

İltihabi Barsak Hastalığında Likopenin Hematoprotektif Etkileri

Songül Çetik

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Biyoloji Anabilim Dalı

Ocak 2011

Hematoprotective Effects of Lycopene in Inflammatory Bowel Disease

Songül Çetik

MASTER OF SCIENCE THESIS

Department of Biology

January 2011

İltihabi Barsak Hastalığında Likopenin Hematoprotektif Etkileri

Songül Çetik

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Lisansüstü Yönetmeliği Uyarınca

Biyoloji Anabilim Dalı

Genel Biyoloji Bilim Dalında

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Olarak Hazırlanmıştır.

Danışman: Doç. Dr. Adnan Ayhancı

Ocak 2011

ONAY

Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans öğrencisi Songül Çetik' in YÜKSEK LİSANS tezi olarak hazırladığı'' İltihabi Barsak Hastalığında Likopenin Hematoprotektif Etkileri'' başlıklı bu çalışma, jürimizce lisansüstü yönetmeliğin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

Danışman: Doç. Dr. Adnan AYHANCI

İkinci Danışman: -

Yüksek Lisans Tez Savunma Jürisi:

Üye: Prof. Dr. Ahmet ÖZATA

Üye: Prof. Dr. Mehtap KUTLU

Üye: Doç. Dr. Adnan AYHANCI

Üye: Yrd. Doç. Dr. Ünal ÖZELMAS

Üye: Yrd. Doç. Dr. Pınar ÖZTOPÇU VATAN

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunun tarih ve sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Nimetullah BURNAK

Enstitü Müdürü

ÖZET

İltihabi barsak hastalığında (İBH) anemi sık rastlanan bir problemdir. İBH' de anemi patogenezinde en sık demir eksikliği ve kronik hastalık anemisi görülmektedir. Bu nedenle İBH' li hastalara antiinflamatuvar ilaçların verilmesi ya da antioksidan maddeler kullanılarak hastalığın giderilmesi, demir ve vitamin replasmanı kadar önemlidir. Bu deneysel çalışmada antioksidan ve hücre koruyucu etkileri olduğu bilinen likopenin kolitte gelişen anemiyi önlemede muhtemel koruyucu etkisi test edildi. Çalışmada 112 adet Sprague dawley ırkı erkek sıçanlar her grupta 7 hayvan olacak şekilde kontrol grubu hariç 15 gruba ayrıldı. Tüm deney gruplarına 0. günde 120 mg/kg TNBS intrarektal olarak verildi ve sıçanlarda akut kolit oluşturuldu. TNBS uygulamasından bir gün sonra i.p. olarak, 40 mg/kg L-NAME, 1 mg/kg zeytinyağı, 5 ve 10 mg/kg likopen dozları zeytinyağında (1:1) hazırlanarak, üç gün süre ile (her gün) verildi. Tüm sıçanlardan eter anestezisi altında intrakardiyak kan örnekleri alınarak eritrosit, lökosit ve trombositler sayıldı ve SPSS 9.0 paket programı ile verilerin istatistiksel analizleri yapıldı. 1. günde eritrosit sayısı TNBS grubu hariç diğer gruplarda düşerken lökosit sayısı inflamasyonu işaret edecek şekilde arttı. Trombosit sayısı ise TNBS grubu hariç diğer tüm gruplarda düştü. 2. günde eritrosit ve trombosit sayıları TNBS grubu hariç diğer tüm gruplarda artarken lökosit sayısı tüm gruplarda düştü. 3. günde eritrosit ve trombosit sayıları 10 mg/kg likopen grubu hariç diğer tüm gruplarda arttı. Lökosit sayısı ise 10 mg/kg likopen grubunda artış gösterirken diğer gruplarda 2. gün değerleri ile aynı kaldı. Deneysel akut kolit modelimizde likopenin, hemopoezde ve aneminin önlenmesinde etkili olduğunu söyleyebiliriz ancak ne ölçüde etkili olduğunu söyleyebilmek için kronik kolit modellerinin oluşturulması gerekir.

Anahtar Kelimeler: TNBS, Akut Kolit, Hematoksisite, L-NAME, Zeytinyağı, Likopen, Antioksidan, Sitoprotektivite, Rat.

SUMMARY

Anemia is a frequent extra intestinal complication of inflammatory bowel disease (IBD). It is generally a combination of iron deficiency and anemia of chronic disease (ACD). For this reason, prescribing anti-inflammatory drugs or remedying the disease through antioxidant agents is also important, in addition to replacement of iron and vitamins in the treatment of this disease. The present study aims to determine the possible protective effects of lycopene, which is known to have both cell-protective and antioxidative effects, upon anemia that develops in colitis. In the present study, 112 Sprague-dawley male rats were equally divided into 16 groups, one remaining as the control group. All the study groups were intrarectally administered 120 mg/kg of trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS), as a result of which experimental colitis was induced. Just one day after TNBS administration, 40 mg/kg of L-NAME, 1 mg/kg of olive oil, 5 and 10 mg/kg of lycopene dissolved in olive oil (1:1) was intraperitoneally given to the rats in the study groups three days in a row. All the rats were sacrificed after being anesthetized with ether in order to determine erythrocyte, leukocyte and thrombosis numbers via intracardiac blood samples. Subsequently, a statistical analysis of the data obtained was achieved through SPSS 9.0 software package. On the 1st day of the experiment while the number of erythrocytes decreased in all the groups with the exception of the TNBS group, the number of leukocytes showed an increase that was deemed as an indication of inflammation. As to the thrombosis levels, they showed a decrease in all study groups excepting the TNBS group. On the 2nd day of the experiment, while the number of erythrocytes and thromboses was observed to have increased in all the groups excepting the TNBS group, the number of leukocytes decreased in all the study groups. On the 3rd day of the experiment, the number of erythrocytes and thromboses showed an increase in all the study groups excepting 10 mg/kg Lycopene group, in which the number of leukocytes increased. However, leukocytes in all the other groups remained at the same levels as they were on the 2nd. Based upon the data obtained in this experimental acute colitis model, we can assume that lycopene is effective in hemopoiesis, as well as in preventing anemia. However, in order to be able to determine to what extent lycopene exerts this influence, chronic colitis models should be carried out by further studies.

Keywords: TNBS, Akut Colit, Hematoxicite, L-NAME, Olive Oil, Lycopene, Antioxidant, Cytoprotectivity, Rat.

TEŞEKKÜR

Bu tez çalışmasının gerçekleştirilmesinde ve tüm üniversite eğitimim süresince benden hiçbir zaman yardımlarını, desteğini ve tecrübelerini esirgemeyen, büyük sabır ve anlayışla bana yol gösteren değerli danışman hocam aynı zamanda manevi babam olarak gördüğüm Sayın Doç. Dr. Adnan AYHANCI' ya en içten saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmam boyunca desteklerini gördüğüm, bilgilerinden yararlandığım değerli hocalarım Yılmaz ALTUNER ve Sait KILIÇASLAN' a sonsuz teşekkür ederim. Tez yazım sürecinde yardım ve desteğini esirgemeyen Sibel GÜNEŞ' e sonsuz teşekkür ederim.

Yine çalışmam boyunca her zaman yanımda olan arkadaşlarım Sevtap KARABOĞA, Seval ALP, Ömer Faruk ELÇİÇEK ve Deniz BOZKURT, Mürvet DEMİRKAYA ve Yasemin TEKİN' e sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

Hayatımın her anında karşılıksız sevgileri ve maddi, manevi destekleriyle yanımda olan, varlıklarıyla bana gurur ve onur veren başta sevgili babam Şemsettin Çetik ve annem Hanife ÇETİK olmak üzere, abim M. hadi ÇETİK, ablalarım Vesile ve Kezban ÇETİK, kardeşlerim Saim ve Gülşah ÇETİK' e teşekkür ediyorum.

Ayrıca her zaman, her koşulda yanımda oldukları için aynı şekilde ailemle gurur ve onur duyuyor, en içten sevgi ve saygılarımı sunuyorum ve bu tezimi sevgili aileme hediye ediyorum.

İÇİNDEKİLER

| | <u>Sayfa</u> |
|---|--------------|
| ÖZET | v |
| SUMMARY | vi |
| TEŞEKKÜR | vii |
| TABLolar DİZİNİ..... | xi |
| ŞEKİLLER DİZİNİ | xii |
| SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ | xiii |
| | |
| 1. GİRİŞ..... | 1 |
| | |
| 2. GENEL BİLGİLER | 4 |
| 2.1. İltihabi Bağırsak Hastalığı..... | 4 |
| 2.2. IBH’de Mukozal Hücre Hasarına Neden Olabilecek Etkenler..... | 7 |
| 2.3. İnflamasyon Hazırlayıcıları..... | 8 |
| 2.3.1. Genetik yatkınlık..... | 8 |
| 2.3.2. Çevresel faktörler | 8 |
| 2.3.3. İnfeksiyöz ajanlar..... | 9 |
| 2.4. İltihabi Barsak Hastalığında Anemi..... | 9 |
| 2.4.1. Demir metabolizması ve demir eksikliği anemisi..... | 10 |
| 2.4.1.1. Demir metabolizması..... | 10 |
| 2.4.1.2. Demir eksikliği anemisi..... | 11 |
| 2.4.2. Kronik hastalık anemisi..... | 13 |
| 2.4.3. Vitamin B ₁₂ ve folat eksikliği..... | 14 |
| 2.4.3.1. Vitamin B ₁₂ eksikliği..... | 14 |
| 2.4.3.2. Folik asit eksikliği..... | 15 |

İÇİNDEKİLER (devam)

| | |
|--|----|
| 2.4.4. Hemolitik Anemi..... | 16 |
| 2.4.5. Kemik İliği Depresyonu..... | 17 |
| 2.5. TNBS-E Kombinasyonu ile Ratlarda Oluşturulan deneysel kolit modeli..... | 17 |
| 2.6. Nitrik Oksit..... | 18 |
| 2.6.1. NO'nun Kimyasal, Fiziksel ve Biyolojik Özellikleri | 18 |
| 2.6.2. NO Sentezi ve Metabolizması..... | 19 |
| 2.6.3. Nitrik Oksit Sentetazlar (NOS)..... | 20 |
| 2.6.4. Sindirim Sistemi ve Nitrik Oksit İlişkisi..... | 22 |
| 2.7. Serbest Radikaller..... | 23 |
| 2.7.1. Serbest Radikallerin Biyolojik Önemi..... | 24 |
| 2.8. Serbest Oksijen Radikalleri (SOR)..... | 25 |
| 2.8.1. Hücrede SOR oluşum yolları..... | 25 |
| 2.9. Antioksidanlar..... | 27 |
| 2.10. Karotenoidler..... | 30 |
| 2.11. Likopen..... | 31 |
| 2.11.1. Likopenin Genel Özellikleri..... | 31 |
| 2.11.2. Likopen'in Yapısı, Bulunurluğu ve Taşınması..... | 32 |
| 2.11.3. Likopenin Etkileri..... | 34 |
| 2.11.3.1. Likopen'in antioksidatif etkisi..... | 34 |
| 2.11.3.2. Likopen'in antikanserojen etkisi..... | 34 |
| 2.11.3.3. Likopen'in antiinflamatuvar etkisi..... | 35 |
| 2.11.4. Likopen – barsak- kolit ilişkisi..... | 36 |

İÇİNDEKİLER (devam)

| | |
|---|-----------|
| 3. GEREÇ ve YÖNTEMLER..... | 39 |
| 3.1. Gereç | 39 |
| 3.1.1. Deney hayvanları ve Deney Gruplarının Oluşturulması..... | 39 |
| 3.2. Yöntemler..... | 39 |
| 3.2.1. Kimyasal Maddeler ve Uygulamaları..... | 39 |
| 3.2.2. Kan Örneklerinin Alınması..... | 40 |
| 3.2.3. İstatistiksel Değerlendirme..... | 40 |
| 4. BULGULAR..... | 41 |
| 4.1. Periferik Kan Parametrelerinin Bulguları..... | 41 |
| 4.1.1. Eritrosit Değerlerinin Karşılaştırılması..... | 43 |
| 4.1.2. Lökosit Değerlerinin Karşılaştırılması..... | 46 |
| 4.1.3. Trombosit Değerlerinin Karşılaştırılması..... | 49 |
| 5. TARTIŞMA VE SONUÇ..... | 51 |
| 6. KAYNAKLAR DİZİNİ..... | 56 |
| 7. EKLER..... | 65 |

TABLolar DİZİNİ

| <u>Tablo</u> | <u>Sayfa</u> |
|---|---------------------|
| 4.1.1. Kontrol ve deney gruplarının periferik kan değerleri..... | 42 |
| 4.1.1.1. Kontrol ve deney gruplarının 1., 2. ve 3. günlerine ait eritrosit değerleri..... | 45 |
| 4.1.2.1. Kontrol ve deney gruplarının 1., 2. ve 3. günlerine ait lökosit değerleri..... | 48 |
| 4.1.3.1. Kontrol ve deney gruplarının 1., 2. ve 3. günlerine ait trombosit değerleri..... | 50 |

ŞEKİLLER DİZİNİ

| <u>Sekil</u> | <u>Sayfa</u> |
|--|---------------------|
| 2.6.2.1. Nitrik oksit sentetaz tarafından katalizlenen arjinin amino asitinden NO sentezi..... | 20 |
| 2.6.3.1. NOS enzimlerinin genel yapısı..... | 21 |
| 2.8.1.1. SOR oluşum yolları..... | 26 |
| 2.11.2.1. Likopenin kimyasal yapısı..... | 32 |
| 2.11.4.1. Likopenin barsaklardan alınması ve taşınması..... | 37 |

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

| <u>Simgeler</u> | <u>Açıklama</u> |
|---------------------------|------------------------------------|
| ml | Mililitre |
| mg | Miligram |
| kg | Kilogram |
| n | Denek Sayısı |
| μ | Mikron |
| ppm | Milyonda Bir (Parts Per Million) |
| <u>Kısaltmalar</u> | <u>Açıklama</u> |
| İBH | İnflamatuvar Barsak Hastalığı |
| ÜK | Ülseratif Kolit |
| CH | Crohn Hastalığı |
| NO | Nitrik Oksit |
| SOR | Serbest Oksijen Radikalleri |
| GLN | Glutamin |
| 5-ASA | 5-amino salisilik asit |
| TNBS | 2,4,6-trinitrobenzen sülfonik asit |
| NOS | Nitrik Oksit Sentetazlar |
| BH4 | Tetrahidrobiobterin |
| EDRF | Endotel Kaynaklı Gevşeme Faktörü |

| | |
|--------------------|----------------------------------|
| GSH-P _x | Glutatyon Peroksidaz |
| SOD | Süperoksit Dismutaz |
| VLDL | Çok düşük Dansiteli Lipoprotein |
| HDL | Yüksek Dansiteli Lipoprotein |
| LDL | Dansiteli Lipoprotein |
| CRP | C- Reaktif Protein |
| PUFA | Çoklu Doymuş Yağ Asiti |
| SLİ | Serbest Likopen İzomerleri |
| Lik | Likopen |
| L-NAME | N(G)-nitro-L-arjinin metil ester |
| ALT | Alaninaminotransferaz |
| AST | Aspartataminotransferaz |
| LDH | Laktat dehidrogenaz |
| NAC | N-Asetil Sistein |
| GSH | Glutatyon |

1. GİRİŞ

İltihabi barsak hastalığı (İBH), gastrointestinal sistemi tutan ve hastanın yaşam kalitesini etkileyen sistemik bir hastalıktır [Eray, 2009]. Genetik olarak duyarlı kişilerde, çeşitli antijenlere ya da çevresel faktörlere karşı abartılı bir immün yanıt ile meydana gelen, nedeni tam olarak bilinmeyen, kronik seyirli, durgunluk ve aktivasyon dönemleri [Sands, 2006] olan İBH, genel olarak, ağızdan anüse kadar tüm sindirim sistemini tutabilen ve önemli ölçüde mortalite ve morbiditeye neden olabilen bir grup inflamatuvar hastalıktır [Eray, 2009]. Bazı yazarlar yalnızca Crohn (CH) ile ülseratif koliti (ÜK) İBH olarak tanımlarken, bir kısmı da bakteriyel, viral, fungal ve parazitik infeksiyonlar ve ilaç ile yatrogenik oluşturulan veya radyasyon ile gelişen inflamasyonları da bu grup hastalık içerisinde tanımlamaktadırlar [Kodner ve ark., 1993].

Anemi, İBH'lerin sık rastlanan bir ekstraintestinal komplikasyondur. Anemi, genel olarak hemoglobin düzeyinin azalması şeklinde tanımlanır. İBH'de anemi nedenleri; demir eksikliği anemisi, kronik hastalık anemisi, vitamin B₁₂ ve folik asit eksikliği, hemolitik anemi ve kemik iliği süpresyonudur [Harries, 1983; Weatherall, 1984].

Demir eksikliği sonucu eritroblast gelişimi için gereken demir sağlanamaz, kırmızı hücre hemoglobinizasyonu bozulur. Kemik iliğinden mikrositik ve hipokromik kırmızı hücreler salınır. Hemoglobindeki düşüş eritropoezi uyarır ve eritropoezin artması ile daha da artan demir ihtiyacı karşılanamaz. Sonuç olarak ineffektif eritropoez oluşur [Cavill, 2002].

Laboratuvar bulguları demir depoları tükendiğinde ve demir eksikliği hipokromi ve mikrositozla sonuçlandığı zaman gelişir. Ortalama eritrosit hacmi (MCV) azalır (<80 fl, mikrositoz), ortalama eritrosit hemoglobini (MCH) azalır (<28 pg, hipokromi), ortalama eritrosit hemoglobin konsantrasyonu (MCHC) azalır. Periferik yaymada hipokromi ve mikrositoz görülür [Bublely ve Lange, 1993; Hoffbrand ve Pettit, 1994]. Serum ferritin düzeyinde azalma (<12ng/ml) demir eksikliği açısından anlamlıdır ve kesin demir eksikliği anemisi tanısı konulmalıdır. Ancak inflamasyon varlığında ferritin akut faz reaktanı gibi davranarak yükselir. İBH'de anemi varlığında aktif inflamasyon sırasında ferritin yanlış yüksek bulunabilir. Serum demir düzeyi düşük

(<30 µg/dl), total demir bağlama kapasitesi yüksektir (TDBK 350-500 µg/dl). Transferin saturasyonu (serum demiri/serum demir bağlama kapasitesi x100) azalmıştır (<%10). Kemik iliğinde eritroid seride mikronormoblastik hiperplazi mevcuttur. Kemik iliği biyopsi preparatında demir boyaması ile hemosiderin azalmış veya yoktur. Kemik iliği aspirasyonu veya biyopsisi tanı için gerekli değildir [Bublely and Lange, 1993; Hoffbrand and Pettit, 1994].

Son yıllarda likopen, barsak ve kolit ilişkisine ait birkaç çalışma yapılmıştır. Raifen ve arkadaşlarının (2004) iyodoasetamid ile oluşturdukları deneysel kolit modelinde, sıçanların (üç gün) diyetlerine 5-aminosalisilik asit ve likopen verdiklerinde oluşan inflamasyonu ve oksidatif stresi azalttıklarını ileri sürmüşlerdir. Ayrıca Martinez-Ferrrer ve arkadaşlarının (2006) Fisher 344 sıçanlarında azoksimetan ile oluşturulmuş kolon tümörlerinin, diyet olarak verilen likopen ile azaldığını bildirmişlerdir.

Altuner ve arkadaşlar tarafından sıçanlarla yapılan deneysel bir kolit modelinde (2010), metallothioneinlerin (MT) periferik kan parametrelerine doğrudan mitotik bir etki yaptığı ve bu etkinin doza bağlı olarak periferik kan hücrelerinin değerlerini artırdığı görülmüştür. Diğer taraftan koliti tedavi etmek amacıyla kullanılan yüksek dozda N(G)-nitro-L-arginin metil esterinin (L-NAME) periferik kan üzerine etkisinin oldukça az olduğu görülmüş ve iyileştirme etkisini ancak kolit şiddetinin azaldığı deneyin üçüncü gününde gösterdiği anlaşılmıştır. Bu sonuç L-NAME' nin depolanmış kan hücrelerinin salınımını sağlayabileceğini ortaya koymuştur. Bu çalışmanın sonunda 2,4,6-trinitrobenzen sülfonik asitin (TNBS) verilmesiyle, deneyin birinci gününde periferik kan değerlerinin oldukça arttığı gözlenmiştir. Ancak bu artışın depolanmış kan hücrelerinin salınımı şeklinde olduğu düşünülmektedir.

Kolitte, indüklenebilir nitrik oksit sentetazın (iNOS) aşırı aktivitesinden dolayı artan nitrik oksit (NO) ve metabolitlerinin toksik etkilerinin ortadan kaldırılmasında kullanılan iNOS inhibitörleri ve diğer kimyasal maddelerin hem yan etkilerinin fazla olması hem de tedaviye tam cevap verememesine bağlı olarak başarı sağlanamadığı belirlenmiştir [Altuner ve ark., 2010].

Yaptığımız çalışmada, sıçanlarda TNBS ile oluşturduğumuz deneysel kolitte, antioksidan özelliği iyi bilinen likopenin reaktif oksijen türlerine ve oluşan oksidatif

hasara karşı koruma sağlayıp sağlamadığını kan parametreleri ile belirlemeyi amaçladık.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. İltihabi Barsak Hastalığı

İltihabi Barsak Hastalığı (İBH), ince ve kalın barsağın çeşitli katmanlarını tutan bir hastalık grubudur. Bazı yazarlar yalnızca Crohn (CH) ile ülseratif koliti (ÜK) İBH olarak tanımlarken, bir kısmı da bakteriyel, viral, fungal ve parazitik infeksiyonlar ve ilaç ile yatrogenik oluşturulan veya radyasyon ile gelişen inflamasyonları da bu grup hastalık içerisinde tanımlamaktadırlar. CH ve ÜK, süresi ve şiddeti değişken alevlenmeler ve remisyonlar ile karakterizedirler. Genel olarak klinik seyirlerini tahmin edebilmek oldukça güçtür. CH birincil olarak ince barsağı, özellikle de ileumu tutarken, ÜK ise sadece kolon hastalığı olarak ortaya çıkar. Her iki hastalık da gerek belirti ve bulguları, gerekse seyirleri açısından genel olarak birbirlerine benzerler. Her ikisi de, barsak dışı birçok organda oluşturabildikleri komplikasyonlar ve malignite potansiyelleri nedeniyle, kolon ve rektum hastalıkları arasında önemli yer tutmaktadırlar [Kodner et al., 1993].

ÜK, kolon ve rektum mukozasını tutan, tekrarlayan inflamasyon ve ülserlerle karakterize, remisyon ve relapslarla seyreden kronik bir hastalıktır. Kadın/erkek oranı hemen hemen bütün yaş gruplarında 1'e yakındır ve en çok 15-40 yaş grubunda görülmektedir. Olguların %5'inde ailevi bir predispozisyon bulunur. Hastalığın prevalansı tüm populasyonda 20-130/100000 iken insidansı 1,3-15,1 /100000/yıl'dır. Hastalık, akut ve ağır hastalık durumları dışında yalnızca mukoza ile sınırlıdır. Hastalıklı dokuların histopatolojik incelemelerinde akut ve kronik inflamatuvar hücrelerin mukozayı infiltre ettikleri, goblet hücrelerinin azaldığı ve çok sayıda kript abselerinin bulunduğu görülmektedir. Ancak ağır durumlarda ülserle transmural olabilmekte ve CH' de görülen lezyonlardan ayrılabilmeleleri güçleşmektedirler. Klinik olarak kanlı mukuslu diyare, rektal kanama, kramp tarzı karın ağrısı, ateş, iştahsızlık, kilo kaybı gibi semptomlar ve lokal ya da sistemik komplikasyonlarla seyreder. Olguların %54'ünde hastalık rektosigmoid yerleşimli iken %27'si sol kolon tipi ve %19'u pankolit şeklindedir [Andres and Friedman, 1999; Irvine, 2001].

CH ağızdan anüse kadar gastrointestinal kanalın herhangi bir yerini tutabilen, kronik seyirli, progresif, granülamatöz inflamasyonla karakterize bir hastalıktır. Her yaşta ortaya çıkabilen CH' nin hafif bir kadın hakimiyeti vardır. Beyazlar ve Yahudilerde daha sık görülür. Hastalığın prevalansı tüm populasyonda 10-70/100000 iken insidansı 0,5-6,3 /100000/yıl'dır. En sık ileum ve kolonun birlikte tutulumu görülür. İnflamasyon, barsak duvarının tamamını ve çevredeki mezenter ve lenf bezlerini de içine alabilmektedir. Hastalığın bir özelliği de, lezyonların transmural olarak barsağı tutması ve lezyonlar arasında sağlam segmentler bulunmasıdır. Uzun dönemde bu lezyonlar barsakta kısalmalara ve striktür oluşumuna yol açabilmektedirler [Mortensen, 1994]. .

İlk kez 1932 yılında, Crohn, Ginzburg ve Oppenheimer terminal ileumda segmenter mukozal ülserasyonlar, çok sayıda fistüller, barsak duvarında aşırı bağ dokusu reaksiyonu ve buna bağlı stenoz ile seyreden bir olguyu terminal ileit olarak tanımlamıştır. Klinik olarak kramp benzeri karın ağrıları, kilo kaybı, diyare ve ateş ön plandadır. Rektal kanama, ülseratif kolitte olduğu kadar sıklıkta görülmez. Mesane, üreter, diğer barsak segmentleri gibi organlara fistüller oluşması ve perianal bölge hastalıklarının sıklıkla görülmesi hastalığın özellikleri arasındadır. Mikroskopik olarak granülomların görülmesi, akut ve kronik inflamatuvar hücrelerin infiltrasyonu ile birlikte transmural lezyonların olması tanı koymaya yardımcı olmaktadır. Birincil olarak sindirim sisteminin bir hastalığı olmasına karşın iritis, ankilozan spondilit, sklerozan kolanjit, nefrolitiazis, üriner sistem patolojileri gibi ekstraintestinal komplikasyonlar sıklıkla bulunur. Hastaların yarısında ileokolik bölge tutulur. Geri kalanların %19' unda hastalık kolonda ve %2'sinde anorektal bölgede lokalizedir. Özofagus, mide, duodenum tutulumu %3-5, sadece ince barsak tutulumu ise %29'dur [Irvine, 2001].

1989 yılında Morris ve arkadaşları deneysel kolit modeli oluşturmak için yeni bir ajan olan, TNBS, bildirmişlerdir. 5-30 mg/kg TNBS' nin 0,25 ml % 50' lik etanol ile transrektal yoldan uygulanması sonucunda kolonik mukozada ülserasyonlar ve inflamasyon tespit etmişlerdir. Bu modelde insanlarda oluşan CH bir çok histopatolojik ve klinik özellikleri gözlenmekte ve oluşan kronik inflamasyon yanıtın süresi 8 haftaya kadar uzanmaktadır. Etanol, mukoza bariyerini ortadan kaldırmak ve bu yolla TNBS'

nin barsak duvarına nüfuz etmesine yardımcı olmak amacıyla verilmektedir. Lavman şeklinde uygulanan TNBS, kovalent reaktif bir bileşik (hapten) olduğu için barsakta oksidatif hasara ve buna bağlı olarak genellikle transmural akut nekroza yol açmaktadır. Deneysel kolit modelleri üzerine, tedavi amacıyla, bir çok madde denenmiştir. Bu denenen maddelerin de bir kısmını antioksidan (AO) ajanlar oluşturmaktadır. Yapılmış olan çalışmalarda aktif ÜK' de AO enzim aktivetelerinde ve glutatyon (GSH) düzeylerinde azalma tespit edilmiştir [Nieto et al., 2000]. GSH, glutamin, sistein ve glisinden oluşan önemli bir antioksidan moleküldür. N-Asetil Sistein (NAC), bir tiol molekül mukolitik ajan olup L - sistein ve indirgenmiş glutatyonun öncülüdür. NAC hücrelerde sülfidril gruplarının kaynağı olup, OH gibi reaktif oksijen radikalleriyle etkileşerek serbest radikalleri temizler. Ayrıca NAC apoptozu önleyebilmekte, çeşitli proteinlerin aktivitelerini düzenleyerek hücre ömrünü uzatmaktadır [Mallory and Kren, 1990].

2.2. İBH' de Mukozal Hücre Hasarı

İBH' de mukozal hücre hasarına neden olabilecek etkenler; azalmış splankik kan akımı, sitokinler ve serbest oksijen radikallerinin (SOR) neden olduğu hasar, AO besinlerin alımında azalma (GLN, çinko, selenyum vit A,C,E), enteral beslenmede yetersizlik ve/veya ekzojen barsak trofik besinlerin yetersiz alınımı (GLN, kısa zincirli yağ asitleri), barsak hücrelerinin, trofik besinleri öğütme yeteneğinde yetersizlik, hormonal büyüme faktörleri etkilerine hücre sel direnç ve diğer bilinmeyen nedenler olarak sıralanabilir.

Supozituar, veya lavman şeklinde lokal steroid tedavisi, hastalığı rektumda sınırlı hastalara uygulanabilir. Steroidlerin sistemik yan etkilerden sakınmak için yeni topikal steroidler geliştirilmiştir. ÜK remisyona girdikten sonra idame tedavisinde aminosalisilatlar kullanılırlar. Bu amaçla 5 - amino salisilik asit (5 - ASA) ve sülfapiridinin birleşmesinden oluşmuş olan sülfosalazin kullanılır. CH' de ise bu ilaçların idame tedavisindeki yeri açık değildir [Akobeng, 2008].

Son zamanlarda, tedaviye dirençli aktif dönemdeki İBH' de ve CH' de remisyondaki hastaların idame tedavisinde, fistüllerde, perianal hastalıkta immüno supresif ilaçlar denenmiş ve başarılı bulunmuştur. Yapılan çalışmalar bu ajanların, steroid dozlarını azaltmada etkili olduklarını göstermişlerdir. Azothioprine, 6-merkaptopürin, siklosporin ve Metotreksat (MTX) bu amaçla kullanılan immüno supresif ajanlardır. Yine tedavide kullanılan immüno modülatör ilaçlar da etkilerini lenfositlerin aktivasyonunu ve proliferasyonunu azaltarak gösterirler. Genellikle medikal tedaviye yanıt vermeyen, fulminan gidişli olgularda bu tedavi yüksek doz uygulanarak hastayı cerrahi girişimden korumak amaçlanır [Evers et al., 1999].

ÜK tedavisinde antibiyotiklerin ise, sepsis dışında fazla kullanım alanı yoktur. Fulminan kolit ve toksik megakolon durumunda intravenöz antibiyotikler uygulanır. Bu amaçla metranidazol ve siprofloksasin kullanılabilir.

ÜK' de medikal tedaviye yanıtsız ağır ataklarda ve bu ataklar sırasında gelişen komplikasyonlarda, (perforasyon, akut dilatasyon, obstrüksiyon gibi), cerrahi tedavi endikasyonu vardır. CH' de ise cerrahi tedavi sadece komplikasyonlara yönelik olmalıdır çünkü hastalığın nüks olasılığı yüksektir.

ÜK' in cerrahi tedavisi aynı zamanda hastalık için kür de sağlar. Bu amaçla total kolektomi, ileostomi, total kolektomi-poşlu ileoanal anastomoz gibi cerrahi yöntemler tercih edilir [Evers et al., 1999].

2.3. İnflamasyon Hazırlayıcıları

2.3.1. Genetik yatkınlık

İBH' nin genetik temelli olduğunu gösteren birçok kanıt vardır. İBH olan hastaların 1. derece akrabaları arasında İBH sıklığı, genel popülasyona göre 14-15 kat daha fazladır.

Bir çok genin İBH ile ilişkili olduğu saptanmıştır; HLA-DR1-DQB1 ve DRB3*0301 allelinin CH' de, HLA-DR2'nin ise ülseratif kolitte ekspresyonu artmıştır. NOD2/CARD15 (nucleotide-binding oligomerization domain 2-caspase-recruitment domain 15) geninin ise CH ile ilgili olduğu gösterilmiştir [Hugot et al., 2001].

2.3.2. Çevresel Faktörler

İBH olan hastalarda en çok dikkat edilmesi gereken çevresel faktörlerin başında sigara kullanımı gelmektedir. ÜK sigara içmeyen ve sigarayı bırakmış insanlarda, sigara içenlere göre 2-6 kat daha fazla sıklıkta gözlenmektedir. CH' de ise sigara içme oranı daha fazla olup, sigara içenlerde daha fazla cerrahi gereksinim ve daha fazla tekrarlama riski vardır [Sands, 2006].

Oral kontraseptif kullanımının hem ÜK hem de CH gelişim riskini artırdığı düşünülmektedir.

Rafine şeker ve non-steroid anti-inflamatuvar ilaç kullanımı da CH için risk faktörleri arasında sayılmaktadır [Sands, 2006].

2.3.3. İnfeksiyöz Ajanlar

Bu konuda pek çok çalışma bulunmaktadır, ama hiçbir bakteriyel, viral, fungal ajan suçlanamamaktadır. Kızamık virüsü (paramyxovirus) granüloamatöz vaskülit ve barsakta mikroinfarkt yapması nedeniyle CH sıklığını artırdığını gösteren çalışmalar vardır. Erken kızamık aşılması ile CH sıklığının artması arasında ilişki bulunmuştur [Wakefield et al., 1993].

CH oluşumu ile ilgili en çok üzerinde durulan ajan Mycobacterium paratuberculosis'dir. Sonrasında da M. paratuberculosis ile ilgili birçok çalışma yapılmış olsa da bu hipotezi destekleyecek veya reddettirecek bir sonuca varılamamıştır [Sands, 2006].

2.4. İltihabi Barsak Hastalığında Anemi

Anemi, İBH'lerin sık rastlanan bir ekstraintestinal komplikasyondur ve hastaların genel durumunu ve hayat kalitesini kötüleştirmekte, hastaneye yatış oranını artırmaktadır [Giannini and Martes, 2006].

Anemi, genel olarak hemoglobin düzeyinin azalması şeklinde tanımlanır. Normal hemoglobin konsantrasyonu erkeklerde 13-17g/dl, kadınlarda 12-16g/dl düzeyindedir. Hemoglobin konsantrasyonu erkeklerde 13 g/dl'nin altında, kadınlarda ise 12 g/dl'nin altında olunca anemiden bahsedilir. İBH'li hastalarda anemi sıklığı literatüre bakıldığında %8.8 ile %73.7 arasındadır. İBH' de anemi patogenezinde vitamin B₁₂ ve folik asit eksikliği, ilaca bağlı kemik iliği süpresyonu, hemolitik anemi gibi faktörler yer alsa da en sık demir eksikliği ve kronik hastalık tipinde anemi görülmektedir. Bu nedenle İBH' li hastalarda anemi tanısı, aneminin tipi ve tedavisi oldukça önemlidir [Weatherall, 1984].

İBH' de anemi nedenleri; demir eksikliği anemisi, kronik hastalık anemisi, vitamin B₁₂ ve folik asit eksikliği, hemolitik anemi ve kemik iliği süpresyonudur.

2.4.1. Demir Metabolizması ve Demir Eksikliği Anemisi

2.4.1.1. Demir metabolizması

Demir her gün belli bir miktar alınması zorunlu bir mineraldir. Bedendeki demirin %60'ı eritrositlerde bulunur. Eritrositlerin yaşam süresinin ortalama 120 gün olduğu düşünülürse sürekli eritropoez ile ilişkili olarak günde yaklaşık 30 mg demir gerekmektedir. Bedene demir gıdalar ile barsaktan emilerek ve yaşlı eritrositlerin parçalanmasıyla ortaya çıkan demirin tekrar kullanıma sunulması ile sağlanır [Beşışık, 2007].

Normal bir diyetle 12-15 mg demir bulunur ve bunun %5-10'u (0.6-1.5 mg) emilir. Diyetteki demir hem (miyoglobin, kümes hayvanları ve balık) ve hem dışı (bitkiler) olmak üzere 2 formda bulunur. Hem dışı demirin emilimi mide asiti, askorbik asit ve inhibitör (fitik asit, polifenol) faktörlerin varlığından etkilenir. Hem demiri ise miyoglobinin mekanik ve enzimatik sindirimi ile ortaya çıkar ve emilim sırasındaki faktörlerden az etkilenmesinden dolayı hem dışı demire göre daha iyi emilir.

Demir duodenum ve üst jejunum enterositlerinin zarlarından emilir. Barsak yüzeyinde ferro (Fe^{+2}) değerliğine sahip demir ferri redüktaz ile ferro (Fe^{+3}) değerliğine sahip hale döner ve enterosit içine alınır. Enterosit içine geçen demirin bir kısmı depo edilmekte (ferritin) bir kısmı ise bazolateral bölgeden plazmaya aktarılmaktadır. Emilen demir plazmada transferrine bağlı olarak taşınır. Plazma demir deposu 3.5-5 gr arasındadır ve transferrin bedendeki total demirin küçük bir kısmını yansıtır.

Transferrin 2 adet demir bağlama bölgesi içerir. Fizyolojik koşullarda bu bağlanma bölgelerinden %30-40'ı doludur (transferrin saturasyonu). Transferrine bağlı demirin, eritroid öncül hücreler başta olmak üzere karaciğer ve immün hücrelere geçişi transferrin reseptörleri ile olur [Gasche et al., 2004].

İntrasellüler demir eksikliği durumunda hücrenin demir ihtiyacının karşılanması için hücredeki transferrin reseptör ekspresyonu artırılır. Hücre içinde demir ferritin formunda saklanır. Ferritin, 24 zincirli subünitten oluşan apoprotein kabuk ve içinde 4,500 atom içeren demir çekirdekten oluşur. Ferritin proteinlerin sentezinde

kullanılacak demir havuzunu sağlamaktadır. Dolaşımdaki ferritin düzeyleri, intrasellüler ferritin ve demir kaynaklarının miktarını yansıtır. İnflamasyon ve neoplazi varlığında serum ferritin konsantrasyonu artar. Ferritin inflamasyona cevap olarak akut faz proteini gibi davranır ve inflamasyon varlığında yanlış olarak yüksek düzeylerde ölçülebilir [Thomson et al., 1978].

Demir kaybı dökülen barsak ve deri hücreleri ile günde 1-2 mg' dır. Kadınlar her menstruasyon döngüsünde ekstra 10-42 mg demir kaybeder.

Demirin bedendeki en önemli rolü hemoglobinin sentezinde kullanımınıdır. Eritroid öncül hücrelerdeki hemoglobinin sentezi intrasellüler demir varlığına bağlıdır. Hemoglobinin total demirinin %60'ını taşır. Demirin metabolizması hemoglobinin, plazma demir, transferrin ve ferritin konsantrasyonları ölçümü ile izlenir [Gasche et al., 2004].

Demir bağışıklık hücrelerinin çoğalması ve işlevi için de gereklidir. Nötrofil ve makrofaj aracılı sitotoksistide gerekli olan reaktif oksijen metabolit oluşumunda demir katalizör görevi görür. Demirin eksikliği B ve T lenfositlerinin çoğalma ve farklılaşmasını etkiler. Demirin fazlalığı ise naturel killer hücre disfonksiyonu, nötrofil etkisinde azalma ve CD4, CD8 lenfosit oranında değişikliğe yol açar. Demirin yüklü makrofajlar interferon- γ cevabı, TNF- α üretimi ve NO oluşumunu azaltır. Bu durum belli oranda demirin lenfosit gelişimi için gerekli olduğunu ama fazla demir depolanmasının immün fonksiyonları ve konak direncini azalttığını göstermektedir [Weiss et al., 1995].

2.4.1.2. Demirin eksikliği anemisi

İltihabi barsak hastalığında demirin eksikliği anemisi kronik intestinal kan kaybına bağlıdır. Kronik intestinal kanamaya cevap olarak barsaktan demirin emilimi artırılrsa da günlük kaybedilen demirin miktarı emilen demirin miktarından fazla olur ve negatif demirin dengesi oluşur. İBH'de genel olarak demirin emilimi normaldir, sadece duodenum ve üst jejunum tutulumu olan CH hastalarında demirin emilimi azalır [Bartels et al., 1978].

Demir eksikliğinin sonucu olarak eritroblast gelişimi için gereken demir sağlanamaz, kırmızı hücre hemoglobinizasyonu bozular. Kemik iliğinden mikrositik ve hipokromik kırmızı hücreler salınır. Hemoglobindeki düşüş eritropoezi uyarır ve eritropoezin artması ile daha da artan demir ihtiyacı karşılanamaz. Sonuç olarak ineffektif eritropoez oluşur [Cavill, 2002].

Demir eksikliğine bağlı klinik belirti ve bulgular da oluşabilir ve bu durum anemiden bağımsızdır. Epitelyal dokuların hızlı büyüme ve hayat döngüleri için demire gereksinimleri vardır. Demir eksikliğinde bu dokular etkilenir. Glossit, ağız çevresi ve dudak bileşkesinde çatlaklar, özefagusta halka veya darlık ve midede atrofi gelişebilir. Pika, normal olmayan yemek yeme duygusudur ve demir eksikliğinde görülür. Hastalar kil, toprak (jeofaji), buz (pagofaji) gibi bazı maddeleri yemek için şiddetli arzu duyarlar. Pika, demir tedavisi ile sıklıkla birkaç günde düzeler. Koilonişi (kaşık tırnak) tırnakların kolay kırılır hale gelmesi, incilmesi, düzleşmesi ve ukurlaşmasıdır, demir eksikliğine özgü olsa da görülme oranı azdır [Beard, 2001].

Laboratuar bulguları demir depoları tükendiğinde ve demir eksikliği hipokromi ve mikrositozla sonuçlandığı zaman gelişir. Ortalama eritrosit hacmi (MCV) azalır (<80 fl, mikrositoz), ortalama eritrosit hemoglobini (MCH) azalır (<28 pg, hipokromi), ortalama eritrosit hemoglobin konsantrasyonu (MCHC) azalır. Periferik yaymada hipokromi ve mikrositoz görülür [Hoffbrand and Pettit, 1994]. Serum ferritin düzeyinde azalma (<12ng/ml) demir eksikliği açısından anlamlıdır ve kesin demir eksikliği anemisi tanısı koydurmalıdır. Ancak inflamasyon varlığında ferritin akut faz reaktanı gibi davranarak yükselir. İBH'de anemi varlığında aktif inflamasyon sırasında ferritin yanlış yüksek bulunabilir. Serum demir düzeyi düşük (<30 µg/dl), total demir bağlama kapasitesi yüksektir (TDBK 350-500 µg/dl). Transfferin saturasyonu (serum demiri/serum demir bağlama kapasitesi x100) azalmıştır (<%10).

Kemik iliğinde eritroid seride mikronormoblastik hiperplazi mevcuttur. Kemik iliği biyopsi preparatında demir boyaması ile hemosiderin azalmış veya yoktur. Kemik iliği aspirasyonu veya biyopsisi tanı için gerekli değildir [Hoffbrand and Pettit, 1994].

2.4.2. Kronik Hastalık Anemisi

İBH' de anemi nedenlerinden ikinci sırada kronik hastalık anemisi yer alır. Kronik hastalık anemisinde asıl durum demirin retiküloendotelyal sistemde tutulması, biriktirilmesi ve eritrona sunulmamasıdır. Anemi derinliği barsak inflamasyon durumu ve hastalık aktivitesi ile paralellik gösterir.

Patogeneizde rol alan faktörler şu şekilde sıralanabilir:

1. Sitokinlerin direkt etkileri: İnflamasyon sırasında açığa çıkan sitokinlerin farklı etkileri vardır. Proinflamatuvar sitokinler (TH 1 kaynaklı sitokinler), interlökin-1 (IL-1), interferon gama (IFN- γ), IL-2, IL-6, TGF (transforming growth factor) ve tümör nekroz faktörü-beta (TNF- β)'dır. Monosit-makrofaj sisteminin aktive edilmesini izleyerek açığa çıkarlar, ilikte eritroid öncü hücrelerin çoğalmasına engel olurlar, ayrıca hematokrit değerine göre eritropoietin yanıtını olumsuz etkilerler. Yine eritroid öncüllere demir sunumunun azalmasına yol açarlar [Beşışık, 2007].

2. Eritronlara demir sunumunun azalması: Eritrositlerin parçalanması ile ortaya çıkan demir eritropoezin azalması sonucu veya direkt etki ile eritroid öncül hücrelere sunulamaz ve retiküloendotelyal sistemde depolanır. Sonuç olarak serum ferritin düzeyleri artar ve barsaktan demir Emilimi azalır [Gasche, 2004].

3. Eritroid öncü hücrelerin çoğalma ve farklılaşmasının inhibisyonu: TNF- α , tip 1 ve 2 interferonlar ve IFN- γ bu durumdan sorumlu sitokinlerdir. NO' de sorumlu ajanlar arasında gösterilmektedir [Means and Krantz, 1992].

4. Eritropoetine azalmış yanıt: Kronik hastalık anemisinde eritropoetine azalmış yanıt vardır. Serum eritropoietin düzeyi ölçüldüğünde normaldir ama anemi derecesine göre göreceli olarak düşüktür. Bu durum kronik hastalık anemisine neden olan bütün hastalıkları kapsamayabilir ama Crohn hastalığı ve ülseratif kolit için gösterilmiştir. Serum eritropoietin düzeyi muhtemelen altta yatan hastalığın şiddeti ve serum sitokin konsantrasyonundan etkilenmektedir. Nitekim IFN- γ ve TNF- α düzeyi çok yüksek hastalarda yüksek dozda eritropoietin ile yanıt sağlanabilmektedir. Sitokinler böbrekten eritropoietin üretimini direkt olarak da inhibe edebilirler [Faquin et al., 1992].

5. Eritrosit ömrünün kısalması: Kronik hastalık anemisinde eritrositlerin ömrü kısalmıştır. Bu kısa sağkalım süresinin dalakta bulunan makrofajların eritrofagositoz yapmaları ile ilişkili olduğu düşünülmektedir [Fillet et al., 1989].

Kronik hastalık anemisine ait belirti ve bulguları altta yatan hastalığa ait belirti ve bulgular oluşturur. Kronik hastalık anemisi hastalığın ilk 1-2. ayında yerleşir. Anemi genellikle orta ya da hafif derecedir. Genellikle eritrosit morfolojisi normokrom normositiktir. İleri olmayan hipokromi ve mikrositoz da görülebilir. Serum demir düzeyi düşük, TDBK normal veya azalmıştır. Transferrin saturasyonu genelde azalmıştır ama demir eksikliği anemisi düzeyinde değildir. Serum ferritin düzeyi kronik inflamasyona bağlı artmıştır. Kemik iliği aspirasyonunda genellikle mikronormoblastik hiperplazi görülür. Kronik hastalık anemisine özgü bir bulgu olarak kemik iliğinde makrofaj içi demir artmış, demir içeren eritroblast (sideroblast) azalmıştır [Schreiber and Wedel, 1997].

2.4.3. Vitamin B₁₂ ve Folat Eksikliği

2.4.3.1. Vitamin B₁₂ eksikliği

Vitamin B₁₂ (kobalamin) nükleoprotein sentezi için gerekli olan kofaktördür. İnsan bedeninde metilkobalamin ve adenosil kobalamin şeklinde bulunur. Metilkobalamin homosisteinin metionine dönüşmesini sağlayan koenzimdir. Kobalamin eksikliğinde bu reaksiyon çalışmaz ve folat metabolizması da bozulur. Dolayısıyla nükleik asit sentezi bozulur. Eritrosit öncül hücrelerde DNA sentezi bozulur, nükleus olgunlaşması geri kalır, stoplazma olgunlaşması devam eder. Bu nükleostoplazmik dissosiyasyon morfolojik olarak megaloblastik deyimini ile ifade edilir [Weatherall, 1984].

Normal bir diyet yaklaşık 15 µg/gün kobalamin içerir. Günlük ihtiyaç 1-2 µg'dır. Besinlerle alınan kobalamin mideden salgılanan intrinsek faktör ile birleşerek terminal ileumdan emilir. Emilen kobalamin transkobalamin II taşıyıcı proteinine bağlanarak taşınır. Normal terminal ileumdan kobalamin emilimi 2-3 µg/gün ile sınırlıdır. Kobalamin karaciğerde depolanır. Erişkinde total olarak 2-5 mg bulunur, bunun 1 mg'ı

karaciğerdedir. Diyetle hiç alınmadığı zaman depoların tükenmesi ve kobalamin eksikliği gelişmesi için en az 3-4 yıl geçmelidir [Conner and Hoffbrand, 1994].

Kobalamin eksikliğine yol açan ana nedenler arasında gıda ile yetersiz alım, midede intrinsek faktör oluşumuna engel olacak inflamasyon veya malignite, bakteriyel aşırı gelişim, parazit gibi nedenler sayılabilir. İBH' de kobalamin eksikliği özellikle CH'de kronik ileal inflamasyon veya ileum rezeksiyonu nedeniyle olur [Schreiber and Wedel, 1997].

Klinik belirtiler başlıca hematopoetik sistem, gastrointestinal sistem ve sinir sistemini etkiler. Anemi yavaş geliştiğinden, hasta belirtileri tolere edebilir. Glossit, hazımsızlık, diyare ve zayıflama gözlenir. Nörolojik belirtiler hastaların ortalama %10' unda ve spinal kordun subakut dejenerasyonu sonucu gelişir [Conner and Hoffbrand, 1994].

Laboratuvar bulgularından, serum kobalamin düzeyi <100pg/ml'dir. Periferik yaymada makrositöz ve hipersegmente nötrofiller saptanır. Kemik iliğinde eritroblastlar megaloblastik karakterdedir. İneffektif eritropoez nedeniyle LDH ve indirekt bilirubinde artış saptanır. Pernisiyöz anemi ile kobalamin alım eksikliği veya emilim bozukluğu ayırımında Schilling testi kullanılabilir. İntramüsküler kobalamin verilerek depoları doyurulan hasta oral radyoaktif işaretli kobalamin verildikten sonra 24 saatlik idrarla atılan miktar pernisiyöz anemide %8'in altındadır [Schreiber and Wedel, 1997].

2.4.3.2. Folik asit eksikliği

Folik asit de hücre metabolizmasında önemli rol oynar ve nükleoprotein sentezi için gereklidir. Eksikliğinde nükleik asit sentezi bozulur. Eritrosit öncül hücrelerde DNA sentezi bozulur, nükleus olgunlaşması geri kalır, stoplazma olgunlaşması devam eder. Bu nükleositoplazmik dissosiyasyona morfolojik olarak megaloblastik denir [Schreiber and Wedel, 1997].

Normal diyet 500-700 mcg folat içerir. Alınan folatın %50-60'ı duodenum ve jejunumdan emilir. Karaciğerde poliglutamit formunda depolanır. Total olarak 10-15

mg depo folat bulunur ve hiç alınmadığı zaman 1-2 ayda depolar tükenir [Conner and Hoffbrand, 1994].

Folik asit eksikliği, yetersiz alım, yetersiz emilim veya her ikisinin birlikteliği nedeniyle olur. İBH' de özellikle CH' de üst gastrointestinal sistem tutulumu durumunda emilimde azalma gelişir. Ayrıca tedavide kullanılan sülfosalazin ve metotreksat da folik asit eksikliğine neden olur.

Klinik belirtilerden anemi ve gastrointesinal sisteme ait belirtiler kobalamin eksikliğine benzer ama daha belirgindir. Sinir sistemine ait belirti görülmez.

Laboratuvar bulgularından, serum folik asit düzeyi 2.5 ng/ml'nin altındadır. Periferik yaymada makrositoz ve hipersegmente nötrofiller saptanır. Kemik iliğinde eritroblastlar megaloblastik karakterdedir. İneffektif eritropoez nedeniyle LDH ve indirekt bilirubinde artış saptanır [Schreiber and Wedel, 1997].

2.4.4. Hemolitik Anemi

Hemolitik anemi periferik kandaki eritrositlerin yaşam sürelerinin kısalması sonucu oluşur. Hemoliz; eritrosite bağlı nedenler ve eritrosit dışı nedenler olmak üzere iki grupta incelenir.

İBH' de otoimmün veya 5-ASA tedavisine bağlı hemolitik anemi gelişir. Klinik belirtiler hemoglobinde hızlı azalma sonucu hastanın anemiyi tolere edememesine bağlıdır. Sarılık ve ciddi vakalarda ateş, karın ağrısı, sırt ağrısı veya siyah-kırmızı idrar görülür.

Laboratuvar bulgularından retikülositoz, indirekt bilirubinde artış, laktat dehidrogenaz düzeyinde artma ve haptoglobulinde azalma görülür. Direkt Coombs testi pozitifdir. Periferik yaymada hemolize bağlı sferositler, polikromazi, parçalanmış hücreler görülür [Schreiber and Wedel, 1997].

2.4.5. Kemik İliği Depresyonu

İBH' de 5-ASA' ya bağlı aplastik anemi için bildirilen bir kaç vaka vardır. Mekanizma net olmasa da dozdan bağımsız alerjik bir reaksiyon olduğu düşünülmektedir.

Yüksek doz 6-merkaptopürin, azathiopürin veya metotreksatın toksik kemik iliği depresyonu yaptığı gösterilmiştir. Ama İBH' de kullanılan dozlar düşük olduğundan lökopeni, trombositopeni sıkça rastlansa da ilaca bağlı anemi henüz görülmemiştir [Sandbom, 1996].

Laboratuvar bulgularından, periferik pansitopeni her üç serinin de etkilendiğini gösterir. Tanı kemik iliği biyopsisi ile konur. Kemik iliğinde hematopoietik doku azalması ve yağ doku artışı saptanır [Schreiber and Wedel, 1997].

İBH' de oluşan anemi en çok demir eksikliği ve kronik hastalık anemisi tipindedir. Demir eksikliği anemisi, genellikle kronik intestinal kan kaybı sonucu gelişir. CH' de duodenum ve üst jejunum tutulumu varlığında veya ince barsak rezeksiyonu sonrasında demir emiliminin azalması da katkıda bulunmaktadır. Aynı zamanda inflamasyon nedeniyle açığa çıkan sitokinler de demirin eritroid öncül hücrelere sunumunu engelleyerek demir eksikliğine yol açar. Demir eksikliği anemisinin tedavisi eksik olan demirin yerine konması ile olur [Oldenburg et al., 2001].

2.5. TNBS-E Kombinasyonu ile Sıçanlarda Oluşturulan Deneysel Kolit Modeli

Morris ve arkadaşları (1989) tarafından ortaya konulan bu modelde sensitize edici allerjen bir madde olan TNBS'nin etanol içinde hazırlanmış solüsyonunu (TNBS-E) sıçanlara lavman şeklinde uygulanması sonucu kolit geliştirilmiştir. Bu modelde insanlarda oluşan CH' nin birçok histopatolojik ve klinik özellikleri gözlenmekte ve oluşan kronik inflamatuvar yanıtın süresi 8 haftaya kadar uzamaktadır. Etanol, mukoza bariyerini ortadan kaldırmak ve bu yolla TNBS' nin barsak duvarına penetre olmasına yardımcı olmak amacıyla verilmektedir. Lavman şeklinde uygulanan TNBS, kovalent

reaktif bir bileşik (haptten) olduğu için barsakta oksidatif hasara ve buna bağlı olarak genellikle transmural akut nekroza yol açmaktadır. Sıçanlarda TNBS-E' nin oluşturduğu kolitin patogenezi tam olarak açıklık kazanmamasına rağmen immunolojik mekanizmaları içerdiği düşünülmektedir. Etanol yardımı ile barsak duvarına penetre olan TNBS, dokunun kendi yüksek moleküler ağırlıklı protein molekülleri ile kovalent bağlarla birleşerek "haptten modifiye antijenler" oluşturmakta ve T hücreleri aracılığı ile bu moleküllere immün yanıt oluşmaktadır. Burada oluşan hasar sonucunda makroskopik olarak kolon duvarında belirgin kalınlaşma, derin soliter veya çoklu ülserler ve mikroskopik olarak polimorfonüveli lökosit infiltrasyonu ve granülomlarla seyreden transmural inflamasyon gözlenmektedir. TNBS-E' nin lavman ile verilmesini takip eden ilk bir kaç günde fokal bazal kriptlerinde yer aldığı akut nekroz ve inflamasyon alanları göze çarpmaktadır. Bu safhayı takip eden kronik süreçte ise mononükleer hücre infiltrasyonu ön plana çıkmakta ve daha çok submukozaya sınırlı kronik inflamasyon görüntüsü saptanmaktadır [Hendrickson et al., 2002].

2.6. Nitrik Oksit

2.6.1. Nitrik Oksit'in Kimyasal, Fiziksel ve Biyolojik Özellikleri

Nitrik Oksit renksiz bir gaz olup, inorganik serbest radikal özelliğine sahip basit bir moleküldür. Diğer radikal türlerinin aksine, NO radikalinde paylaşılmamış elektron nitrojen atomu üzerinde yerleşmemiş, fakat nitrojen ve oksijen atomları üzerinde lokalize olmamış olarak bulunur. NO' nun bu özelliği, kendi reaktivitesini baskılamakta, stabilitesini artırmakta (Nathan, 1997) ve biyolojik koşullarda bilinen en düşük moleküler ağırlıklı memeli salgı ürünü olarak sentezlendiği yerlerden daha uzak yerlere reseptöre bağımlı olmadan difüzyonunu kolaylaştırdığı ileri sürülmüştür [Moncada, 1992].

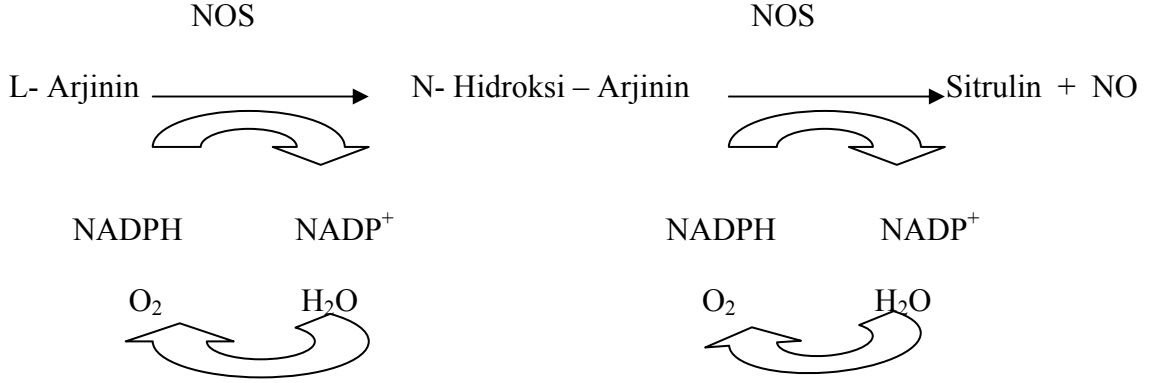
Çevresel bir toksin olmasının yanında, endojen olarak oluşan nitrik oksitin inflamatuvar barsak hastalığı, septik ve hemorajik şok ve belirli otoimmün bozukluklarda rol oynadığı ileri sürülmüştür. Reaksiyonların bu şaşırtıcı durumu

hakkında NO' nun kimyasının dolaylı ve doğrudan etkilerinin ayırt edilmesiyle deliller sağladı. Doğrudan etkiler, NO' nun doğrudan bir biyolojik molekül veya hedef ile ilişkiye girdiği reaksiyonlardır. Oysa dolaylı etkiler, oksijen (O₂) veya süperoksit (O₂⁻) ile NO reaksiyonlarından oluşan reaktif azot oksit türleriyle oluşan reaksiyonlardır.

Son 15-20 yıl içinde NO ile ilgili yapılan pek çok araştırmada NO' nun; transkripsiyon faktör aktivasyonu, demir metabolizmasını kontrol eden mRNA' ların translasyonu, mutagenез, apoptoz, glikoliz, mitokondrial elektron transport zinciri, protein açılması, deoksinükleotid sentezi, nötrofil ve trombosit adezyonu, miyeloid öncüllerinin çoğalması, T hücreleri, keratinositler ve tümör hücrelerinin çoğalması, bağışıklık savunmasının kontrolü, hipofiz hormonlarının salınımı, bronş ve sfinkterlerinin tonusu, mide, ince barsak, uterus ve kalbin kontraksiyonu, penis sertleşmesi, opioid bağımlılığı, hafıza, uyku ve kan basıncının düzenlenmesidir gibi bir çok olayda etkisi olduğu belirlenmiştir [Nathan, 1997]

2.6.2. NO Sentezi ve Metabolizması

Nitrik Oksit, insanlar, hayvanlar ve en basit canlı formlarında L- arjininin oksidasyonu sonucunda sentezlenir. L- arjininden NO'nun sentezi, nitrik oksit sentetaz (NOS) enzimi aracılığı ile iki basamakta gerçekleşir. Tepkimenin ilk basamağında arjininin guanido nitrojeni (N⁰) hidroksillenerek N⁰-Hidroksi arjinin (N-OH Arjinin) oluşur. Enzime sıkı bağlı olan ara ürün ikinci aşamada sitrulin ve NO' ya çevrilir. Her iki basamakta substrat olarak NADPH ve O₂ kullanılır [Kılınç ve Kılınç, 2003].



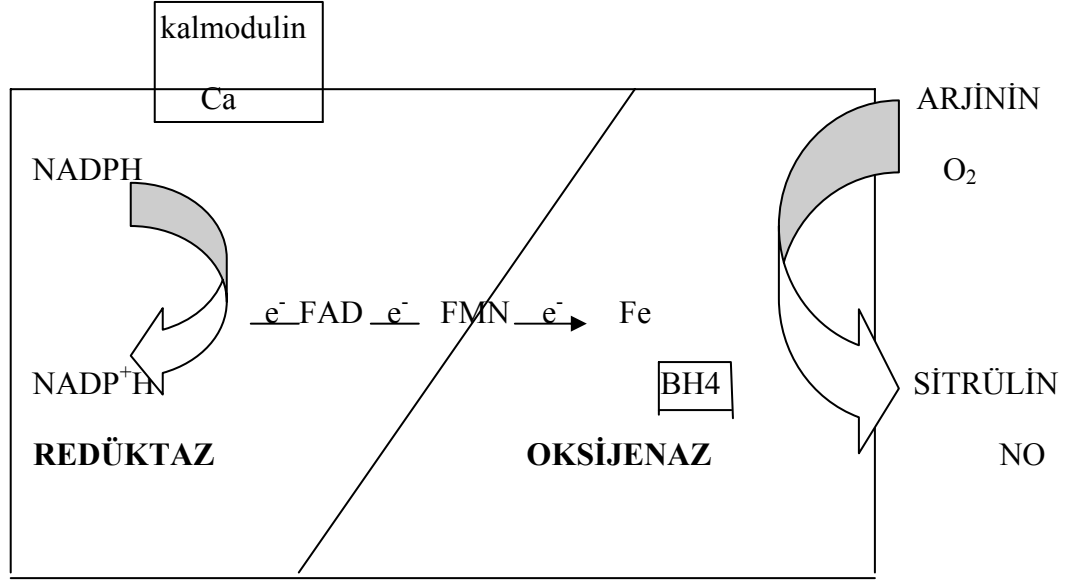
Şekil 2.6.2.1. Nitrik oksit sentetaz tarafından katalizlenen L-arjinin amino asitinden NO sentezi. Mayer and Hemmens (1997)' den değiştirilerek alınmıştır.

2.6.3. Nitrik Oksit Sentetazlar (NOS)

Nitrik oksit sentetaz enzimleri (NOS) birbirinin aynı olan iki alt birimden oluşan proteinlerdir. NOS enzimlerini kodlayan yapısal DNA (cDNA)'dan yararlanılarak üç izoformu belirlenmiş ve bunlar arasındaki benzerliğin yüksek olduğu ortaya çıkarılmıştır. Farklı izoformlar arasında %50- 60 ve farklı türler arasında aynı izoform %80-94 ve sitokrom p450 ile %60 benzerlik gösterdiği belirlenmiştir [Kılınç ve Kılınç, 2003]. NOS enzimleri amino ve karboksil (N- ve C-terminal) domain (tersiyer yapı) bölgesi olmak üzere iki farklı kısımdan oluşmuştur. Enzimin N-terminal bölgesi sitokrom p450 oksidaza yapı ve fonksiyon olarak benzer ve oksidaz domain bölgesi olarak adlandırılır. Bu bölge, hem grubu, subtrat (arjinin), tetrahydrobiopterin (BH₄) ve oksijen bağlanma bölgelerini içerir. Alt birimler arası iletişimi sağladığından dimerizasyondan sorumludur [Kılınç ve Kılınç, 2003].

Enzimin karboksil terminalinde ise, yapı ve fonksiyon olarak sitokrom p450 redüktaz enzimine benzer ve redüktaz domaini olarak adlandırılır. Bu bölge, koenzimlerden NADPH, FAD, FMN ve kalmodulin bağlanma bölgelerini içerir ve elektron transferinden sorumludur. Özellikle NO sentezi sırasında redüktaz kısım NADPH'dan elektron alır ve hem demirine transfer eder [Kılınç ve Kılınç 2003]. Oksijenaz ve redüktaz domainler yapısal, proteolizisiz ve biofiziksel çalışmalarla ayrıntılı olarak belirlendi. NOS' un üç izoformunun yapısal olarak türden türe ve

hücreden hücreye özellikle homodimer yapılarının değişiklik göstermesi ile farklı işlevleri yaptıkları ortaya çıkarılmıştır [Fischmann et al., 1999]. NOS enzimlerinin genel yapısı şekil 2.6.3.1.'de gösterilmiştir.



Şekil 2.6.3.1. NOS enzimlerinin genel yapısı. Alderton et al., (2001)' dan değiştirilerek alınmıştır.

NO sentezini katalizleyen NOS enzimlerinin fiziko-kimyasal ve kinetik özelliklerine göre yapısal (cNOS) ve indüklenebilir (iNOS) olmak üzere iki temel formu belirlenmiştir. Ayrıca cNOS' un iki formu vardır. Bunlardan biri endotelial NOS (eNOS veya NOS III) olup, ağırlıklı olarak zarsal bir enzimdir ve endotel kaynaklı gevşeme faktörünün (EDRF) sentezinden sorumludur. Bu enzimin ikinci formu ise merkezi sinir sistemi ve nöronlarda haberci molekül olarak kullanılan nöronal NOS (nNOS veya NOSI) diye adlandırılır. iNOS izoformu ise alt birim olarak kalmoduline ihtiyaç duyar. Aktivitesi için hücre içi kalsiyum derişiminin artması gerekli değildir, çünkü normal hücre kalsiyum derişiminde aktif durumda bulunur [Kılınç ve Kılınç, 2003].

2.6.4. Sindirim Sistemi ve Nitrik Oksit İlişkisi

Gastrik mukozal korumada gastrointestinal kan akımının düzenlenmesinde, mukus salgısının uyarılmasında ve peristaltik hareketin düzenlenmesinde NO' nun büyük rolünün olduğunu belirlenmiştir. Ayrıca NO' nun bir endojen mitojen, bir anjiogenez faktör, bir protoonkojen oluşum artırıcısı ve apoptozisin bir inhibitörü olarak da etkileri ortaya çıkarılmıştır [Ambs et al., 1998].

İnflamasyonun akut ya da kronik oluşumunda, makrofajlardan ve epitel hücrelerden salgılanan NO' nun etkisi; salgılanma miktarına, salgılanma şekline, yerine ve diğer bileşiklerle olan etkileşimine bağlı olarak değişiklik göstermektedir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda iNOS aktivitesinin özefagusun gastrik metaplazisinde, kronik gastritte, viral kronik hepatitte, barsak inflamasyonu ile CH ve ÜK arttığı ileri sürülmüştür [Kimura et al., 1998(b)].

NO' nun inflamasyonun şiddetini artırması ya da gelişiminde önemli bir patolojik role sahip olduğu ortaya çıkarılmıştır. NO' nun bu etkileri iNOS aktivitesinden kaynaklandığı ve NOS' un aktivitesinin interlökin- 1 β ve tümör nekrozis faktör (TNF- α) gibi sitokinlerle gerçekleştiği belirlenmiştir [MacNaughton et al., 1989].

İnflamasyonun farklı modellerinde gözlenen damar ve doku hasarının, hem oksijen hem de NO'dan kaynaklandığının belirlenmesi süperoksid dismutaz ya da NOS inhibitörlerinin kullanılması ile inflamasyonun düzeltilebileceği ileri sürülmüştür [Nathan, 1997]. iNOS' un NO' yu bloke eden seçici veya seçici olmayan iNOS inhibitörleri inflamatuvar barsak hastalıklarında kullanılmıştır. iNOS ve onun aracılığı ile yapılan çalışmalarda, NO ve peroksinitrit yakalayıcıları, ilaçlar ve p53 ile iNOS oluşumunun yeniden yapılması ve iNOS ve kofaktörlerinin inhibisyonunu içine alan stratejiler tedavi amaçlı uygulanmıştır. Özellikle barsakta iltihap oluşumunun, artmış iNOS aktivitesine bağlı olarak bereberinde mukozal lezyonlar, ülser oluşumları, intraluminal kanlanma ve barsak genişletilmesi artışlar oluşturulduğu belirlenmiştir. Kısmen seçici iNOS inhibitörlerinden merkaptotilguanidin, aminoguanidin ve N-

iminoetil-L-lisin sıçanlarda oluşturulan kolitte peroksinitritin ortadan kaldırılmasını ve iNOS inhibisyonunu sağladığı ileri sürülmüştür [Dikopoulouos, 2001].

Son yıllarda kolitle ilgili deneysel çalışmalarda oldukça seçici olarak kabul edilen ve 1400 W (N-[3(amino-metil) benzil]) adı verilen iNOS inhibitörünün diğer iNOS inhibitörlerden hem bin kat daha güçlü olduğu hem de tümör gelişimini inhibe ettiği bildirilmiştir. Kankuri ve arkadaşları (2001) merkaptoetilguanidin, aminoguanidin ve N-iminoetil-L-Lisin gibi ajanların iNOS' a oldukça ılımlı bir etki yaptığını da ileri sürmüşlerdir [Kankuri et al., 2001].

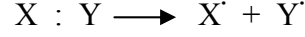
iNOS'un dönüşümsüz inhibisyonu, NADPH, FMN ve FAD için flavoprotein iodium ve BH₄ içinde N-asetil seratonin ve dikumoral adı verilen kimyasallar kullanılarak sağlanmıştır. Ancak bu inhibitörler daha çok deneysel amaçlı kullanıldığı için terapötik kullanımı oldukça sınırlıdır ve nitrik oksitin aşırı yapılmasının eşlik ettiği patolojilerde yararlı olup olmadıkları hala tartışılmaktadır. Zira bir NOS inhibitörü olan N-monometil-L-arjinin infüzyonunun insanda kan basıncını yükselttiği, NO' nun trombosit agregasyonunun inhibe edici etkiside geri çevirdiği ve agregasyonu arttırdığı saptanmıştır. Ayrıca NOS inhibitörlerinin kardiovasküler sistem bozuklukları ve immun fonksiyonlarda aksamalara neden olduğu düşünülmektedir [Kurose et al., 1997].

2.7. Serbest Radikaller

Dış orbitallerinde bir ya da daha fazla paylaşılmamış elektron içeren, aşırı derecede etkin ve kısa ömürlü moleküller serbest radikaller olarak adlandırılırlar. Serbest radikaller bu özelliklerinden dolayı tüm hücre bileşenleri ile etkileşebilme özelliğine sahiptir [Uysal, 1998].

Serbest radikaller canlılarda metabolizma yan ürünü olarak veya ilaçlar ve diğer zararlı kimyasal maddeler ile çevresel etkilerle meydana gelebilirler [Cross et al., 1987]. Serbest radikaller 3 farklı yol ile meydana gelebilirler [Akkuş, 1995];

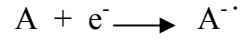
1. Kovalent bağlı normal bir molekülün, her bir parçasında ortak elektronlardan birinin kalarak homolitik bölünmesi;



2. Normal bir molekülden tek bir elektronun kaybı;



3. Normal bir moleküle tek bir elektronun eklenmesi.



Serbest radikallerin oluşum hızı ile inaktivasyon hızı denge halinde olduğu sürece serbest radikallerin canlı üzerinde herhangi bir etkisi olmamaktadır. Bu denge halindeki durum herhangi bir sebeple bozulur ya da bu bileşiklerin oluşum hızı inaktivasyon hızından yüksek olursa oksidatif stres meydana gelmekte ve serbest radikallere bağlı hücre hasarı ortaya çıkmaktadır [Uysal, 1998].

2.7.1. Serbest Radikallerin Biyolojik Önemi

Serbest radikallerin başlıca kaynağı moleküler oksijendir [Batrelli et al., 1972]. Canlı içerisinde oluşan Serbest Oksijen Radikalleri (SOR) sadece hücre içerisinde substrat ile birleşerek hasara neden olmaz, aynı zamanda bağlandıkları moleküllerin hücre içerisinde çeşitli yan metabolit oluşumuna sebep olarak da hasara neden olabilirler. Örneğin; oksijenin redüksiyonu ile negatif yüklü bir ara ürün olan süperoksit ($O_2^{\cdot -}$) radikali oluşur. Süperoksit radikalinden ise spontan ya da enzimatik dismutasyon ile ikinci bir ara ürün olan hidrojen peroksit (H_2O_2) ortaya çıkar. Hidrojen peroksitin bir dizi reaksiyonu sonucunda ise hidroksil radikali ($OH\cdot$) oluşur [Fridovich, 1983].

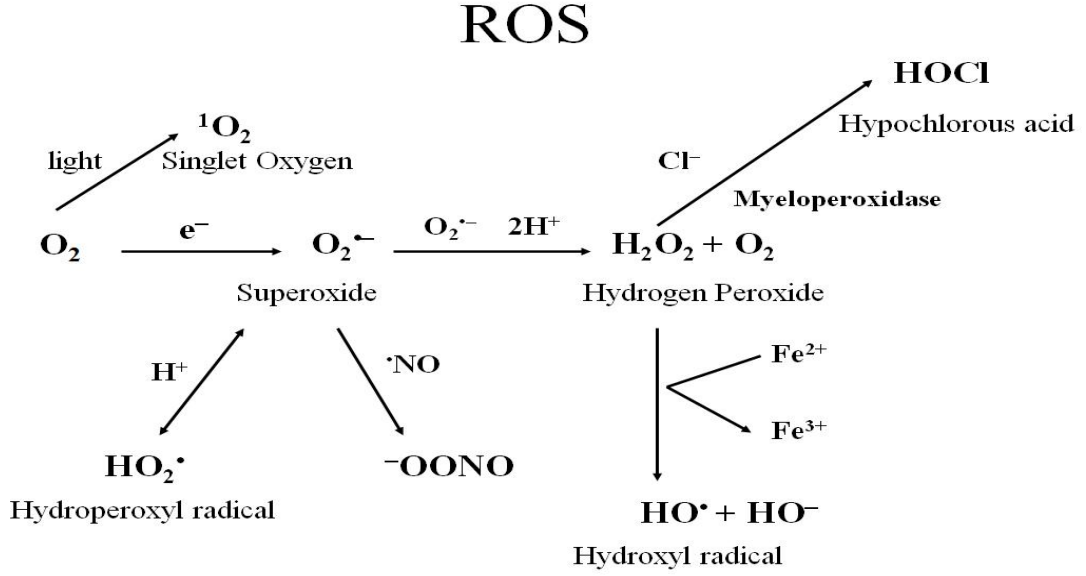
2.8. Serbest Oksijen Radikalleri

Serbest Oksijen Radikalleri (SOR) nükleik asitler, proteinler, karbohidratlar ve lipitleri de kapsayan birçok biyolojik molekül ile reaksiyona girme özelliğindedir [McMichael et al., 2004]. Normalde hücrelerde oluşan SOR formlarının temel kaynağı elektron taşıma zincirinden sızan elektronlardır. Mitokondrilerde kullanılan oksijenin yaklaşık %90-95' i son ürün olarak su ve moleküler oksijene dönüştürülürken, kalan %5-10' u SOR meydana getirir. SOR üretimi; elektron transferindeki yüksek verimlilik ve metal iyonlarının SOR yakalama yetenekleri sayesinde minimum düzeyde tutulur. Hücre içerisindeki diğer SOR kaynakları arasında, endoplazmik retikulumlardaki sitokrom P450, lipoksijenaz, siklooksijenaz, ksantin oksidaz ve NADPH oksidaz sayılabilir [Curtin et al., 2002].

Canlıların yapı taşlarını oluşturan tüm moleküller SOR hasarına yatkın olsalar da bu hasardan en çok etkilenen moleküller lipitlerdir. Bu durumun sebebinin, lipitlerin çift bağ yapma eğiliminde olmaları ve lipitlerin hücre zarının her yerinde bulunmaları olduğu düşünülmektedir (Kelly, 2001). Memeli hücreleri, oksidatif strese oldukça elverişli olan çoklu doymamış yağ asidi (PUFA) miktarı açısından oldukça zengindir. Bu PUFA' lar trigliserit ve fosfolipitlerin yapı taşlarını oluşturan diğer yağ asitleri formu ile birlikte, linoleik ve araşidonik asiti de kapsar [Acworth et al., 1997].

2.8.1. Hücrede SOR oluşum yolları

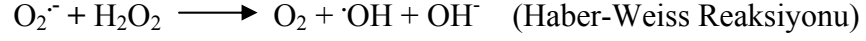
Başlangıç olarak SOR, ya diğer bir radikal ile reaksiyona girerek kovalent bir bağ kurar, ya da daha yaygın olarak, radikal olmayan bir başka molekülle reaksiyona girer (2.8.1.1.) [Pratico, 2001].



Şekil 2.8.1.1 Hücrede SOR oluşum yolları.

Serbest radikaller radikal olmayan bir başka molekül ile reaksiyona girdiklerinde, radikal olmayan molekül bir elektron kaybederek serbest radikale dönüşür. Bu mekanizma hücre zarlarında meydana gelen yüksek miktardaki hasarı tetikleyen zincirleme reaksiyonların başlangıcı ya da temelidir. Bir radikal bir başka radikal ile birleştiğinde oluşan yeni ürün bir önceki radikalden daha fazla yıkıcı etkiye sahip olabilir. Örneğin; nitrik oksit (NO) süperoksit ($\text{O}_2^{\cdot -}$) ile birleştiğinde meydana gelen peroksinitrit radikali (OONO^{\cdot}) hidrojen peroksitten (H_2O_2) 2000 kat daha fazla hasara neden olmaktadır. Bir başka deyiş ile iki radikalın birleşmesi zincirleme reaksiyonların başlamasına sebep olur. Lipitler ile SOR etkileşimi serbest demir atomu varlığında lipit peroksidasyonu ile sonuçlanır [Halliwell, 1999].

Serbest haldeki Fe^{+2} H_2O_2 ile reaksiyona girerek hidroksil radikali oluşturur (Fenton reaksiyonu). Hidroksil radikali bir başka şekilde, H_2O_2 'nin, $\text{O}_2^{\cdot -}$ radikali ile birleşmesi ile meydana gelir ki bu reaksiyon da Haber-Weiss reaksiyonu olarak adlandırılır [Valko et al., 2007].



Lipit peroksidasyonunu başlatan iki temel serbest radikal, hidroksil (OH^\cdot) ve peroksinitrit radikalidir (OONO^\cdot). Hidrojen peroksitin metallerle birleşmesi ile OH^\cdot , $\text{O}_2^{\cdot-}$ 'nin NO ile birleşmesi ile de OONO^\cdot oluşur. Peroksi radikal (RO_2^\cdot) formlarının oluşumu ile sonlanan lipit peroksidasyonu, OH^\cdot ve OONO^\cdot ' in PUFA' lardan bir proton çıkarılması ile başlatılır. RO_2^\cdot ; hücre zarındaki diğer çoklu doymamış yağ asitlerine saldırarak lipit peroksidasyonundaki zincirleme reaksiyonları tetikler. Bu zincirleme reaksiyonlar, substrat tükeninceye (ör; hücre zarındaki lipitler) ya da RO_2^\cdot ' nin bu zincirleme reaksiyonlarını kırabilecek (E vitamini gibi) bir antioksidan molekül ile karşılaşınca kadar devam eder.

Lipit peroksidasyonu, hücrelerdeki enzim sistemleri ve reseptörlerinin değişimine, iyon kanallarındaki değişimlere ve kalsiyum ile diğer iyonların zardan geçişinde artışa neden olarak, hücre zarlarında şiddetli hasara neden olur. Buna ek olarak lipit peroksidasyonu son ürünlerinin, inflamasyon ve apoptozu başlattığı, tiol içeren bileşikleri inaktive ettiği de düşünülmektedir [Acworth et al., 1997].

2.9. Antioksidanlar

Antioksidanlar (AO) hem direkt hem de dolaylı olarak hücre içerisinde meydana gelen toksik radikal reaksiyonların oluşturduğu oksidatif hasarın, ksenobiyotiklerin ve karsinojenlerin, olumsuz etkilerine karşı hücreleri koruyan moleküllerdir.

Antioksidanlar başlıca dört yolla oksidanları etkisiz hale getirir [Gökpınar ve ark., 2006]:

1- Süpürme etkisi (Scavenging): Oksidanları daha zayıf bir moleküle dönüştürerek etkisizleştirir. Oksidan enzimler ve mikromoleküller bu yolla etki eder.

2- Söndürme etkisi (Quenching): Oksidanlara bir hidrojen aktararak inaktive etmesine denir. Vitaminler, flavanoidler, timetazidin ve mannitol bu şekilde etki eder.

3- Zincir reaksiyonlarını kırma etkisi (Chain Breaking): Hemoglobin, serüloplazmin ve ağır metal oksidanları kendilerine bağlar ve inaktive eder.

4- Onarma etkisi (Repair): Oksidatif hasar görmüş biyomolekülü onarırlar.

Doğal AO' lar arasında enzimler (süperoksit dismutaz-SOD, katalaz-CAT, glutatyon peroksidaz- GP, glutatyon redüktaz, sitokrom-C oksidaz, hidroksiperoksidaz, makromoleküller (serüloplazmin, transferrin, ferritin, miyogloblin, heptoglobilin) ve mikromoleküller (betakaroten, A vitamini, C vitamini, E vitamini, tokoferoller, tiol içeren glutatyon (GSH), N-asetil sistein, metionin, kaptopril, ubiquinon) sayılabilir [Hilmi, 1994]. AO' lar, lipitler, DNA ya da proteinlerin oksidasyonunu önleyen ya da geciktiren moleküller olarak tanımlanırlar [Halliwell et al., 1999]. Vitamin C, E, A, beta karoten, metallothionein, NADPH, adenosin, koenzim Q-10, resveratrol, glutatyon, glutatyon peroksidaz, katalaz, süperoksit dismutaz, polifenoller, flavanoidler vb. maddeler bu grupta yer alırlar. Bu moleküllerden, süperoksit dismutaz, katalaz ve glutatyon peroksidaz hücre içi enzimatik işleve sahip antioksidanlardır. Hücrede SOR üretimini engelleyen bu enzimler, pek çok memeli hücrelerinden izole edilmişlerdir [Mates, 2000].

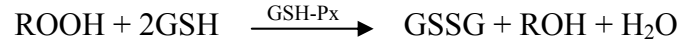
Küçük molekül ağırlığına sahip olan AO' lar, suda çözünen (askorbik asit, ürik asit, bilirubin, glutatyon, çinko ve selenyum) ve yağda çözülebilenler (tokoferoller (E vitamini), β -karoten, ubiquinol-10 (koenzim Q-10) ve, likopen) olmak üzere iki grupta toplanırlar.

Hücre zarlarının lipit tabakalarında yer alan tokoferol ve β -karoten, lipit peroksidasyonunda meydana gelen zincirleme reaksiyonları baskılar ya da durdururlar. Bedende hücreler arası sıvı içerisinde ise askorbik asit, bilirubin, transferrin, heptogloblin, albumin, ürat ve serüloplazmin gibi sayısız AO karakterli molekül bulunmaktadır [Halliwell, 1999].

Memeli hücrelerinde sentezlenen ve hücre içi AO enzim olan glutatyon peroksidazın (GSH-P_x), SOR formlarına karşı ilk savunma mekanizması olduğu düşünülmektedir. GSH-P_x, substrat olarak glutatyonu (GSH) kullanarak H₂O₂' yi suya

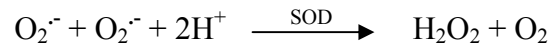
ve oksijen molekülüne dönüştüren sülfürlü bir tripeptittir (glisin, sistein, glutamin) [Flohe, 1980]. GSH-P_x' in hücre içerisinde, kofaktör olarak selenyumu kullanarak H₂O₂ ve RO₂' yi dönüştüren ve kofaktör olarak selenyumu kullanmadan H₂O₂' nin redüklenmesini katalizleyen iki formu bulunmaktadır.

Doku içerisindeki GSH'nin azalması ile oksidatif hasar belirlenebilir. Bu durum oksidatif hasara maruz kalan sıçan hepatositlerinde meydana gelen GSH seviyesindeki azalma ile gösterilmiştir [Kurose et al., 1997].



Hücrelerde meydana gelebilecek SOR hasarına karşı ikinci savunma hattını oluşturan, E vitaminin de dahil olduğu tokoferol ve trienoller, α -tokoferoller, hücre zarının yapısını oluşturan lipitler içerisinde bol miktarda bulunurlar. E vitamini, hücre zarının iç kısmında, PUFA' ların bol bulunduğu lipofilik bölgede yer alarak lipit peroksidasyonu sırasında meydana gelen zincirleme reaksiyonları durduran bir serbest radikal tutucu olarak görev yapar. Bir lipit peroksidasyon dalgası hücre zarı üzerinde konumlanmış olan E vitaminine ulaştığında, E vitamini serbest radikali oksitleyerek etkisiz hale getirir ve böylece PUFA' ları lipit peroksidasyonundan korur. Bu durumda daha az reaktif olan E vitamini, C vitamini ile H₂O varlığında birleşerek E vitamini tekrar eski haline dönüşür. Suda çözünebilir bir AO olan C vitamini, ya direk olarak SOR' u yakalayıp ya da E vitamininin eski halini almasını sağlayarak iki farklı şekilde AO savunmada görev alır [Marino, 1998].

Bir diğer hücre içi AO olan SOD ise aktif bölgesinde kofaktör olarak magnezyum, çinko ya da bakır içeren bir oksidoredüktazdır. SOD, O₂^{-•}'i O₂ ve H₂O₂' ye dönüştürür.



Canlı içerisinde bulunduğu yerler, sitozol (kofaktör olarak bakır ve çinkoyu kullanır), mitokondri (kofaktörü magnezyumdur) ve hücre dışındaki yüzeylerdir

(kofaktörü çinko ve bakırdır). Mitokondrial SOD' un antioksidan savunma sisteminde temel rol oynadığı düşünülmektedir [Baskın and Salem, 1997].

Katalaz peroksizomlarda yer alan, H₂O₂' yi O₂ ve H₂O' ya ayrıştıran bir proteindir.



SOD, O₂'yi H₂O₂' ye, katalaz enzimi de H₂O₂' yi O₂ ve H₂O' ya ayrıştırarak birlikte iş görürler. Katalaz, düşük H₂O₂ konsantrasyonlarında alkol ve askorbatı kullanarak peroksidaz aktivitesi gösterebilir. Katalazın indirgeyici aktivitesi, H₂O₂, metil ve etil hidroperoksitleri gibi küçük moleküllere karşıdır. Büyük moleküllü hidroperoksitlere etki etmez [Chaudiere and Ferrari, 1999].

2.10. Karotenoidler

Karotenoidler tetraterpen ailesinden olup 600' den fazla doğal çeşidi bulunmaktadır. Hayvan ve insanlarda sentezlenmeyip dışarıdan besinler ile alınmaktadır. Karotenoidler yapısal olarak; yalnız hidrojen ve karbon atomu içeren karotenoidler ve yapılarında en az bir oksijen atomu taşıyan oksokarotenoidler olmak üzere iki sınıfa ayrılır.

İnsan ve hayvanlarda özellikle likopen ve β-karoten, diğer AO' larla beraber veya onları tetikleyerek peroksil ve singlet oksijen radikallerinin etkisi ile oluşan oksidatif sürece karşı rol oynarlar. Karotenoidlerle ilgili yapılan in vivo hayvan deneylerinde ve insanlarda in vitro kanser hücrelerinin inhibisyonunda rol oynadığı belirlenmiştir (Amir et al., 1999). Özellikle likopenin akciğer, kolon, göğüs ve prostat kanserlerinin oluşumunu engelleyen besinlerden olduğu bir çok araştırmacı tarafından kabul edilmiştir [Giovannucci, 1999].

2.11. Likopen

2.11.1. Likopenin Genel Özellikleri

Domates (*Lycopersicon esculentum*), dünya çapında yaygın olarak tüketilen bir sebzedir. Son yıllarda yapılan çalışmaların, içeriğinde domates bulunan besin maddelerinin tüketiminin sindirimi kolaylaştırdığı prostat kanseri riskini azalttığı sonucunu ortaya çıkarması bilim insanlarının dikkatini bu sebze üzerinde yoğunlaştırmıştır.

Domates kayda değer miktarda likopen ve β -karoten içerir, iyi bir C vitamini kaynağıdır ve kafeik asit, klorojenik asit, ruti ve naringeninden oluşan bir çok polifenolü içermektedir. Bunların yanında domates E vitamini ve iz elementlerden selenyum, bakır, manganez ve ve çinko gibi antioksidan enzimlerin kofaktörlerini içermektedir [Pellegrini et al., 2000].

Önemli bir karotenoid olan likopen ise en fazla domateste olmak üzere; karpuz, pembe greyfurt gibi meyve ve sebzelerde bulunur ve onlara kırmızı rengini verir [Yaping et al., 2002]. Karotenoidlerin AO özellik ve işlevleri onların kimyasal yapılarından kaynaklanır. Çünkü bu yapıda tekli ve konjuge çift bağlı bir sistemde 40 C üniti (C=C) kuyruk kuyruğa bağlanarak tetraterpen yapıda uzar. Bu özellik de onların singlet oksijen (O_2^-) toplamalarına izin verir [Kurt, 2005].

Bu radikal toplama özellikleri sayesinde kanser, kalp rahatsızlıkları ve dejeneratif göz hastalıkları gibi ciddi rahatsızlıklara karşı koruyucu etkilerinin olduğu birçok epidemiyolojik çalışmada gösterilmiş. Bununla birlikte likopenin biyolojik sistemlerdeki serbest oksijenin (O_2^-) en önemli önleyicilerinden biri olduğu gösterilmiştir. Benzer epidemiyolojik sonuçlar domates tüketimi ile mide, barsak sistemi, pankreas, mesane, serviks ve akciğer kanserlerine yakalanma riskinin de azaldığını göstermektedir [Hasler, 2000].

İnsanlar tarafından bitkisel besinlerle alınan karotenoidler, A-vitamini öncülü olarak görev yaparlar, bunların başlıcaları α -karoten, β -karoten ve β -kriptoksantindir.

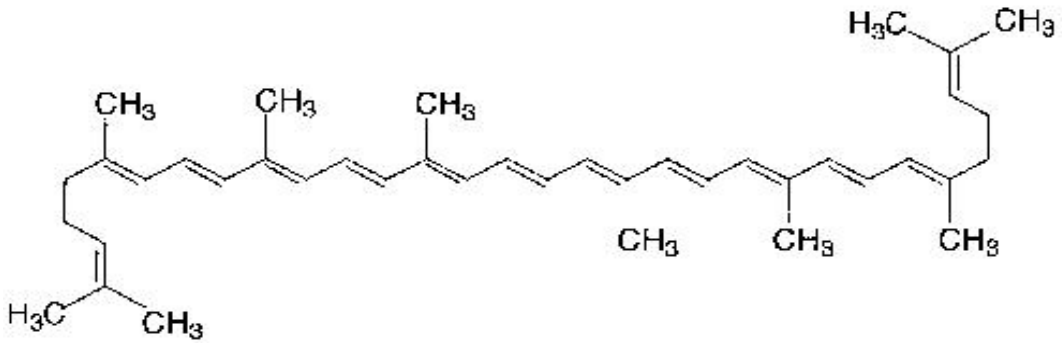
En fazla bulunan ve en etkili olanı β -karotendir. β -karoten A vitamin öncülü olma özelliği yanında biyolojik önemi lipit AO' su olması ve özellikle singlet oksijen olmak üzere serbest radikalleri nötralize etmesidir [Aşıcıoğlu, 2005].

Likopen pro-vitamin A aktivitesine sahip değildir, insan serumunda da bulunur. Likopen β -karotene göre in-vitro sistemlerde AO olarak daha büyük radikal toplama aktivitesine sahiptir.

Likopeni de kapsayan diyetle bağlı AO' ların reaktif oksijen türlerini inaktive ettiği ve oksidatif hasara karşı koruma sağlayarak, prostat kanserinin önlenmesinde potansiyel moleküller olabilecekleri düşünülmektedir. Bunun yanında domates ve domates ürünlerinin, bazı kanser tiplerinin ve plazma lipit peroksidasyonun gelişimi ile ters bir ilişki göstermesi de likopenin AO özelliklerine bağlanmıştır [Pellegrini et al., 2000].

2.11.2. Likopen'in Yapısı, Bulunurluğu ve Taşınması

Likopen düz bir halka halinde dizilmiş 11 adet çift ve 2 adet tekli bağ içeren hidrokarbon zincirinin açık formundan oluşur. Alfa karoten zincirinin sonunda açık bir beta halkası bulunur (Şekil 2.11.2.1.). Kimyasal reaksiyonlarda yüksek veya düşük enerjide bu bağlar *trans* formunda mono veya *cis* izomerasyonuna maruz kalabilir. Likopen genellikle all- *trans* ve 5-*cis*, 9-*cis* ve 15-*cis* izomeri formu ile tanınır.



Şekil 2.11.2.1. Likopenin kimyasal yapısı.

İnsan plazmasında en yüksek düzeylerde bulunan karotenoidlerden olan likopenin yarı ömrü 2-3 gündür. Likopen doğal likofilik karakterde olduğundan düşük dansiteli lipoprotein (LDL) ve çok düşük dansiteli lipoprotein (VLDL) yapılarında yer alırken yüksek dansiteli lipoproteinlerde (HDL) bulunmaz. Diyet içerisindeki likopenin başlıca kaynakları domates ve bu sebzededen elde edilen ketçap, sos ve domates suyu gibi ürünlerdir [Hadley et al., 2003]. Domateste likopen düzeyleri domateslerin çeşitleri ve olgunluklarına göre 0.85-13.6 mg/100gr arasında değişiklik gösterebilir. Ham domateste likopenin trans izomeri fazla iken, pişirilmiş ve konserve domateslerde cis izomeri daha yoğundur. Trans likopen ve beta-karotenin -80 °C de dondurulmuş besinlerde konserve şeklinde üç yıl sağlam olarak kaldığı rapor edilmiştir [Thomas et al., 1998].

Likopen içeren karotenoidler lipit miselleri ile birleşerek barsak mukoza yüzeyinden pasif difüzyon emilir. Likopen şilomikron yapıları dahil edilerek karaciğere taşınmak üzere lenfatik sisteme bırakılır ve en fazla hepatositler ve az miktarda ise dalakta birikir [Ferreira et al., 2000].

2.11.3. Likopenin Etkileri

Likopenin etkilerini genel olarak; antioksidatif etki, antikarsinojik etki ve antiinflamatuvar etki olmak üzere üç ana başlıkta toplayabiliriz.

2.11.3.1. Likopen'in antioksidatif etkisi

Çeşitli stres faktörleri ile açığa çıkan reaktif oksijen ve nitrojen türleri lipitler, proteinler ve DNA gibi kritik hücrel biyomolekülleri etkileyerek osteoporoz, kardiyovasküler, kanser ve sindirim sisteminde akut ya da kronik hastalıklara olan yatkınlığı artırmaktadırlar. Bu sebeple AO' ların besinler yoluyla alınması stratejik moleküllerin oksidatif zarardan korunmasında önemli rol oynadığı ileri sürülmüştür [Ames et al., 1995]. Plazmanın AO kapasitesinin, AO bileşiklerin konsantrasyonlarına ve sinerjilerine bağlı olduğu ve bununda oksidatif zarara karşı lipoproteinlerle

savunmada suda çözünen ve lipofilik AO' lar arasında var olan etkileşimden kaynaklandığı saptanmıştır [Harats et al., 1991].

Karotenoidler diğer serbest radikallerin oluşumuna sebep olan singlet oksijeni (O_2) ortadan kaldırmada etkilidir. Singlet oksijenin giderildiği süreçte enerji likopen molekülüne aktarılır. Değişim sırasında enerji bakımından zengin bir bileşik oluşur. Bileşikteki likopen fiziksel dönme veya ısınma şeklinde enerji dağılması ile eski haline döner ve başka serbest radikalleri ortadan kaldırmak için hazır şekilde bileşikten ayrılır. Likopen in vitro koşullarda güçlü bir AO özellik gösterirken, in vivo ortamlarda DNA, protein ve lipidlerin oksidasyonuna karşı koruyucudur. Likopenin in vivo ve in vitro şartlarda oksidatif DNA hasarını azalttığı saptanmıştır [Matos et al., 2001]. Bowen ve arkadaşları (2002) da likopen bakımından zengin diyetin prostattaki oksidatif DNA zararını azalttığını tespit etmişlerdir. Ayrıca yapılan klinik çalışmalarda domates tüketiminin, insan lökositlerinde oksidatif DNA hasarını önlediği saptanmıştır [Porrini and Riso, 2000].

2.11.3.2. Likopen'in antikanserojen etkisi

Likopenin antikanserojenik etkilerini; hücresel döngüyü durdurucu etki, hücreler arası birleşme yerlerinde (gap-junction) haberleşmeyi artırıcı etkisi ve IGF-1 Sinyal iletimini inhibe edici etkisi olmak üzere üç ana başlık altında toplamak mümkündür.

a.) Hücresel döngüyü durdurucu etkisi

Yapılan araştırmalarda likopenin prostat (Obermuller-Jevic et al., 2003) ve uterus (Şahin ve ark., 2004) kanser hücrelerinin gelişimlerini baskıladığı ileri sürülmüştür. Likopen, hücre gelişimindeki D1 döngüsünü düzenleyerek hücresel döngüdeki G0/G1 fazı arasında tutukluğa öncülük ettiği saptanmıştır. G0/G1 fazı arasında tutukluk likopen ile tedavi edilen lösemi hücrelerinde (Amir et al., 1999) ve endometrial kanser hücrelerinde [Nahum et al., 2001].

b.) Hücreler arası birleşme yerlerinde haberleşmeyi artırıcı etkisi

Likopenin hücreler arası birleşme yerlerindeki haberleşmede etkisinin olduğu ve doku homeostazında anahtar rol oynadığı ortaya konmuştur [Saez et al., 2003].

c.) IGF-1 Sinyal iletimini baskılayıcı etkisi

Serum insülin benzeri büyüme faktörü 1 (IGF-1) konsantrasyonundaki artış prostat kanseri gibi kanser tiplerinde önemli rol oynar [Furstenberger and Senn, 2002]. IGF-1 kan seviyesini yüksek oluşu akciğer, kolon, rektum ve prostat kanseri risklerinin artışı önceden haber veren belirteçlerdendir. Likopen, MCF-7 göğüs kanser hücrelerinde uyarılmış IGF-1 artışı önemli derecede düşürmüştür. İnhibisyon gelişimi G1/S hücre döngüsünün ilerlemesinin gecikmesiyle ilişkilidir. Bu etki IGF-1 bağlayan proteinlerin likopenle düzenlenebileceğini ileri sürmüşlerdir [Karas ve ark. 2000]. Ayrıca Siler ve arkadaşları (2004) sıçan prostat kanser modelinde yaptıkları çalışmada besinlere 200 ppm likopen eklenmesi ile prostat tümörlerindeki lokal IGF-1 ekspresyonunun düşürüldüğünü saptamışlardır.

2.11.3.3. Likopen'nin antiinflamatuvar etkisi

Likopen, retinol, α -tokoferol ve karotenoidlerin oksijen radikallerini yok etme kapasitesi önemli AO özelliklerindedir. Likopen ve bazı AO vitaminler ile C-reaktif protein (CRP) seviyesini belirleyen sistemik inflamasyon tepkimelerin arasında ters bir ilişki bulunduğu belirlenmiştir. Yapılan araştırmalar kanser ve kardiyovasküler hastalıkların inflamasyon ve koagülasyon ile ilişkili olduğunu göstermiştir. Likopen enfeksiyöz etkenlere karşı savunma mekanizmalarını aktive ederek antiinflamatuvar etki gösterir. Likopen siklooksijenaz ve lipooksijenaz enzimlerini düzenleyerek proinflamatuvar moleküllerden prostoglandin, prostosiklin, tromboksan ve lökotrien sentezini baskılayarak yangıya yol açan reaksiyonları önlediği ileri sürülmüştür [Pruthi et al., 2003].

2.11.4. Likopen – Barsak- Kolit İlişkisi

Oluşabilen kronik hastalıkların tedavisi için de farmasötik AO hem sentetik hem de doğal preparatlar yapılarak kullanılmaya başlanmıştır. Dolayısıyla araştırmacılar daha çok bitkilerdeki AO maddeleri belirleyerek, kronik hastalıkların tedavisinde kullanmaya başlamışlar ve önemli sonuçlar elde etmişlerdir. Bu hastalıklardan biri de kolonda başlatıp rektuma kadar yayılabilen ve oluşum nedeni hala tam olarak bilinmeyen kolittir.

Düzenli çalışan bir metabolizmada mitokondriyel sitokrom sistemi, sitozoldeki organelleri zararlı etkilerden korur. Bu sistemin yetersiz kaldığı durumlarda doğal enzimler devreye girer. Enzimlerce etkisiz hale getilemeyen oksidanlar ilk olarak hücre zarındaki lipitleri etkileyerek ‘lipit peroksidasyonu’ nu başlatırlar. Lipit peroksidasyonu, zarda bulunan çoklu doymuş yağ asitlerinin (PUFA) serbest oksijen radikalleri tarafından peroksitler, alkoller, aldehitler gibi çeşitli ürünlere yıkılması reaksiyonudur ve sonuçta ortaya çıkan biyo-aktif aldehitler hücre hasarına neden olduğu belirtilmiştir [Benzer ve Ozan, 2003]. Vitamin E, Selenyum, Vitamin C ve karotenoidler AO maddeler, metabolizmada çevresel faktörler, ilaç veya ksenobiyotikler tarafından oluşturulan oksidatif hasarlara karşı koruyucu etkilere sahip olduğu ileri sürülmüştür [Raifen et al., 2004].

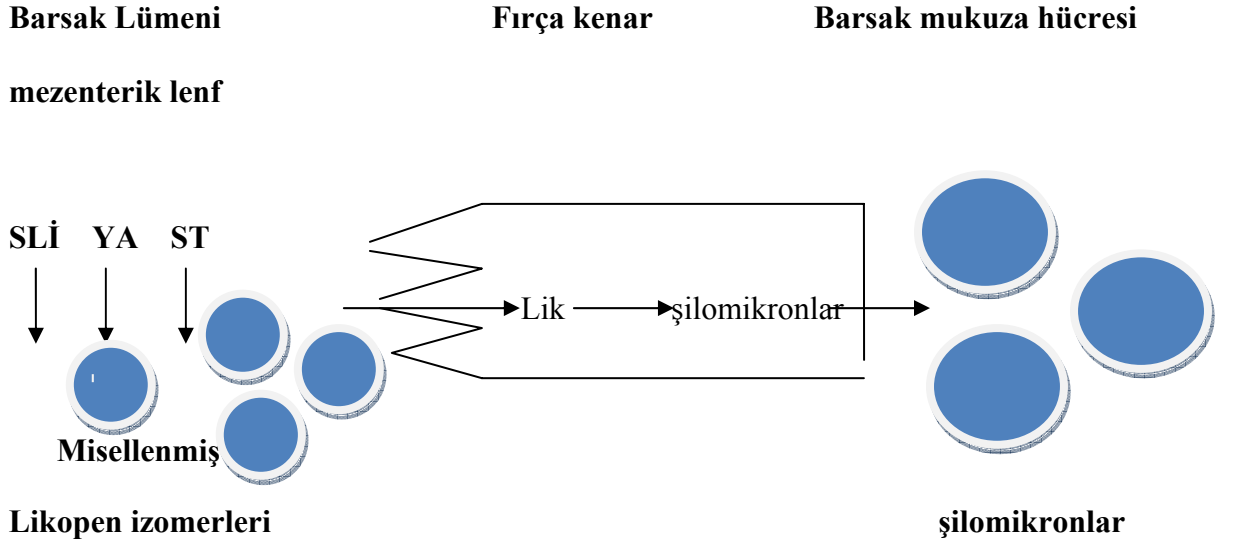
Karotenoidler insanda ince barsakta %5-50 oranında pasif difüzyon ile emilir. Bu emilim oranında diyetdeki yağ miktarıyla ilişkili olduğu açıklanmıştır. Karotenoidler hücreyi oksidatif stresten, triplet molekülleri ve singlet oksijeni süpürerek, serbest radikalleri baskılayarak koruduğu bildirilmiştir [Tee, 1992].

Karotenoidlerin oksidatif stres üzerine etkisine dair pek çok araştırma yapılmıştır. Domates ve domatesten elde edilen ürünler likopen ve diğer karotenoidleri içerir. Likopen, bir alifatik karbondur ve doğal olarak bulunan yaklaşık 600 karotenoidden bir tanesidir [Tapiero et al., 2004].

Likopen tarafından güçlü bir şekilde oluşturulan AO aktive, çeşitli oksidatif hasarlar, toksisite ve diğer hastalıkların önlenmesine katkıda bulunmaktadır. Bundan dolayı, karotenoidler arasında likopen biyolojik etkin oksijen gruplarına karşı daha

etkili, bir oksidandır ve hem in vivo hem de in vitro doku ve hücrelerin iyileşme ya da korunma yaptığı çalışmalarda ortaya konmuştur [Raifen et al., 2004].

Likopenin barsak mukoza hücreleri içine safra asit misellerinin oluşturularak alınır. Bu hali ile barsağın fırça kenarlı kısmından likopen hücre içine pasif difüzyon ile girer. Likopenin hücre içine girişinde hala hücreler arası spesifik proteinler aracılığıyla mı yoksa lipit damlacıkları şeklinde taşınması hakkında hala tam net bir bilgi yoktur. Barsak içindeki likopen şilomikron yapılarına katılır ve buradan mezenterik lenfe salgılanır ve oradanda kana geçer. Bu hali ile kandaki likopen böbrek, dalak, yağ dokusu, akciğer ve üreme organlarına pasif difüzyon ile (Şekil 2.11.4.1.) geçer [Thomas et al., 2002].



Şekil 2.11.4.1. Likopenin barsaklardan alınması ve taşınması. Thomas ve ark. dan (2002) değiştirilerek alınmıştır (SLİ: serbest likopen izomerleri, YA: yağ asitleri, ST: safra tuzları, Lik: likopen).

Likopenin sindirim sistemi ile bağlantılı hasar görmüş doku organların tedavisinde etkili sonuçlar yapılan araştırmalarla elde edilmiştir. Özellikle farinks,

özefagus, mide, rektum, kolon (Franceschi et al., 1994), mesane ve prostat (Giovannucci et al., 1999) gibi organlarda oluşan inflamasyon ve kanser vakalarında likopenin tedavi sürecinde oldukça etkili sonuçlar elde edilmiştir.

Son yıllarda likopen, barsak ve kolit ilişkisine ait bir kaç çalışma yapılmıştır. Raifen ve ark., (2004) iodoasetamid ile oluşturdukları deneysel kolit modelinde, sıçanların (üç gün) diyetlerine 5-aminosalisilik asit ve likopen verdiklerinde oluşan inflamasyonu ve oksitadif stresi azalttıklarını ileri sürmüşlerdir. Ayrıca Martinez-Ferrrer ve arkadaşları (2006) Fisher 344 sıçanlarında azoksimetan ile oluşturulmuş kolon tümörlerin, diyet olarak verilen likopen ile azaldığını bildirmişlerdir.

Tüm bu literatür bilgileri ışığı altında; kolitte, nedeni bilinmeyen ya da aşırı iNOS aktivitesinden dolayı artan NO ve metabolitlerinin toksik etkilerini ortadan kaldırılmasında şu ana kadar kullanılan gerek iNOS inhibitörleri gerekse diğer kimyasal maddelerin hem yan etkilerinin fazla olması hem de tedaviye tam cevap verememesine bağlı olarak başarı sağlanamadığı belirlenmiştir.

Çalışmamızda, sıçanlarda trinitrobenzensülfonik asit (TNBS) ile oluşturduğumuz deneysel kolitte, AO özelliği iyi bilinen likopenin; reaktif oksijen türlerine ve oluşan oksidatif hasara karşı koruma sağlayıp sağlamadığını kan parametreleri ile belirlemeyi amaçladık.

3. GEREÇ ve YÖNTEMLER

3.1. Gereç

3.1.1. Deney Hayvanları ve Deney Gruplarının Oluşturulması

Çalışmamızda Osmangazi Üniversitesi Tıbbi ve Cerrahi Deneysel Araştırma Merkezi'nden (TICAM) temin edilen yaklaşık 220-250 gram ağırlığında, erkek Sprague Dawley ırkı sıçanlar kullanıldı. Çalışmaya başlamadan önce Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik kurulu onayı alınmıştır (PR-07-03-15-2).

Çalışmamız kontrol, TNBS (120 mg/kg), L-NAME (40 mg/kg), Zeytinyağı 1 mg/kg, Likopen 5 ve 10mg/kg olmak üzere 112 adet sıçan her grupta 7 hayvan olacak şekilde 16 gruba ayrıldı.

3.2. Yöntemler

3.2.1. Kimyasal Maddeler ve Uygulamaları

Kullanılan TNBS, L- NAME, likopen Sigma şirketinden sağlandı. Deney grupları öncelikle % 50' lik metanol ile hazırlanan TNBS' ten 120 mg/kg doz hazırlandı. TNBS sıçanın anüsünden yaklaşık 8 cm kadar içeri girilerek, bir ince plastik kanül aracılığı ile verilerek sıçanlarda akut deneysel kolit oluşturulmuştur [Kankuri et al., 1999].

TNBS verilmesinden bir gün sonra intraperitoneal olarak (i.p.), 40 mg/kg L-NAME, (iNOS nonselektif inhibitörü), 5 ile 10 mg/kg likopen dozları zeytin yağında (1:1) hazırlanarak, üç gün süre ile (her gün) deney gruplarına verilmiştir. TNBS verilmesinden sonra L-NAME, zeytinyağı ve likopen gruplarındaki sıçanlar birinci, ikinci ve üçüncü günlerde eter anestezisinde diseksiyonları yapılmış daha sonra kan ve doku örnekleri alınmıştır.

3.2.2. Kan Örneklerinin Alınması

Sıçanlar kan örneği için eter ile anestezi edildi. İçerisinde % 3.8'lik sodyum sitrat (1:9, sodyum sitrat: kan) bulunan enjektörlerle doğrudan kalpten (intrakardiyak) yaklaşık 5 ml kan alınmıştır. Her bir deney grubundaki sıçanlardan birinci, ikinci ve üçüncü günlerde alınan kan bekletilmeden Coulter marka kan sayım cihazında sayılmıştır.

3.2.3. İstatistiksel Değerlendirme

Çalışmamızda kan olarak kontrol ve deney gruplarına ait elde ettiğimiz verilere SPSS [SPSS for Windows, 1999] istatistiksel paket programında (9.05) tek yönlü ANOVA testi uygulanmıştır.

4. BULGULAR

4.1. Periferik Kan Parametrelerinin Bulguları

Kontrol ve deney gruplarından intrakardiyak alınan kan örnekleri bekletilmeden hayvanlara özgü (hemawet marka) kan sayım cihazında sayıldı. Daha sonra elde edilmiş periferik kan (eritrosit, lökosit ve trombosit) değerlerinin SPSS 9.0 paket istatistik programı ile istatistiksel analizleri yapılarak tablo ve grafikleri elde edilmiştir.

Tablo 4.1.1. 1. Kontrol ve deney gruplarının periferik kan değerleri.

| GRUPLAR | PERİFERİK KAN PARAMETRELERİ | | | | | | | | |
|------------------------------|--|--|--|--|--|--|--|--|--|
| | 1.GÜN | | | 2.GÜN | | | 3.GÜN | | |
| | Eritrosit 10 ⁶ mm ³ | Lökosit 10 ³ mm ³ | Trombosit 10 ⁶ mm ³ | Eritrosit 10 ⁶ mm ³ | Lökosit 10 ³ mm ³ | Trombosit 10 ⁶ mm ³ | Eritrosit 10 ⁶ mm ³ | Lökosit 10 ³ mm ³ | Trombosit 10 ⁶ mm ³ |
| Kontrol | 9.6±0.6 | 6.7±1.8 | 961.2±143.2 | 9.6±0.6 | 6.7±1.8 | 961.2±143.2 | 9.6±0.6 | 6.7±1.8 | 961.2±143.2 |
| 120mg/kg TNBS | 10.2±0.8 | 14.6±2.1 | 1372±181.5 | 9.1±1.7 | 12.6±1.7 | 839.4±159.4 | 13.4±4.3 | 8.9±0.7 | 992.7±156.7 |
| 40 mg/kg L-NAME | 6.2±0.6 | 10.8±1.6 | 472.3±74.4 | 9.0±0.5 | 12.6±5.5 | 851.4±153.0 | 12.1±3.1 | 9.6±0.9 | 1030.1±98.8 |
| 1mg/kg Zeytinyağı | 8.3±1.0 | 17.1±5.2 | 627.3±88.8 | 9.2±1.3 | 9.3±2.3 | 855.4±107.9 | 12.3±2.9 | 8.8±0.7 | 1037.4±88.4 |
| 5mg/kg Likopen | 8.2±0.5 | 15.0±4.5 | 700±51.2 | 8.5±0.9 | 9.5±1.7 | 833.7±73.8 | 11.3±3.2 | 8.3±0.8 | 1050.4±89.4 |
| 10 mg/kg Likopen | 8.3±1.5 | 12.2±2.4 | 649.6±98.7 | 9.0±0.5 | 8.0±2.9 | 828.7±129.4 | 8.4±0.5 | 12.6±0.9 | 640.9±94.9 |

4.1.1 Eritrosit Değerlerinin Karşılaştırılması

1. gün eritrosit değerleri (Tablo 4.1.1 ve grafik 4.1.1.);

Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında; TNBS grubu hariç diğer tüm deney gruplarında eritrosit sayıları kontrole göre ileri derecede önemli azalma gösterirken ($p<0.001$), TNBS grubunda eritrosit sayısı kontrole ve deney gruplarına göre ileri derecede önemli artış göstermiştir ($p<0.001$).

L-NAME grubunda eritrosit sayısı 1 mg/kg zeytinyağı grubu ile 5 ve 10 mg/kg likopen gruplarına göre istatistiksel olarak ileri derecede önemli azalma göstermiştir ($p<0.001$).

Zeytinyağı grubu, 5 mg/kg likopen grubu ve 10 mg/kg likopen grubu arasında eritrosit sayıları bakımından anlamlı fark bulunmamıştır ($p>0.05$).

2. gün eritrosit değerleri (Tablo 4.1.1. ve grafik 4.1.1.);

Kontrol grubu, TNBS grubu, L-NAME grubu, zeytinyağı grubu, 5 ve 10 mg/kg likopen grupları arasında eritrosit değerleri bakımından küçük değişiklikler görülmekle birlikte bu değişiklikler istatistiksel açıdan anlamlı bir fark olarak kabul edilmemiştir ($p>0.05$).

3. gün eritrosit değerleri (Tablo 4.1.1. ve grafik 4.1.1.);

Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında; TNBS, L-NAME, zeytinyağı ve 5 mg/kg likopen gruplarında eritrosit sayıları kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bir artış gösterirken ($p<0.05$), 10 mg/kg likopen grubu kontrole göre azalma göstermiştir ancak bu azalma istatistiksel açıdan anlamlı bir fark olarak kabul edilmemiştir ($p>0.05$).

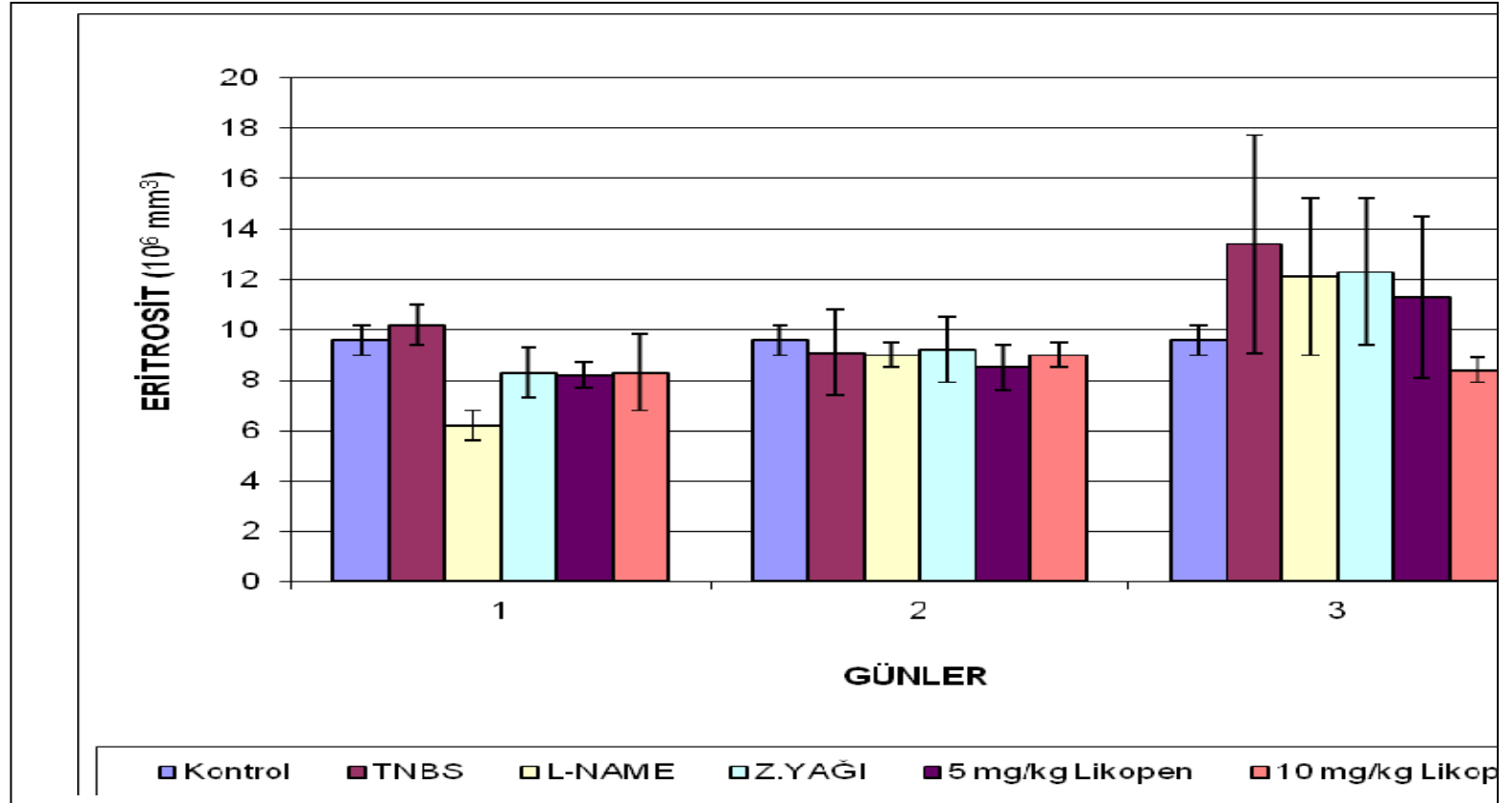
TNBS grubunda eritrosit sayısı diğer bütün deney gruplarına göre yüksek olmasına rağmen bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0.05$).

L-NAME grubu, zeytinyağı grubu ve 5 mg/kg likopen grupları eritrosit sayıları açısından karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir ($p>0.05$). Ancak 10 mg/kg likopen grubuyla karşılaştırıldığında likopen grubunda eritrosit sayısındaki azalma istatistiksel açıdan anlamlı bulunmuştur ($p<0.05$).

Zeytinyağı grubu, 5 mg/kg likopen gurubuyla karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark ($p>0.05$) göstermemesine karşın, 10 mg/kg likopen gurubuna göre istatistiksel açıdan anlamlı bir artış göstermiştir ($p<0.05$).

5 mg/kg likopen grubunda eritrosit sayısı 10 mg/kg likopen grubuna göre artış göstermiş ve bu artış istatistiksel açıdan anlamlı bir fark olarak kabul edilmiştir ($p<0.05$).

Grafik 4.1.1.1. Kontrol ve deney gruplarının 1., 2. ve 3. günlerine ait eritrosit değerleri.



4.1.2 Lökosit Değerlerinin Karşılaştırılması

1. gün lökositdeğerleri (Tablo 4.1.1. ve grafik 4.1.2.1);

TNBS, L-NAME, zeytinyağı, 5 ve 10 mg/kg likopen gruplarında lökosit sayıları kontrol grubuna göre oldukça artmış ve bu artış istatistiksel olarak ileri derecede önemli bir artış olarak kabul edilmiştir ($p<0.001$).

TNBS, L-NAME, zeytinyağı, 5 ve 10 mg/kg likopen gruplarında lökosit sayıları arasında artma veya azalma görülmesine rağmen bu farklılıklar istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmemiştir ($p>0.05$).

2. gün lökosit değerleri (Tablo 4.1.1. ve grafik 4.1.2.1.);

Deney grupları lökosit sayıları bakımından kontrol grubu ile karşılaştırıldığında TNBS ve L-NAME gruplarında kontrole göre görülen artış istatistiksel bakımdan ileri derecede anlamlı bir fark olarak kabul edilirken ($p<0.001$), kontrol grubuna göre zeytinyağı, 5 ve 10 mg/kg likopen gruplarında görülen artış anlamlı bulunmamıştır ($p>0.05$).

TNBS, L-NAME, zeytinyağı, 5 ve 10 mg/kg likopen gruplarında lökosit sayıları artış bakımından farklılıklar göstermelerine rağmen bu farklılıklar istatistiksel açıdan anlamlı bulunmamıştır ($p>0.05$).

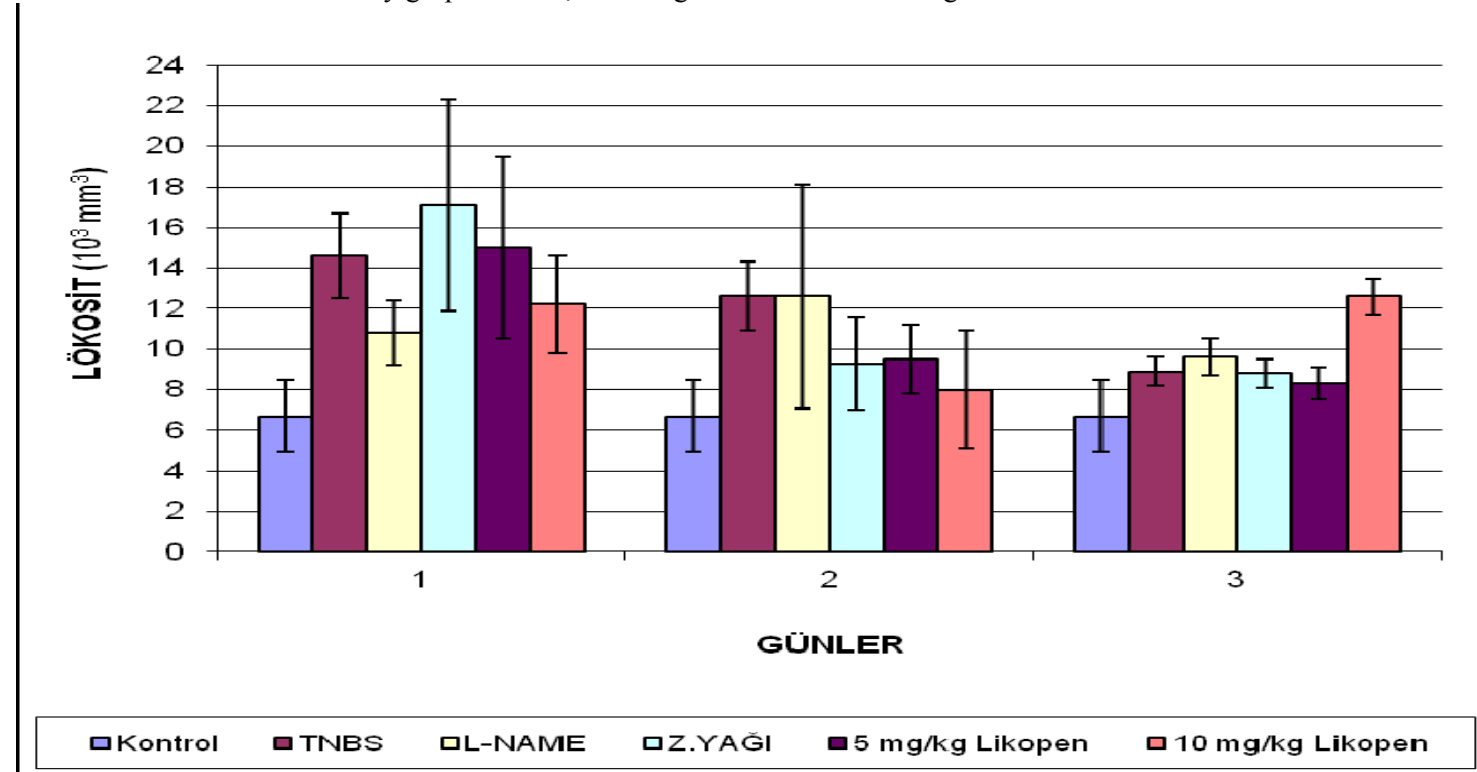
3. gün lökosit değerleri (Tablo 4.1.1. ve grafik 4.1.2.1.);

Deney grupları lökosit sayıları bakımından kontrol grubu ile karşılaştırıldığında lökosit sayıları kontrole göre oldukça artış göstermiş olup bu artış istatistiksel açıdan ileri derecede önemli bir artış olarak kabul edilmiştir ($p<0.001$).

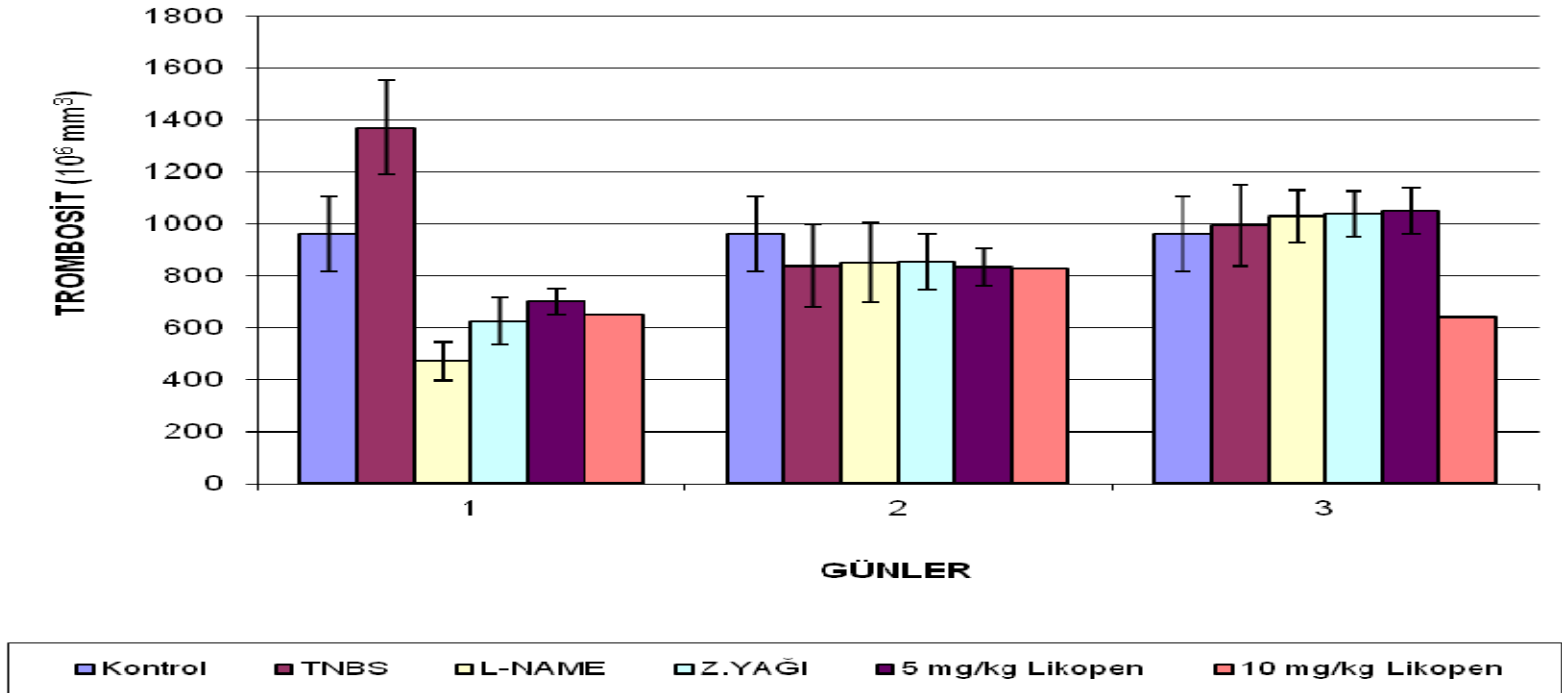
TNBS grubunda lökosit sayısındaki artış 5 mg/kg likopen ve zeytinyağı gruplarına göre daha az olup bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0.05$). Buna karşılık 10 mg/kg likopen grubunda lökosit sayısı TNBS grubuna göre oldukça yüksek bulunmuştur ($p<0.001$).

Zeytinyağı, L-NAME ve 5 mg/kg likopen gruplarında lökosit sayıları bakımından anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p>0.05$). Buna karşılık 10 mg/kg likopen grubunda lökosit sayısı zeytinyağı, L-NAME ve 5 mg/kg likopen gruplarına göre ileri derecede önemli bir artış göstermiştir ($p<0.001$).

Grafik 4.1.2.1 Kontrol ve deney gruplarının 1., 2. ve 3. günlerine ait lökosit değerleri.



Grafik 4.1.3.1. Kontrol ve deney gruplarının 1., 2. ve 3. günlerine ait trombosit değerleri.



Deney grupları trombosit değerleri bakımından kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, TNBS grubunda kontrole göre ileri düzeyde bir artış görülürken ($p<0.001$), L-NAME, zeytinyağı ile 5 ve 10 mg/kg likopen gruplarında ileri derecede önemli bir azalma saptanmıştır ($p<0.001$).

L-NAME grubunda trombosit sayısındaki azalma diğer tüm gruplardan fazla bulunmuştur ($p<0.001$).

Zeytinyağı grubu ile 5 ve 10 mg/kg likopen grupları arasında trombosit değerleri bakımından anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p>0.05$).

2. gün trombosit değerleri (Tablo 4.1.1. ve grafik 4.1.3.1.);

Kontrol ve diğer deney grupları arasında trombosit sayısında çok fazla değişiklik bulunmadığından istatistiksel olarak anlamlı fark ($p>0.05$) bulunmamıştır.

3. gün trombosit değerleri (Tablo 4.1.1. ve grafik 4.1.3.1.);

Sadece kontrol grubu ile 10 mg/kg likopen grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark ($p<0.001$) bulunmuş olup diğer gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark ($p>0.05$) görülmemiştir.

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

İltihabi barsak hastalığında (İBH) anemi, sıklığı %8.8 ile %73.7 arasındadır. Anemi, İBH olan hastaların yaşam kalitesini önemli ölçüde azaltmaktadır. İBH' de anemi patogenezinde en sık demir eksikliği ve kronik hastalık anemisi görülmektedir. Demir eksikliği anemisi genellikle kronik intestinal kan kaybı nedeniyle oluşmaktadır [Giannini et al., 2006]. Demir eksikliği anemisi tedavisinde yıllardan beri öncelikli olarak oral demir preparatları kullanılmaktadır. Ancak verilen demirin sınırlı miktarı emilmektedir (10/30 mg), emilemeyen demir barsak içeriğinde kalır. Demirden zengin barsak içeriği ülser alanlarında hidroksil radikalleri oluşumunu artırabilir. Demir bunu Fenton reaksiyonunu katalizleyerek yapar. Hidroksil radikalleri son derece zararlıdır ve doku hasarına neden olmaktadır [Kulnigg and Gasche., 2006]. Bu hipotezi destekleyen pek çok hayvan çalışması yapılmıştır.

Carrier ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada (2006) demirin, dekstran sülfat sodyum (DSS) ile uyarılan kolitli sıçanlarda nötrofilik infiltrasyon, sitokinler ve nükleer faktör kappa-B (NF-kappaB) aracılı inflamasyona etkisi ve vitamin E ile kombinasyonunun olası yararları araştırıldı. DSS verilen sıçanlar 4 gruba ayrıldı: normal beslenen kontrol grubu, yüksek demir (3000 mg/kg) verilen grup, sadece vitamin E (2000 mg/kg) verilen grup ve demirle vitamin E' nin birlikte verildiği grup. Kolonik inflamasyon, myeloperoksidaz aktivitesi (MPO), lipid peroksidaz (LPO), proinflamatuvar sitokinler (TNF- α , IL-1, IL-6) ve NF-kappaB bağlanma aktivitesi ölçüldü. Demir verilen grupta, kontrol ve vitamin E verilen gruba göre anlamlı olarak artmış inflamatuvar skor, MPO, TNF- α , IL-1, LPO ve NF-kappaB aktivite düzeyi saptandı. Demir ve vitamin E beraber verilen grupta ise inflamatuvar skor, TNF-alfa ve IL-6 anlamlı olarak azalmıştı. Bu çalışma kolit varlığında demirin, oksidatif stres, nötrofilik infiltrasyon, sitokin ve NF-kappaB aktivitesini artırarak hastalık aktivitesini artırdığı ve vitamin E ile bu etkinin kısmen azalabileceği saptanmıştır. Bu deneysel çalışma, hastalığın aktivitesi ile oksidatif stres arasındaki bağlantıyı ortaya koymaktadır.

İnsanlarda her yaş grubunda görülebilen kolitin tam olarak oluşum nedeni bilinmemesine rağmen, hastalığın etiyoloji ve patogenezinde genetiksel, çevresel etkenler (Blumberg et al., 1999), mikroorganizmalar (Rath et al.,1996) ve bağışıklık sistemi bozuklukları (Fuss et al., 1996) ile oluşabileceğine ait deliller elde edilmiştir.

Gerek beden hücrelerinden alınan biyopsi örneklerinde (Rachmilewitz et al., 1995] gerekse nötrofil, makrofaj, epitel ve endotel hücrelerinde yapılan analizlerde (Iwashita et al., 1998) nitrik oksit (NO) miktarının aşırı artması, ÜK için önemli patolojik belirleyici etken olduğunu ortaya çıkarmıştır. Ayrıca kolit ile ilgili yapılan çalışmalarda, NO' dan türeyen peroksinitrit ve oksijen radikallerinin, oluşan harabiyeti daha fazla artırdığı belirlenmiştir [McCafferty, 2001].

İBH'de anemi, demir eksikliği ve iltihap anemisinin (örneğin kronik hastalık anemisi ACD) bir arada görüldüğü ve eritrosit üretiminin farklı aşamalarında aktive olan bağışıklık sisteminin olumsuz etkilerinden kaynaklanan bir prototiptir. Demir eksikliği ve ACD' nin yanısıra, metabolizmaya bağlı rahatsızlıklar, vitamin eksikliği ve İBH tedavisinde sık kullanılan ilaçlar da İBH'de görülen anemiye azdırabilir. [Gasche et al., 2004]. İnflamasyon, normal eritrosit üretimi için çok önem teşkil eden üç büyük adımı etkilemekte ve dolayısıyla inflamasyona bağlı anemi gelişimine yol açmaktadır. Bu etkiler; a.) Bağışıklık sisteminin neden olduğu demir trafiğinde meydana gelen sapma, demir metalinin makrofajlarda hapsolmesine yol açar ki bu da demirden yoksun eritrosit üretimi ile sonuçlanır. b.) İnflamasyon, eritrosit üretimini uyaran en önemli hormon olarak bilinen eritropoietinin biyolojik faaliyetini köreltmektedir. c.) İnflamasyon, eritrosit öncül hücrelerinin farklılaşma ve çoğalmasını inhibe etmektedir.

Bedenin demir dağılımında meydana gelen değişikliklere sitokin ve akut faz proteinleri neden olmaktadır. Bu değişiklikler arasında, demir dengesini sağlayan başlıca unsur olarak bilinen hepsidin önemli rol oynamaktadır. Bu madde çoğunlukla karaciğerde aşırı demir yüklenmesine bir yanıt olarak ya da lipopolisakkarit ve interlukin-6 gibi proinflamatuvar uyarıcıların devreye girmesiyle vücutta üretilir. Hepsidin, etkisini hücrelerden dışarıya demir çıkışını sağlayan ferroportin (SLC40S1) üzerinden yürütür. Hepsidin ferroporine bağlanması, onun internalizasyonuna ve lizozomal degradasyonuna sonuç olarak da ferroportinin membrandan kaybına yol açmaktadır. Dolayısıyla, duodenal enterositlerden emilen demirin kan dolaşımına geçişini engeller. Bu etki tümör nekroz faktörü (TNF- α) ile daha da vahim bir hale gelebilir ki öyle bir durumda demir elementi makrofaj ve monositlerde hapsolür. Bu hapsolme önemli bir etkidir çünkü makrofajlar, eritrofagositlerin yakaladığı yaşlı eritrosit hücrelerindeki demirin tekrardan kullanılmasında etkili olduğu bilinmektedir. Fagositlerin içerisindeki demir, hem' in enzimatik bozulması ile geri dönüştürülür ve

ferroportin aracılığı ile tekrar kan dolaşımına gönderilir. Zaten günlük demir ihtiyacının %90' ı bu şekilde sağlanır. İnflamasyon durumlarda ise, oksidatif stres ve lipid peroksidasyon sonucu eritrositlerin biyolojik yarı ömürleri azalır. Böylece, eritrofagositler çoğalıp demirin tekrar kana karışmasını azaltır. Ayrıca, inflamasyonu tetikleyen ve önleyen sitokinler bir taraftan bu hücrelerdeki ferroportin transkripsiyonunu baskılamak, demirin alındığı kanalları uyararak, monosit ve makrofajların içerisinde demirin hapsolmesine katkıda bulunur. Tüm bu olaylar, demirin fagositlerin içerisinde hapsolmesine yol açıp fonksiyonel demir yetersizliğinin ortaya çıkmasına zemin hazırlar. Bu da şu anlama geliyor ki vücutta demir bol miktarda bulunmasına rağmen, bu element eritrosit üretimi için elverişli değildir. [Nemeth et al., 2004]. Tüm bu bilgiler değerlendirildiğinde İBH' de gelişen aneminin önlenmesinde sadece demir ve vitamin replasmanı aneminin giderilmesinde yeterli olamamaktadır. Bundan dolayı inflamasyonu önleyen ve hücre koruyucu etkileri bilinen antioksidan maddeler ve ilaçlar kullanılarak hastalığın etkin tedavisi gerekmektedir.

Çalışmamızda antioksidan ve hücre koruyucu etkileri olduğu bilinen likopenin kolitte gelişen oksidatif hasara ve dolayısıyla anemiye karşı muhtemel koruyucu etkisi test edildi. Deney grupları periferik kan parametreleri yönünden kontrolleriyle karşılaştırıldığında; 120 mg/kg TNBS verilen deney grubunda eritrosit ve trombosit sayıları 1. ve 3. günde artış gösterirken, 2. günde çok az bir düşüş göstermiştir. Aynı grupta lökosit sayısı 1. ve 2. günde daha fazla olmak üzere inflamasyonu işaret edecek şekilde deney süresince kontrolden yüksekti. 40 mg/kg L-NAME verilen deney grubunda eritrosit sayısı 1. ve 2. günde kontrol grubuna göre azalma gösterirken 3. günde oldukça artmıştır. L-NAME grubunda deney süresince trombosit sayısındaki değişiklikler anlamlı bulunmamıştır. Lökosit sayısı deney süresince artmıştır. 1 mg/kg zeytinyağı verilen deney grubunda lökosit sayıları 1. gün daha fazla olmak üzere deney süresince yüksekti. Deneyin 1. gününde düşüş gösteren eritrosit sayısı 2. ve 3. günlerde giderek arttı ve inflamasyona karşı lökosit cevabına paralel bir şekilde seyretti. 5 mg/kg likopen grubunda eritrosit ve trombosit sayıları kontrole göre 1. ve 2. günde azalma gösterirken 3. günde tüm değerler artış göstermiştir. 10 mg/kg likopen grubunda eritrosit ve trombosit sayıları kontrole göre deney süresince düşük bulunmuştur. Lökosit sayısı ise 1. ve 3. günde daha fazla olmak üzere deney süresince artmıştır. Lökosit sayısının artması inflamasyon şiddetinin artmasıyla ilişki olabilir.

Koruyucu etkilerini araştırdığımız L-NAME ile 5 ve 10 mg/kg likopenin anemiye önlemede ve bir anlamda antioksidan etkinliklerini ortaya koymada periferik kan değerleri karşılaştırıldığında 1. ve 2. gün eritrosit sayısında L-NAME' de daha çok azalma görölmüştür. 3. günde ise eritrosit sayısında L-NAME ve 5 mg/kg likopen grubunda artma görölmüş, 10 mg/kg likopen grubunda azalma görölmüştür. Lökosit sayısında ise artma göstererek 1. gün en çok 5 mg/kg likopen grubunda, 2. Gün ise en çok L-NAME grubunda artma görölmüştür. 3. gün L-NAME ve 5mg/kg likopen grubunda tüm değerlerde artma görölmüş, 10 mg/kg likopen grubunda ise eritrosit ve trombosit sayısında azalma görölmüştür.

10 mg/kg likopen grubunda 3. günde eritrosit ve trombosit sayısının azalması aneminin ve dolayısıyla inflamasyonun azalması anlamına gelebilir. Bu anlamda 10 mg/kg likopen grubu koruyucu olarak kullandığımız L-NAME ve zeytinyağından daha koruyucu olmuştur.

Çalışmamızda kan parametrelerinden deneyin 1. gününde TNBS grubunda trombositlerin aşırı artması akut inflamasyona ve barsak kanamasına bağlı olabilir. Diğer taraftan bu grupta deney süresince lökositlerin artması ise meydana gelen inflamasyona karşı immün cevabın şiddetlenmesini işaret ediyor olabilir. TNBS grubunda deneyin 3. gününde eritrosit sayısının artması TNBS' nin eritrosit yapımını uyarmasından değil, depolanmış eritrositlerin salınımını uyarmasından kaynaklanıyor olabilir. Dahası aynı etkiyi L-NAME ve zeytinyağının yapabileceğine dair deneysel bulgular rapor edilmiştir. Bu durum, kolit şiddetinin azalmasıyla kan tablosunun normale yakın değerlere geldiğini ve dolayısıyla TNBS' nin ve L-NAME'nin doğrudan kan hücrelerinin yapımına etki edemeyeceğini ve bu artışın depolanmış kan hücrelerinin salınımını uyarmalarıyla olabileceğini göstermektedir.

Bu çalışmanın birinci kısmı olan barsak dokusu histopatolojisine bakıldığında 5 ve 10 mg/kg likopen nedenli iyileşme likopenin hücre koruyucu etkileri olduğunu göstermektedir. Buradan likopenin kolitte gelişen anemiye önlemede de etkili olabileceği fikri doğmuştur. Nitekim periferik kan bulgularımız özellikle deneyin 2. ve 3. günlerinde likopenin kontrol grubuna yaklaştığını göstermektedir.

Yaping ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada (2004), likopenin hem antiinflamatuvar hem de antikoagulan etkiye sahip olduğunu ortaya çikarmışlardır. Bizim çalışmamızda da 5 ve 10 mg/kg likopen verilen deney gruplarında kontrollerine

oranla trombosit sayılarının 5 mg/kg likopenin deneyin 3. gününde istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmeyen küçük bir artışı hariç deney süresince düşük bulunmuştur. Bu sonuç likopenin antikoagülan etkileri olduğu anlamına gelebilir.

Altuner ve arkadaşları yaptıkları bir deneysel kolit modelinde (2010) metallotioneinlerin (MT) kemik iliğini doğrudan mitotik bir etki ile uyararak periferik kan hücreleri sayısını doza bağlı olarak artırabileceğini öne sürmüşlerdir. Diğer taraftan koliti tedavi etmek amacıyla kullanılan yüksek dozda L-NAME' nin periferik kan üzerine etkisinin oldukça az olduğu ve iyileştirme etkisini ancak kolit şiddetinin azaldığı deneyin 3. gününde gösterdiği anlaşılmıştır ve bu da L-NAME'nin depolanmış kan hücrelerinin salınımını sağlayabileceğini ortaya koymaktadır. Deneysel bulgularımız literatür bildirimleriyle uygunluk göstermektedir. Nitekim deneysel çalışmamızın 3. gününde L-NAME grubunda eritrosit ve trombosit sayıları artmıştır.

Sonuç olarak, deneysel akut kolit modelimizde likopenin, hemopoezde ve aneminin önlenmesinde etkili olduğunu söyleyebiliriz ancak ne ölçüde etkili olduğunu söyleyebilmek için kronik kolit modellerinin oluşturulması gerekir.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Acworth, I., McCabe, D., Mather, T., 1997, The analysis of free radicals, their reaction products, and antioxidants, Oxidants, Antioxidants, and free radicals, Taylor & Francis Washington, DC., 23–77.
- Akkuş İ., 1995, Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri, Konya, Mimoza Yayınları, Kuzucular Ofset.
- Akobeng AK. Review article: the evidence base for interventions used to maintain remission in Crohn's disease. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics* 2008; 27(1):11-18.
- Alderton, WK., Cooper, CE and Knowles, RG., 2001, Nitric Oxide Syntheses: Structure, function and inhibition. *Biochem. J.* 357: 593-615.
- Altuner Y., A., Ayhancı, K., Civi, H., Ozden, D., Ustuner, M.C., Ustuner, and H., Kurt. Protective effects of NG-Nitro-L-Arginine Methyl Ester and metallothioneins on excess nitric oxide toxicity in trinitrobenzene sulfonic acid–induced rat colitis. *Analytical and Quantative Cytology and Histology*; volume 32 number 3-june 2010.
- Ames, BN., Gold, LS., Willet, WC., 1995. Causes and prevention of cancer. *Proc Natl Acad Sci USA.* 92: 5258-5265.
- Ambs, S., Ogunfusika, MO., Merriam, WG., Benett, VP., Billiar, TM., and Herris, CC., 1998, Up- regulation of iNOS expression in cancer-prone p53 knockout mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA:* 95: 8823-8828.
- Amir, H., Karas, M., Giat, J., Danilenko, M., Levy, R., Yermiahu, T., Levy, J., Sharoni, Y., 1999. Lycopene and 1,25-dihydroxivitamin-D3 cooperate in the inhibition of cells cycle progression and induction of differentiation in HL-60 leukemic cells. *Nutr Cancer.* 33: 105-112.
- Andres PG, Friedman LS. Epidemiology and the national course of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology Clinics of North America* 1999; 28(2): 255-81.
- Aşıcıoğlu, Y.T., 2005, Sıçanlardaki kronik alkolik karaciğer hasarına likopenin etkisi, Uzmanlık Tezi, İstanbul.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

- Bartels U , Pedersen NS, Jarnum S. Iron absorption and serum ferritin in chronic inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol* 1978;13:649–56.
- Baskın, S., Salem, H.,1997. *Oxidants, Antioxidants, and Free Radicals*, Tylor&Francis, Washington, DC.
- Batrelli, M.G., Corte, E.D., and Stirpe, F., 1972, Xanthine oxidase type D (dehydrogenase) in the intestine and other organs of the rat, *Biochem. J.*, 126, 747-749.
- Beard JL: Iron biology in immune function, muscle metabolism and neuronal functioning. *J Nutr* 2001; 131:568S-579S.discussion 580S.
- Benzer, F., Ozan, ST., 2003. Fasiola hepaticale enfekte koyunlarda lipid peroksidasyonu, antioksidan enzimler ve nitric oksit düzeyleri. *Türk J Vet Anim Sci.* 27: 657-61.
- Beşışık S, Demir eksikliği anemisi, ed. Büyüköztürk K, İç Hastalıkları, Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul,2007, Cilt 1, 603-608.
- Blumberg, RS., and Saubermann, LJ., and Strober, W., 1999, Animal models of mucosal inflammation and their relation to human inflammatory bowel disease. *Curr.Opin.Immunol*, 11: 648-656.
- Bowen, P., Chen, L., Stacewicz-Sapuntzakiz, M., Duncan, C., Sharifi, R., Ghosh, L., Kim, SH., Christov-Tzelkov, K., Van Breemeni R., 2002.Tomato sauce supplementation and prostate cancer: lycopene accumulation and modulation of biomarkers of carcinogenesis. *Exp Boil Med.* 227: 886-893.
- Bubley GJ, Lange RF. Microcytic anemias. In: Robinson SH, Reich PR. *Hematology: pathophysiologic basis for clinical practice*.Boston: Little Brown, 1993:35-74.
- Cavill I . Erythropoiesis and iron. *Best Pract Res Clin Haematol* 2002;15:399–40995.Ludwig H , Strasser K. Symptomatology of anemia. *Semin Oncol* 2001;28 (suppl 8) :7–14.
- Conner NTJ, Hoffbrand AV. Anemia in systemic disease. In:Delamore IW, Lui-Yin JA, eds. *Haematological aspects of systemic disease*. London: Bailliere Tindall, 1994:33-65.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

- Curtin, J.F., Donovan, M., Cotter, T.G., 2002. Regulation and measurement of oxidative stress in apoptosis, *J. Immunol Methods*. 265: 49-72.
- Dikopoulos, N., Nussler, AK., Liptay, S., Bachem, M., Renishage, M., Stiegler, M., Schmid, RM., Adler, G., Weidenbach, H., 2001. Inhibition of nitric oxide synthase by Aminoguanidine increases intestinal damage in the acute phase of rat TNBS-colitis. *Eur.j. Clin. Invest*: 31: 234-239.
- Eray C., uzmanlık tezi- Adana-2009, Deneysel kolit modeli üzerinde glutamin, N-asetil sistein ve intrarektal metotreksat'ın etkilerinin incelenmesi.
- Evers BM, Townsend M, Thompson JC, Fry RD, Fleshman JW, Birnbaum EH, Read TE. *Principles of Surgery 7th ed.* Antip As., p1249-1257, 1329-1346.1999.
- Faquin WC, Schneider TJ, Goldberg MA. Effect of inflammatory cytokines on hypoxia-induced erythropoietin production. *Blood* 1992;79:1987-94.
- Fillet G , Beguin Y, Baldelli L. Model of reticuloendothelial iron metabolism in humans: abnormal behavior in idiopathic hemochromatosis and in inflammation. *Blood* 1989;74:844-51.
- Fischmann, TO., Hruza, A., and Niux, D., 1999, Structural characterization of nitric oxide synthase isoforms reveals striking active site conservation. *Nat. Struct. Biol*: 6: 233-242.
- Franceschi, S., La Vecchia, C., Talamini, R., D'Avanzo, B., Negri, E., 1994. Tomatoes and risk digestive-tract cancers. *Int J Cancer*. 59:181-184.
- Fridovich, I., 1983, Superoxide radical: an endogenous toxicant, *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 23, 239-257.
- Furstenberger, G., Senn, HJ., 2002. Insulin-like growth factors and cancer. *Lancet Oncol*. 3: 298-302.
- Fuss, IJ., Neurath, M., and Boirivant, M., 1996. Disparate CD4+ lamina propria (LP) lymphokine secretion profiles in inflammatory bowel disease: Chorn's LP cells manifest increased secretion of IFN- γ , whereas ulcerative colitis LP cells manifest increased secretion of IL-5: *J. Immunol*, 157, 1261-1270.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

- Gasche C, Lomer MC, Cavill I, Weiss G. Iron, anaemia, and inflammatory bowel diseases. *Gut*. 2004 Aug;53(8):1190-7.
- Giannini S, Martes C. Anemia in inflammatory bowel disease. *Minerva Gastroenterol Dietol*. 2006 Sep;52(3):275-91.
- Giovannucci, E., 1999. Tomatoes, tomato-based products, lycopene and cancer. Review of epidemiologic literature. *J Natl Cancer Inst*. 91: 317-331.
- Gökpınar Ş., Koray T., Akçiçek E., Göksan T., ve Durmaz D., 2006, Algal Antioksidanlar. *E.U. Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. Cilt/Volume 23. Ek/Suppl (1/1): 85-89.
- Hadley, CW., Clinton, SK., Schwartz, SJ., 2003. The consumption of processed tomato products enhances plasma lycopene concentrations in associations with a reduced lycopene sensitivity to oxidative damage. *J. Nutr*. 133: 727-732.
- Halliwell, B., 1999, Antioxidant defence mechanism: from the beginning to the end (of the beginning), *Free Radical Research*, 31, 261-272.
- Harats, D., Chevion, S., Nahir, M., Norman, Y., Sagee, O., Berry, E., 1991. Citrus fruit supplementation reduced lipoprotein oxidation in young men ingesting a diet high in saturated fat: presumptive evidence for an interaction between vitamin C and E in vivo. *Am J Clin Nutr*. 67: 240-245.
- Hasler R, C.M. 2000. Plants as medicine: The role of phytochemicals in optimal health. In *Phytochemicals and Phytopharmaceuticals*, edited by F. Shahidi and C.-T. Ho, pp. 1-12. Champaign, Illinois: AOAC Pres.
- Hendrickson BA, Gokhale R, Cho JH. Clinical aspects and pathophysiology of inflammatory bowel disease. *Clin Microbiol Rev* 2002; 15: 79-94.
- Hilmi, Ş., 1994, Oksidanlar ve antioksidanlar. *THT Drug*, 48: 1-2, 44-49.
- Hoffbrand AV, Pettit JE. *Color atlas of clinical hematology*. Loudon: Mosby-Wolfe, 1994.
- Hugot JP, et al: Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 2001; 411:599.
- Irvine EJ. A critical review of epidemiologic studies in inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol*. 2001, 36:2-15.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

- Iwashita, E., Iwai, A., and Sawazaki, J., 1998, Activation of micravascular endothelial cells in ulcerative colitis end detection of inducible nitric oxide synthase. *Am. J. Gastroenterol.* 27: S 74-79.
- Kankuri, E., Valli, K., Knowles, RG., Lahdemari, M., Korpela, R., Vapaatalo, and H., Moilanen, E., 2001, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*: 298: 1125-1132.
- Karas, M., Amir, H., Fishman, D., Danilenko, M., Segal, S., Nahum, A., Koifmann, A., Giat, Y., Levy, J., Sharoni, Y., 2000. Lycopene interfere with cell cycle progression and insuli-like growth factor-1 signaling in mammary cancer cells. *Cancer.* 36:101-111.
- Kelly, F.J., 2001, Urinary F₂-isoprostane metabolite analysis: a step closer to obtaining a reliable mesure of oxidative stres?, *Clin. Exp. Allergy*, 31, 355-356.
- Kılınç, A., ve Kılınç K., 2003, Nitrik Oksit: Biyolojik Fonksiyonları ve Toksik Etkileri. Palme Yayıncılık, Ankara.
- Kimura, H., Hokari, R., Miura, S., Shigemot, SUT., Hirokava, M., Akiba, Y., Kurose, I., Higuchi, H., Fujmori, H., 1998(b). Increased expression of an inducible isoform of nitric oxide synthase and formation of peroxynitrite in colon mucosa of patiens with active ulcerative colitis. *Gut*: 42: 180-187.
- Kodner IJ, Fry RD, Fleshman JW, Birnbaum EH. Colon, rectum, and anus. Chap. 26 in Schwartz SI (ed.): *Principles of Surgery*, 6th Edition. New York: McGraw-Hill Co., , pp 1191-1306 1993.
- Kulnigg S, Gasche C Systematic review: managing anaemia in Crohn's disease. *Aliment Pharmacol Ther.* 2006 Dec;24(11-12):1507-23.
- Kurt H., Başaran A., Aral E., 2005. Sıçanlarda karbon tetraklorit'in oluşturduğu oksidatif stresin likopen ile önlenmesi. *Türkiye Klinikleri J Med Sci.* 25; 167-173.
- Kurose, I., Higuchi, H., Miura, S., Saito, H., Watanabe, N., Hokari, R., Hirokawa, M., Takaishi, M., Zeki, S., Nakamura, T., Ebinuma, H., Kato, S., Ishii, H., 1997, Oxidative stres mediated apoptosis of hepatocytes exposed to acute ethanol intoxication, *Hepatology.*, 25, 368-378.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

- MacNaughton, WK., Cirino, G., and Wallace, JL.,1989, Endothelium-derived relaxing factor (nitric oxide) has protective action in the stomach. *Life. Sci:* 45: 1869-1876.
- Mallory A, Kren F. Drug Induced Pancreatitis: a critical review.*Am. J. Gastroenterology* 1990; 78: 813-820.
- Marino, P., 1998, The threat of oxidant injury, *The ICU book*, Williams&Wilkins, Baltimore, 32-50.
- Mates, J.M., 2000. Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology, *Toxicology*, 153, 83-104.
- Matos, HR., Capelozzi, VL., Gomes, OF., Mascio, PD., Medeiros, MH., 2001. Lycopene inhibits DNA damage and liver necrosis in rats treated with ferric nitrilotriacetate. *Arch Biochem Biophys.* 396: 171-177.
- Mayer, B., and Hemmens, B., 1997. Biosynthesis and action of nitric oxide in mammalian cells. *Trans. Biochem. Sci:* 22: 477-481.
- McCafferty, DM., 2001. Peroxynitrite and inflammatory bowel disease. *Gut:* 46: 436-439.
- McMichael, Moore, R.M., 2004 a, Ischemia-reperfusion injury pathophysiology, part I, *Journal of Veterinary and Critical Care*, 14 (4), 231-241.
- Means RTJ, Krantz SB. Progress in understanding the pathogenesis of the anemia of chronic disease. *Blood* 1992;80:1639-47.
- Moncada, S., 1992, Nitric oxid gas: Mediator, modulator and Pathophysiologic entity. *J. Lab. Clin. Med:* 120(2): 187-191.
- Morris GP, Beck PL, Herridge MS, Depew WT, Szewczuk MR, Wallace RL. Hapten-induced model of chronic inflammation and ulceration in the rat colon. *Gastroenterology* 1989; 96(3):795-803.
- Mortensen H. Inflammatory disease of the colon. In: *Oxford Textbook of Surgery* (Morris PJ and Malt RA, Ed.) Oxford University Press, New York, , pp 1036-1059 1994.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

- Nahum, A., Hirsch, K., Danilenko, M., Watts, CK., Prall, OW., Levy, J., Sharoni, Y., 2001. Lycopene inhibition of cycle cell progression in breast and endometrial cancer cells is associated with reduction in cyclin D levels and retention of p27 (Kip1) in the cyclin E-cdk2 complexes. *Oncogene*. 20: 3428-3436.
- Nathan, C., 1997, Inducible nitric oxide synthase what difference does it make? *J. Clin. Invest.* 100: 2417-2423.
- Nemeth E, Tuttle MS, Powelson J, Vaughn MB, Donovan A, Ward DM, et al. Hepcidin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization. *Science*. 2004;306(5704):2090-3.
- Nieto N, Torres MI, Fernandez MI, Giron MD, Rios A, Suarez MD, Gil A. Experimental ulcerative colitis impairs antioxidant defense system in rat intestine. *Digestive diseases and sciences* 2000; 45, 1820-1827.
- Obermuller-Jevic, UC., Olano-Martin, E., Corbacho, AM., Eiserich, JP., van dre Vliet, A., Valacchi, G., Cross, CE., Packer, L., 2003. Lycopene inhibits the growth of normal human prostate epithelial cells in vitro. *J Nutr.* 133: 3356-3360.
- Oldenburg B, Koningsberger JC, Van Berge Henegouwen GP, Van Asbeck BS, Marx JJ. Iron and inflammatory bowel disease *Aliment Pharmacol Ther.* 2001 Apr;15(4):429-38.
- Pellerini N., Riso P., Porrini M., 2000. Tomato consumption does not affect the total antioxidant capacity of plasma. *Nutrition* 16; 268-271.
- Pruthi, RS., Derksen, E., Gaston, K., 2003. Cyclooxygenase-2 as a potential target in the prevention and treatment of genitourinary tumors, a review. *J.Urol.* 169: 2352-59.
- Rachmilewitz, D., Rooney, N., Bachwich, D., Karmeli F, Okon E and Bursztyn M: 1995, Enhanced colonic nitric oxide generation and nitric oxide synthase activity. *Gut*: 36: 718-723.
- Raifen, R., Nissenkorn, A., Matas, Z., Bujanover, Y., 2004., 5-ASA and lycopene decrease the oxidative stress and inflammation induced by iron in rats with colitis. *J Gastroenterol.* 39: 514-519.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

- Rath, HC., Herforth, HH., and Ikeda, JS., 1996, Normal luminal bacteria, especially *Bacteriodes* species, mediate chronic colitis, gastritis and arthritis in HLA-B27/human b2 microglobulin transgenic rats. *J.Clin. Invest*, 98, 945-953.
- Saez, JC., Berthoud, VM., Branes, MC., Martinez, AD., Beyer, EC., 2003. Plasma membrane channels formed by connexins: their regulation and functions. *Physiol Rev*. 83: 1350-1400.
- Sands BE; Crohn's Disease. Feldman M. Sleisenger & Fordtran's Gastrointestinal and Liver Disease, Eighth ed. Saunders: 2006: 2459-2498.
- Sandbom WJ. A review of immune modifier therapy for inflammatory bowel disease: azathioprine, 6-mercaptopurine, cyclosporine, and methotrexate. *Am J Gastroenterol* 1996;91:423-33.
- Schreiber S, Wedel S. Diagnosis and Treatment of Anemia in Inflammatory Bowel Disease. *Inflamm Bowel Dis* 1997;3(3):204-216.
- Siler , U., Barella, L., Spitzer, V., Schnorr, J., Lein, M., Goralczyk, R., Wertz, K., 2004. Lycopene and vitamin E interfere with autocrine/paracrine loops in the dunning prostatic cancer model. *FASEB J*. doi, 10.1096/fj.03-1116fje.
- Şahin, K., Ozercan, R., Onderci, M., Sahin, N., Gursu, MF., Khachik, F., Sarkar, FH., Munkarah, A., Ali-Fehmi, R., Kmat, D., Kucuk, O., 2004. Lycopan supplementation prevents the development of spontaneous smooth muscle tumors of the oviduct in Japanese quail. *Nutr Cancer*. 50: 181-189.
- Tapeiro, H., Townsend, DM., Tew, KD., 2004. The role of carotenoids in prevention of human pathologies. *Biomed Pharma*. 58: 100-110.
- Tee, ES., 1982. Carotenoids and retinoids in Human Nutrition. *Critical Reviews in Food Sci and Nutr*. 31: 103.
- Thomas, W., Boileau, M., Boileau, AC., Erdman JW.Jr, 2002. Bioavailability of all-trans and cis-isomers of lycopene. *Exp.Biol Med*. 227: 914-919.
- Thomson AB, Brust R, Ali MA, Mant MJ, Valberg LS. Iron deficiency in inflammatory bowel disease. Diagnostic efficacy of serum ferritin. *Am J Dig Dis* 1978;23:705-9.
- Uysal, M., 1998. Serbest radikaller, lipit peroksitleri ve organizmada prooksidan-antioksidan dengesi etkileyen koşullar, *Klinik Gelişim*, 11, 336- 341.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M.T.D., Mazur, M., Telser, J., 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease, *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 39 (1), 44-84.
- Wakefield AJ, Pittilo RM, Sim R, et al: Evidence of persistent measles virus infection in Crohn's disease. *J Med Virol* : 1993; 39:345.
- Weatherall DJ. Diseases of the blood. In: Weatherall DJ, Ledingham JGG, Warrell DA, eds. *Oxford textbook of medicine*. Oxford:Oxford University Press, 1984:19.100-19.203.
- Weiss G, Wachter H, Fuchs D. Linkage of cell-mediated immunity to iron metabolism. *Immunol Today* 1995;16:495-500.
- Yaping Z., Suping Q., Wenli Y., et al. Antioxidant activity of lycopene extracted from tomato paste towards tri-chloromethyl peroxy radical CCl_3O_2 . *Food Chem* 2002; 77: 209-212.



EK 2 : SERTİFİKA

HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU
DENEY HAYVANLARI KULLANIM SERTİFİKASI

Belge No: 08 - 10

Sayın Songül ÇETİK

20 Eylül - 01 Ekim 2010 tarihleri arasında düzenlenen
"Deney Hayvanları Kullanımı İle İlgili Eğitim Programı" teorik ve pratik
uygulamalarına katılarak başarıyla tamamlanmıştır.

Prof.Dr. Kevser EROL
Hayvan Deneyleri Yerel
Etik Kurulu Başkanı

Prof. Dr. Fazıl TEKİN
Eskişehir Osmangazi Üniversitesi
Rektörü

