevdir (şekil 3A). Normal koşullarda SOD enzimi, oluşan O₂^{•-}'nin dismutasyona uğratmaya yetecek düzeydedir, fakat

$O_2^{\cdot-}$ düzeyleri çok artmışsa ya da fazla miktarda NO^{\cdot} meydana gelmişse $ONOO^{\cdot}$ oluşur. Peroksinitrit DNA'yı, enzimleri, proteinleri, lipidleri ve -SH gruplarını okside edebilen yüksek toksisiteye sahiptir. Peroksinitritin proteinler üzerine atağının ana ürünü olan NT; tirozinin orto pozisyonunda nitrasyonu ile oluşur. (şekil 3B). Tirozinin geri dönüşümsüz olarak nitrasyonu, tirozinin fosforille-defosforille formlarının birbirine dönüşümünü engelleyerek, enzim aktivitesinin düzenlenmesini ve sinyal ileti mekanizmalarının regülasyonunu etkiler. Nitrotirozin, $ONOO^{\cdot}$ oksidasyonunun stabil son ürünü olduğundan NT konsantrasyonu in vivo protein hasarının tespitinde kullanışlı bir belirteçtir (21).



Şekil 3. Nitrotirozin oluşum reaksiyonları (21)

İleri oksidasyon protein ürünleri, ditirozin içeren çapraz bağlı protein ürünleri olarak tanınmaktadır. İleri oksidasyon protein ürünlerinin yapısal olarak ileri glikasyon son ürünlerine benzediği bildirilmektedir. İleri oksidasyon protein ürünleri, protein oksidasyonunun derecesini belirlemede duyarlı bir belirteçtir (4, 18).

Moleküler oksijen varlığında, proteinlerin ROM ile etkileşimi sonucunda diğer proteinleri, DNA'yı, antioksidanları ve lipidleri hasara uğratabilecek protein hidroperoksitlerinin oluşumu, sırasıyla karbon merkezli protein radikali ve reaktif protein peroksil radikali üzerinden meydana gelir. (Şekil 1). Protein hidroperoksil radikali, geçiş metal iyonlarının varlığında bozularak yeni serbest radikalleri oluşturur, hücrel antioksidanlar ile reaksiyona girer, glutatyon redüktazı inaktive eder, DNA'ya çapraz bağlanır. Aminoasit, peptid ve protein peroksil radikali; glutatyon peroksidaz, glutatyon ve askorbat tarafından indirgenerek dayanıklı bir ürün ve protein oksidasyonunun belirteci olan alkol türevlerini oluşturur (21).

Protein oksidasyonunun biyokimyasal sonuçları; enzim aktivitesinde azalma, protein fonksiyonlarının kaybı, proteaz inhibitör aktivitenin kaybı, protein agregasyonu, proteolize artmış ya da azalmış yatkınlık, reseptör aracılı endositozun bozulması, gen transkripsiyonundaki değişimler ve immünojen aktivitedeki artış olarak sıralanabilir (21).

Proteinlerin oksidatif modifikasyonu, bir dizi bozukluk ve hastalığın etiyolojisi ile ilerlemesinde rol oynar. Alzheimer, amiyotrofik lateral skleroz, katarakt oluşumu, kronik böbrek yetmezliği, kistik fibroz, diyabet, iskemi ve reperfüzyon hasarı, parkinson, romatoid artrit ve sepsis bu hastalıklardan başlıcaları olarak sayılabilir (4, 17).

ANTIOKSİDANLAR

Oksijenli yaşamla birlikte aerobik organizmalar oksijen kaynaklı radikalleri oluşturmaya başlamışlardır. Eş zamanlı olarak da, serbest radikallerin zararlı etkilerini engellemek üzere antioksidan savunma sistemleri veya kısaca antioksidanlar olarak adlandırılan savunma mekanizmaları gelişmiştir. Serbest radikallerin ve antioksidanların düzeyleri arasındaki hassas dengenin korunamadığı durumlarda hücre hasarına kadar giden birçok patolojik değişiklik ortaya çıkmaktadır. Antioksidanların bilinen ilk etkileri, zar yapısındaki lipidleri peroksidasyona karşı koruması olduğundan, başlangıçta lipid peroksidasyonunu engelleyen moleküller olarak tanımlanmışlardır. Günümüzde ise, antioksidanların tanımı lipidlerin yanısıra proteinler, nükleik asitler ve karbonhidratlar gibi diğer hedef moleküllerin koruyucu etkilerini de içerecek şekilde genişletilmiştir. Böylece antioksidanlar, hedef moleküllerdeki oksidan hasarı engelleyen veya geciktiren maddeler olarak tanımlanmaktadır (9, 11, 13, 14).

Antioksidanların oksidan moleküllere karşı etki tipleri şunlardır (15, 22):

1-Toplayıcı etki; Yeni radikal oluşumunu engelleme ve oluşmuş olan radikalleri daha az zararlı hale getirme,

2-Bastırıcı etki; Oksidanlarla etkileşip onlara bir hidrojen atomu aktararak aktivitelerini söndürme ve inaktif hale getirme,

3- Zincir kırıcı etki; Zincirleme olarak devam eden tepkimeleri belirli yerlerinden kırarak oksidan etkiyi durdurma,

4- Onarıcı etki; Serbest radikallerin oluşturdukları hasarın tamiri ve temizlenmesi.

Antioksidanlar çeşitli kriterlere göre sınıflandırılabilirler (9, 11, 23):

Yapılarına göre;

a) Enzimler

b) Enzim olmayan proteinler, küçük moleküller

Kaynaklarına göre;

a) Organizmaya ait olanlar (endojen antioksidanlar)

b) Dışarıdan alınanlar (ekzojen antioksidanlar)

Çözünürlüklerine göre;

- a) Suda çözünenler
- b) Lipidde çözünenler

Yerleşimine göre;

- a) Hücre içinde bulunan
- b) Plazma ve diğer ekstraselüler sıvılarda bulunanlar

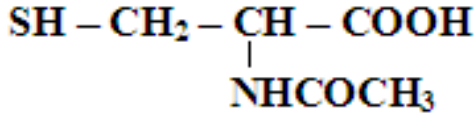
Küçük moleküller: endojen bir antioksidan olan glutatyon; organizmanın tüm hücrelerinde bulunan, hücrenin protein yapısı dışındaki -SH grubu içeriğinin % 90 kadarını oluşturan bir tripeptiddir. Glutamik asit, sistein ve glisin aminoasitlerinden γ -glutamil sistein sentetaz ve glutatyon sentetaz enzimleri ile oluşur. Hidrofilik özellikte bir tripeptit olan GSH, yüksek oranda karaciğerde sentezlenir.

Glutatyon hücre metabolizmasında düzenleyici, koruyucu ve kofaktör fonksiyonları ile önemli roller üstlenmektedir. Serbest -SH grubu bulunan indirgenmiş glutatyon (GSH), hücre içi -SH tamponu olarak etkilidir. Eritrositlerde bulunan GSH, hemoglobinin sistein gruplarını ve diğer hücre proteinlerinin -SH gruplarını indirgenmiş şekilde tutar. Böylece hemoglobini oksidasyondan koruyarak hücre bütünlüğünü sağlar.

Glutatyon, hücrelerde oksidatif ve toksik bileşiklerin detoksifikasyonunda da etkin rol oynar. Biyotransformasyon ile oluşan zehirli maddelerin zehirsizleştirme reaksiyonlarına doğrudan katıldığı gibi bazı enzimlerin aktivatörü veya substratı olarak da görev yapar.

Glutatyonun peroksitlerle ve disüflitlerle reaksiyonu sonucu yükseltgenmiş glutatyon (GSSG) oluşur. Yükseltgenmiş glutatyon konsantrasyonundaki artış oksidan stresin bir göstergesidir. Ayrıca GSSG, tiyol içeren proteinlerin konformasyon ve aktivitesi üzerine zararlı etkileri olan bir moleküldür. Glutatyon, serbest radikallere karşı antioksidan savunma sisteminin anahtar bileşenidir. Konsantrasyonu ve hücresel turnover hızı oksidatif stresin bir indeksidir. Glutatyon; glutatyon peroksidaz ve glutatyon-s-transferaz enzimlerinin katalizlediği reaksiyonların önemli bir kofaktörüdür (22, 23).

Ekzojen bir antioksidan olan N-asetilsistein, L-sistein aminoasidinin N-asetil türevidir. İlk olarak, 1960 yılında geliştirilmiştir. Moleküler ağırlığı 163.2 g.mol^{-1} ve moleküler formülü $\text{C}_5\text{H}_9\text{NO}_3\text{S}$ 'dir (şekil 4).



Şekil 4. N-asetilsisteinin moleküler formülü (24)

N-asetilsistein antioksidan özelliklere sahip bir ajandır ve antioksidan fonksiyonu moleküler yapısı ile açıklanabilir. Amino grubuna bağlı asetil, oksidasyona karşı molekülün daha stabil olmasını sağlar. N-asetilsistein, sahip olduğu -SH grupları nedeniyle $\text{O}_2^{\cdot-}$, HOCl ve H_2O_2 gibi oksidanlar ile direkt olarak etkileşmektedir. Ayrıca, N-asetilsistein, -SH grubu içeren diğer antioksidanlar gibi 'OH'nin yakalayıcısıdır.

Antioksidan etkisine ek olarak glutatyon transferaz enzim aktivitesini ve detoksifikasyonu artırmaktadır. N-asetilsisteinin hücresel GSH sentezinde rol aldığını, hayvan deneyleri ve hücre kültürlerinde oksidan hasarı önlediği veya azalttığını gösteren pek çok çalışma bulunmaktadır. 10^{-5} M üzerinde NAC alımı intrasellüler GSH seviyesinde yaklaşık olarak 10 kat artış oluşturur. N-asetilsistein, boşalmış olan GSH depolarını tekrar doldurarak hücrelerin antioksidan potansiyelini yenilemektedir. Hücresel GSH öncülleri için anahtar mekanizma NAC'in N-deasetilasyonudur.

N-asetilsisteinin antiinflamatuvar özelliği de bulunmaktadır. N-asetilsistein; apoptozu önleyebilmekte, çeşitli proteinlerin aktivitelerini düzenleyerek hücrenin yaşam sürecini uzatmaktadır. N-asetilsistein, endotelial disfonksiyonunu azaltmakta, inflamasyon, fibroz, invazyon, kartilaj erozyonu, asetaminofen detoksifikasyonu ve transplantasyon ihtiyacının geciktirilmesini sağlamaktadır (5, 25).

İNFLAMATUVAR BARSAK HASTALIKLARI

İnflamatuvar barsak hastalıkları günümüzde önemli bir sağlık sorunu olarak karşımıza çıkmaktadır ve araştırma potansiyeline sahip bir konu olduğundan literatürde geniş bir yer kaplamaktadır. Gastrointestinal sistemin inflamatuvar hastalıkları olarak bilinen ÜK ve CH'nin etyolojisi ise halen bilinmemektedir.

Ülseratif kolit ve CH yerleşimleri, kronik, alevlenme-remisyonlarla seyreden klinik seyirleri ve aynı tedavi yöntemlerine cevap vermeleri açısından birbirine çok benzerler. Ancak komplikasyonları, barsağın farklı bölgelerine lokalize olmaları, klinik görünümleri ve histopatolojileri açısından birbirinden farklı hastalık grubunu oluştururlar (26). İBH'nin etyolojisi için geçerli olan görüş, zeminde yer alan inflamatuvar hücreler ve sitokinlerle

oluşan inflamasyondur (27). Etyolojik olarak bir takım genetik bozukluklar, enfeksiyöz ajanlar, emosyonel stres, alkol kullanımı, oral kontraseptif alımı ve rafine yiyeceklerin tüketimi gibi çevresel bazı faktörler sorumlu tutulmaktadır. Etyolojiden sorumlu olan ajan ne olursa olsun her iki hastalık da sonuçta doku düzeyinde hasar ile seyretmektedir (1).

Günümüzde İBH'nın patogenezi ile ilgili en geçerli açıklama İBH'nın olası nedeninin multifaktöryel olup genetik yatkınlığı olan bir konakta barsak kökenli antijenlere karşı abartılı bir immün yanıt gelişmesidir (27). Crohn hastalığında daha sıklıkla olmak üzere her iki durumda da ailevi tutulumu rastlanması, hastalığın bazı ırklarda daha fazla görülmesi ve HLA gruplarıyla hastalık arasında ilişki saptanması İBH'nın genetik özelliklerini destekleyen bulgulardır. Ailesel CH ya da ÜK olgularında yapılan genom taramalarında, özellikle CH'nda kromozom 16'da, her iki hastalıkta da kromozom 3, 5, 7 ve 12'de yatkınlık lokusu bulunması, bazı kişilerde insan lökosit antijen (HLA) genleri ve sitokin genlerinde polimorfizm saptanması, genetik faktörlerin önemini ortaya koymaktadır (26) .

İnflamatuvar Barsak Hastalıkları ve Oksidatif Stres

İnflamatuvar hücrelerin inflamasyon bölgelerindeki doku hasarından önemli oranda sorumlu oldukları düşünülmektedir (26). Polimorfonükleer lökosit (PNL) ve makrofaj kaynaklı ROM'nin, hücrelerin bakterisidal etkileri için gerekli olduğu bilinmektedir (24, 28). Reaktif oksijen metabolitlerinin üretimi endojen antioksidan savunma mekanizmalarının kapasitesini aşarsa doku hasarına neden olabilmektedir. Crohn hastalarından alınan kan örneklerinde yapılan in vitro kemilüminesans ölçümlerinde ROM kaynağının dolaşımdaki nötrofiller olduğu gösterilmiştir (28). Lökosit-endotel hücresi ilişkisi parankimal infiltratın oluşmasında etkilidir, ancak lökositlerin parankime migrasyonu için öncelikle endotel hücrelerine bağlanması ve endoteli geçmesi gerekmektedir (29). Aktive olmuş makrofajların ve T-lenfositlerinin ürünleri olan interlökin 1, tümör nekroz faktörü alfa ve intersellüler lökosit adhezyon molekülü-1 ve interferon; T lenfositlerin endotel hücrelerine bağlanma özelliğini arttırmaktadır. Sitokinler ile endotel hücrelerinin etkileşimi sonucu ortaya çıkan ajanlar inflamasyonun başlamasında ve devamında rol oynamaktadır (26, 28). Mast hücrelerinden kaynaklanan histaminin İBH'nın patogenezi de önemli rol oynadığı düşünülmektedir. İnflamatuvar barsak hastalıklarının aktif döneminde mukoza ve submukozadaki mast hücresi sayısının ve histamin salgısının arttığı gösterilmiştir (30).

İntestinal mukoza hücrelerinde görülen ROM artışının önemli kaynaklarından birisi XO enzimin katalitik döngüsüdür. Pürinlerin yıkım yolunda ksantin dehidrogenaz ve aldehid

dehidrogenaz gibi NAD^+ indirgeyici enzimler oksidasyon veya sınırlı proteoliz ile O_2 indirgeyici enzimler olan XO, aldehid oksidaza dönüşmektedir. Oksidaz aktivasyonu, geçici iskemik safha ortadan kalkınca kolon epiteli ve endotel tarafından ROM üretimine yol açmaktadır (2, 15). Reaktif oksijen metaboliti üretimindeki bu artış ise kapiller ve mukozal membran geçirgenliğindeki artışa neden olur. Kolon epitelinin apikal kesiminde oluşan ROM koruyucu mürsin tabakasını yıkarak mukozal bariyeri ortadan kaldırmakta ve bunun sonucunda çeşitli bakteriyel ürünler lamina propriyaya difüze olarak burada fagositik lökositlerin infiltrasyonuna ve aktive olmalarına neden olmaktadır (29). Reperfüzyon esnasında $\text{O}_2^{\cdot-}$ 'e bağlı kemotaktik ajanlar lamina propriyaya daha fazla lökosit akımına neden olmaktadır. Lökosit infiltrasyonu ve aktivasyonu, ROM üretimini daha da artırarak fagositik vakuolden sızıntı yoluyla ya da nötrofil ölümü ile katepsin, elastaz, kollajenaz gibi oksidatif olmayan toksinlerin ortama salınmalarına yol açar. Lizozomal proteolitik bu enzimler elastin, kollojen ve diğer doku proteinlerini parçalayarak doku incinmesine neden olurlar (31).

İnflamatuvar barsak hastalığı ve deneysel kolit modellerinin patogenezinde yer alan medyatörler arasında araşidonik asit kaskadının siklooksijenaz (COX) ve lipooksijenaz yollarının çeşitli ürünleri de bulunmaktadır. Paiotti ve ark. (32) ÜK olgularının, Romero ve ark. (33) Crohn hastalarının kolon dokularında COX-1 ve COX-2 ifadelerinin arttığını, ancak COX-2 ifadesindeki artışın daha fazla olduğunu bildirmişlerdir. Deneysel kolit modeli uygulanan ratların kolon dokularında Ajuebor ve ark. (34) COX-2 ürünü olan PDG_2 'nin; Boughton-Smith ve ark. (35) lipooksijenaz ve COX-2 yolu ürünlerinin arttığını bildirmişlerdir.

İnflamatuvar Barsak Hastalıklarında Hayvan Modelleri

İnflamatuvar barsak hastalıklarının etiopatogenezinin daha iyi anlaşılabilmesi için pek çok deneysel kolit modeli geliştirilmiştir. Uygun hayvan modeli; barsağın morfolojik değişikliklerini, inflamasyonu, semptom ve bulguları, patofizyolojiyi sergileyecek nitelikte ve insan İBH seyrine benzer ya da özdeş olmalıdır. Aynı zamanda önerilen deney modelinde kullanılan deneğin immun sistem ve genetik özelliklerinin iyi tanımlanmış olması gerekmektedir. İBH'ında hayvan modelleri beş grupta değerlendirilmektedir:

1. Gen knockout (KO) modeli; IL-2/IL-4 KO, IL-10 KO, T hücre reseptör mutant, TNF- β KO,
2. Transgenik fare ve rat modeli; HLA B27 transgenik,
3. Spontan kolit modeli; C3H/Hej,

4. İndüklenebilir kolit modeli; asetik asit, indometazin, 2,4,6 trinitrobenzen sülfonik asit/etanol, dekstran sülfat sodyum ve peptidoglikan-polisakkarit gibi ajanlar ile,

5. Adoptive transfer modeli; sıcak şok proteini 60'a spesifik CD T hücre transferi, CD45RB transferi olarak alt gruplar da tanımlanmıştır (36).

Asetik asit modeli: % 3-10 oranında dilüe edilmiş asetik asidin ratlarda, tavşanlarda ve kobaylarda intrarektal olarak uygulanması akut inflamatuvar cevap oluşmasına neden olmaktadır. İnce barsakta patolojik ve fonksiyonel hasar asetik asit uygulamasından 30 dakika sonra başlamakta, 1. gün maksimum düzeye erişmekte, 7-14 gün içinde de spontan iyileşmektedir. Kolitli hayvanlarda araşidonik asit metabolizmasının işleyişi insanda görülen İBH ile tamamen aynıdır. Bu modelde insan ÜK'inde görülen patolojik bulgulara benzer şekilde; distal kolonda diffüz ülserasyon, pseudopolip benzeri yapılar, kript derinliğindeki değişiklikler, mukozal sekresyondaki değişiklikler ve transmural nonspesifik inflamatuvar yanıt gelişmektedir. Başlangıç hasarı hafif epiteliyal nekroz ve ödemdir. Asetik asitin konsantrasyonuna ve temas süresine bağlı olarak değişen hasar lamina propria, submukoza veya eksternal kas tabakalarına kadar ulaşmaktadır. Epiteliyal hasar, organik asitlere karşı verilen spesifik bir reaksiyondur. Epiteliyal hücre hasarını takip eden mukozal ve submukozal inflamasyon araşidonik asit yolunun aktivasyonu ile ilişkilidir. Lökotrien blokajı, prostaglandin analogları, fosfolipaz A₂ inhibitörleri, glukokortikoidler, nötrofil katılımının engellenmesi, interlökin 1 reseptör antagonistleri, platelet aktive edici faktör inhibitörleri, somatostatin analogları, mast hücre stabilizatörleri ve ROM antagonistleri inflamatuvar yanıtın bu fazını inhibe etmektedir. İnflamatuvar yanıt epiteliyal bariyerin kaybına bağlı spesifik olmayan bir sekel gibi görünmektedir ve farelerde 2-3 günde; ratlarda ise 2-3 haftada iyileşmektedir.

Asetik asit modelinin avantajları tekrarlanabilirliğinin iyi olması, insan ÜK patolojisine benzer lezyonlar oluşturması, maliyetinin az olması, uygulama kolaylığıdır. Modelin temel sınırlılığı oluşan hasarda kronik inflamatuvar sürecin oluşmamasıdır. Bu nedenle kronik immunolojik çalışmaları incelemek için uygun bir model olmamakla beraber, diğer çalışmalarda ve yeni ilaçların denenmesinde faydalı bir model olarak sunulmaktadır (36).

GEREÇ VE YÖNTEMLER

Bu çalışma T.Ü. Tıp Fakültesi Yerel Etik Kurul onayı alınarak Trakya Üniversitesi, Biyokimya Anabilim Dalı araştırma laboratuvarında gerçekleştirilmiş ve T.Ü. Bilimsel Araştırma Projeleri tarafından 2009/1 nolu proje olarak desteklenmiştir (Ek1).

DENEY HAYVANLARI

Ağırlıkları 200-250 g arasında değişen, 8-10 haftalık, standart koşullarda yetiştirilen 40 adet erkek Wistar albino sıçan Trakya Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Deneysel Hayvanlar Birimi'nden temin edildi. Sıçanlar, % 50-60 nem oranı, 22 ± 1 °C oda ısısı, ışık düzeni 12 saat gündüz/12 saat gece olan ortamda tutuldu ve araştırma süresince bazal diyet ile beslendi. Kolon dokularında dışkı bulunmaması amacıyla deneyden 24 saat öncesinde aç bırakılan sıçanların suya serbest erişimleri sağlandı. Denekler rastlantısal olarak 4 gruba ayrılarak çalışma grupları oluşturuldu. Kontrol (n=10), kolit (n=10), NAC₁ tedavi (n=10) ve NAC₂ tedavi (n =10) olarak belirlendi.

Deneklere anestezik olarak ketalar (50 mg/kg) ve rompun (10 mg/kg) intramuskuler (im) enjeksiyon ile uygulandı. Ardından sıçanlar 30° trendelenburg pozisyonuna getirilerek 8 mm'lik kateter, rektal yoldan 8 cm ileriye uzanacak şekilde yerleştirildi. Kolit, NAC₁ ve NAC₂ grubundaki sıçanlara 1 ml, pH 2.4, % 4'lük asetik asit intrarektal (ir) olarak uygulandı. Kontrol grubundaki sıçanlara ise eş zamanlı olarak ir yoldan 1 ml serum fizyolojik (nötr pH'da % 0.9'lük NaCl) verildi. Uygulanan maddelerin geri kaçmasını engellemek için denekler 30 sn süreyle kuyruktan kaldırılarak baş aşağı şekilde tutuldu ve sonrasında yine trendelenburg pozisyonunda anesteziden çıkana kadar yaklaşık 30 dk bekletildi. Asetik asit

veya serum fizyolojik uygulamasının ardından 24. saatte, NAC₁ grubundaki sıçanlara 100 mg/kg/gün dozunda, NAC₂ grubundakilere 500 mg/kg/gün dozunda NAC, kontrol ve kolit grubundaki sıçanlara ise serum fizyolojik intraperitoneal (ip) olarak verildi. Tüm gruptaki denekler ir asetik asit veya serum fizyolojik uygulamasından 48 saat sonra sakrifiye edildi.

Genel anestezi altındaki sıçanlara karın bölgesi traşı yapılmasının ardından batın ön duvarı orta hattından yapılan yaklaşık 4 cm'lik insizyonla laparotomi gerçekleştirildi ve intrakardiyak ponksiyonla kan örnekleri alınarak heparinli tüplere konuldu. Ardından, transvers kolonun ortasından rektumun distalde mümkün olan en alt seviyesine kadar uzanan yaklaşık 10 cm'lik kolon segmenti çıkarılarak deney sonlandırıldı. Alınan kolon materyali longitudinal olarak 2 parçaya ayrılıp distal ve proksimal kısımları tespit edilerek fekal içeriği serum fizyolojik ile temizlendi. Makroskobik analizin ardından yaklaşık 0.5 cm çapındaki kolon parçası % 10'luk formol solüsyonunda mikroskobik kolon hasarı değerlendirilmesi için Patoloji Anabilim Dalı araştırma laboratuvarına ulaştırıldı.

Diğer parçalar ise kan plazma örnekleriyle birlikte protein oksidasyon göstergeleri çalışılmak üzere analiz gününe kadar -80 °C'de saklandı.

KULLANILAN MALZEMELER

Kimyasal Maddeler

Asetik asit (CH ₃ COOH)	(Sigma Aldrich GmbH, Seelze-Almanya)
Bakır sülfat (CuSO ₄ .5H ₂ O)	(Sigma Aldrich GmbH, Seelze-Almanya)
2,2'-Dinitro-5,5'ditiobenzoik asit (C ₁₄ H ₈ N ₂ O ₈ S ₂)	(Merck KgaA, Darmstadt-Almanya)
Folin ayıracağı	(Merck KgaA, Darmstadt-Almanya)
Glutasyon (indirgenmiş form) (C ₁₀ H ₁₇ N ₃ O ₆ S)	(Sigma Aldrich GmbH, Seelze-Almanya)
Heparin (5.000 IU/ml)	(Phanpharma S.A. Fransa)
Hidroklorik asit (HCl)	(Merck KgaA, Darmstadt-Almanya)
Metanol (% 96) (CH ₃ OH)	(Sigma Aldrich GmbH, Seelze-Almanya)
N-asetil sistein (Asist)	(Hüsnu Arsan ilaçları)
Perklorik asit (% 70) (HClO ₄)	(Merck KgaA, Darmstadt-Almanya)
Potasyum klorür (KCl)	(Merck KgaA, Darmstadt-Almanya)
Sodyum fosfat (monobazik) (NaH ₂ PO ₄)	(Panreac Madrid-İspanya)
Sodyum fosfat (dibazik) (Na ₂ HPO ₄)	(Merck KgaA, Darmstadt-Almanya)

Sodyum hidroksit (NaOH)	(Merck KgaA, Darmstadt-Almanya)
Sodyum karbonat (Na ₂ CO ₃)	(Merck KgaA, Darmstadt-Almanya)
Sodyum-potasyum tartarat (NaKC ₄ H ₄ O ₆ .4H ₂ O)	(Panreac Madrid-İspanya)
Sodyum sitrat (tribazik) (C ₆ H ₅ Na ₃ O ₇ .2H ₂ O)	(Sigma Aldrich GmbH, Seelze-Almanya)
Trichloroacetic asit (Cl ₃ CCOOH)	(Sigma Aldrich GmbH, Seelze-Almanya)

Diğer Aletler ve Cam Malzemeler:

Cam malzemeler	: Deney tüpleri, balon jojeler, beherler v.b.
Distile su cihazı	: Nüve, Almanya
Elektronik tartı	: Sartorius AG, Almanya
Etüv	: Memmert 400, Almanya
Homojenizatör	: Heidolph DIAX 900
Manyetik karıştırıcı	: Ikamag RH-Staufen, Almanya
Otomatik pipetler	: Eppendorf, Socorex, Microlit
pH metre	: Inolab pH level 1 WTW, Almanya
Soğutmalı santrifüj	: Hettich Universal 30RF, Almanya
Spektrofotometre	: Shimadzu UV-1700A, Japonya
Vortex	: Velp Scientifica, Almanya

BİYOKİMYASAL ÖLÇÜMLER

Tam Kanda Glutasyon Tayini

Heparinli tam kanda glutasyon düzeyinin ölçümü Beutler ve ark.'nın (37) tanımladıkları yöntemle yapıldı.

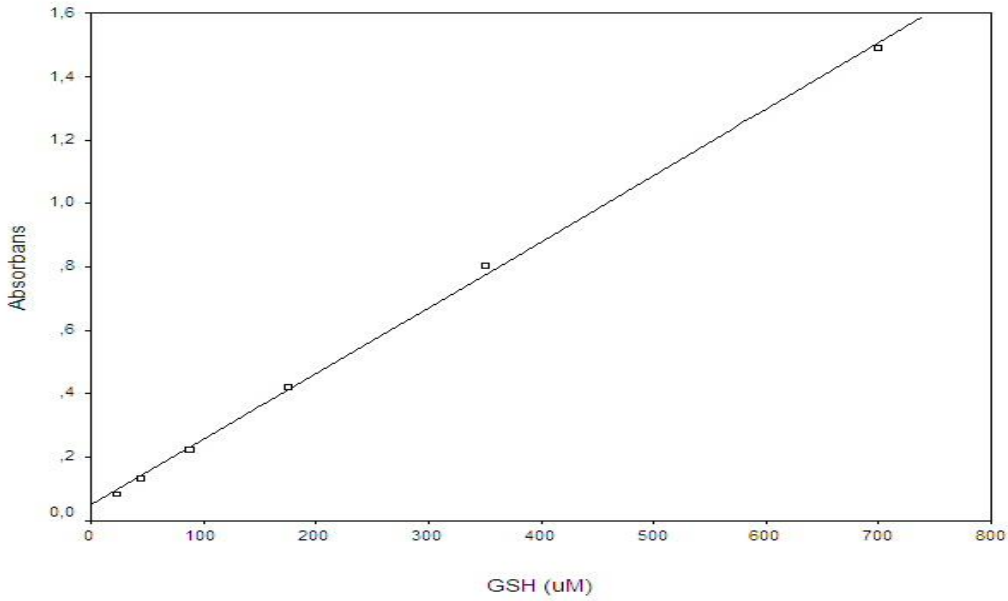
Prensib: İndirgenmiş glutasyonun -SH gruplarının bazik ortamda 2,2'-dinitro-5,5'-ditiodibenzoik asit (DNTB) reaktifi ile kromojen bir bileşik oluşturması ve bileşiğin sarı renginin 412 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçülmesi esasına dayanır.

Deney: Heparinli tam kanın distile su ile hazırlanan hemolizatın perklorik asit ile deproteinize edilmesiyle elde edilen berrak süpernatanttaki -SH gruplarının pH 8.0' de DNTB ile oluşturduğu sarı renkli kompleksin absorbansı, 412 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçüldü. Tüm örneklerde çalışmalar iki kez tekrarlandı.

Kalibrasyon eğrisinin hazırlanması için; 21.87, 43.75, 87.5, 175 ve 350 µM yoğunluklarında GSH çözeltileri hazırlandı. Yukarıdaki yöntemle göre 2'şer kez çalışılarak yoğunluk-absorbans grafikleri çizildi (Şekil 5). Regresyon analizi ile saptanan formül kullanılarak örneklerdeki ölçülen absorbans üzerinden GSH düzeyi hesaplandı. GSH değerleri, hemotokrite oranlanarak sonuçlar µmol/dl eritrosit olarak ifade edildi.

GSH kalibrasyon eğrisinin denklemi:

$$y = 0.03605 + 0.0022 x$$



Şekil 5. Glutatyon standart grafiği

Plazma Tiyol Tayini

Plazma -SH seviyelerinin ölçümü Hu'nun (38) tanımladığı metoda göre yapıldı.

Prensip: Serbest tiyol gruplarının bazik ortamda DNTB reaktifi ile kromojen bir bileşik oluşturması ve bileşiğin sarı renginin 412 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçülmesi esasına dayanır.

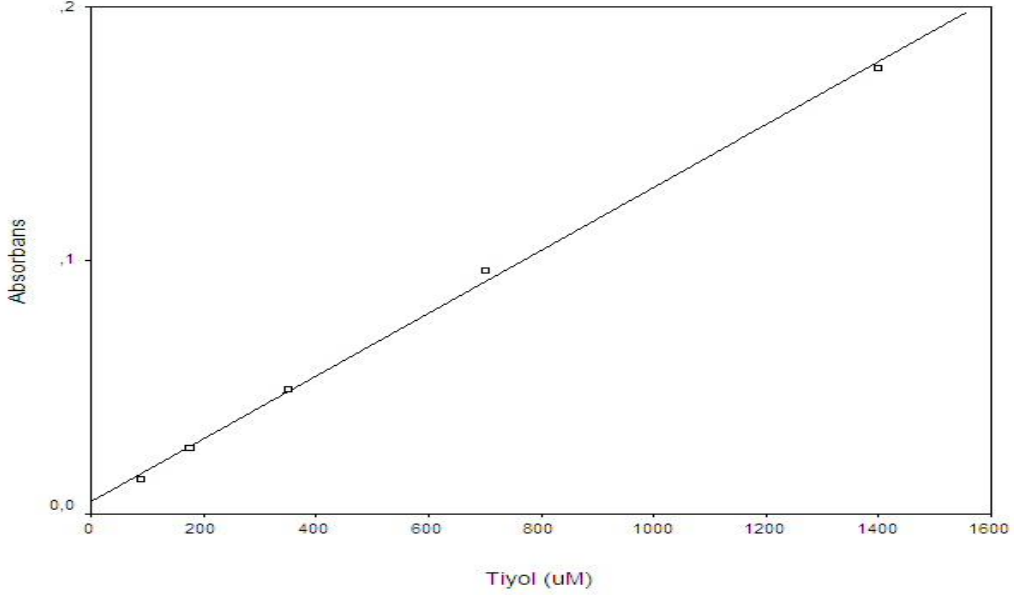
Deney: Plazma üzerine pH 8.2 Tris-HCl tamponu, DNTB ve metanol eklendikten sonra, oda ısısında 15 dakika inkübe edilen karışımın absorbansı 412 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçüldü. Her örnek için % 1'lik sodyum sitrat içeren numune körü benzer şekilde hazırlandı. Tüm örneklerde çalışmalar iki kez tekrarlandı.

Kalibrasyon eğrinin hazırlanması için; 87.5, 175, 350, 700 ve 1400 µM yoğunluklarında GSH çözeltileri hazırlandı. Yukarıdaki yöntemle göre ikişer kez çalışılarak yoğunluk-absorbans grafikleri çizildi (Şekil 6). Regresyon analizi ile saptanan formül

kullanılarak örneklerdeki ölçülen absorbans üzerinden tiyol düzeyi hesaplandı. Bulunan değerler $\mu\text{mol/L}$ olarak ifade edildi.

Tiyol kalibrasyon eğrisinin denklemi:

$$y = 0.0052 + 0.00012x$$

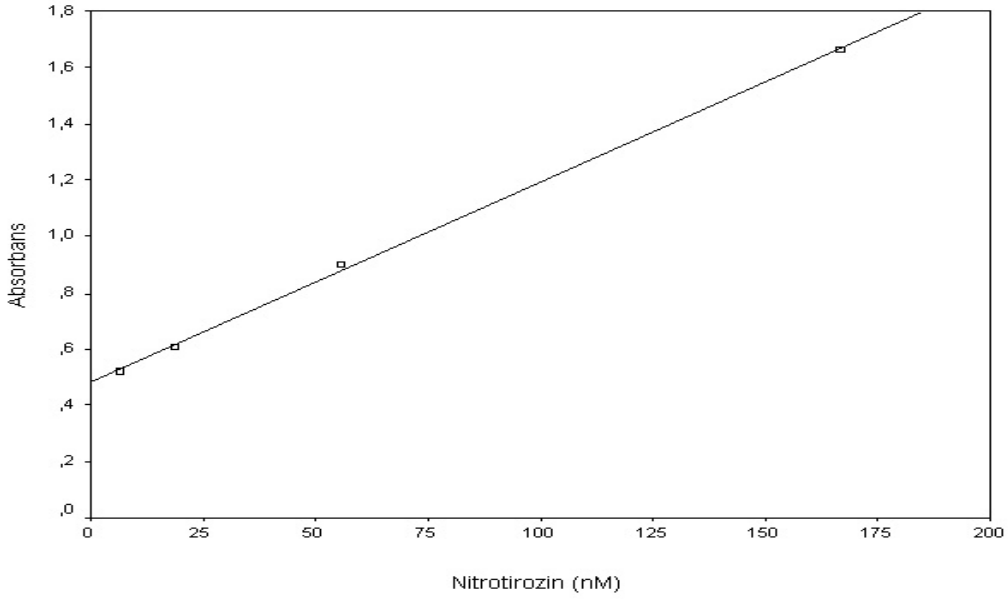


Şekil 6. Tiyol standart grafiği

Nitrotirozin Tayini

Plazma örnekleri Hycult marka nitrotirozin kiti ile Eliza yöntemiyle çalışılarak 450 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçüldü.

6.2, 18.5, 55.6, 166.7 nmol/L NT standart çözeltileri ile oluşturulan standart eğri kullanılarak elde edilen sonuçlar nmol/L olarak değerlendirildi.



Şekil 7. Nitrotirozin standart grafiği

Dokuda Total Tiyol, Nonprotein Tiyol ve Protein Tiyol Tayini

Doku total tiyol (T-SH) ve nonprotein tiyol (Np-SH) düzeylerinin ölçümü, Sedlak ve Lindsay'ın (39) tanımladıkları yöntemle yapıldı.

Prezib: İndirgenmiş -SH gruplarının bazik ortamda DNTB reaktifi ile kromojen bir bileşik oluşturması ve bileşiğin sarı renginin 412 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçülmesi esasına dayanır.

Doku Örneklerinin Hazırlanması: Sıçanlardan çıkarılan kolon dokuları 1/10 (w/v) oranında 0.15 M KCl ile homojenize edilerek homojenatlar hazırlandı. Homojenatların 2000xg ve ardından 4500xg'de santrifüj edilmesiyle sağlanan süpernatantlar analiz için kullanıldı.

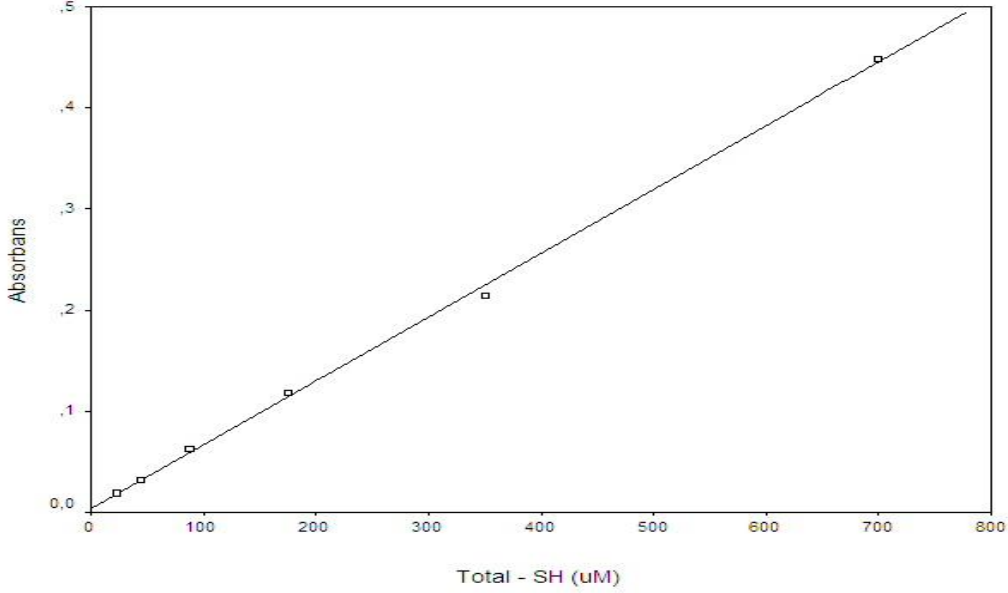
Deney: Total tiyol tayini için doku süpernatatı üzerine pH 8.2 Tris-HCl tamponu, DNTB ve metanol eklendikten sonra, oda ısısında 15 dakika inkübe edilen karışımın absorbansı 412 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçüldü. Her örnek % 1'lik sodyum sitrat içeren numune körü benzer şekilde hazırlandı. Tüm örneklerde çalışmalar iki kez tekrarlandı.

Kalibrasyon eğrinin hazırlanması için; 21.87, 43.75, 87.5, 175, 350 ve 700 µM yoğunluklarında GSH çözeltileri hazırlandı. Yukarıdaki yöntemle göre ikişer kez çalışılarak yoğunluk-absorbans grafikleri çizildi (Şekil 7). Regresyon analizi ile saptanan formül

kullanılarak örneklerdeki T-SH düzeyi hesaplandı. Bulunan değerler dokuda protein miktarı ile oranlanarak nmol/mg protein olarak ifade edildi.

Total -SH kalibrasyon eğrisinin denklemi:

$$y = 0.0044 + 0.00629 x$$



Şekil 8. Total-SH standart grafiği

Deney: Nonprotein tiyol tayini için doku homojenatının perklorik asit ile deproteinize edilmesiyle elde edilen berrak süpernatanttaki -SH gruplarının DNTB ile oluşturduğu sarı renkli kompleksin absorbansı, 412 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçüldü. Tüm örneklerde çalışmalar iki kez tekrarlandı.

Regresyon analizi ile saptanan formül kullanılarak örneklerdeki Np-SH düzeyi hesaplandı. Bulunan değerler dokuda protein miktarı ile oranlanarak nmol/mg protein olarak ifade edildi.

Np-SH kalibrasyon eğrisinin denklemi:

$$y = 0.03605 + 0.0022 x$$

Total tiyol değerlerinden Np-SH değerleri çıkarılarak P-SH düzeyleri bulundu. Bulunan değerler dokuda protein miktarı ile oranlanarak nmol/mg protein olarak ifade edildi.

İleri Oksidasyon Protein Ürünleri (AOPP) Tayini

Dokuda AOPP düzeylerinin ölçümü, Witko-Sarsat ve ark.'nın (40) tanımladıkları yöntemle yapıldı.

Doku örneklerinin hazırlanması: Dokular 1/10 (w/v) oranında pH 7.4 fosfat salin tampon solüsyonu (PBS) ile homojenize edilerek homojenatlar hazırlandı. Homojenatların 2000xg ve ardından 4500xg'de santrifüj edilmesiyle sağlanan süpernatantlar deneyde kullanıldı.

Deney: Dilüe süpernatant üzerine potasyum iyodür ve asetik asit ilavesinden sonra oluşan renk şiddeti 340 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçüldü. Her örnek için PBS içeren numune körü benzer şekilde hazırlandı. Tüm örneklerde çalışmalar iki kez tekrarlandı.

AOPP'nin 340 nm'deki molar absorpsivitesi kullanılarak homojenatlardaki AOPP konsantrasyonu hesaplandı. Bulunan AOPP değerleri doku protein düzeyine oranlanarak sonuçlar nmol/mg protein olarak ifade edildi.

Total Protein Tayini

Doku protein miktarlarının ölçümünde Lowry ve ark.'nın (41) tanımladıkları yöntem kullanılmıştır.

Premsib: Alkali ortamdaki Cu^{+2} 'in protein ile etkileşmesiyle oluşan tirozin ve triptofan aminoasitlerin fosfomolibdik ve fosfotungustik asitleri hetero polimolibdenyuma indirgeyip kromojen bir kompleks oluşturmaları ve bileşiğin mavi renginin 660 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçülmesi esasına dayanır.

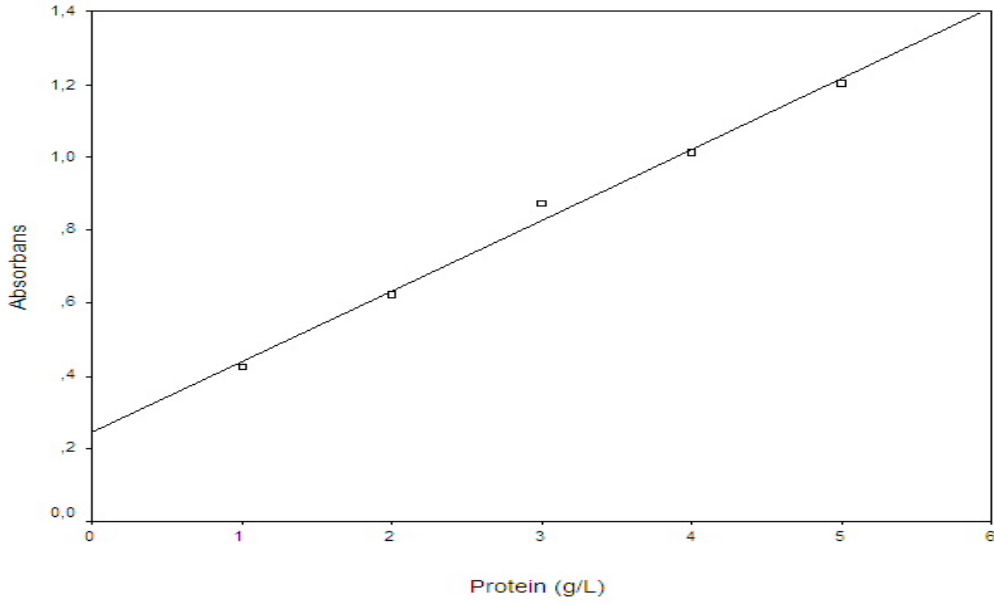
Doku Örneklerinin Hazırlanması: Sıçanlardan çıkarılan kolon dokuları 1/10 (w/v) oranında 0.15 M KCl ile homojenize edilerek homojenatlar hazırlandı. Homojenatların 2000xg ve ardından 4500xg'de santrifüj edilmesiyle sağlanan süpernatantlar analiz için kullanıldı.

Deney: Serum fizyolojik üzerine süpernatant ardından alkalen bakır eklendikten sonra oda ısısında 10 dakika inkübe edilen karışım dilüe folin reaktifi ilavesiyle 660 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçüldü. Tüm örneklerde çalışmalar iki kez tekrarlandı.

Standart eğrinin hazırlanması için bovin serum albumini ile 1, 2, 3, 4 ve 5 g/L yoğunluklarında standart çözeltileri hazırlandı. Yukarıdaki yönteme göre ikişer kez çalışılarak, yoğunluk-absorbans grafiği çizildi (Şekil 8). Regresyon analizi ile saptanan formül kullanılarak örneklerdeki protein yoğunlukları hesaplandı.

Protein kalibrasyon eğrisinin denklemi:

$$y = 0.243 + 0.194 x$$



Şekil 9. Protein standart grafiği

HİSTOPATOLOJİK DEĞERLENDİRME

Makroskobik Skorlama

Kolon hasarı modifiye edilmiş bir skorlama sistemi kullanılarak değerlendirildi. Kolonik mukozadaki makroskobik morfoloji 0'dan 4'e kadar skorlandı (Tablo 3).

Tablo 3. Kolonik Mukozadaki Makroskobik Bulguların Sınıflandırılması (7)

Skor	Kriter
0	Normal görünümlü mukozal tabaka
1	Hafif hiperemili mukozal tabaka
2	Belirsiz inflamasyonlu lineer ülserasyonlar
3	Kolon uzunluğu boyunca 5 mm'den küçük hemorojik lezyonlar ve granülomatoz lezyonlar
4	İki veya daha fazla bölgede ülserasyonlar ve 5mm'den büyük hemorojik lezyonlar ve/veya perforasyon

Mikroskobik Skorlama

% 10'luk formol solüsyonunda fiske edilen kolon segmentleri parafinle bloklanarak mikroskobik kesitler elde edildi. Hemotoksilen ve Eozin ile boyanan kesitlerde gözlenen

hasarın derecesi ışık mikroskopisi kullanılarak skorlama sistemine göre 0'dan 3'e kadar skorlandı (Tablo 4).

Tablo 4. Kolonik Mukozadaki Mikroskopik Bulguların Sınıflandırılması (7)

Skor	Epitelyal hücre kaybı	Kript absesi	Goblet hücre hasarı	İnflamatuvar hücre infiltrasyonu
0	Yok	Yok	Yok	Yok
1	< %5	< %10	Var	Az
2	%5 - %10	%10 - %20	-	Orta
3	> %10	> %20	-	Belirgin

İSTATİSTİKSEL DEĞERLENDİRME

Verilerin istatistiksel değerlendirilmesi Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyoistatistik Anabilim Dalı'nda bulunan Minitab Release 13 (Lisans no: WCP 1331.00197) paket programı kullanılarak yapıldı.

Her bir grupta verilerin parametrik varsayımları yerine getirip getirmediğini incelemek için normal dağılıma uygunluk ve varyansların homojenliği testleri uygulandı. Tam kanda GSH, plazmada NT ve dokudaki T-SH, Np-SH ile AOPP parametrelerinin değerlendirilmesinde bağımsız gruplar arasındaki istatistiksel farklılıkların belirlenmesi için Kruskal-Wallis varyans analizi ve ardından grupların karşılaştırılması için Bonferroni düzeltmeli Mann-Whitney U testi kullanıldı. Plazma tiyol ile dokudaki P-SH parametrelerinin değerlendirilmesinde ise bağımsız gruplar arasındaki istatistiksel farklılıkların belirlenmesi için tek yönlü varyans analizi yöntemi (Oneway ANOVA) ve ardından grupların karşılaştırılması için sırasıyla Tamhane T2 ve Bonferroni t post-hoc testleri kullanıldı. Elde edilen değerler ortalama±standart sapma olarak ifade edildi ve $p<0.05$ 'in altındaki farklılıklar anlamlı olarak değerlendirildi. Ayrıca, dokularının histopatolojik değerlendirme sonuçları frekans tablosu şeklinde sunuldu.

BULGULAR

Tam kan GSH ve plazma NT düzeyleri Tablo 5’de gösterilmiştir.

Tablo 5. Kontrol, kolit, NAC₁ ve NAC₂ tedavi gruplarının tam kan GSH ve plazma NT değerleri (Ort±SD)

Gruplar	Tam Kan GSH (µmol/dl Erit) §	NT (nmol/L) §
Kontrol (n=10)	13.23±2.11	2.51±0.43
Kolit (n=10)	13.05±1.75	3.11±0.38 a**
NAC ₁ (n=10)	10.72±2.52	3.49±0.26 a*** b*
NAC ₂ (n=10)	12.46±1.00	4.26±0.30 a*** b*** c***
χ^2 , p [#]	5.68, > 0.05	31.46, < 0.001

#: Kruskal wallis varyans analizi ile değerlendirildi.

§: Mann-Whitney U testi ile değerlendirmede;

a: Kontrol grubu ile

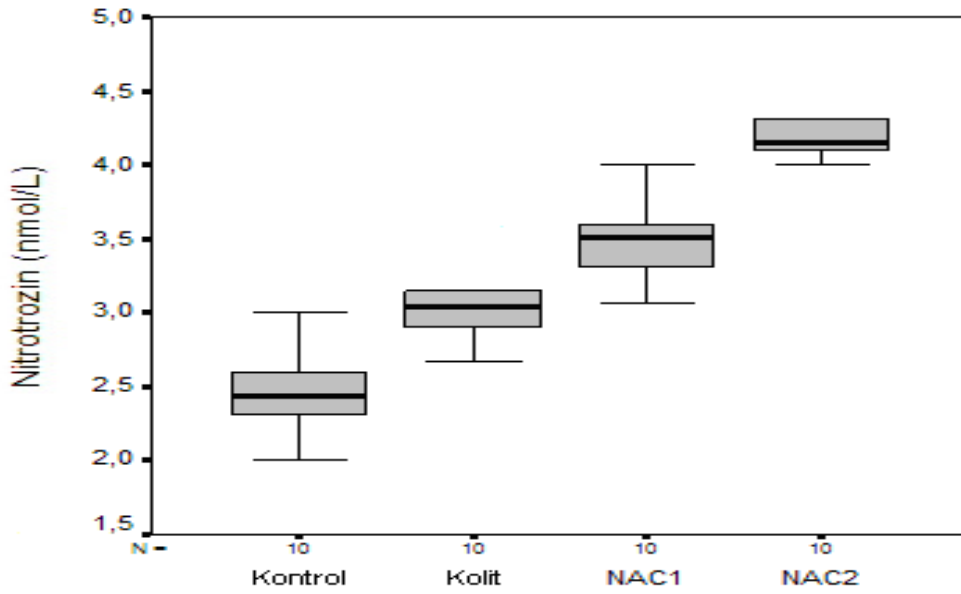
b: Kolit grubu ile

c: NAC₁ grubu ile

*: p<0.05, **: p<0.01, ***: p<0.001.

Tam kandaki GSH düzeyinin kolit grubunda 13.23 ± 2.11 $\mu\text{mol/dl}$ eritrosit olduğu ve diğer gruplarla arasında anlamlı bir fark olmadığı gözlenmiştir. Kolit ve NAC tedavi grupları arasında da istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır.

Kolit ile her iki NAC tedavi gruplarındaki sıçanların plazma NT düzeylerinin kontrol grubuna göre anlamlı derecede arttığı (sırasıyla; $p < 0.01$, $p < 0.001$, $p < 0.001$) görülmüştür (şekil 10). NAC_1 ve NAC_2 tedavi gruplarının plazma NT düzeylerinin kolit grubuna göre anlamlı derecede arttığı (sırasıyla; $p < 0.05$, $p < 0.001$) saptanmıştır. NAC_2 grubu plazma NT değerlerinin NAC_1 grubuna göre yüksek ($p < 0.001$) olduğu gözlenmiştir.



Şekil 10. Plazma Nitrotirozin düzeyleri

Plazma tiyol düzeyleri Tablo 6'da sunulmuştur. Kolit ve NAC_1 tedavi grubunun plazma tiyol değerlerinde kontrol grubuna göre bir fark gözlenmezken; NAC_2 tedavi grubunda azaldığı ($p < 0.05$) görülmüştür (şekil 11). NAC_2 tedavi grubunun plazma tiyol değerleri NAC_1 grubuna göre de azalmıştı ($p < 0.05$).

Tablo 6. Kontrol, kolit, NAC₁ ve NAC₂ tedavi gruplarının plazma tiyol değerleri (Ort±SD)

Gruplar	Plazma Tiyol (µmol/L) §
Kontrol (n=10)	339.61±35.66
Kolit (n=10)	327.06±69.57
NAC ₁ (n=10)	392.64±97.39
NAC ₂ (n=10)	286.17±31.50 a* c*
p [†]	< 0.05

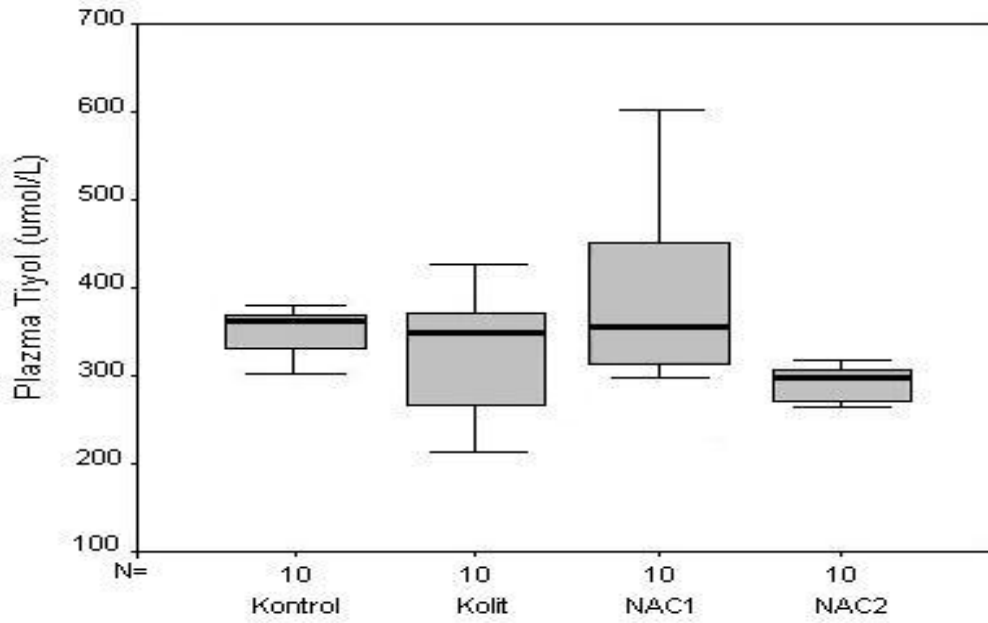
†: Tek yönlü varyans analizi ile değerlendirildi.

§: Tamhane T2 post-hoc testi ile değerlendirmede;

a: Kontrol grubu ile

c: Düşük doz tedavi grubu ile

*: p<0.05.



Şekil 11. Plazma Tiyol düzeyleri

Grupların kolon dokusu T-SH ve Np-SH düzeyleri Tablo 7’de sunulmuştur. Kolit grubu ile tedavi gruplarının kolon dokusu T-SH düzeylerinin kontrol grubunun değerlerine göre anlamlı derecede azaldığı (hepsi; $p<0.01$) görülmüştür (Şekil 12). Kolit grubu ile tedavi grupları arasında anlamlı bir fark gözlenmemiştir.

Kolit grubunun Np-SH düzeyleri ortalaması 15.39 ± 4.95 nmol/mg protein olup, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır (şekil 13). NAC_1 ve NAC_2 tedavi gruplarının kolon dokusu Np-SH düzeylerinin kontrol grubuna göre (sırasıyla; $p<0.001$, $p<0.01$) ve kolit grubuna göre (ikisi; $p<0.001$) anlamlı derecede arttığı gözlenmiştir. Tedavi grupları arasında anlamlı bir fark gözlenmemiştir.

Tablo 7. Kontrol, kolit, NAC_1 ve NAC_2 tedavi gruplarının kolon dokusu T-SH ve Np-SH değerleri (Ort \pm SD)

Gruplar	T-SH (nmol/mg protein) [§]	Np-SH (nmol/mg protein) [§]
Kontrol (n=10)	86.47 \pm 13.30	15.39 \pm 4.95
Kolit (n=10)	65.66 \pm 11.52 ^{a**}	11.59 \pm 4.21
NAC_1 (n=10)	57.93 \pm 16.99 ^{a**}	29.72 \pm 6.51 ^{a***} b***
NAC_2 (n=10)	68.54 \pm 12.44 ^{a**}	25.12 \pm 5.77 ^{a**} b***
χ^2 , p [#]	13.97, < 0.01	24.71, < 0.001

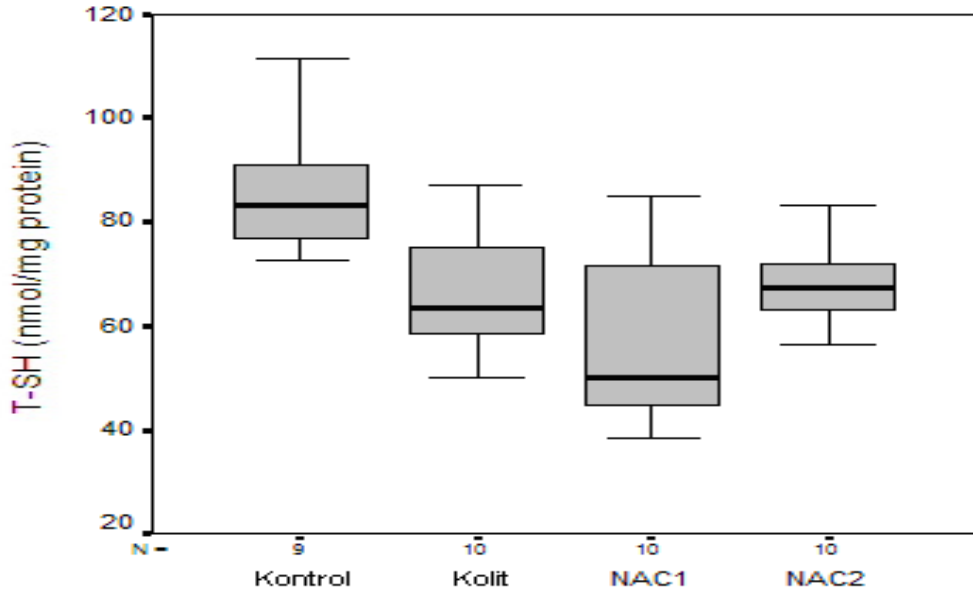
[#]: Kruskal wallis varyans analizi ile değerlendirildi.

[§]: Mann-Whitney U testi ile değerlendirmede;

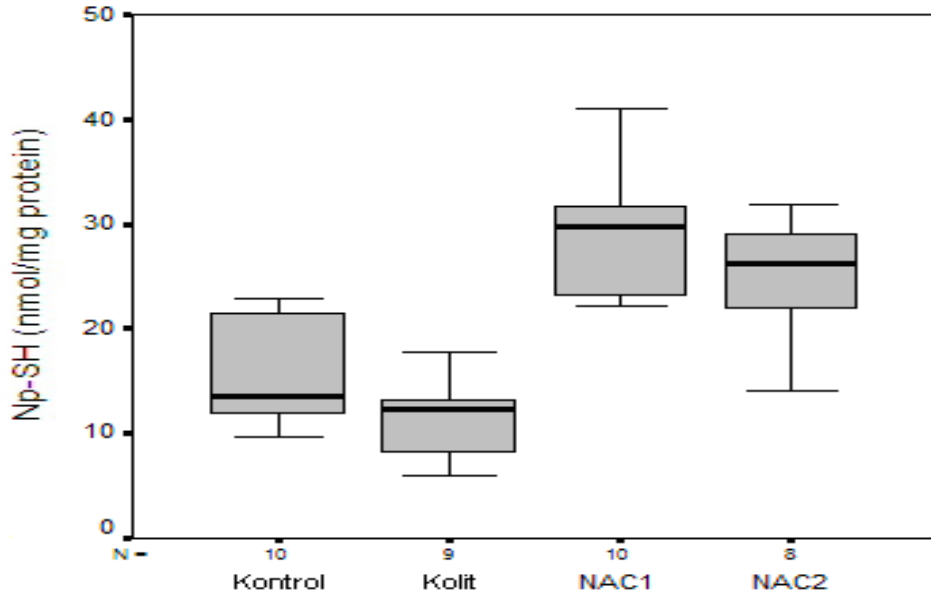
a: Kontrol grubu ile

b: Kolit grubu ile

** : $p<0.01$, ***: $p<0.001$.



Şekil 12. Kolon dokusu T-SH düzeyleri



Şekil 13. Kolon dokusu Np-SH düzeyleri

P-SH düzeyleri Tablo 8’de verilmiştir. Kolit grubunun kolon dokusu P-SH düzeyleri kontrol grubuna göre azalmış olmasına rağmen bu azalış istatistiksel olarak anlamlı değildir (şekil 14). NAC₁ ve NAC₂ tedavi gruplarındaki sıçanların P-SH değerlerinin kontrol grubuna göre anlamlı derecede azaldığı (sırasıyla; $p < 0.001$, $p < 0.01$) saptanmıştır. NAC₂ tedavi grubunun P-SH düzeylerinde kolit grubuna göre bir fark gözlenmezken; NAC₁ tedavi grubunda azaldığı ($p < 0.01$) görülmüştür.

Tablo 8. Kontrol, kolit, NAC₁ ve NAC₂ tedavi gruplarının kolon dokusu P-SH değerleri (Ort±SD)

Gruplar	P-SH (nmol/mg protein) [§]
Kontrol (n=10)	70.72±14.62
Kolit (n=10)	53.03±9.97
NAC ₁ (n=10)	28.21±16.27 a*** b**
NAC ₂ (n=10)	44.99±16.60 a**
p [†]	< 0.05

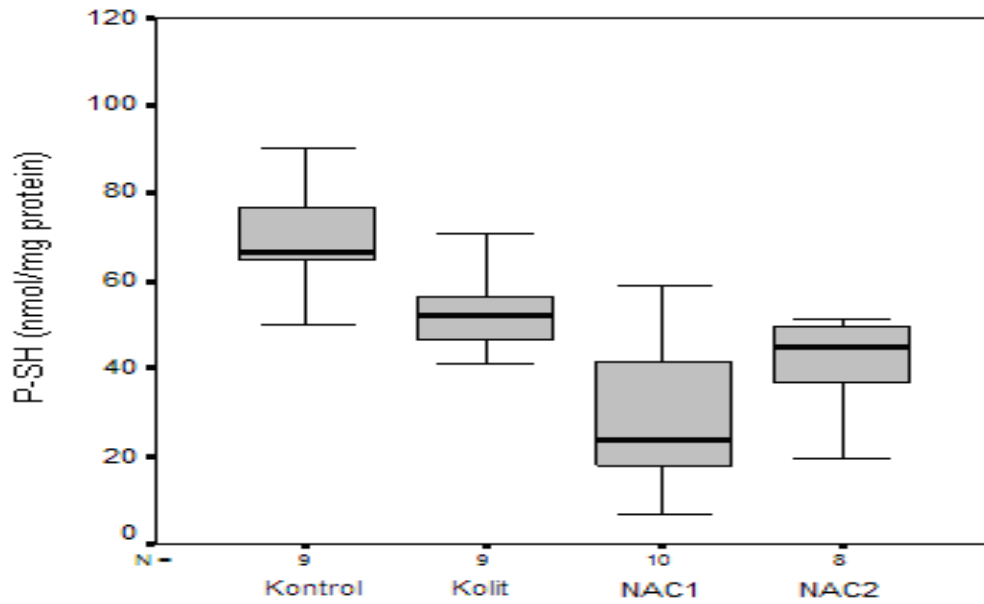
†: Tek yönlü varyans analizi ile değerlendirildi.

§: Bonferroni post-hoc testi ile değerlendirmede;

a: Kontrol grubu ile

b: Kolit grubu ile

** : p<0.01, ***: p<0.001.



Şekil 14. Kolon dokusu P-SH düzeyleri

Tablo 9. Kontrol, kolit, NAC₁ ve NAC₂ tedavi gruplarının kolon dokusu AOPP düzeyleri (Ort±SD)

Gruplar	AOPP (nmol/mg protein) §
Kontrol (n=10)	69.84±14.61
Kolit (n=10)	97.76±32.44 a**
NAC ₁ (n=10)	58.02±10.39 a* b***
NAC ₂ (n=10)	70.73±25.09
χ^2 , p#	12.83, < 0.01

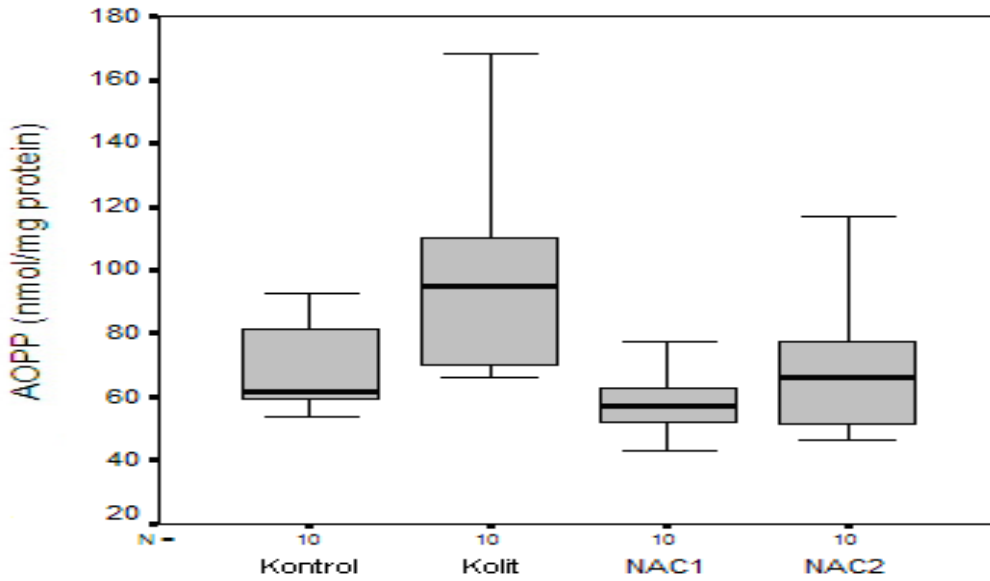
#: Kruskal wallis varyans analizi ile değerlendirildi.

§: Mann-Whitney U testi ile değerlendirmede;

a: Kontrol grubu ile

b: Kolit grubu ile

*: p<0.05, **: p<0.01, ***: p<0.001.



Şekil 15. Kolon dokusu AOPP düzeyleri

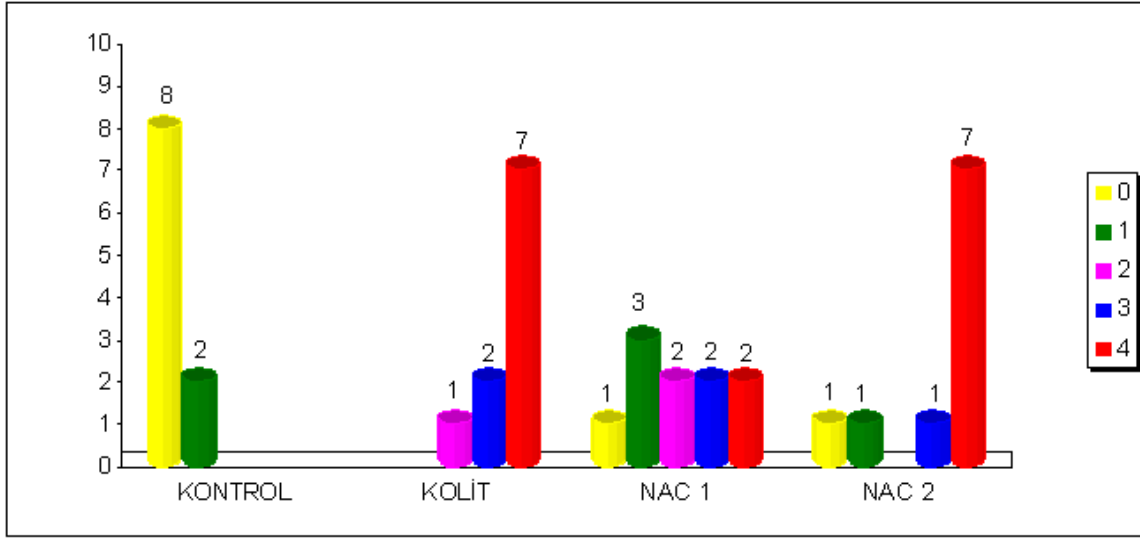
Grupların kolon dokusu AOPP düzeyleri Tablo 9’da gösterilmiştir. Kolit grubundaki sıçanların kolon dokusu AOPP düzeylerinin kontrol grubuna göre anlamlı derecede arttığı ($p<0.01$) gözlenmiştir (şekil 15). NAC₂ tedavi grubunun AOPP değerlerinde kontrol grubuna göre bir fark gözlenmezken; NAC₁ tedavi grubunda azaldığı ($p<0.05$) görülmüştür. NAC₁ tedavi grubunun AOPP düzeyinin kolit grubuna göre anlamlı derecede azaldığı ($p<0.001$) saptanmıştır.

Tablo 10. Kolon Dokusunda Makroskobik Değerlendirme

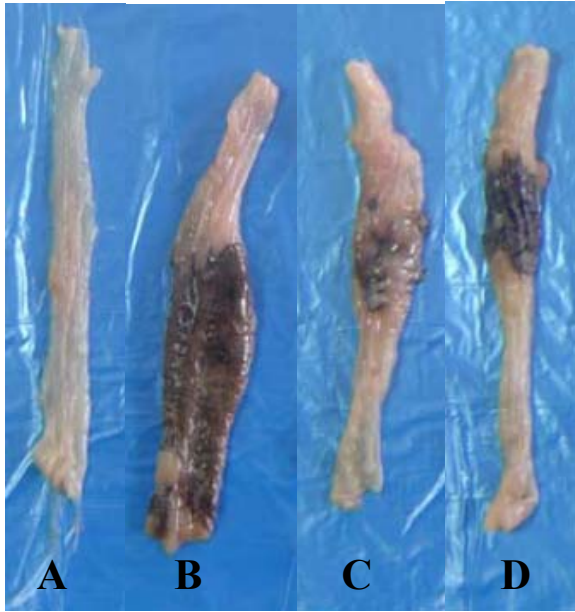
Gruplar	Skor				
	0	1	2	3	4
Kontrol (n=10)	8	2	-	-	-
Kolit (n=10)	-	-	1	2	7
NAC ₁ (n=10)	1	3	2	2	2
NAC ₂ (n=10)	1	1	-	1	7

Tablo 10’da kolon dokularının makroskobik değerlendirme sonuçları gösterilmiştir. Kontrol grubundaki deneklerden % 80’inin kolon dokularının makroskobik görünümüleri normal ve sadece 2’sinde hafif hiperemi tespit edilmişken; kolit grubundaki deneklerin hepsinde makroskobik hasar bulguları olduğu görülmüştür. Kolit grubundaki deneklerin % 70’inde makroskobik hasar skoru en büyük hasar derecesi olan 4 idi.

NAC tedavi gruplarında sadece bir deneğin kolon dokusunun normal görünümlü mukozal tabakaya sahip iken; diğer deneklerin kolon dokularında makroskobik düzeyde hasar olduğu görülmüştür. NAC₁ tedavi grubunda kolon dokusundaki makroskobik hasar skoru değerlendirmesi 1 olan 3 denek varken 2, 3 ve 4 olan ikişer denek vardı. NAC₂ tedavi grubundaki deneklerin % 70’inde makroskobik hasar skoru en büyük hasar şiddeti olan 4 idi (Şekil 16) (Resim 1; A, B, C, D).



Şekil 16. Kontrol, kolit, NAC₁ ve NAC₂ tedavi gruplarındaki deneklerde görülen makroskobik hasarın dağılımı



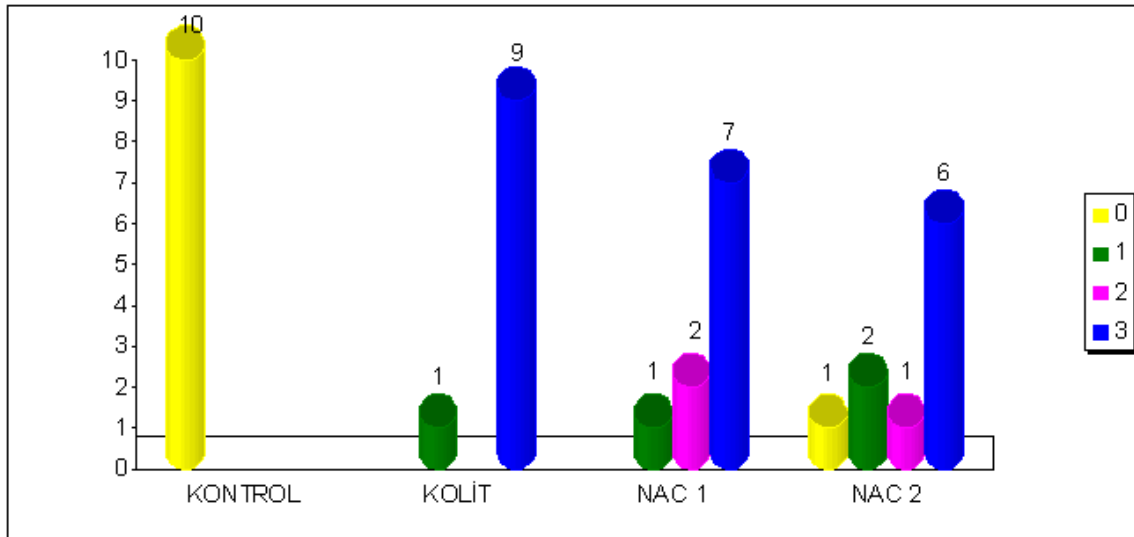
Resim 1. Kolon dokusunun makroskobik görünümü (A: kontrol, B: kolit, C: NAC₁ tedavi, D: NAC₂ tedavi grubu)

Tablo 11’de kolonik mukozadaki epitelyal hücre kaybı, kript absesi, goblet hücre hasarı ve inflamatuvar hücre infiltrasyonu bulguları bakımından mikroskobik değerlendirme sonuçları verilmiştir.

Tablo 11. Kolonik Mukozadaki Mikroskobik Değerlendirme

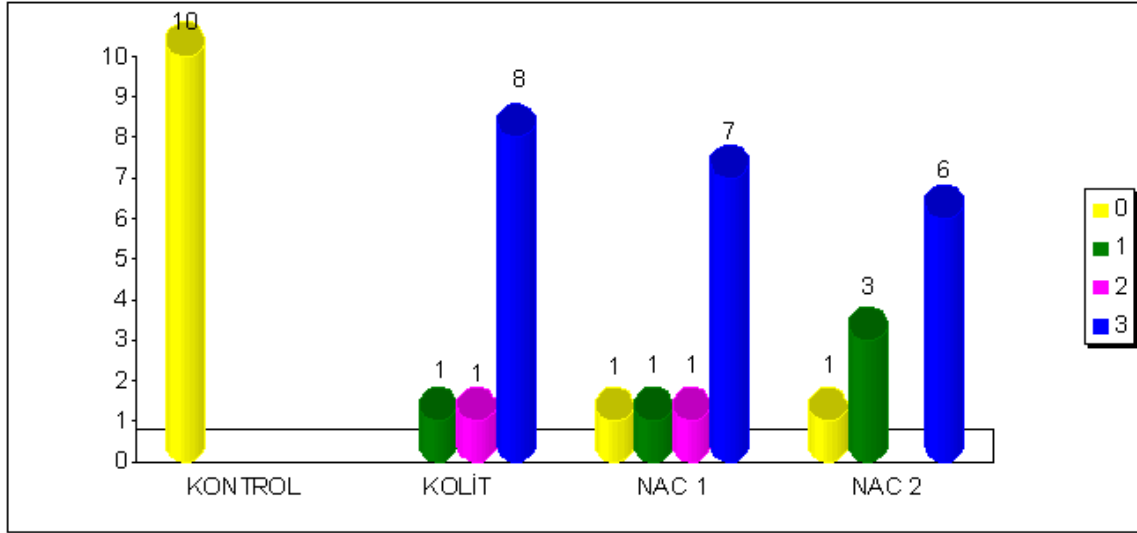
Bulgular	Skor	Kontrol (n=10)	Kolit (n=10)	NAC ₁ (n=10)	NAC ₂ (n=10)
Epitelyal hücre kaybı	0	10	-	-	1
	1	-	1	1	2
	2	-	-	2	1
	3	-	9	7	6
Kript absesi	0	10	-	1	1
	1	-	1	1	3
	2	-	1	1	-
	3	-	8	7	6
Goblet hücre hasarı	0	10	1	1	3
	1	-	9	9	7
İnflamatuvar hücre infiltrasyonu	0	5	-	-	-
	1	5	-	1	2
	2	-	-	1	2
	3	-	10	8	6

Kontrol grubundaki sıçanların hiç birinde kolon dokusunda epitelyal hücre kaybı görülmezken, en şiddetli hasar derecesi olan 3 skoruna sahip denek oranı kolit grubunda % 90, NAC₁ tedavi grubunda % 70, NAC₂ tedavi grubunda ise % 60 idi (Şekil 17).



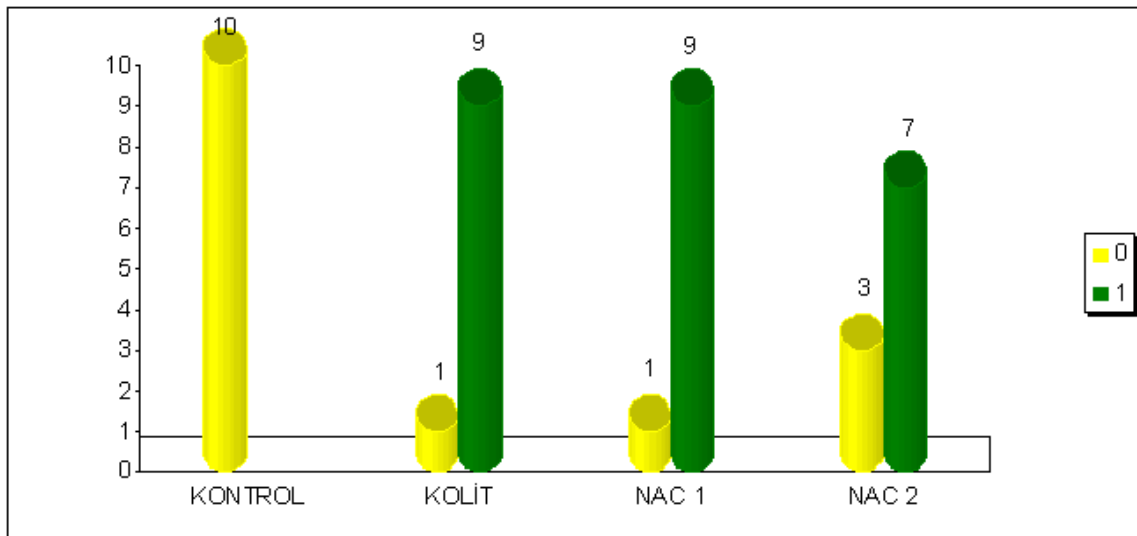
Şekil 17. Kontrol, kolit, NAC₁ ve NAC₂ tedavi gruplarındaki deneklerde görülen epitelyal hücre kaybı dağılımı

Kontrol grubundaki sıçanların hiç birinde kolon dokusunda kript absesi görülmezken, en şiddetli hasar derecesi olan 3 skoruna sahip denek oranı kolit grubunda % 80, NAC₁ tedavi grubunda % 70, NAC₂ tedavi grubunda ise % 60 idi (Şekil 18).



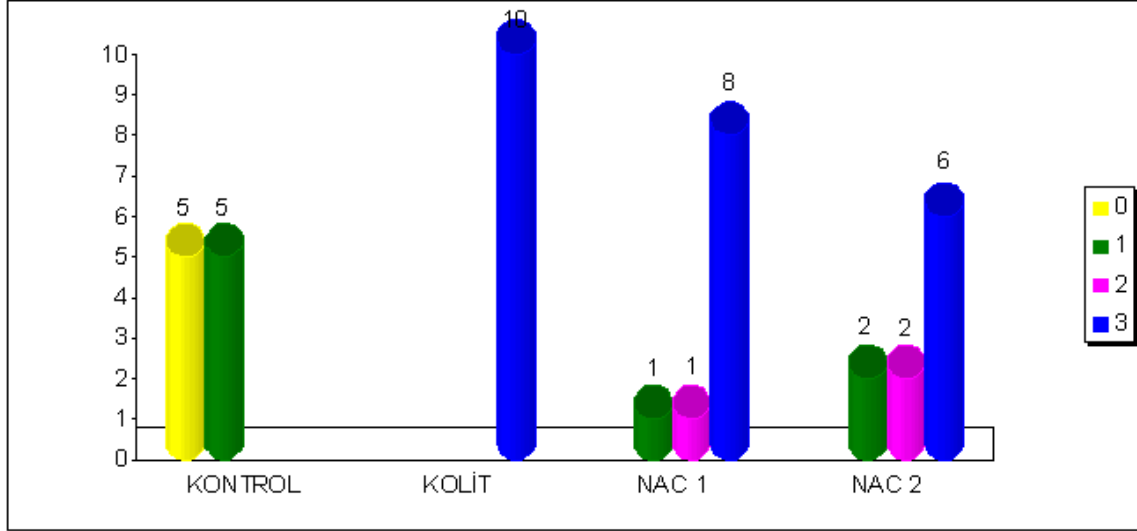
Şekil 18. Kontrol, kolit, NAC₁ ve NAC₂ tedavi gruplarındaki deneklerde görülen kript absesi dağılımı

Goblet hücre hasarı kontrol grubundaki sıçanların hiç birinde görülmezken, en şiddetli hasar derecesi olan 1 skoruna sahip denek oranı kolit ve NAC₁ tedavi gruplarında % 90, NAC₂ tedavi grubunda ise % 70 idi (Şekil 19).

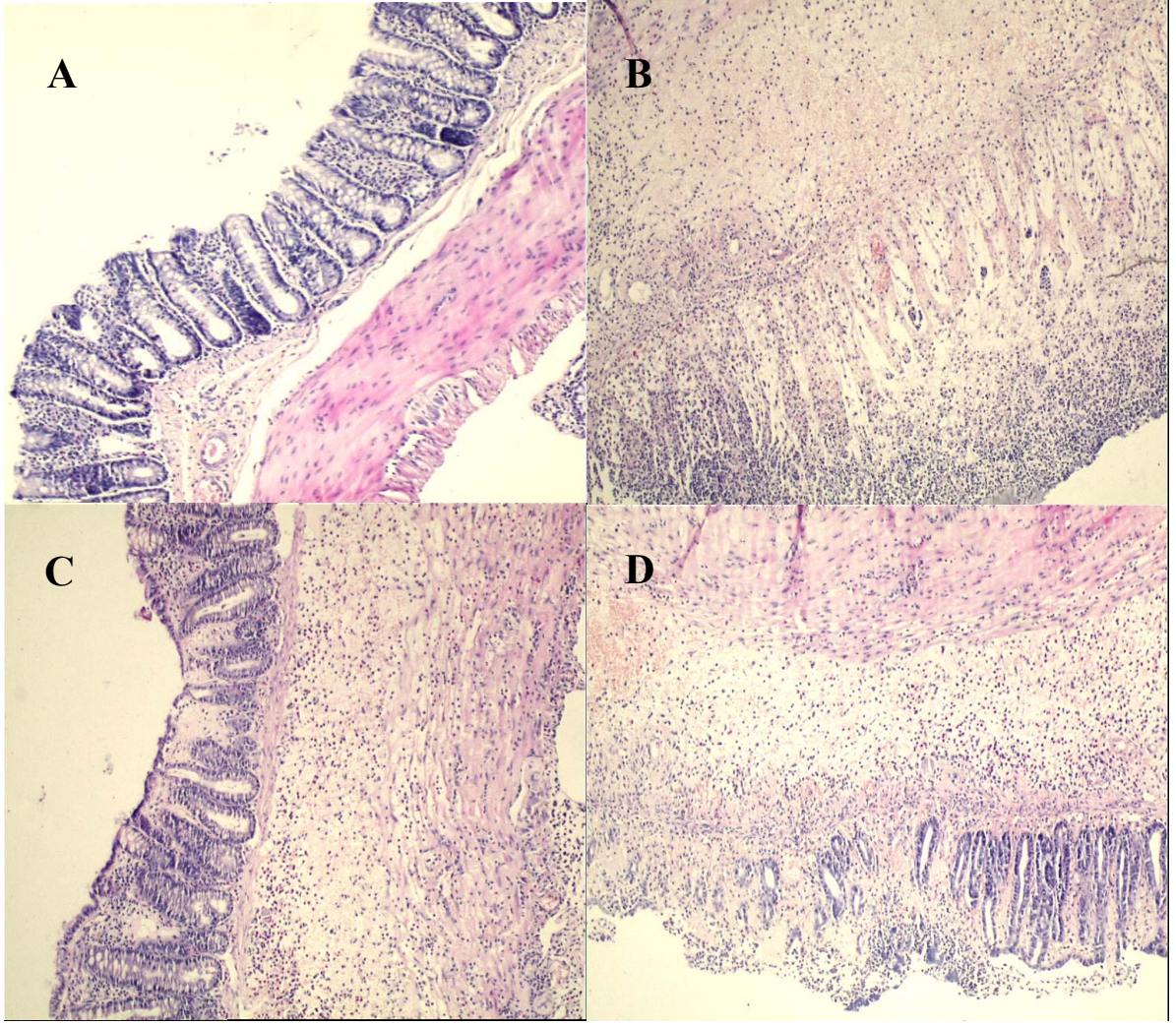


Şekil 19. Kontrol, kolit, NAC₁ ve NAC₂ tedavi gruplarındaki deneklerde görülen goblet hücre hasarı dağılımı

Kontrol grubundaki sıçanların kolon dokusunda inflamatuvar hücre infiltrasyonu bakımından en şiddetli hasar derecesi olan 3 skoruna sahip denek oranı kolit grubunda % 100, NAC₁ tedavi grubunda % 80, NAC₂ tedavi grubunda ise % 60 idi (şekil 20).



Şekil 20. Kontrol, kolit, NAC₁ve NAC₂ tedavi gruplarındaki deneklerde görülen inflamatuvar hücre infiltrasyonu dağılımı



Resim 2. Kontrol (A), kolit (B), NAC₁ tedavi (C) ve NAC₂ tedavi (D) gruplarında oluşan histopatolojik değişiklikler (HEx100)

Kontrol, kolit, NAC₁ ve NAC₂ tedavi gruplarının makroskopik görünümüleri resim 2’de sunulmuştur.

Tablo 12. Kontrol, kolit, NAC₁ ve NAC₂ gruplarındaki deneklerin her birinde saptanan tam kan GSH, plazma tiyol ve NT, kolon dokusunda T-SH, Np-SH, P-SH ve AOPP düzeyleri

Grup	hayvan no	Htc	Tam kan GSH ($\mu\text{mol/dl RBC}$)	Plazma tiyol ($\mu\text{mol/L}$)	NT (nmol/L)	T-SH ($\mu\text{mol/gr protein}$)	Np-SH ($\mu\text{mol/gr protein}$)	P-SH ($\mu\text{mol/gr protein}$)	AOPP ($\mu\text{mol/gr protein}$)
Kontrol	1	42	10,63	374,83	3,40	-	12,11	-	53,67
	2	39	10,67	362,69	2,40	74,41	9,57	64,84	81,52
	3	41	14,95	362,69	3,00	83,22	12,76	70,46	61,37
	4	40	12,68	330,30	2,00	78,35	21,44	56,91	76,61
	5	39	-	301,96	2,00	72,49	22,80	49,69	92,50
	6	40	-	269,57	2,33	88,24	21,68	66,56	62,28
	7	36	12,40	314,10	2,30	102,42	11,96	90,46	59,41
	8	38	16,13	362,69	2,45	111,42	16,57	94,85	92,32
	9	40	15,52	378,88	2,58	91,04	14,56	76,48	59,51
	10	36	12,82	338,39	2,60	76,66	10,47	66,19	59,20
Kolit	1	45	14,13	354,59	2,68	58,29	11,83	46,46	68,24
	2	51	13,51	293,86	2,98	65,07	12,62	52,45	96,45
	3	40	13,24	342,44	2,75	54,37	13,19	41,18	70,00
	4	42	11,71	358,64	2,93	58,89	5,95	52,94	66,12
	5	38	10,55	216,94	3,93	62,28	5,96	56,32	74,40
	6	40	14,95	370,78	3,13	49,85	8,14	41,71	110,18
	7	48	14,59	265,52	2,90	67,88	17,71	50,17	100,03
	8	52	14,78	241,23	3,15	75,03	-	-	168,41
	9	42	12,97	399,12	3,60	87,38	16,54	70,84	92,77
	10	43	10,03	427,46	3,10	77,53	12,35	65,18	130,96
NAC ₁	1	44	11,01	350,54	3,65	68,47	27,09	41,38	59,26
	2	37	14,11	427,46	3,20	81,01	22,14	58,87	56,48
	3	45	8,91	314,10	3,30	48,30	22,40	25,90	46,37
	4	38	6,47	451,75	3,55	51,89	30,48	21,41	56,99
	5	42	7,11	601,55	3,60	44,83	23,13	21,70	55,61
	6	44	11,87	484,14	3,06	47,05	29,21	17,84	51,97
	7	45	11,77	297,91	4,00	42,74	31,07	11,67	42,80
	8	41	12,18	314,10	3,45	38,35	31,72	6,63	62,85
	9	41	13,29	326,25	3,48	71,72	41,20	30,52	70,21
	10	47	10,47	358,64	3,60	84,94	38,77	46,17	77,66
NAC ₂	1	46	13,00	306,01	4,00	48,49	28,66	19,83	52,72
	2	42	11,71	277,67	4,00	56,39	-	-	65,47
	3	47	11,35	293,86	4,10	83,04	31,96	51,08	111,29
	4	43	13,99	297,91	4,10	64,63	29,64	34,99	46,22
	5	45	11,69	314,10	4,10	92,34	14,08	78,26	70,53
	6	44	-	265,52	4,20	68,20	-	-	116,95
	7	41	13,11	306,01	4,20	71,77	28,06	43,71	77,53
	8	38	11,55	269,57	4,30	66,24	20,84	45,40	66,78
	9	37	-	212,89	4,80	71,17	23,18	47,99	50,96
	10	39	13,29	318,15	4,80	63,14	24,50	38,64	48,81

Tablo 13. Kontrol, kolit, NAC₁ ve NAC₂ gruplarındaki deneklerin her birinde saptanan kolon dokusunda makroskobik ve mikroskobik patolojik bulgular

Grup	hayvan no	Makroskobik hasar skoru	Epitelyal hücre kaybı skoru	Kript abseleri skoru	Goblet hücre hasarı skoru	İnflamatuvar hücre infiltrasyonu skoru
Kontrol	1	0	0	0	0	0
	2	1	0	0	0	0
	3	0	0	0	0	0
	4	0	0	0	0	1
	5	0	0	0	0	0
	6	0	0	0	0	1
	7	1	0	0	0	1
	8	0	0	0	0	1
	9	0	0	0	0	1
	10	0	0	0	0	0
Kolit	1	3	3	3	1	3
	2	4	3	2	1	3
	3	3	1	1	0	3
	4	4	3	3	1	3
	5	4	3	3	1	3
	6	4	3	3	1	3
	7	4	3	3	1	3
	8	4	3	3	1	3
	9	4	3	3	1	3
	10	2	3	3	1	3
NAC₁	1	2	3	3	1	3
	2	4	3	3	1	3
	3	1	3	3	1	3
	4	1	3	3	1	3
	5	3	2	2	1	3
	6	2	3	3	1	3
	7	0	2	1	1	2
	8	1	1	0	0	1
	9	4	3	3	1	3
	10	3	3	3	1	3
NAC₂	1	1	3	3	1	3
	2	0	3	3	1	3
	3	4	1	1	0	2
	4	3	0	0	0	1
	5	4	3	3	1	3
	6	4	3	3	1	3
	7	4	2	1	1	2
	8	4	1	1	0	1
	9	4	3	3	1	3
	10	4	3	3	1	3

TARTIŞMA

İnflamatuvar barsak hastalıkları günümüzde önemli bir sağlık sorunu olarak karşımıza çıkmaktadır. Kesin etyolojik bir faktörün bulunmayışı ve İBH'nı tam olarak taklit eden deneysel bir model olmayışı İBH patogenezinin anlaşılmasını zorlaştırmaktadır. Birkaç potansiyel sorumlu etkenin, inflamatuvar olayların başlamasında etkili olduğu düşünülüyorsa da; kabul edilen görüşe göre immun olayların baskılanmasında bir eksiklik vardır (1, 27).

Kolit tablosuna medikal yaklaşım oldukça uzun bir zaman süreci geçirmesiyle birlikte yeni tedavi yöntemlerinin araştırılması gerekmektedir. Deneysel kolit modelleri insanda görülen İBH ile farklılıklarına rağmen benzer yanları ile İBH patogenezi ve tedavileri hakkında bazı ipuçları verebildiği için yeni tedavi seçeneklerinin denenmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır.

İnflamatuvar barsak hastalıklarındaki hayvan modelleri arasında yer alan asetik asit kolit modeli yaygın olarak uygulanmaktadır. Asetik asit ile geliştirilen akut kolit modelinde sıçanlarda gelişen lezyonlar insanlardaki ÜK tablosunda görülen histopatolojik değişikliklere oldukça benzemektedir. Bununla birlikte, bu modelin bilinen ÜK tablosundan önemli farklılıkları da vardır. Asetik asit kolit modeli akut olarak gelişim göstermekte ve sonrasında inflamasyonda hızlı bir şekilde düzelme izlenmektedir. Histopatolojik görünümde akut inflamasyon egemendir (36). Ülseratif kolit ise daha yavaş ortaya çıkar ve yavaşça remisyon gösterir. Histopatolojik tabloda hem akut hem de kronik inflamasyon kaskadı aktive olmaktadır (27).

Asetik asit ile oluşturulmuş kolitte ekzojen araşidonik asit normal mukozaya göre daha fazla metabolize edilir. Bu olayda lipooksijenaz yolu, siklooksijenaz yoluna göre birkaç kat daha hızlıdır. İnflamatuvar barsak hastalığı olgularının kolon mukozalarında lipooksijenaz yolu metabolitlerinin siklooksijenaz yolununkilere oranla daha fazla artmış olduğu gösterilmiştir (35, 36).

Toksik, infeksiyöz ya da idiyopatik medyatörler İBH'nda fonksiyonel ve histolojik benzerliklerin gelişmesini açıklayabilirler.

Çalışmamızda deneysel kolit geliştirmek için % 4'lük asetik asit modeli seçilmiştir. Bu çalışmada kontrol grubundaki deneklerin kolon dokularının % 80'inde makroskopik görünüm normal, % 20'sinde hafif hiperemili iken epitelyal hücre kaybı, kript abseleri, goblet hücre hasarı bakımından mikroskopik hasarlanma gözlenmeyip, % 50'sinde hafif derecede inflamatuvar hücre infiltrasyonu bulgusu saptandı. Kolit grubundaki sıçanların hepsinde makroskopik hasar gözlenirken, deneklerin % 70'inde iki veya daha fazla bölgede ülserasyonlar, yaygın hemorojik lezyonlar ve/veya perforasyon gelişmişti. Kolit grubunda epitelyal hücre kaybı, kript absesi ve inflamatuvar hücre infiltrasyonu oluşmayan denek yok iken, goblet hücre hasarı deneklerin sadece birinde oluşmamıştı. En yüksek hasar derecesine sahip denek oranı; epitelyal hücre kaybı ve goblet hücre hasarında % 90, kript abselerinde % 80, inflamatuvar hücre infiltrasyonunda da %100'ü idi. Bulgularımız kolit modelinin başarı ile gerçekleştiğini ve % 4'lük asetik asit dozunun yeterli olduğunu göstermektedir.

Kolit gelişiminin ardından bir günlük tedavi süresinin sonunda NAC tedavi gruplarında sadece birer deneğin kolon dokusunun normal görünümlü mukozal tabakaya sahip olduğu diğer deneklerin kolon dokularında makroskopik düzeyde hasar olduğu görüldü. NAC₁ tedavi grubunda kolon dokusundaki makroskopik hasar skoru değerlendirmesi 1 olan 3 denek varken 2, 3 ve 4 olan ikişer denek vardı. NAC₂ tedavi grubundaki deneklerin % 70'inde makroskopik hasar skoru en büyük hasar şiddeti olan 4 idi. NAC₁ grubunda epitelyal hücre kaybı ile inflamatuvar hücre infiltrasyonu oluşmayan denek yok iken, deneklerin sadece birinde kript absesi ve goblet hücre hasarı oluşmamıştı. Histopatolojik değerlendirmede en şiddetli hasar skoruna sahip denek oranı NAC₁ grubunda epitelyal hücre kaybı ve kript abseleri bakımından % 70 iken, goblet hücre hasarında % 90, inflamatuvar hücre infiltrasyonunda % 80 olarak bulunmuştur. NAC₂ grubundaki bir denekte kript absesi, inflamatuvar hücre infiltrasyonu ve goblet hücre hasarı oluşmamış, bir başka denekte de goblet hücre hasarı oluşmamışken diğer deneklerde mikroskopik hasarların olduğu görülmüştür. NAC₂ grubundaki en yüksek hasar skoruna sahip deneklerin oranı epitelyal hücre kaybı, kript abseleri ve inflamatuvar hücre infiltrasyonunda % 60, goblet hücre hasarında ise % 70 idi.

Asetik asit ile oluşturulan kolit modelinde kolon dokusunda makroskopik ve mikroskopik hasar geliştiği (6-8), doku kalınlığında, kolonun yaş doku ağırlığında ve vasküler geçirgenlikte artış olduğu (8) ve deneysel kolit modellerinde nötrofil infiltrasyonunun kantitatif göstergesi olarak MPO aktivitesinde de artış olduğu bildirilmektedir (7, 8, 42). NAC uygulamasının makroskopik ve mikroskopik hasar düzeyinde azalmaya yol açtığı ancak kontrol grubunda görülen normal yapıya

ulaştıramadığı (6); kısa dönem NAC uygulamasının hasar skorlarında düzelme sağlayamamasına rağmen bir hafta uygulamasında düzelme görüldüğü (7); en iyi düzelmenin 100 mg dozunda olduğu daha yüksek dozda ise hasar derecesinin arttığı gösterilmiştir.

Çalışmamızda kolit grubunda saptadığımız bulgular literatürdeki bulgularla uyumludur. Tedavi gruplarından 100 mg/kg NAC uygulamasında makroskobik hasar oluşumu kolit ve yüksek doz NAC uygulamasına göre daha hafifti. Mikroskobik hasar bulgularında kolit grubuna göre hafif bir azalma sağlamasına rağmen yeterli olmadığı görülmektedir. Makroskobik hasar bulgumuz literatürdeki NAC uygulamasının hasar derecesini azalttığı ama tamamen düzeltmediğini ve en uygun dozun 100 mg olduğunu gösteren çalışmalarla uyumludur. Mikroskobik bulgularımız ise her iki doz NAC uygulamasının etkisinin zayıf olduğunu göstererek literatürdeki çalışmalardan farklıdır. Bu farklılık çalışmamızda mikroskobik değerlendirmenin literatürdeki çalışmalardan daha ayrıntılı yapılmış olmasından kaynaklanabileceği gibi, tedavi süresinin kısa olmasından da kaynaklanmış olabilir. Akgün ve ark. (7) uzun süre NAC tedavisinin daha etkin olduğunu bildirmişlerdir.

Proteinlerde yapısal değerikliğe yol açan başlıca moleküler mekanizmalar PC oluşumu ile karakterize edilen metal katalizli protein oksidasyonu, P-SH gruplarının kaybı, NT ve AOPP oluşumu olarak sıralanabilir (17).

Çalışmamızda kan ve dokudaki redoks değerimini göstermek için plazmada tiyol ile kolon dokusunda T-SH, redoks değerimine karşı savunmayı göstermek için tam kanda GSH ve dokuda Np-SH lmleri yapıldı. Proteinlerin oksidatif stresten etkilenme düzeylerinin göstergesi olarak plazmada NT, dokuda ise P-SH ve AOPP seviyeleri tespit edildi.

Redoks değerimine karşı savunmada en önemli bileşen olan GSH tam kanda, kolit grubundaki sıçanlarda kontrollere göre azalmış olmasına rağmen bu azalış istatistiksel olarak anlamlı değerildi. Literatürdeki deneysel kolit modellerinde tam kanda GSH düzeylerinin bakıldığı çalışmaya rastlamadık. Erichsen ve ark. (43) Crohn hastalarında plazmada total GSH, GSH ve GSSG düzeylerinde kontrollere göre değeriklik olmadığını bildirmişlerdir. Sido ve ark. (44) İBH görülen bireylerde periferik kan mononükleer hücre total GSH seviyelerinin kontrol grubuna göre değermediğini bildirmişlerdir. Yapılan bu çalışma tam kan GSH düzeylerini yansıtılmakla birlikte bulgularımızla uyumludur.

Kolit grubu plazma NT seviyelerinin kontrol grubuna göre anlamlı derecede arttığını ($p<0.01$) saptadığ. İNFLAMATUVAR barsak hastalarında ve deneysel kolit modellerindeki deneklerde NT düzeyine bakılmış çalışmaya rastlamadık. Plazmada bakılan çalışmalar olmamakla birlikte Akgün ve ark. (7) kolit grubu kolon dokusu NO[•] düzeyinde artış olduğunu, Ebrahimi ve ark. (45) kolit grubundaki farelerin kolon dokusunda NO[•] seviyelerinin kontrol grubuna göre

arttığını bildirerek deneysel kolit modelinde nitrozatif stresin oluştuğuna dikkat çekmişlerdir. Shishebor ve ark. (46) kardiyovasküler hastaların plazma NT düzeyinin, Sajdel-Sulkowska ve ark. (47) otistik olguların postmortem otopsilerinde beyin dokusu NT düzeylerinin arttığını bildirmişlerdir. Nitrozatif stresin arttığını ve plazmadaki proteinlerin etkilendiğini gösteren bu çalışmalar bizim sonuçlarımızı destekler niteliktedir. Çalışmamız kolit modelinde artan nitrozatif stresin dolaşımdaki proteinleri etkilediğini gösteren ilk çalışmadır.

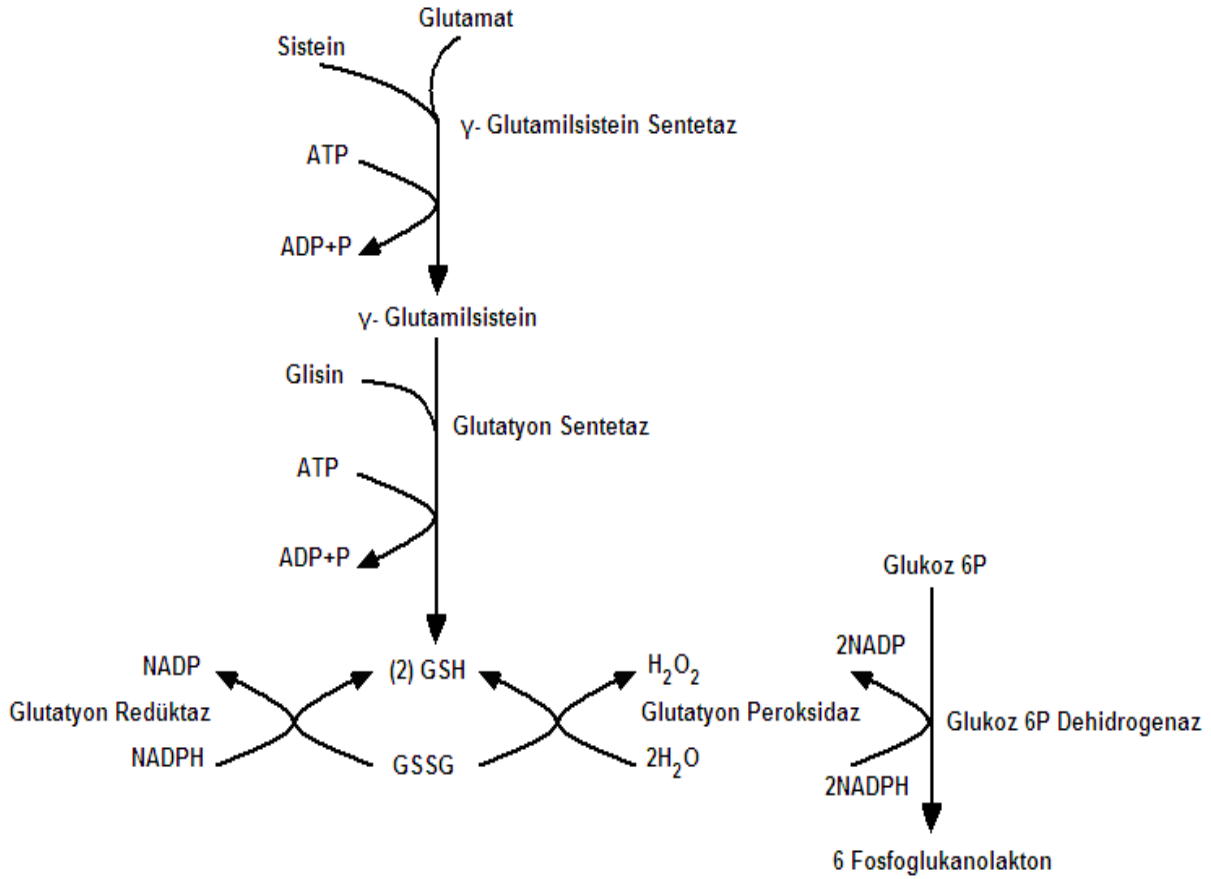
Çalışmamızda kolit grubu plazma tiyol düzeylerinde kontrol grubuna göre farklılık gözlenmedi. Bu bulgumuz dolaşımdaki redoks durumunun değişmediğini göstermektedir. Baskol ve ark. (48) ÜK olgularında plazma tiyol seviyelerinin kontrollere göre arttığını bildirmişlerdir. Bu bulgu farklılığı deneysel kolit modellerinin İBH'nı bire bir yansıtmayı ve farklı türlerdeki proteinlerin -SH gruplarının oksidatif strese dayanıklılık farklılığının burada faktör olabileceği düşünülmektedir.

Doku T-SH düzeylerinin kolit grubu kolon dokusunda kontrol grubuna göre 1.32 kat azaldığını saptadık. Kolon dokusundaki azalma istatistiksel olarak anlamlı idi ($p < 0.01$). Deneysel kolit modellerinde yapılan çalışmalar (6, 42, 45) ve İBH'lı bireylerin incelendiği çalışmada (44) kolon dokusu T-SH düzeylerinin azaldığı bildirilmiştir. Bu araştırmalar çalışmamızın sonuçlarını destekler niteliktedir.

Kolit grubu kolon dokusundaki Np-SH düzeyleri kontrol grubuna göre 1.33 kat azalış göstermesine rağmen gruplar arasındaki farkın anlamlı olmadığı saptadık. Akgün ve ark. (7) kolit grubundaki deneklerin Np-SH seviyelerinin kontrol grubuna göre azaldığını bildirmişlerdir. Holmes ve ark. (49) ÜK hastalarının kolonik mukozasındaki Np-SH düzeylerinde kontrollere göre değişiklik olmadığını bildirmişlerdir. Sido ve ark. (44) Crohn olgularındaki total GSH düzeyinin inflame dokuda daha belirgin azalma gösterdiğini ve GSH/GSSG oranında da azaldığını bildirilmiştir. Bu çalışma bulguları sonuçlarımızı doğrulamaktadır.

Çalışmamızda kolit grubundaki sıçanların kolon dokularında bulunan proteinlerdeki serbest -SH grup miktarının ve proteinlerin dokudaki redoks değişiminden etkilenme şiddetinin göstergesi olan P-SH düzeylerinin kontrol grubuna göre 1.33 kat azaldığını, ancak gruplar arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı saptadık. McKenzie ve ark. (50) İBH olgularının inflame kolon mukozasında 37 kDa ağırlığındaki bir proteinin miktarının azalmadığını ancak tiyol gruplarının okside olduğunu ve bu proteinin N-terminalindeki aminoasit dizisinin glukoz 6 fosfat dehidrojenaz (GAPDH) enzimi ile homoloji gösterdiğini saptamışlardır. Bu bulgudan yola çıkarak in vitro ortamda GAPDH'nin aktif bölgesindeki tiyol gruplarının tüm oksidanlarla özellikle de OCI^- ve H_2O_2 ile okside olduğunu böylece enzim aktivitesinin azaldığını tespit ederek İBH olgularının kolonik mukozasındaki -SH grupları okside olmuş 37 kDa ağırlığındaki proteinin gerçekte GAPDH

olduğunu bildirmişlerdir. Sido ve ark. (44) Crohn hastalarında kolonik mukozada total GSH düzeyi ve GSH sentezinde yer alan enzim aktivitelerinde azalma olduğunu, bu azalmanın inflamme gölgede daha bariz olduğunu bildirmişlerdir.

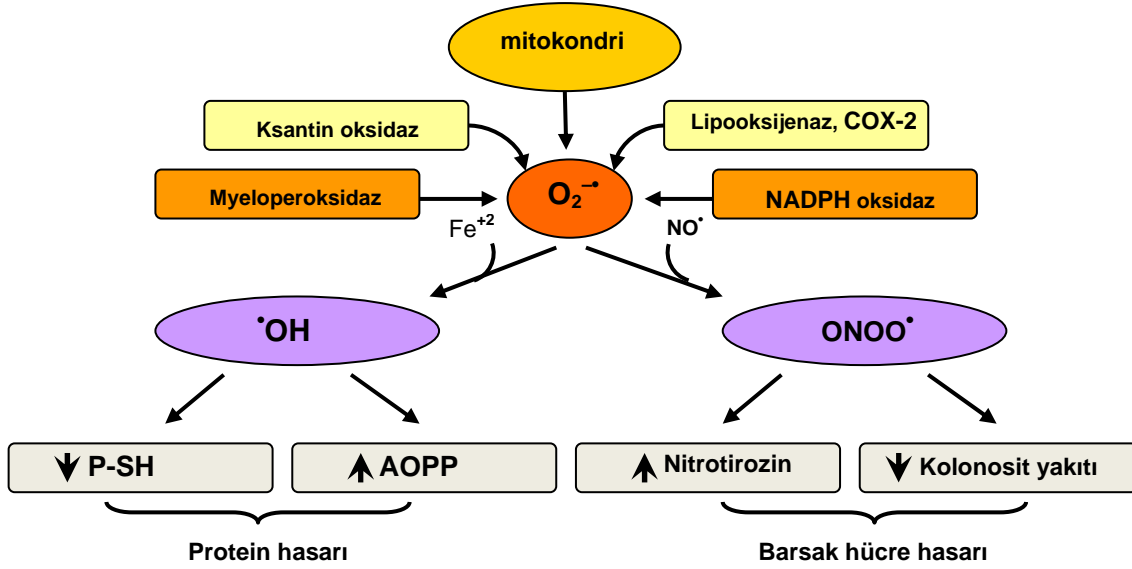


Şekil 21. Glutatyon metabolizması

Protein -SH gruplarının oksidasyonu proteinlerin fonksiyon kaybına yol açar. İnflamatuvar barsak hastalarının kolonik mukozasında GAPDH enziminin aktif bölgesindeki tiyol gruplarının oksidasyonu enzimin aktivasyonunu kaybetmesine ve üç boyutlu yapısının bozulmasına neden olur. Enzimin aktivitesi azaldığında doku NADPH üretimi düşmekte ve glutatyon peroksidaz reaksiyonuyla GSSG'un GSH'a dönme süreci aksamaktadır. Glukoz 6 fosfat dehidrojenaz enziminin yanı sıra dokuda glutatyon sentezinde yer alan enzimlerin aktivite seviyeleri de düştüğünden ve glutatyonun rejenerasyonu bozulduğundan yeniden sentez reaksiyonları aksamakta ve doku P-SH düzeyi kolit olgularında azalmaktadır (şekil 21).

Literatürde AOPP düzeylerinin ölçümü en güvenilir protein oksidasyonu parametrelerinden kabul edilmektedir. Çalışmamızda kolit grubu kolon dokusu AOPP düzeylerinin kontrollere göre anlamlı derecede arttığını ($p<0.01$) saptadık. Doku düzeyinde AOPP seviyesine bakılmış çalışmalara rastlamadık. Baskol ve ark. (48) ÜK olgularında plazma AOPP seviyelerinin kontrol

grubuna göre arttığını bildirmişlerdir. Krzystek-Korpacka ve ark. (51) ÜK olgularında hastalığın aktif ve inaktif dönemlerde, Crohn hastalarında ise yalnızca aktif döneminde AOOP düzeylerinin kontrollere göre arttığını bildirmişlerdir.



Şekil 22. Kolit modelinde protein oksidasyon mekanizmaları

Asetik asit ile oluşturulan kolit modelinde artmış olan oksidatif stres proteinlerin tiyol gruplarının oksidasyonunda, AOPP oluşumunda etkili olabilir. Nitrozatif stres barsak hücrelerinin ana enerji kaynağı olan bütirik asit oksidasyonunu inhibe etmekte, proteinlerin tirozin kalıntılarının nitrasyonu ile etkilenmesine yol açmaktadır. Protein -SH gruplarının oksidasyonu proteinlerin fonksiyon kaybına neden olmaktadır (şekil 22).

NAC uygulaması ile kolit grubuna göre tam kan GSH düzeyinde anlamlı bir fark gözlenmemiştir. Literatürde kolit modeli veya olgularında NAC tedavisinin tam kan GSH düzeyine etkisini inceleyen çalışmaya rastlanmamıştır.

Plazma NT düzeylerinin NAC₁ grubunda kontrol ve kolit grubuna göre yüksek olduğu (sırasıyla; p<0.001, p<0.05) ve NAC₂ grubunda ise kontrol, kolit ve NAC₁ grubundakilere göre arttığı (hepsi; p<0.001) görüldü. Akgün ve ark. (7), doku NO• düzeylerinin 2 gün süreli NAC (20 mg/kg/gün) uygulaması ile artarken, 7 günlük uzun dönem NAC (100 mg/kg/gün) kullanımı ile azaldığını bildirmişlerdir. Ebrahimi ve ark. (45) 4 gün süreyle uygulanan 160 mg/kg/gün ve 240 mg/kg/gün NAC dozlarının doku NO• seviyesini azalttığını bildirmişlerdir. Akgün ve ark. (7) kısa süreli NAC uygulaması ile nitrozatif stresi artışını engelleyemediğini bildirdikleri gibi, biz de çalışmamızda tek günlük 100 mg/kg ve 500 mg/kg NAC dozları uygulaması ile proteinlerin

nitrozatif stresten etkilenmesini önleyemedik. Hatta 500 mg/kg NAC dozunda proteinlerin nitrozatif stresten etkilenmesinin arttığını tespit ettik.

NAC₁ grubundaki plazma tiyol düzeyinde kolit grubuna göre değişiklik gözlenmezken, NAC₂ grubu plazma tiyol seviyesi kontrol ve NAC₁ grubuna göre anlamlı azalma (hepsi; p<0.05) göstermişti.

Çalışma bulgularımız düşük doz NAC'in plazma redoks değişiminde etkili olmadığını yüksek doz NAC'in ise total tiyol miktarında azalmaya yol açtığını göstermektedir.

NAC tedavi gruplarındaki sıçanların kolon dokusu T-SH düzeylerinde kontrol grubuna göre anlamlı azalma (p<0.01) gözlemlendi. Ebrahimi ve ark. (45) 160 mg/kg/gün ve 240 mg/kg/gün NAC dozlarının 4 gün boyunca kullanımının kolit grubuna göre T-SH düzeylerini arttırdığını bildirmişlerdir. Çetinkaya ve ark. (6) tedavide tek gün süreyle ir veya ip olarak 500 mg/kg NAC dozu kullandıkları çalışmalarında, rektal yoldan NAC uygulamasının tedavi gruplarındaki T-SH seviyelerini kolit grubuna göre arttırdığını bildirmişlerdir. Çalışmamızda ise tek gün süreyle ip olarak her iki doz NAC uygulaması kolit grubu T-SH düzeylerinde görülen azalmayı düzeltmede etkili olmamıştır. Bu bulgu farkının, NAC'in uygulama yolu ve kullanım süresiyle ilgili olabileceğini söyleyebiliriz.

NAC₁ ve NAC₂ gruplarındaki sıçanların kolon dokusu Np-SH düzeylerinin kontrol ve kolit gruplarına göre anlamlı derecede arttığı (sırasıyla; p<0.001, p<0.01 ve p<0.01, p<0.001) saptanmıştır. Akgün ve ark (7) 20 mg/kg NAC dozunun 2 gün boyunca uygulanmasının Np-SH düzeyini azaltırken, 7 gün süreli 500 mg/kg NAC kullanımının arttırdığını bildirmişlerdir. Bu çalışmalar sonuçlarımızı destekler niteliktedir.

Doku P-SH değerlerinin NAC₁ tedavi grubundaki sıçanlarda kontrol ve kolit gruplarına göre anlamlı derecede düşük (sırasıyla; p<0.001, p<0.01) olduğu ve NAC₂ grubunda ise kontrollere göre azaldığı (p<0.01) görüldü. NAC uygulamasının proteinlerin -SH gruplarındaki oksidasyonu engelleyemediği gözlenmektedir.

NAC uygulaması ile NAC₁ grubundaki sıçanların AOPP düzeyinde kontrol ve kolit gruplarına göre azalış (p<0.001) gözlenmiş iken, NAC₂ grubundaki deneklerde kolit grubuna göre farklılık bulunmamıştır.

Çalışmamızda NAC'in çift etkisi dikkati çekmektedir. 100mg/kg/gün NAC dozu uygulaması AOPP oluşumunu önleyerek proteinler üzerinde antioksidant etki oluştururken; 500 mg/kg/gün NAC dozu ile tedavinin NAC₂ grubunda oksidan etkiyi önleyemediği ve/veya arttırdığı görülmektedir. Bayır ve ark. (52) kolesterolden zengin diyetle beslenen ratlarda NAC'in antioksidan ve pro-oksidan etkilerini araştırdıkları çalışmalarında bulgularımıza benzer sonuçlara ulaşmışlardır. Çalışmalarında 8 hafta boyunca NAC₂ grubuna uygulanan 50 mg/kg/gün NAC dozu lipid

peroksidasyonunu önleyebilmesine karşın, NAC₃ grubuna verilen 100 mg/kg/gün NAC dozunda lipid peroksidasyonunun artış gösterdiğini bildirmişlerdir. Çalışmamızda NAC₂ grubunda saptadığımız bulgular ve literatür ışığı altında yüksek doz NAC (500 mg/kg) kullanımının geçiş metallerinin indirgenmesinde rol alarak serbest radikal üretimine ve oksidatif hasara yol açabileceğini söyleyebiliriz.

Sonuç olarak asetik asit ile oluşturulmuş kolit modelinde 100 mg/kg ve 500 mg/kg NAC dozlarının tek gün süresince uygulamasının proteinleri oksidatif hasardan korumakta kısmen başarılı olduğunu, redoks değişimlerinden etkilenmesini ise engelleyemediğini söyleyebiliriz. Farklı dozlarda ve daha uzun sürelerde NAC uygulamasının kolit grubundaki sıçanlarda protein oksidasyonuna etkisini gösteren yeni çalışmalara ihtiyaç olduğunu ve ayrıca proteinlerde tam bir koruma sağlanabilmesi için mutlaka redoks değişimine etkili başka bir ilaçla beraber kullanımının araştırılması gerektiğini söyleyebiliriz.

SONUÇLAR

Ülseratif kolitte oksidan ürün düzeylerindeki artış ve antioksidan kapasitede görülen yetersizlikler sonucu ortaya çıkan oksidatif stresin hastalığın etyolojisi, ilerlemesi ve komplikasyonlarının ortaya çıkışı ile ilişkili olduğu bildirilmektedir.

Asetik asit ile kolit geliştirdiğimiz çalışma gruplarımızda oksidatif hasar sonucu oluşan protein oksidasyonu ve N-asetilsistein tedavisinin buna etkisinin incelenmesi hedeflenmiştir. Bu amaçla tam kanda GSH, plazmada tiyol ve nitrotirozin, kolon dokusunda T-SH, Np-SH, P-SH ile AOPP düzeylerinin ölçüldüğü çalışmamızda elde edilen sonuçlar aşağıda belirtilmiştir.

1. Sadece asetik asit uygulanan kolit grubundaki sıçanların hepsinin kolon dokusunda makroskobik hasar gözlemlendi. Mikroskobik hasarlanma bulguları olan epitelyal hücre kaybı, kript absesi ve inflamatuvar hücre infiltrasyonu oluşmayan denek yok iken, deneklerin sadece birinde goblet hücre hasarı oluşmamıştı. Bu bulgular kolit modelinin başarı ile gerçekleştiğini göstermektedir.
2. Asetik asit ile kolit geliştirilen ve NAC ile tedavi edilen gruplardaki makroskobik hasar bulgularımız NAC uygulamasının hasar derecesini azalttığını, ancak tamamen düzeltmediğini ve en uygun dozun 100 mg/kg olduğunu gösterdi. Mikroskobik bulgularımız ise her iki doz NAC uygulamasının etkisinin zayıf olduğunu gösterdi.
3. Kontrol, kolit ve NAC tedavi grupları tam kan GSH düzeyleri arasında fark bulunmadı.
4. Kolit grubunda plazma NT düzeyinin kontrol grubundan yüksek olduğu gözlemlendi. Bu bulgu kolit modelinde nitrozatif stresin oluştuğu ve plazma proteinlerinin nitrozatif stresten etkilendiğini düşündürmektedir.

5. Plazma NT düzeylerinin NAC₁ grubunda kontrol ve kolit grubuna göre yüksek olduğu, NAC₂ grubunda ise kontrol, kolit ve NAC₁ grubundakilere göre arttığı bulundu. Yüksek doz NAC uygulamasının nitrozatif strese proteinlerin etkilenmesinin artmasına yol açtığını düşündürmektedir.
6. Kolit ve NAC₁ gruplarının plazma tiyol düzeylerinde kontrol grubuna göre anlamlı farklılıklar bulunmamasıyla birlikte, NAC₂ grubu plazma tiyol düzeyinin kontrol ve NAC₁ grubuna göre düşük olduğu gözlemlendi.
7. Kolit grubu ile NAC tedavi gruplarının kolon dokusu T-SH düzeylerinin kontrol grubuna göre düşük olduğu, NAC uygulamasının T-SH düzeyinde kolit grubuna göre değişiklik oluşturmadığı bulundu. Bu bulgular asetik asit uygulamasının neden olduğu T-SH düzeylerindeki azalmayı NAC tedavisinin engelleyemediğini düşündürmektedir.
8. Kolit grubunun kolon dokusu Np-SH düzeyinin kontrol grubuna göre azalmış olmasına rağmen, bu azalışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı, NAC tedavi gruplarındaki Np-SH değerlerinin kontrol ve kolit gruplarına göre yüksek olduğu gözlemlendi.
9. Kolit grubunun kolon dokusu P-SH düzeyleri kontrol grubuna göre azalmış olmasına rağmen bu azalışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı bulundu. Doku P-SH düzeylerinin NAC₁ grubunda kontrol ve kolit gruplarına göre, NAC₂ grubunda ise kontrollere göre azaldığı gözlemlendi. Bu bulgu NAC uygulamasında P-SH oksidasyonunun arttığını düşündürmektedir.
10. Kolon dokusu AOPP düzeylerinin kolit grubunda kontrol grubuna göre artmış olduğu, NAC₁ grubunda kontrol ve kolitlere göre azaldığı bulundu. NAC₂ grubunda ise kolit grubuna göre anlamlı farklılıklar oluşmadığı gözlemlendi.

Sonuç olarak bulgularımız asetik asit ile oluşturulan kolit ile protein oksidasyonunun arttığını göstermektedir. N-asetilsistein kullanımının protein oksidasyonunun AOPP parametresini etkilediğini söyleyebiliriz.

ASETİK ASİT İLE KOLİT GELİŞTİRİLMİŞ SIÇANLARDA N-ASETİLSİSTEİNİN PROTEİN OKSİDASYONU ÜZERİNE ETKİSİ

ÖZET

Aylin YILMAZ

Çalışmamızın amacı asetik asit ile kolit geliştirilmiş sıçanlarda N-asetilsisteinin (NAC) tam kan, plazma ve kolon dokusundaki protein oksidasyonu ile bazı antioksidan parametreler üzerine etkisini araştırmaktır. Çalışmada 40 adet Wistar sıçan rastlantısal olarak 4 gruba ayrıldı. Çalışma grupları; kontrol (n=10), kolit (n=10), NAC₁ tedavi (n=10) ve NAC₂ tedavi (n =10) olarak belirlendi. Deneysel kolit modeli, kolit ve NAC tedavi gruplarındaki sıçanlara asetik asidin (pH 2.4, % 4) intrarektal olarak uygulanması ile oluşturuldu. Asetik asit uygulamasının ardından 24. saatte, NAC₁ grubundaki sıçanlara 100 mg/kg/gün dozunda, NAC₂ grubundakilere ise 500 mg/kg/gün dozunda NAC intraperitoneal olarak enjekte edildi. Tam kanda GSH, plazmada tiyol ile protein oksidasyonu belirteçlerinden nitrotirozin, kolon dokusunda protein oksidasyonun göstergesi olan total-SH, non-protein-SH, protein-SH ve ileri oksidasyon protein ürün düzeyleri değerlendirilmiştir.

Kolit grubu kolon dokusunda kontrol grubuna göre ileri oksidasyon protein ürün düzeylerinin ve plazma nitrotirozin düzeylerinin arttığı (ikisi; p<0.01) bulundu. Doku total-SH düzeyleri kolit grubunda kontrol grubuna göre azalmıştı (p<0.01). Kolon dokusunda kontrol ve NAC tedavi gruplarına göre non-protein-SH düzeyleri azalış göstermişti. NAC

uygulamasının NAC₁ grubunda kontrol ve kolit grubuna göre ileri oksidasyon protein ürün düzeylerini anlamlı olarak azalttığı gözlemlendi.

Sonuç olarak bu çalışmada NAC'in deneysel kolit modelinde plazma ve doku redoks değişimini etkilemediği, proteinlerin redoks değişiminden etkilenmesini engelleyemediği, ancak ileri oksidasyon protein ürünlerinin oluşumunu önleyerek proteinleri oksidatif hasardan kısmen koruduğunu söyleyebiliriz.

Anahtar Kelimeler: Deneysel kolit, N-asetilsistein, Glutasyon, Nitrotirozin, Total-SH, Non-Protein-SH, Protein-SH, İleri Oksidasyon Protein Ürünleri

THE EFFECTS OF N-ACETYLCYSTEINE ON PROTEIN OXIDATION OF ACETIC ACID-INDUCED COLITIS IN RATS

SUMMARY

ASETİK ASİT İLE KOLİT GELİŞTİRİLMİŞ SIÇANLARDA N-ASETİLSİSTEİNİN PROTEİN OKSİDASYONU ÜZERİNE ETKİSİ

Aylin YILMAZ

Aim of this study, effects of N-acetylcysteine (NAC) on protein oxidation and antioxidant system parameters in the whole blood, plasma, and colonic tissues of acetic acid-induced colitis in rats were investigated. During this work 40 Wistar rats were divided randomly into four groups: control (n=10), colitis (n=10), NAC₁ treatment (n=10) and NAC₂ treatment (n=10) . Experimental colitis model was induced in colitis and NAC treatment groups rats by intrarectal administration of acetic acid (pH 2.4, 4 %). N-acetylcysteine was injected to NAC₁ group rats (100 mg/kg) and NAC₂ group rats (500 mg/kg) intraperitoneally, at the 24th hours after the intrarectal acetic acid administration. Whole blood glutathione, plasma thiol and nitrotyrosine, colon tissue total-SH, non-protein-SH, protein-SH, and advanced oxidation protein products were measured.

In the colonic tissues, advanced oxidation protein products and plasma nitrotyrosine levels of the colitis group were elevated in comparison with the control group (both; $p < 0.01$). Total-SH levels were decreased in the colitis group as compared to the control group ($p < 0.01$). A decrease was observed non-protein-SH levels in colonic tissues as compared with the control and the NAC treatment groups. In the NAC₁ group administration of N-acetylcysteine significantly decreased the advanced oxidation protein products levels compared to the control and colitis groups.

As a result, in this study it was established that N-acetylcysteine does not affect redox change in plasma and tissues at experimental colitis model, that it could not prevent proteins from being affected by redox change while it protected proteins from oxidative damage avoiding advanced oxidation protein products.

Key Words: Experimental colitis, N-acetylcysteine, Glutathione, Nitrotyrosine, Total-SH, Non-protein-SH, Protein-SH, Advanced oxidation protein products

KAYNAKLAR

1. Head KA, Jurenka JS. Inflammatory bowel disease part I: Ulcerative colitis-pathophysiology and conventional and alternative treatment options. *Altern Med Rev* 2003; 8(3):247-83.
2. Parks DA. Oxygen radicals: mediators of gastrointestinal pathophysiology. *Gut* 1989; 30(3):293-8.
3. Gutteridge JM. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage [Review]. *Clin Chem* 1995; 41(12 Pt 2):1819-28.
4. Gülbahar Ö. Protein oksidasyonunun mekanizması, önemi ve yaşlılıkla ilişkisi. *Turkish Journal of Geriatrics* 2007; 10(1):43-8.
5. Zafarullah M, Li WQ, Sylvester J, Ahmad M. Molecular mechanisms of N-acetylcysteine actions. *Cell Mol Life Sci* 2003; 60(1):6-20.
6. Cetinkaya A, Bulbuloglu E, Kurutas EB, Ciralik H, Kantarceken B, Buyukbese MA. Beneficial effects of N-acetylcysteine on acetic acid-induced colitis in rats. *Tohoku J Exp Med* 2005; 206(2):131-9.
7. Akgün E, Caliskan C, Celik HA, Ozutemiz AO, Tunçyurek M, Aydın HH. Effects of N-acetylcysteine treatment on oxidative stress in acetic acid-induced experimental colitis in rats. *J Int Med Res* 2005; 33(2):196-206.
8. Nosál'ová V, Cerná S, Bauer V. Effect of N-acetylcysteine on colitis induced by acetic acid in rats. *Gen Pharmacol* 2000; 35(2):77-81.
9. Çavdar C, Sifil A, Çamsarı T. Reaktif oksijen partikülleri ve antioksidan savunma. *Türk Nefroloji Diyaliz ve Transplantasyon Dergisi* 1997;3-4:92-5.
10. Delibaş N, Özçankaya R. Serbest radikaller. *SDÜ Tıp Fakültesi Dergisi* 1995; 2(3):11-7.

11. Kavas G. Serbest radikaller ve organizma üzerine etkileri. Türkiye Klinikleri 1989; 9(1):1-8.
12. Şimşek F. Serbest oksijen radikalleri, antioksidanlar ve lipit peroksidasyonu. T Klin J Pediatr 1999; 8:42-7.
13. Halliwell B. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. Plant Physiol 2006; 141(2):312-22.
14. Sies H. Oxidative stres: Oxidants and antioxidants [Review]. Exp Physiol 1997; 82(2):291-5.
15. Altınışık M. Serbest oksijen radikalleri ve antioksidanlar. <http://www.mustafaaltinisik.org.uk/21-adsem-01s.pdf> Erişim tarihi:20.06.2009.
16. Miller RA, Britigan BE. Role of oxidants in microbial patophysiology. Clin Microbiol Rev 1997; 10(1):1-18.
17. Çakatay U, Kayalı R. Protein oksidasyonunun klinik önemi. Cerrahpaşa J Med 2004; 35:140-9.
18. Berlett BS, Stadtman ER. Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. J Biol Chem 1997; 272(33):20313-6.
19. Dean RT, Fu S, Stocker R, Davies MJ. Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation [Review]. Biochem J 1997; 324(Pt 1):1-18.
20. Stadtman ER, Levine RL. Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins. Amino Acids 2003; 25(3-4):207-18.
21. Kayalı R, Çakatay U. Protein oksidasyonunun ana mekanizmaları. Cerrahpaşa J Med 2004; 35: 83-9.
22. Aksoy Y. Antioksidan mekanizmada glutatyonun rolü. T Klin Tıp Bilimleri 2002; 22:442-8.
23. Meister A. Glutathione, ascorbate, and cellular protection. Cancer Res 1994; 54:1969-75.
24. Ahola T. Preventive potential of N-acetylcysteine in oxidative stres-related complications of prematurity (Dissertation). Helsinki: Helsinki Univ; 2004.
25. Kelly GS. Clinical applications of N-acetylcysteine. Altern Med Rev 1998; 3(2):114-27.
26. Podolsky DK. İnflammatory bowel disease. N Eng J Med 2002; 347(6):417-29.
27. Oktay E. İnflamatuar barsak hastalıkları: etyopatogenez, semptomatoloji, tanı ve komplikasyonlar. İstanbul: İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, 2001:199-206.

28. Williams JG, Hughes LE, Hallett MB. Toxic oxygen metabolite production by circulating phagocytic cells in inflammatory bowel disease. *Gut* 1990; 31(2):187-93.
29. Darka Ö. Hücre adezyon molekülleri ve enflamasyondaki rolleri. *T Klin J Mikrobioloji Enfeksiyon* 2003; 2:36-43.
30. He SH. Key role of mast cells and their major secretory products in inflammatory bowel disease [Review]. *World J Gastroenterol* 2004; 10(3):309-18.
31. Kuralay F, Çavdar Z. İnflamatuvar medyatörlere toplu bir bakış. *Genel Tıp Derg* 2006; 16(13):143-52.
32. Paiotti AP, Artigiani Neto R, Forones NM, Oshima CT, Miszputen SJ, Franco M. Immunoexpression of cyclooxygenase-1 and -2 in ulcerative colitis. *Braz J Med Biol Res* 2007; 40(7):911-8.
33. Romero M, Artigiani R, Costa H, Oshima CT, Miszputen S, Franco M. Evaluation of the immunoexpression of COX-1, COX-2 and p53 in Crohn's disease. *Arq Gastroenterol* 2008; 45(4):295-300.
34. Ajuebor MN, Singh A, Wallace JL. Cyclooxygenase-2-derived prostaglandin D(2) is an early anti-inflammatory signal in experimental colitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2000; 279(1):G238-44.
35. Boughton-Smith NK, Whittle BJR. Increased metabolism of arachidonic acid in an immune model of colitis in guinea-pigs. *Br J Pharmac* 1985; 86:439-46.
36. Fedorak RN, Madsen KL. Naturally occurring and experimental models of inflammatory bowel disease. In: Kirsner JB (Ed.). *İnflammatory bowel disease*. 5th ed. Chicago: W.B. Saunders Co; 2000: p.113-125.
37. Beutler E, Duron O, Kelly BM. Improved method for the determination of blood glutathione. *J Lab Clin Med* 1963; 61:882-8.
38. Hu ML. Measurement of protein thiol groups and glutathione in plasma. *Methods Enzymol* 1994; 233:380-5.
39. Sedlak J, Lindsay RH. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Anal Biochem* 1968; 25(1):192-205.
40. Witko-Sarsat V, Friedlander M, Capeillere-Blandin C, Nguyen-Khoa T, Nguyen AT, Zingraff J, et al. Advanced oxidation protein products as a novel marker of oxidative stress in uremia. *Kidney Int* 1996; 49(5):1304-13.
41. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193(1):265-75.

42. Blackburn AC, Doe WF, Buffinton GD. Colonic antioxidant status in dextran sulfate-induced colitis in mice. *Inflamm Bowel Dis* 1997; 3(3):198-203.
43. Erichsen K, Hausken T, Ulvik RJ, Svardal A, Berstad A, Berge RK. Ferrous fumarate deteriorated plasma antioxidant status in patients with Crohn disease. *Scand J Gastroenterol* 2003; 38(5):543-8.
44. Sido B, Hack V, Hochlehnert A, Lipps H, Herfarth C, Dröge W. Impairment of intestinal glutathione synthesis in patients with inflammatory bowel disease. *Gut* 1998; 42(4):485-92.
45. Ebrahimi F, Esmaily H, Baeeri M, Mohammadirad A, Fallah S, Abdollahi M. Molecular evidences on the benefit of N-acetylcysteine in experimental colitis. *Cent Eur J Biol* 2008; 3(2):135-42.
46. Shishehbor MH, Aviles RJ, Brennan ML, Fu X, Goormastic M, Pearce GL, et al. Association of nitrotyrosine levels with cardiovascular disease and modulation by statin therapy. *JAMA* 2003; 289(13):1675-80.
47. Sajdel-Sulkowska EM, Lipinski B, Windom H, Audhya T, McGinnis W. Oxidative stress in autism: elevated cerebellar 3-nitrotyrosine levels. *Am J Biochem Biotech* 2008; 4(2):73-84.
48. Baskol M, Baskol G, Koçer D, Ozbakir O, Yucesoy M. Advanced oxidation protein products: a novel marker of oxidative stress in ulcerative colitis. *J Clin Gastroenterol* 2008; 42(6):687-91.
49. Holmes EW, Yong SL, Eiznhamer D, Keshavarzian A. Glutathione content of colonic mucosa: evidence for oxidative damage in active ulcerative colitis. *Dig Dis Sci* 1998; 43(5):1088-95.
50. McKenzie SJ, Baker MS, Buffinton GD, Doe WF. Evidence of oxidant-induced injury to epithelial cells during inflammatory bowel disease. *J Clin Invest* 1996; 98(1):136-41.
51. Krzystek-Korpacka M, Neubauer K, Berdowska I, Boehm D, Zielinski B, Petryszyn P, et al. Enhanced formation of advanced oxidation protein products in IBD. *Inflamm Bowel Dis* 2008; 14(6):794-802.
52. Bayır S, Eskiocak S, Altaner Ş, Çakır E. Kolesterolde zengin diyetle beslenen ratlarda N-asetilsisteinin anti-oksidan/pro-oksidan etkileri. *Türk Klinik Biyokimya Derg* 2006; 4(1):15-23.

RESİMLEMELER LİSTESİ

ŞEKİLLER

	Sayfa No
1. Protein karbonil oluşumuna yol açan primer modifikasyon reaksiyonları.....	12
2. Protein karbonil oluşumuna yol açan sekonder modifikasyon reaksiyonları.....	13
3. Nitrotirozin oluşum reaksiyonları.....	14
4. N-asetilsisteinin moleküler formülü.....	17
5. Glutasyon standart grafiği.....	24
6. Tiyol standart grafiği.....	25
7. Nitrotirozin standart grafiği.....	26
8. Total-SH standart grafiği.....	27
9. Protein standart grafiği.....	29
10. Plazma nitrotirozin düzeyleri.....	32
11. Plazma tiyol düzeyleri.....	33
12. Kolon dokusu T-SH düzeyleri.....	35
13. Kolon dokusu Np-SH düzeyleri.....	35
14. Kolon dokusu P-SH düzeyleri.....	36
15. Kolon dokusu AOPP düzeyleri.....	37
16. Kontrol, kolit, NAC ₁ ve NAC ₂ tedavi gruplarındaki deneklerde görülen makroskobik hasarın dağılımı.....	39
17. Kontrol, kolit, NAC ₁ ve NAC ₂ tedavi gruplarındaki deneklerde görülen epitelyal hücre kaybı dağılımı.....	40

18.	Kontrol, kolit, NAC ₁ ve NAC ₂ tedavi gruplarındaki deneklerde görülen kript absesi dağılımı.....	41
19.	Kontrol, kolit, NAC ₁ ve NAC ₂ tedavi gruplarındaki deneklerde görülen goblet hücre hasarı dağılımı.....	41
20.	Kontrol, kolit, NAC ₁ ve NAC ₂ tedavi gruplarındaki deneklerde görülen inflamatuvar hücre infiltrasyonu dağılımı.....	42
21.	Glutasyon metabolizması.....	50
22.	Kolit modelinde protein oksidasyon metabolizmaları.....	51

TABLULAR

1.	Reaktif oksijen metabolitleri.....	5
2.	Oksijen merkezli olmayan serbest radikaller.....	7
3.	Kolonik mukozadaki makroskobik bulguların sınıflandırılması.....	29
4.	Kolonik mukozadaki mikroskobik bulguların sınıflandırılması.....	30
5.	Kontrol, kolit, NAC ₁ ve NAC ₂ tedavi gruplarının tam kan GSH ve plazma NT değerleri (Ort±SD).....	31
6.	Kontrol, kolit, NAC ₁ ve NAC ₂ tedavi gruplarının plazma tiyol değerleri (Ort±SD).....	33
7.	Kontrol, kolit, NAC ₁ ve NAC ₂ tedavi gruplarının kolon dokusu T-SH ve Np-SH değerleri (Ort±SD).....	34
8.	Kontrol, kolit, NAC ₁ ve NAC ₂ tedavi gruplarının kolon dokusu P-SH değerleri (Ort±SD).....	36
9.	Kontrol, kolit, NAC ₁ ve NAC ₂ tedavi gruplarının kolon dokusu AOPP düzeyleri (Ort±SD).....	37
10.	Kolon dokusunda makroskobik değerlendirme.....	38
11.	Kolonik mukozadaki mikroskobik değerlendirme.....	40
12.	Kontrol, kolit, NAC ₁ ve NAC ₂ tedavi gruplarındaki deneklerin her birinde saptanan tam kan GSH, plazma tiyol ve NT, kolon dokusu T-SH, Np-SH, P-SH ve AOPP düzeyleri.....	44
13.	Kontrol, kolit, NAC ₁ ve NAC ₂ tedavi gruplarındaki deneklerin her birinde saptanan kolon dokusunda makroskobik ve mikroskobik patolojik bulgular.....	45

RESİMLER

1. Kolon dokusunun makroskopik görünümü (A: kontrol, B: kolit, C: NAC₁ tedavi, D: NAC₂ tedavi grubu).....39
2. Kontrol (A), kolit (B), NAC₁ tedavi (C) ve NAC₂ tedavi (D) gruplarında oluşan histopatolojik değişiklikler (HEx100).....43

ÖZGEÇMİŞ

08.05.1982 tarihinde Kırklareli ili Lüleburgaz ilçesinde doğdum. İlk ve orta öğrenimimi Lüleburgaz'da tamamladım. 2001 yılında girdiğim Trakya Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nden 2005 yılında mezun oldum. 2006 yılında Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimime başladım. Halen aynı enstitüde 2006 yılından bu yana yüksek lisans eğitimim devam etmektedir.

EKLER

1. Yerel Etik Kurul Onayı

T.C.

TRAKYA ÜNİVERSİTESİ

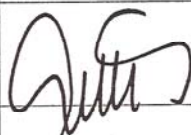
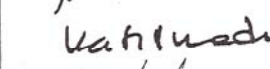
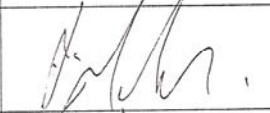

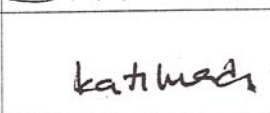
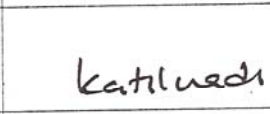

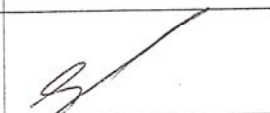
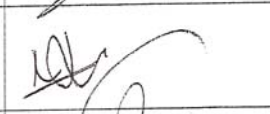
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU KARARLARI

Oturum Sayısı: 08

Karar Tarihi: 08.09.2008

KARAR NO: 2008/08.06

Yürütücülüğünü Tıp Fakültesi öğretim üyesi Doç.Dr. Sevgi ESKİOCAK'ın yaptığı ve Yüksek Lisans Öğrencisi Biyolog Aylin YILMAZ'ın tezi olarak planlanan TÜHDYEK-2008/042 protokol nolu "Asetik asit ile kolit geliştirilmiş sıçanlarda N-asetilsisteinin protein oksidasyonu üzerine etkisi" başlıklı çalışma hakkında görüşüldü; araştırmanın amaç, yaklaşım, gereç ve yöntemler dikkate alınarak incelenmesi sonucunda: Hayvan Hakları Evrensel Bildirgesi ve etik kurallara uygun olarak hazırlandığına ve çalışmanın yapılabileceğine mevcudun oy birliği ile karar verilmiştir.

Ünvanı/Adı/Soyadı	Araştırma ile İlişki	Toplantı Katılımı	İmza
Doç. Dr. Gülay DURMUŞ-ALTUN Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi -Başkan	<input type="checkbox"/> var <input type="checkbox"/> yok	<input type="checkbox"/> evet <input type="checkbox"/> hayır	
Yrd.Doç. Dr. Hayati ARDA Fen-Edebiyat Fakültesi Öğretim Üyesi	<input type="checkbox"/> var <input type="checkbox"/> yok	<input type="checkbox"/> evet <input checked="" type="checkbox"/> hayır	 katılmadı
Vet.Hek. Ziya ÇUKUR Veteriner Hekim	<input type="checkbox"/> var <input type="checkbox"/> yok	<input type="checkbox"/> evet <input type="checkbox"/> hayır	
Hüseyin KOÇ Sivil Toplum Örgütü Üyesi Sivi Üye	<input type="checkbox"/> var <input type="checkbox"/> yok	<input checked="" type="checkbox"/> evet <input checked="" type="checkbox"/> hayır	
İlyas ÖZMEN Sivil Üye	<input type="checkbox"/> var <input type="checkbox"/> yok	<input type="checkbox"/> evet <input checked="" type="checkbox"/> hayır	 katılmadı
Yrd.Doç.Dr. Beytullah ÖZKAN Fen-Edebiyat Fakültesi Öğretim Üyesi	<input type="checkbox"/> var <input type="checkbox"/> yok	<input type="checkbox"/> evet <input checked="" type="checkbox"/> hayır	 katılmadı
Yrd.Doç.Dr. Burhan AKSU Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi	<input type="checkbox"/> var <input checked="" type="checkbox"/> yok	<input checked="" type="checkbox"/> evet <input type="checkbox"/> hayır	
Yrd.Doç.Dr. S. Arzu VARDAR Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi	<input type="checkbox"/> var <input checked="" type="checkbox"/> yok	<input checked="" type="checkbox"/> evet <input type="checkbox"/> hayır	
Doç. Dr. Nilda TURGUT Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi	<input type="checkbox"/> var <input checked="" type="checkbox"/> yok	<input checked="" type="checkbox"/> evet <input type="checkbox"/> hayır	
Yrd.Doç.Dr. Ruşen COŞAR-ALAŞ Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi	<input type="checkbox"/> var <input checked="" type="checkbox"/> yok	<input checked="" type="checkbox"/> evet <input type="checkbox"/> hayır	