

**T.C.
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ**

**DENEYSSEL KOLİT OLUŞTURULMUŞ SIÇANLARDA
ALFA LİPOİK ASİT'İN İNOS GEN İFADESİ VE
APOPTOZİS ÜZERİNE ETKİSİ**

Dr. İlhan ZENCİRCİ

**Genel Cerrahi Anabilim Dalı
TIPTA UZMANLIK TEZİ**

**ESKİŞEHİR
2011**

**T.C.
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ**

**DENEYSEL KOLİT OLUŞTURULMUŞ SIÇANLARDA
ALFA LİPOİK ASİT'İN İNOS GEN İFADESİ VE
APOPTOZİS ÜZERİNE ETKİSİ**

Dr. İlhan ZENCİRCİ

**Genel Cerrahi Anabilim Dalı
TIPTA UZMANLIK TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Serdar ERKASAP**

**ESKİŞEHİR
2011**

TEZ KABUL VE ONAY SAYFASI

T.C.

ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞINA,

Dr. İlhan ZENCİRCİ'ye ait "Deneysel Kolit Oluşturulmuş Sıçanlarda Alfa Lipoik Asit'in İnos Gen İfadesi ve Apoptozis Üzerine Etkisi" isimli çalışma jürimiz tarafından Genel Cerrahi Anabilim Dalı'nda Tıpta Uzmanlık Tezi olarak oy birliği ile kabul edilmiştir.

Tarih:

Jüri Başkanı

Prof. Dr. Serdar ERKASAP
Genel Cerrahi Anabilim Dalı

Üye

Prof. Dr. Tarık ÇAĞA
Genel Cerrahi Anabilim Dalı

Üye

Prof. Dr. Enver İHTİYAR
Genel Cerrahi Anabilim Dalı

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Fakülte Kurulu'nun
...../...../.....Tarih ve/..... Sayılı Kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Necmi ATA
Dekan

TEŞEKKÜR

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Genel Cerrahi Anabilim Dalında almış olduğum uzmanlık eğitimim boyunca bilgi ve tecrübeleri ile bana destek olan ve tezimin hazırlanmasında yardımlarını benden esirgemeyen tez danışmanım sayın hocam Prof. Dr. Serdar ERKASAP'a teşekkür eder, sonsuz saygılarımı sunarım. Bilgi ve deneyimleri ile bana yol gösteren ve eğitimimde büyük emekleri olan hocalarım Prof. Dr. Bekir YAŞAR, Prof. Dr. Ercüment PAŞAOĞLU, Prof. Dr. Tarık ÇAĞA, Prof. Dr. Enver İHTİYAR, Prof. Dr. Adnan ŞAHİN, Prof. Dr. Ersin ATEŞ'e teşekkür eder, sonsuz saygılarımı sunarım. Ayrıca ihtisas eğitimimin ilk yıllarında birlikte çalışma fırsatı bulduğum rahmetli Prof. Dr. Ertuğrul KARAHÜSEYİNOĞLU'nu saygı ve rahmetle anıyorum. Ayrıca tez çalışmamda yardım ve desteğini esirgemeyen Prof. Dr. Nilüfer ERKASAP, Doç. Dr. Murat TOSUN, Arş. Gör. Dr. Mete ÖZKURT ve istatistiksel değerlendirmeleri yapan Dr. Canan DEMİRÜSTÜ' ne içten teşekkürlerimi sunarım.

ÖZET

Zencirci, İ. Deneysel Kolit Oluşturulmuş Sıçanlarda Alfa Lipoik Asit'in İnos Gen İfadesi ve Apoptozis Üzerine Etkisi. Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Genel Cerrahi Anabilim Dalı Tıpta Uzmanlık Tezi, Eskişehir, 2011.

Ülseratif Kolit (ÜK)'te immünolojik hiperaktivasyona neden olan bir mukozal bağışıklık defekti mevcuttur. Bu defekt çevresel ajanlara ve antijenlere karşı başlayan kontrol dışı immün reaksiyonlara neden olmaktadır. Ortaya çıkan kontrol dışı immün yanıt da lenfosit proliferasyonu, sitokinlerin salınımı, diğer hücre birikimleri, aşırı nötrofil üretimine neden olur ve sonuçta hücre hasarı gelişir. Çalışmamızda ÜK oluşturulmuş sıçanlarda Alfa Lipoik Asit (ALA) tedavisinin etkinliğini göstermeyi amaçladık. Bu deneysel çalışmada toplam 30 adet Spraque Dawley cinsi sıçan kullanıldı. Her deney grubunda 10 adet sıçan olacak şekilde toplam 3 grup oluşturuldu. Grup 1: kontrol, Grup 2: sham grubunda herhangi bir tedavi uygulanmadan kolit oluşturulup 4 hafta boyunca izlendi. Grup 3: ÜK oluşturulduktan sonra 4 hafta boyunca alfa lipoik asit 100mg/kg'dan intraperitoneal (ip) uygulandı. Deney sonunda tüm gruptaki sıçanların kolonları cerrahi olarak çıkarıldı. TUNEL yöntemiyle apoptozis ve Real-Time Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) ile İndüklenebilir Nitrik Oksit Sentetaz (iNOS) düzeyi belirlendi. Ayrıca immünohistokimyasal olarak p53 ve NF-kB incelendi. ÜK oluşturulmuş sıçanlarda apoptotik hücre sayısında artış olduğu gözlemlendi. p53 ve NF-kB gen ifadesinin arttığı belirlendi. ALA ile tedaviden sonra apoptotik hücre sayısında belirgin azalma olduğu ve p53 ve NF-kB gen ifadesinde azalma olduğu görüldü. ALA'nın iNOS gen ifadesi üzerine etkisinde ise istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç tespit edemedik. ÜK'in tedavisinde, antioksidan ajan kullanımının kolon fonksiyonlarının korunmasında etkili olduğunu ve tedavide yer alması gerektiğini birçok açıdan gösterdik. Bu nedenle, bulgularımız ileride yapılacak çalışmalara yol gösterici olabilir.

Anahtar Kelimeler: ÜK, TUNEL, immünohistokimyasal, p53, NF-kB, iNOS,

Real-Time PCR, apoptozis, ALA.

Destekleyen Kurum: T.İ.C.A.M.

ABSTRACT

Zencirci, İ. The Effect of Alpha Lipoic Acid on iNOS Expression and Apoptosis in Experimental Colitis Rats. Eskisehir Osmangazi University Medicine Faculty Department of Surgery Medical Specialty Thesis, Eskisehir, 2011. UC has a mucosal immune defect causing immunologic system hiperactivation. This defect leads to start out of control immune system reaction against environmental agents and antigens. Emerging out of control immune response leads to lymphocyte proliferation, cytokine release, accumulation of other cells, excessive neutrophil production and develops ultimately cell injury. In our study, we aimed to shown that ALA treatment affects on UC. Total 30 Sprague Dawley rats were used in these experiments. There were 3 study groups, with 10 rats in each group. Group 1: control; Group 2: sham, Induced Colitis were followed for 4 weeks without treatment Group 3: intraperitoneal (ip) 100 mg/kg alpha lipoic acid treated for 4 weeks after Induced Colitis; After completion of experiments, colon of all rats from all groups were removed surgically. Apoptosis was determined by TUNEL method and iNOS levels were determined by real Time PCR. Also p53 and NF-kB by immunohistochemistry were analyzed. In this study, we analyzed that apoptotic cells increase in rat induiced colitis also expressions of p53 and NF-kB increased. On the other hand; apoptotic cells, expressions of p53 and NF-kB reduced after ALA treatment. The effect of ALA on iNOS expression was not found statistically significant. in this study, use of anti-oxidant agents is effective in prevention of colon functions in the treatment of UC showed in many aspects and they should be included in treatment. May be this effect more clearly could show with study will be at future.

Key Words: ÜK, TUNEL, immünohistokimyasal, p53, NF-kB, iNOS,

Real- Time PCR, apoptozis, ALA.

Supporter Institution: T.I.C.A.M.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
TEZ KABUL VE ONAY SAYFASI	iii
TEŞEKKÜR	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
TABLOLAR DİZİNİ	xiv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Kolon Embriyolojisi	4
2.2. Kolon Anatomisi	4
2.3. Kolon Histolojisi	9
2.4. Kolon Fizyolojisi	9
2.5. Ülseratif Kolit	13
2.6. Nükleer Faktör kappa B	21
2.7. Nitrik Oksit(NO)	24
2.8. p53 Geni	28
2.9. Apoptozis	31
2.10. Alfa Lipoik Asit	47
3. GEREÇ VE YÖNTEM	52
3.1. Kimyasal Maddeler ve Uygulamaları	52
3.2. Deney Grupları	52
3.3. Deney Protokolü	52
3.4. Histolojik İnceleme	54
3.5. Fizyolojik İnceleme	56
3.6. İstatiksel İnceleme	60
4. BULGULAR	61
4.1. Histolojik Bulgular	61
4.2. Fizyolojik Bulgular	68

	Sayfa
5. TARTIŞMA	71
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	79
KAYNAKLAR	81

SİMGELER VE KISALTMALAR

ALA	Alfa Lipoik Asid
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
CAT	Katalaz
cGMP	Siklik Guanozin Monofosfat
DHLA	Dihidro Lipoik Asid
GALT	Gastrointestinal sistemle ilişkili lenfoid doku
GSH-Px	Glutasyon peroksidaz
H ₂ O ₂	Hidrojenperoksit
IL	İnterlökin
IL-1ra	IL-1 receptor antagonist
IFN	İnterferon
iNOS	indüklenebilir Nitrik Oksit Sentetaz
JAK-STAT	Janus Kinases Signal Transducers and Activators of Transcription
KDa	Kilodalton
LTB-4	Lökotriyen B-4
µgr	Mikrogram
ng	Nanogram
NF-kB	Nükleer faktor kappa-B
NO	Nitrik oksit
ONOO ⁻	Peroksinitrit anyonu
O ₂ ⁻	Süperoksit radikali
OH ⁻	Hidroksil radikali
PAF	Platelet aktive edici faktör
PDTC	Pyrrolidinedithiocarbamate
PNL	Polimorf Nüveli Lökosit
PGI ₂	Prostasiklin
SOD	Süperoksit Dismutaz
SOR	Serbest Oksijen Radikalleri
RT-PCR	Real-Time Polymerase Chain Reaction
TACE	TNFα dönüştürücü enzim

TICAM	Tıbbi Cerrahi Araştırma Merkezi
TNF- α	Tümör nekrozis faktör alfa
TUNEL	Terminal deoxynucleotidyl Transferase Biotin - dUTP Nick End Labeling
ÜK	Ülseratif Kolit

ŞEKİLLER

	Sayfa
2.1. Kolonun Arteriyel Sistemi.	6
2.2. Kolonun Venöz Sistemi.	7
2.3. Kolonun Lenfatik drenajı.	7
2.4. Ratlarda Kolon Anatomisi.	8
2.5. Bozulmuş GALT sonucu gelişen inflamasyon.	20
2.6. NF-kB aktivasyonu.	22
2.7. Reseptör Bağımlı NF-kB aktivasyonu.	23
2.8. Nitrik Oksit Sentezi.	25
2.9. p53 Gen etkileşim Modeli.	29
2.10. Genom Bütünlülüğünün Devamında P53 Geninin Rolü.	30
2.11. Nekroz ve apoptozis arasındaki farklar.	36
2.12. İntrensek ve ekstrinsek sinyal yolu tetikleyicileri.	37
2.13. Fas ve TNF ölüm reseptör ve aktivatörleri.	38
2.14. İntrensek apoptotik sinyal yolu.	39
2.15. Apoptozisteki olayların şematik görünümü.	41
2.16. Bax/ Bcl-2'nin etki mekanizması.	43
2.17. ALA ve DHLA'nın yapıları.	49
2.18. Lipoik asidin diğer antioksidanlarla etkileşimi.	51
3.1. Seçilmiş PCR ürünlerinin jel görüntüsü.	60
4.1A. Kontrol grubuna ait Hematoxylen Eosin ile boyanmış kesit.	61
4.1B. Sham grubuna ait Hematoxylen Eosin ile boyanmış kesit.	62
4.1C. Tedavi grubuna ait Hematoxylen Eosin ile boyanmış kesit.	62
4.1D. Kontrol grubunda NF-kB ifadesi	63

	Sayfa
4.1E Sham grubunda NF-kB ifadesi.	63
4.1F Tedavi grubunda NF-kB ifadesi.	64
4.2A Kontrol grubunda p53 ifadesi.	64
4.2B Sham grubunda p53 ifadesi.	65
4.2C Tedavi grubunda p53 ifadesi.	65
4.2D Kontrol grubunda Apoptozis.	66
4.2E Sham grubunda Apoptozis.	66
4.2F Tedavi grubunda Apoptozis.	67
4.3. Gruplara göre iNOS kat artışı.	68
4.4. Kontrol grubuna ait iNOS geni RT-PCR verileri.	69
4.5. Sham grubuna ait iNOS geni RT-PCR verileri.	69
4.6. ALA grubuna ait iNOS geni RT-PCR verileri.	70
4.7. Seçilmiş RT-PCR ürünlerinin jel görüntüsü.	70

TABLÖLAR

	Sayfa
2.1. Nekrozis ve apoptozis arasındaki farklılıklar.	35
2.2. Bcl-2 ailesi.	43
2.3. Apoptozis ile hastalıkların ilişkisi.	45
3.1. gDNA uzaklaştırmak için reaksiyon hazırlanması.	58
3.2. cDNA sentezi için kullanılan karışım içeriği.	58
3.3. RT PCR için miks içeriği.	59
4.1. Grupların histolojik değerlendirilmesi.	67
4.2. Gruplara göre iNOS kat artışı.	68

1.GİRİŞ

Ülseratif kolit (ÜK); klinik olarak kanlı mukuslu ishale seyreden, lokal ve sistemik komplikasyonları bulunan, spontan iyileşme ve şiddetlenmeler gösteren, kolon ve rektum mukozasının ülserli nonspesifik inflamatuvar hastalığıdır(1). Hastalığın etiyojisinde genetik, çevresel ve konakçı immün cevap gibi faktörlerin önemli rol oynadığı düşünülmektedir(1,2).

Son dönemde yapılan çalışmalar ÜK’de immünolojik hiperaktivasyona neden olan mukozal bağışıklık defekti üzerine odaklanmaktadır. Bu defekt çevresel ajanlara ve antijenlere karşı başlayan kontrol dışı immün reaksiyonlara neden olmaktadır(1,2). Ortaya çıkan kontrol dışı immün yanıt lenfosit proliferasyonu, sitokinlerin salınımı, diğer hücre birikimleri, aşırı nötrofil üretimine neden olur ve sonuçta hücre hasarı gelişir. İmmün sistem aktivasyonu sonucu proinflamatuvar ve antiinflamatuvar sitokinler arasındaki denge bozulur ve IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, IFN- γ ve TNF gibi proinflamatuvar sitokinlerde artma, IL-4 gibi antiinflamatuvar sitokinlerde azalma meydana gelir(3,4).

Nükleer faktor kappa-B (NF- κ B) nükleer transkripsiyon faktörü olup immünite ve inflamasyon ile ilişkili çok sayıda gen transkripsiyonunun regüle edilmesinde kritik rol oynamaktadır(5). Bu proinflamatuvar genler interlekinleri, kemokinleri, adezyon moleküllerini, reseptörleri ve enzimleri içermektedir(5,6). NF- κ B’nin direk veya indirek yoldan bazı iltihabi sitokinlerin üretimini etkileyerek ÜK hastalığının patogeneğinde rol oynayabileceği de belirtilmiştir(7). ÜK hastalığında NF- κ B’nin aktive olduğu ve IL-1, IL-6, IL-8 ve TNF gibi proinflamatuvar sitokinlerin üretimini artırdığı bildirilmektedir(4-7).

Artmış inflamatuvar yanıtı bağli olarak ortamda biriken sitokinler ve serbest oksijen radikalleri hücreye ve genomuna zarar vermeye başladığında bekçi gen olarak da bilinen p53 geni devreye girer. Hücre içerisinde biriken p53 proteini hücre siklusunu G1 fazında tutarak S fazına geçmesini engeller. Böylelikle DNA onarımı gerçekleştirilir ve hücre siklusu tamamlanır. Onarım yapılamazsa hücre apoptozise gider(8). Yoshida ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada da inflamatuvar aktivitenin arttığı kolon mukozasında p53 aktivitesinin de arttığını bulmuşlar ve bunun inflamatuvar strese karşı koruyucu olduğunu düşünmüşlerdir(9). p53 hücre

siklusunu durduramazsa kanserleşme görülür. ÜK kolonda kanser gelişimini arttıran bir risk faktörüdür(10).

Apoptozis ile organizmada hasar görmüş veya tehlike potansiyeli olan hücreler, çevreye zarar vermeksizin ortadan kaldırılır(11,12). Serbest oksijen radikallerinin (SOR) orta derecede artışı birçok farklı hücrede apoptozise neden olur(13). ÜK'de bozulmuş immün yanıtı bağlı gelişen patolojik süreçte apoptozisin aktif hücre hasarı ve ölümünde önemli rolünün olduğu çalışmalarla ortaya konmuştur(14,15).

IL-1, TNF ve IFN- γ intestinal epitel hücresinden, makrofajdan ve ortamdaki diğer hücrelerden Nitrik Oksit (NO) salınmasını artırır ve böylece ortamdaki serbest oksijen radikalleri artar(4,16-18). Günümüzde yapılan çalışmalar, serbest oksijen radikalleri üzerine yoğunlaşmıştır. Artmış inflamatuvar yanıtı bağlı olarak doku hasarını başlatan en önemli faktör, serbest oksijen radikalleridir(SOR)(16-18). Aerobik canlılar, metabolizmaları sırasında fizyolojik olarak oksidatif strese maruz kalırlar. Dokuların tükettiği oksijenin büyük bir kısmı (%95) aerobik metabolizma için kullanılırken, %5'inin SOR'e çevrildiği tahmin edilmektedir. Oksijenden üretilen en önemli reaktif türler arasında süperoksit anyonu (O_2^-), hidrojen peroksit (H_2O_2), hidroksil radikali (OH^-), peroksinitrit anyonu ($ONOO^-$) vardır(18). Bu radikaller membran hasarı, DNA yıkımı, proteaz aktivasyonu, lipid ve protein peroksidasyonu, takiben apoptozis ve nekrozla sonuçlanan hücre ölümüne neden olmaktadır(16,18). Alfa Lipoik Asit (ALA) ise bu radikallerden dolayı ortaya çıkan etkilere karşı hücreyi korumaktadır. Biz de çalışmamızda kolon epitelindeki hasarın asıl sorumlusu olan proinflamatuvar ve antiinflamatuvar sitokinler arasındaki dengenin bozulmasıyla ortaya çıkan serbest oksijen radikalleri (SOR) üzerine antioksidan bir ajan olan ALA'nın etkisini göstermeyi amaçladık.

Çalışmamızda; kontrol, sham ve ÜK+ALA grublarında apoptozis, NF-kB, p53 ve iNOS aktivitesini inceledik. Deneysel kolit oluşturulmuş hayvan modellerinde NF-kB inhibitörü kullanarak dokulardaki histolojik iyileşmenin gözlenmesi ve NO seviyesindeki azalma ile başka antioksidanların sitokin üretimini baskılaması ve oksidatif hasarın önlenmesi ile ilgili çalışmalar yapılmıştır(19,20). Güçlü bir antioksidan ajan olan ALA ile değişik doku ve koşullarda oksidatif hasarı azaltma ve apoptozis ile ilgili birçok çalışma yapılmıştır. Ancak yapılan literatür

taramalarında deneysel olarak kolit oluşturulmuş ratlarda ALA'nın apoptozis ve indüklenabilir nitrik oksit sentetaz (iNOS) gen ifadesi üzerine etkisi araştıran herhangi bir çalışmaya rastlayamadık. Bu nedenle oluşturduğumuz deneysel modelde ÜK'in etiyolojisini daha iyi anlamak, dokuyu kanser gelişiminden korumak ve mevcut olan medikal tedavilere alternatif ve tamamlayıcı bir tedavi modeli oluşturmak için ALA'i kullandık.

2. GENEL BİLGİLER

2.1.Kolon Embriyolojisi

Dördüncü gestasyonal haftada gelişen primitif bağırsak; ön bağırsak (foregut), orta bağırsak (midgut), son bağırsak (hindgut) olmak üzere üçe ayrılır. Midgutdan, ince bağırsaklar ve transvers kolonun 2/3 proksimal ve 1/3 distal parçasının birleşim noktasının proksimalinde kalan kalın bağırsaklar gelişir. Hindgutdan transvers kolonun son 1/3 kısmından başlayarak anüsün proksimaline kadar olan kalın bağırsaklar ve alt ürogenital sistem gelişir.

Altıncı gestasyonel haftada gelişen midgut abdominal kavite dışına çıkarken superior mezenterik arter etrafında saat yönünün tersine 270°'lik dönüşünü tamamlayarak abdominal kavitedeki son halini alır. Hindgut terminal parçası ise, yüzey ektodermiyle doğrudan temas eden ve endodermle döşeli bir boşluk olan kloaka içine doğru uzanır. Endodermle ektodermin birbirine dokunduğu bölge kloakal membranı meydana getirir. Ürorektal septum kloakayı önde primitif ürogenital sinus ve arkada da anorektal kanal adı verilen iki parçaya ayırır(21).

2.2.Kolon Anatomisi

Kolon, ileoçekal bileşkedan başlayıp anüse kadar uzanır. 130-150cm uzunluğunda 2,5-8,5 cm çaptadır. Çekum ile terminal ileum arasında ilioçekal kapak bulunur. Bu kapak sayesinde kolonik içeriğin ileuma geçişi engellenir. Longitudinal kas lifleri bir araya gelerek tenya omentalis, tenya libera, tenya mesokolika denilen üç ayrı bant oluşturur(22). Sirküler kas lifleri ise haustra denilen keselenmeleri meydana getirir. Pilika semilunaris olarak adlandırılan hilal biçimli yapılarla haustralar birbirinden ayrılırlar. Appendiks epiploika ise tenyalara tutunan periton kaplı yağlı çıkıntılardır.

Kolon duvarı içten dışa sırasıyla; mukoza, submukoza, sirküler kaslar, longitudinal kaslar ve serozadan oluşur(23).

Kolon; çekum, çıkan kolon, transvers kolon, inen kolon, sigmoid kolon, rektum olmak üzere kısımlara ayrılır. Büyük omentum transvers kolonun üst kenarına tutunur. Çıkan kolon, inen kolon, hepatik ve splenik fleksura arka yüzleri genellikle retroperitonealdir. Çekum, transvers kolon, sigmoid kolon ise intraperitonealdir(22).

Çekum; kolonun ilk parçası olup, sağ iliak fossada yer alır. Yaklaşık 6 cm uzunluğunda, 7,5 cm çapındadır. Arka yüzde psoas majör ve muskularis iliakus ile komşudur. Tenyalar çekum posteromedialinde appendiks vermiformisin yapıştığı yerden başlar. İlioçekal kapağın ileum tarafında villuslar bulunur(22).

Çıkan kolon; çekum ile hepatik fleksura arasındaki 15-20 cm'lik kısımdır. Karaciğer alt komşuluğuna uzanır ve sola öne dönerek transvers kolonu oluşturur. Arkada iliak kaslar, quadratus lumborum kası ve sağ böbrek ile komşudur(22).

Transvers kolon; hepatik fleksuradan başlayarak splenik fleksuraya doğru transvers şekilde uzanır. Yaklaşık 50 cm'dir. Hepatik fleksura duodenum 2. parçası ve pankreas başı ile komşudur. Gastrokolik ligaman ile mideye bağlıdır. Büyük omentuma tamamen yapışıktır. Dalağın hemen inferiorunda splenik fleksurayı oluşturur(22).

İnen kolon; splenik fleksuradan itibaren yaklaşık 25 cm'lik kısmını oluşturur. Sol iliak fossada yerleşir. Sol böbrek dış kenarı, psoas majör kası, kuadratus lumborum kası ile komşudur(22).

Sigmoid kolon; rektum ile inen kolon arasındaki yaklaşık 40 cm'lik kısımdır. Promontoryumun hemen önünde rektosigmoid bileşke bulunur. Rektosigmoid bileşke yakınında tenyalar net görülmez, appendiks epiploikalar kaybolur(22).

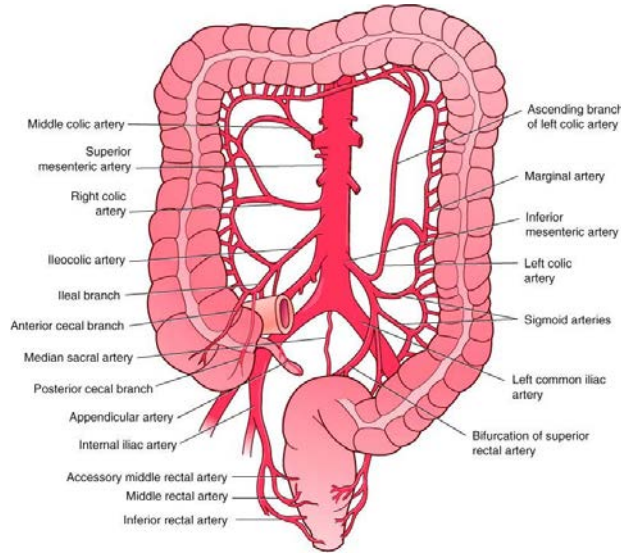
Rektum; promontoryumun hemen önünde başlar. Sakrum ve koksiksin eğimine uygun olarak aşağı ve arkaya doğru yönelir. Sakral bölgeyi geçip pelvik diafragmada anüs ile birleşir. Yaklaşık 14 cm uzunluğunda ve 4 cm genişliğindedir. Haustra, appendiks epiploika ve tenya içermez. Üst 2/3'lük kısmı periton ile örtülüdür(22).

2.2.1.Kolonun Arteriyel Sistemi

Süperior mezenterik arter (SMA), çölyak trunkusun altından, aortanın önünden ayrılır. Çekum, çıkan kolon ve transvers kolonu ileokolik, sağ kolik, orta kolik dalları ile besler(22).

Inferior mezenterik arter (İMA), SMA'nın altında infrarenal aortadan çıkarak inen kolon, sigmoid kolon ve üst rektumu sırası ile sol kolik, sigmoidal ve süperior rektal arter dalları ile besler. İMA süperior rektal arter olarak devam eder ve internal iliak arterin medial rektal arter dalı ve internal pudental arterin inferior rektal arter dalı ile birleşerek anastomoz yapar ve rektumu beslerler(22). Splenik fleksura

hızasında SMA ve İMA arasında kollateraller bulunur. İleokolik, sağ kolik, orta kolik, sol kolik arterler aralarında anastomoz oluşturarak Drummond'un marjinal arterini meydana getirirler. Kolonun mezenterik sınırı boyunca yer alarak kolona vasa rektaları verirler. Böylece mezenterik kenar boyunca devamlı kan akımı elde edilmiş olur. İMA'nın sol kolik dalı ile SMA'nın orta kolik dalı arasındaki sabit olmayan anastomozlar ise Riolan arkı olarak adlandırılır(22) (Şekil 1).



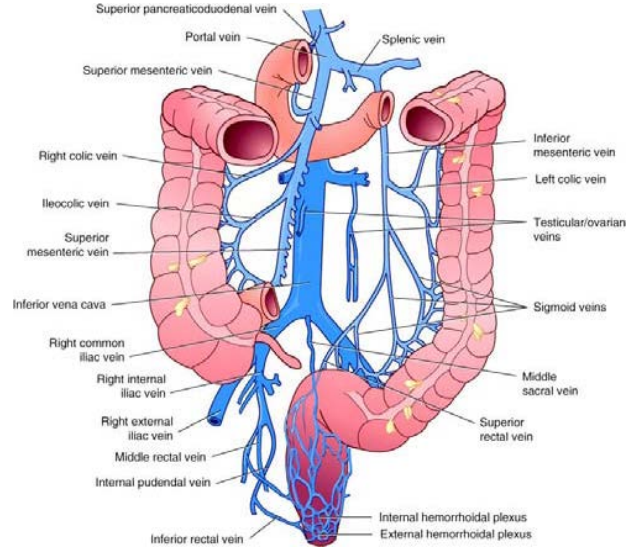
Şekil 2.1. Kolonun Arteriyel Sistemi.

2.2.2.Kolonun Venöz Sistemi

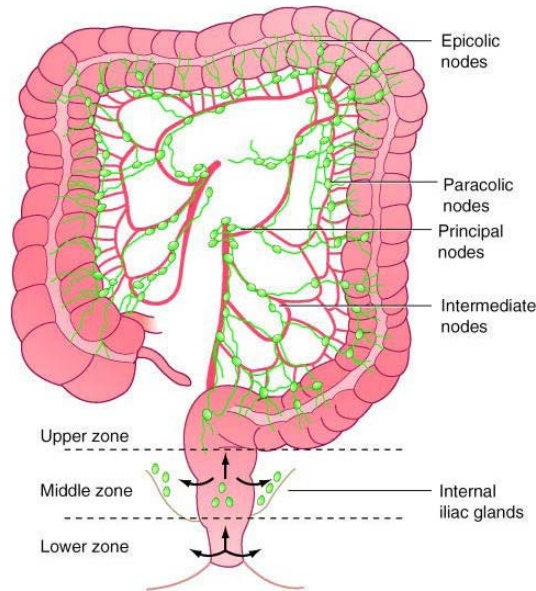
İnferior mezenterik ven dışında kolonu drene eden venler arterlerle aynı yolu takip eder. İnferior mezenterik ven inen kolonu, sigmoid kolonu ve proksimal rektumu drene eder. Trietz ligamanının solunda retroperitoneal olarak ilerler, pankreas gövdesi arkasında devam eder ve splenik vene katılır. Süperior mezenterik ven çekumu, çıkan kolonu ve transvers kolonu drene ederek splenik venle birleşip portal veni oluşturur(22) (Şekil 2).

2.2.3.Kolonun Lenfatik Drenajı

Kolon submukoza ve musküler tabakada yerleşmiş lenfatik kanallarla çevrilidir. Mukozada lenfatik drenaj yoktur. Lenfatik damarlar kolonun arteriyel dolaşımını takip ederler. Lenf nodları bağırsak duvarında (epikolik), bağırsak kenarının iç yüzeyi boyunca (parakolik), mezenterik arterler boyunca (intermediate) ve SMA, İMA çıkışları civarında (ana lenf nodları) yer alırlar (Şekil 3).



Şekil 2.2. Kolonun Venöz Sistemi.



Şekil 2.3. Kolonun Lenfatik Drenajı.

2.2.4. Kolonun Sinirleri

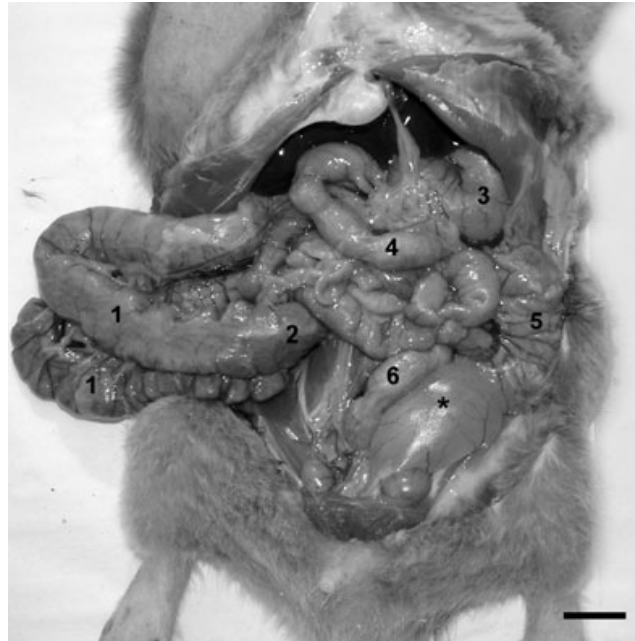
Sempatik sinirler T11-L3' ten kaynaklanan sempatik ganglionlardan sağlanır. Sempatik sinirler peristaltizmi ve sekresyonları azaltır. İlioçekal kapak ve anal sfinkter tonusunu arttırarak defekasyonu geciktirir.

Parasempatik sinirler ise sağ kolon ve transvers kolonun ilk yarısı için nervus vagustan splenic fleksura ve inen kolon için ise S2-S4 pleksusundan köken alır.

Parasempatik sinirler sekresyonları ve peristaltizmi arttırır. Sakral parasempatiklerin dağılımı hipogastrik pleksusdan geçerek splenik fleksuraya kadar ulaşır(22).

2.2.5. Sıçanlarda Kolon Anatomisi

Sıçanların gastrointestinal anatomisi insan anatomisi ile oldukça benzemektedir. Duodenum anatomisi insandaki anatomiden farklıdır. S şeklinde karaciğerin viseral yüzünü takip ederek önce sağa, sonra orta hatta yönelir, transvers kolon ile arasında mevcut olan bağlantı kolonun disseksiyonu sırasında önemlidir. İleum doğrudan kolona açılır, insanda mevcut olan ilioçekal valv yapısını bulundurmaz. Çekum sıçanlarda da kolonun en geniş kısmını oluşturur ve 6-9 cm. uzunluktadır. Daha sonra daralarak insandaki gibi çıkan kolon, transvers kolon ve inen kolon kısımlarını oluşturur. Ortalama uzunluğu 21-24 cm kadardır. Makroskopik olarak ayırt edilebilen tenya yapısı yoktur. Rektum mukozal oblik pililerin bağırsak uzun eksenine paralel hale gelmesiyle kolonun diğer segmentlerinden ayırt edilir. İnsandan farklı olarak kolonun neredeyse tamamı mobildir ve visseral periton ile örtülüdür Bu özellikleri ile sıçan kolonu anatomik olarak kolit modeli oluşturmak için, uzun süredir kullanılan yeterli bir modeldir (Şekil 4).



Şekil 2.4. Sıçan Kolon Anatomisi (1)ve (2) çıkan kolon,(3) mide, (4) duodenum, (5) çekum ve (6) inen kolon (6).

2.3.Histoloji

Tüm gastrointestinal tüp bazı ortak histolojik özellikler taşır. Duvarı içten dışa dört ana tabakadan oluşur: mukoza, submukoza, muskularis ve seroza. **Tunika Seroza:** Serozal tabaka periton tarafından oluşturulmuştur. İnce barsak duodenumun retroperitoneal kesimi dışında periton ile sarılmıştır. Mezenter, ileal ve jejunal ansları karın arka duvarına asan ve L2 vertebra seviyesinden başlayarak çekum medial komşuluğuna uzanan periton plikasıdır. Seroza yaprakları arasında ince barsağın vasküler yapıları, sinirleri, lenfatik kanalları ve yağ bulunur. **Tunika Muskularis:** Bu tabaka düz kas liflerinden oluşur. Dışta longitudinal ve içte sirküler kaslar bulunur. Longitudinal kaslar ince barsakların relaksasyonunu ve kısalmasını, sirküler kaslar ise ince barsakların kontraksiyonunu ve uzamasını sağlar. **Tunika Submukoza:** İçerisinde damar, lenfatik kanallar, ganglion ve nöral pleksuslar bulunan gevşek bağ dokusundan oluşur. **Tunika Mukoza:** İçten dışa epitelyal tabaka, lamina propria ve muskuler tabaka olmak üzere üç tabakadan oluşur Epitelial tabaka tek sıralı silindirik epitel hücrelerinden ve goblet hücrelerinden oluşur. Bu tabaka absorpsiyondan sorumludur.

Lamina propria gevşek bağ dokusundan oluşmuştur. İçerisinde vasküler yapılar, sinirler, Lieberkühn bezleri ve lenf folikülleri bulunur. Lenf nodları antimezenterik kenarda barsak eksenine paralel konfigürasyonda yerleşmişlerdir. Lenf nodlarının oluşturduğu kümelere payer plakları denir. Musküler tabaka dışta longitudinal ve içte sirküler düz kas liflerinden oluşur. İnce barsak mukozası kıvrımlı yapıda olduğundan emilim yüzeyi genişlemektedir. Bu kıvrımlara plika sirkularis denir. Jejunal anslarda ileal anslara göre daha büyük yapıda ve daha çok sayıda bulunmaktadır. Plika sirkularislerin yüzeyinde milimetrik boyutlarda parmak şeklinde villus adı verilen yapılar bulunur. Villuslar epitelyal tabaka, lamina propria ve muskuler tabakanın sirküler liflerinin lümen içine projeksiyonu ile oluşur. Villusların santral kesiminde submukozadaki lenfatik kanallar ile devamlılık gösteren lenfatik kapiller yapılar bulunur. Ayrıca ince barsak mukozasının epitelyal tabakasından lümen içerisine uzanan ince tüysü mikrovilluslar mevcuttur(23).

2.4. Kolon Fizyolojisi

Kolonun başlıca fonksiyonları; kimustan su ve elektrolitlerin emilimi ve fekal maddenin dışarı atılmasına kadar depolanmasıdır. Kolonun proksimal yarısı, temel

olarak emilim ile distal yarısı ise depolama ile ilgilidir(8). Bu fonksiyonlar için şiddetli hareketler gerekmediğinden kolon hareketleri çok çok yavaştır.

2.4.1.Su ve Elektrolit Değişimi

Kolonun majör emici fonksiyonu bağırsakta su ve elektrolit dengesini düzenlemektir. Kolon su ve elektrolitlerin % 90'ından fazlasını emerek enterik içeriğin hacmini azaltır. Günde yaklaşık 6,5 litre sıvı ince bağırsaklar tarafından 1,4 litre sıvı, 200 mEq sodyum ve klor kolon tarafından emilir. 100ml kadar sıvı feçes ile dışarı atılır. Kolon günlük absorpsiyon kapasitesini 5-6 litreye çıkarabilir. Eğer ince bağırsakların günlük absorpsiyon kapasitesi 2 litreden az olursa kolonun sıvı emme gücü aşıldığından fekal su miktarı artar ve klinik olarak diare ortaya çıkar.

Kolon yüksek konsantrasyon gradiyentine karşı sodyum absorbe edebilme yeteneğine sahiptir. Özellikle distal kolonda böbreğin distal tübüllerindeki benzer temel hücrel mekanizmalarla sodyum ve su transportu gerçekleştirilir(24,25). Kolon günlük 400 mEq sodyum emebilme kapasitesine sahiptir. Dehidratasyon sırasında aldersteron stimülasyonuna kolonik cevap önemli kompensatuar mekanizmadır. İleostomili hasta bu absorpsiyon kapasitesini kaybeder, bu yüzden artmış sodyum kaybını tolere edemez. Aldersteron ve glikokortikoidler apikal membran permeabilitesinin sodyuma karşı geçirgenliğini arttırarak absorpsiyonunu arttırır(24). Bu nedenle ülseratif kolitli hastalara tuzsuz diyet önerilmektedir. Kolondaki potasyum geçişi sodyumun aktif transportu sonucu oluşan elektrokimyasal gradiente göre pasif olarak gerçekleşir. Potasyum sekresyonu, lümendeki konsantrasyon 15 mEq'den daha az olduğu sürece devam eder. Bu düzey altında ise potasyum sekresyonu durur ve absorpsiyonu başlar. Aldersteron ve epinefrin sodyum ve potasyum sekresyonunu arttırırken, betanekol azaltır(24,25).

Klor, konsantrasyon gradientine karşı kolon mukozasından aktif emilir. Klor ve bikarbonat lüminal yüzeyde değişime uğrar. Lümende asidotik ortam varsa klor absorpsiyonu artar. Bu da bikarbonat sekresyonunu arttırır. Üreterosigmoidostomili hastalarda üriner klor absorpsiyonu ve aşırı bikarbonat sekresyonu nedeniyle metabolik asidoz ve hiperkloremi gelişebilir. Klor konsantrasyonu % 25 oranında bikarbonat değişimi, % 75 oranında nötral NaCl absorpsiyonu ile olur(2).

Besinlerin aktif emilimi minimal olsa da kolon, emilmemiş karbonhidratlardan intraluminal bakteriyel fermentasyonla oluşan kısa zincirli yağ

asitlerini pasif olarak emebilir. Emilmiş butirat, asetat ve propionat gibi kısa zincirli yağ asitleri kolonik epitelin yakıt kaynağıdır. Oluşan enerji aktif sodyum transportunda gereklidir. Ülseratif kolitli hastalarda kısa zincirli yağ asitlerinin metabolizmasının bozulması sonucu sodyum absorpsiyonu bozulur. Bu hastalarda, intraluminal kısa zincirli yağ asitleri fayda sağlayabilir(2).

Kolonik bakteriler protein ve üreyi parçalayarak amonyak oluşturur. Amonyum iyonları bikarbonat ile reaksiyona girerek noniyonize amonyak olarak kolon mukozası ile karaciğere taşınır. Kolon lümeni asidotik ise amonyak emilimi azalır. Orta spektrumlu antibiyotik, lavman, müşhil kullanımı kolondaki bakteri miktarını azaltarak amonyum üretimi azaltılır. Karaciğer yetmezliği olan hastalarda kullanılabilen tedavi yöntemlerindedir. Bakteri etkinliği sonucu kolonda Kvitamini tiyamin ve riboflavin sentezi gerçekleşmekte ve özellikle karbondioksit, hidrojen ve metan gazı oluşmaktadır(24).

Bakteri, enterotoksin, vazoaktif intestinal polipeptid, nörotransmitter, laksatifler kolondaki sıvı ve elektrolit sekresyonunu uyarır. Vazoaktif intestinal polipeptidin kolondaki su absorpsiyonunu önlediği saptanmıştır. Ülseratif kolit ve laksatiflerle oluşan diarede prostoglandinler kolondaki sekresyonun artışına neden olur(24).

Bilirübünden gelen sterkobilin ve ürobilin feçesinin kahverengi olmasına yol açar. Kokusu ise esas olarak bakteri etkinliği ile oluşan ürünlere bağlıdır.

2.4.2.Motilite

Kolondaki bölgesel farklılıklar ve düzensiz kontraktıl dalgalar nedeniyle kolon motilitesi hakkında çalışma yapmak zordur. Kolondaki kontraksiyonlar üç tiptedir. Geriye Doğru Hareket: Transvers kolondan kaynaklanan ve çekuma doğru ilerleyen kontraktıl dalgalarıdır. Bu kontraksiyonlar, bağırsak içeriğinin sağ kolondan geçişini yavaşlatarak mukozayla temasını uzatır. Böylece transit zamanı uzar, sıvı ve elektrolit absorpsiyonu artar. Segmental Kontraksiyon: En sık gözlenen kontraksiyon tipidir. Longitudinal ve sirküler kasların, izole bir kolon segmentinde eşzamanlı kontraksiyonu ile karakterizedir. Tüm kolonda oluşmakla birlikte daha çok sağ kolonda gözlenir. Sigmoid kolonda ortaya çıkışlarının divertikül oluşumunda rolü olduğu öne sürülmüştür. Bu kontraktıl aktivite yiyeceklerle ve kolinerjik ilaçlarla artar. Kitle Hareketi: En az görülen kolon aktivitesidir. Uzun bir kolon segmentinde

ilerletici kontraktıl dalga ile karakterizedir. Koordine bir hareket ile kitle uyarısının oluştuğu noktanın proksimalinde sirküler bir kasılma ve distalinde de gevşeme ile karakterizedir. Kolonik içeriğin 0,5-1 cm/sn'lik hızla ileri doğru itilmesini sağlar. 20-30 sn kadar sürer ve lümende 100-200 mmHg'lık bir basınç artışı oluşturur. Sıklıkla kahvaltı sonrası olmak üzere günde 3-4 kez ortaya çıkar. Sigmoid kolonda da defekasyon sırasında kitle hareketi olabilir(8). Kitle hareketlerini başlatan sebebler arasında yemek en büyük fizyolojik uyarandır. Özellikle sabah kahvaltısından 15-30 dakika sonra gastrokolik ve duodenokolik refleks propulsif hareketi arttırarak içeriğin distale iletilmesini, defekasyon hissini oluşmasını sağlar. Yiyeceğin mideye girmesi ile refleksin ilişkisi net ortaya konamamıştır. Nöral ve hormonal mekanizmaların da etkili olduğu anlaşılamamıştır. Yemek alımından sonra kolonik aktivitenin başlaması için gastrin, kolesistokin ve gastrik inhibitör polipeptidin kan düzeylerinde yükselmesi arasında bir paralellik saptanmıştır. Nöral yolların ise nervus vagus ile sağlandığı kabul edilmektedir. Yapılan çalışmalarda bu refleksin oluşmasında santral sinir sistemi, lumbokolonik sinirler, vazovagal yollar ve vazolumbal kolonik refleks yolları etkili olmaktadır. Antikolinergik ilaçlar ile bu refleksin erken cevabı önlenmektedir. Emosyonel durumda kitle hareketlerini başlatabilir. Nefret, kızgınlık ve küskünlük hipermotiliteye, kaygı ve korku hipomotiliteye neden olur. Egzersiz ve fizik aktivite sırasında segmental ve peristaltik kasılma artarken, uyku sırasında azalmaktadır. Son olarak kolonik distansiyon ile kolonik aktivitede artış izlenir. Bu özellik laksatif kullanım prensibinin temelini oluşturur(2). Sindirilemeyen polisakkarit ve selüloz deriveleri, lümende suyu absorbe ederek kitle etkisi oluşturur ve propulsif hareketi başlatır(24).

2.4.3. Kolon Mikroflorası

Doğumda insan kolonu sterildir. Ancak saatler içinde bağırsaklar ağızdan anüse doğru kolonize olur. Neonatal dönem ve hayatın ilk aylarında mide-bağırsak kanalına bakteriler yerleşmeye başlar ve zamanla gastrointestinal kanalın değişik yerlerinde kompozisyonları farklı olan mikroflora oluşur. Kalın bağırsak, feçes kuru ağırlılığının 1/3'ünü oluşturan yoğun bakteri popülasyonunu barındırır. Feçesin her gramı 10^{11} - 10^{12} bakteri içerir. Anaerobik bakterilerin aerob bakterilere oranı 1/1000 kadardır. Bacteriodes türleri en sık rastlanan kolonik organizmalardır. Feçesin

milimetresinde 10^{11} - 10^{12} arasında bulunurlar. *Escherichia coli* ise milimetrede 10^{10} kadar bulunur(2).

Normalde bağırsak mukozasının kalıtsal olarak sahip olduğu yapısal ve fonksiyonel özellikleri, lümendeki bakterilerin mukozaya kolonize olmalarına ve bağırsak duvarını invaze etmelerine engel olur. Enterik immün sistem ile mikroorganizmalar arasındaki dengenin bozulması, kronik inflamatuvar bağırsak hastalığını başlatan süreci tetikler. İBH'de bağırsak lümenindeki bakteri sayısının arttığına ve flora kompozisyonunun değiştiğine ait bilgiler vardır(2).

ÜK'li hastaların feçeslerinde adeziv ve invazif özellikleri olan *Escherichia coli* saptanmıştır(3). Yapılan çalışmalarda ÜK hastalarının bağırsak florasında *Bacteriodes vulgatus*un en sık izole edilen ve konsantrasyonu en yüksek olan bakteri olduğunu ve bu hastaların serumlarında *Bacillus vulgatus*, *Bacillus fragilis* ve *Clostridium romasum* aglutinin titrelerinin de yüksek bulunduğunu bildirmişlerdir. İBH'de şiddeti arttıkça mukozal bakteri konsantrasyonunun yükseldiği de bildirilmiştir(2).

Endojen kolon bakterileri sindirilmeden geçen karbonhidrat ve proteinlerin yıkımında önemli rol oynarlar. Ayrıca enterohepatik dolaşım ile yeniden kazanılan birçok maddelerin (bilirubin, safra asitleri, östrojen, kolestrol) metabolizmasında görev alır. K vitamini gibi gerekli maddeleri üretirler(2,24).

2.5. Ülseratif Kolit

Ülseratif kolit (ÜK) inflamatuvar barsak hastalığıdır. Ülseratif kolit, mukozal ülseratif kolit ve idyopatik ülseratif kolit olarak da adlandırılır(2). Ülseratif kolit kolon ve rektum mukozasının etiyojisi tam olarak bilinmeyen alevlenmeler ve remisyonla seyreden, kronik inflamatuvar ve nongranulomatöz hastalığıdır(1,2). 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. ÜK insidansı USA'da 100000'de 2-10 olup ülkemizde yapılan çalışmada 100000'de 4.4 olarak tespit edilmiştir(1,26). ÜK olan hastalarının akrabalarında insidans daha fazladır, bu da genetik predispozisyonun

olduğunu göstermektedir. Hastalığın en sık görüldüğü yaş, 15-25 arasındır, ikinci sık görülme yaşı 55-65'tir. Kadın erkek arasında sıklık bakımından fark yoktur(2).

Başlıca bulgu, kanlı mukuslu diyaredir. Barsak hareketleri sık olmakla birlikte ülseratif kolitlerin dışkı volümü düşüktür. Bu da rektal iltihaplanma sonucudur. Genellikle alt kadranda duyulan karın ağrısı, ateş ve kilo kaybı kolonun tüm tutulmasında görülür. Lokalize tutulmada en önemli semptom kanlı diyaredir. Bazen yaşlı hastalarda rektal spazm dolayısı ile kabızlık da görülebilir. Olguların %54'ünde hastalık rektosigmoid yerleşimli iken % 27'si sol kolon tipi ve % 19'u pankolit şeklindedir(3). Ülseratif kolit hastalığın seyrine göre sınıflandırılır. Bu sınıflandırma da hastalığın tedavisinde yardımcı olur. Hastalığın kronik nüks eden formlarında diyare ve rektal kanama yegane bulgudur. Fizik muayene de sıklıkla normaldir. Olguların %60-65'ini oluştururlar. Spontan iyileşme ve alevlenme nöbetleri ile seyreder. Kronik sürekli devam eden formunda belirtiler altı aydan fazla devam eder. Spontan iyileşme pek görülmez. Bu hastalarda günde 4-6 defa kanlı diyare görülür. Karın ağrısı, karında hassasiyet, hafif ateş, halsizlik vardır. Olguların %30'unu teşkil eder(1). Kolonik komplikasyonlardan darlık oluşumu ve malign değişim sık görülür. Akut fulminan ülseratif kolit olguların %5'ini oluştur. Altıdan fazla bazen 20-30 bulabilen kanlı diyare, şiddetli halsizlik, kilo kaybı, 39°-40° bulan ateş, taşikardi postüral hipotansiyon önemli karın hassasiyeti, hipoaktif barsak hareketleri, anemi ve bazen hipoalbuminemi vardır. Şiddetli hastalıkta abdominal distansiyon ve toksik megakolon da akla getirilmelidir. Birçok olguda ülseratif kolit sessiz başlar ve birkaç hafta içinde tedricen şiddetlenir, fakat bazı hastalarda hastalık, başlangıçta fulminan olarak başlar. Hastalığın başlangıcında çekumun tutulması %20 olguda mevcuttur, % 75 'inde ise sigmoidin proksimalinde tutulma görülmez. Hafif klinik tablo ile gelenlerin % 90'ında ilk ataktan sonra hastalar remisyona girer. Şiddetli tablo ile gelenlerde, sıklıkla kolektomiye gerek duyulur. Birçok hastada, hastalık kronik intermittent olarak devam eder ki uzun bir sessiz dönemden sonra genellikle birkaç hafta veya birkaç ay süren ataklarla devam eder. Bazılarında ise hastalık kronik aktif kolit olarak devam eder.

Ülseratif kolitte gözlenen komplikasyonlar kolona ait ve ekstrakolonik komplikasyonlar olarak ikiye ayrılır. Kolona ait komplikasyonlar arasında anorektal bölgeyi tutan anal fissürler, anal fistüller, anorektal apse ve anal inkontinans

sayılabilir. Akut batın oluşturup acil cerrahi gerektiren kolon perforasyonu daha çok sigmoid kolon ve sol fleksurada rastlanır. Hastanın genel durumunun bozulup apatik ve toksemi tablosu gösterdiğinde toksik megakolon akla gelmelidir. Bu tür hastalarda 39°-40° bulan ateş, karında şiddetli ağrı ve distansiyon, anüsten gaz ve gaita çıkmadığı halde pis kokulu akıntı gelmeye başlar. Rektal kanama ÜK için oldukça sık bir belirtidir ve transfüzyon gerektirecek kanama ile her zaman karşılaşılabılır. Hastalığın özellikle kronik seyirli tiplerinde darlık karşımıza çıkabilir ve malignite yönünden araştırmak gerekir(1). Ülseratif kolitte gözlenen ekstrakolonik belirtiler ikiye ayrılır, hastalığın aktivitesi ile olan veya aktivite ile ilgili olmayan belirtilerdir. Kolitik artrit diz, kalça, ayak bileği, el bileği, dirsekleri tutar, migratuar artrit birkaç hafta sürer ve genellikle deformite bırakmaz, kalın barsak iltihabının tedavisi ile iyileşir, fakat sakroileitis ve ankilozan spondilit hastalığın aktivitesi ile ilgili değildir(3). Sakroileit asemptomatik ve tesadüfen bulunur. Ankilozan spondilit ilerleyici bir hastalık olup, tedaviye cevap vermez. ÜK'tin komplikasyonları steatozis, perikolanjit, kronik aktif hepatit, siroz, sklerozan kolanjit ve safra taşlarıdır. Perikolanjit, histolojik olarak lenfositik ve eozinofilik infiltrasyonlarla beraberdir ve asemptomatiktir. ALP'nin yükselmesi vardır. Sklerozan kolanjit kronik kolestaz ile beraberdir, intra ve ekstrahepatik safra yollarını tutar. Ülseratif kolitte % 1-4 oranında görülür, oysaki sklerozan kolanjitte ÜK prevalansı daha yüksektir. Sklerozan kolanjitin erken safhasında karaciğer biopsisi genişlemiş portal mesafe, ödem ve safra kanalları proliferasyonu gösterir ve bu durum hastalığın ilerlemesi ile fibroz ve siroza gider. Hastalar başlangıçta asemptomatiktir. Hastalık ilerledikçe, ateş, sağ üst karında ağrı, sarılık ve ölüm husule gelir. Bu hastaların %10-15'inde kolanjiokarsinom gelişir. Uveitis ön kameranın iltihabıdır. Bulanık görme, baş ve göz ağrısı, fotofobi, konjunktivit ile beraberdir. Episklerit skleralar enjeksiyon ve gözde yanma hissi ile beraberdir. Amiloidozis; son dönem böbrek hastalığına sebep olur. Derin ven trombozları; Pulmoner emboli, intrakranial ve intraoküler tromboembolik olaylar, pıhtılaşma faktörlerinin aktivasyonu ve trombositosis sonucu ortaya çıkar(3).

En az 10 yıldır total kolon tutulumu olan hastalarda kanser riski vardır. Çalışmalar böyle kronik hastalarda kanser insidansının %10 oranında olduğunu göstermiştir. Ülseratif kolitte kanser riski inflamasyon şiddetine değil, kolonik

mukoza tutulumunun boyutuna ve hastalığın süresine bağlıdır. Ne yazık ki çocuklukta ülseratif koliti bulunan bazı hastalarda hastalık sessiz bir döneme girer ve erişkin yaşta kanser ortaya çıkar(2).

2.5.1.Etiyoloji ve Patogenez

Ülseratif kolit etiyolojisinde genetik, çevresel ve konakçı immün cevabı gibi faktörlerin önemli rol oynadığı bir hastalıktır(1-3). Hastalık intestinal epitelin bariyer fonksiyonunun bozulması ve mukozal immün sistemdeki defeklere bağlı olarak oluşan anormal bir cevap sonucu gelişir. Son yapılan çalışmalar mukozal immün sistemdeki temel bir defektin, belli bir hedef hücreye karşı doğrudan otoimmün tepki oluşturmaktan çok immün hiperaktivasyona neden olduğunu göstermektedir. Çevredeki ajanlara ve antijenlere karşı kontrolsüz bağışıklık reaksiyonuna yol açan bu önemli-temel defet, düzensiz bir bağışıklık yanıtına neden olarak lenfosit proliferasyonu, sitokin salınımı, yardımcı efektör hücrelerin bölgeye çekilmesi, nötrofil ürünlerinde (özellikle lökotrien B₄, NO salınımı ve reaktif oksijen metabolitleri) artış ve sonuçta doku hasarına neden olabilir(2,3). ÜK'de mukozal hücre hasarına neden olabilecek etkenler ise;

- azalmış splankik kan akımı
- sitokinler ve SOR'ların neden olduğu hasar
- artmış NO salınımı
- antioksidan besinlerin alımında azalma (GLN, çinko, selenyum vit A,C,E)
- enteral beslenmede yetersizlik ve/veya ekzojen bağırsak trofik besinlerin yetersiz alınımı (GLN, kısa zincirli yağ asitleri)
- bağırsak hücrelerinin, trofik besinleri öğütme yeteneğinde yetersizlik
- hormonal büyüme faktörleri etkilerine hücrel direnç
- diğer bilinmeyen nedenler olarak sıralanabilir.

Genetik Faktörler: Bazı klinik gözlemler genetik faktörlerin ÜK'e yatkınlığı arttırdığını göstermektedir. Birinci derece yakınarda ÜK görülme oranı % 15'dir. Bu oran genel popülasyondan 30 ile 100 misli fazladır(3). Aynı şekilde klinik olarak ülseratif kolitlilerin sağlıklı akrabalarında antinötrofil sitoplazmik antikordlarda artma gösterilmiştir. Bu da otoantikörlerin kolon iltihaplanmasını göstermesinden ziyade daha önemli rol oynadıklarını göstermektedir(3). Son zamanlardaki detaylı

incelemeler 16.ncı kromozomda ÜK ile ilişkili bir gen tanımlanmış ve bunun sitoplazmik NOD2 adlı bir proteini kodladığı bulunmuştur(27). Bu protein;

Makrofajların üzerinde eksprese olmakta,

Bakteriyel lipopolisakkaridler için sitozolik bir taşıyıcı reseptör gibi davranmakta,

Makrofajların apoptozisini arttırmakta,

Hücre içi endotoksinlere bağlanarak NF-kB nin aktivasyonuna neden olmakta,

İnflamatuvar sitokinlerin üretilmesine yol açmaktadır.

ÜK de genetik ilişkide aşağıdaki durumlarda etkili olmaktadır.

HLA-DR2, MDR-1 gen ekspresyonundaki direnç, (ÜK'li hastalarda steroide refrakterliği arttırmaktadır.) IL-1ra polimorfizmi (hastalığın ciddiyeti ile ilişkilidir.) ve MUC3 polimorfizmi (ÜK'li hastalarda genetik yatkınlığı etkilemektedir.)

Çevresel Faktörler; ÜK'de çevresel ve hastalığa katkıda bulunan etkenler arasında en yaygın incelenen nonsteroid antiinflamatuvar ilaçlar olup, bu tür ilaçlar hastalığın alevlenmesine yol açarlar. Bu ilaçlar koruyucu prostanooidlerin azalması, lökosit aderansı ve migrasyonunun arttırılması ve intestinal bariyeri değiştirerek etkili olduğu düşünülmektedir. Sigara ÜK'li hastalarda koruyucu etkisini nikotinin T hücrelerinin fonksiyonları üzerine inhibitör etki göstererek sağlar. Sigara içiminin hücrel ve humoral immün sistemi etkilediği ve kolondaki müküs salgısını arttırdığı gösterilmiştir(2).

Diğer taraftan erken yaşlarda yapılan apendektominin ÜK sıklığında azalmaya neden olduğu ileri sürülmektedir. Bu ilişkide ÜK'e olan genetik yatkınlığın apandisit gelişmesine karşı koruyucu olabileceği düşünülmektedir(2).

Ayrıca barsak florasının yapısı da ÜK'in gelişmesinde önemli rol oynamaktadır. Geniş spektrumlu antibiyotikler ve probiyotikler hastaların belirli bir alt grubunda yaralı olmaktadır. Ayrıca fizyolojik stres durumları da önemli bir tetikleyici kabul edilmekte ve ÜK'li hastaların %40 da stres önemli bir faktör olarak karşımıza çıkmaktadır. Stresin süresi de önemli bir faktördür.

Kızamık, mikobakterium paratüberkülozis ve listeria monositogenezis infeksiyonu arasındaki bir ilişkiden de bahsedilmektedir. Aktif hastalığı olan kişilerde anerobik bakteri ve laktobasillus sayısında önemli bir azalma olduğu da

göstermiştir. İnfeksiyonların T hücre toleransını engellediği ve bir hipotez olarak yatkın kişilerin kendi barsak florasında toleransı bozarak kronik immün cevaba neden olduğu düşünülmektedir(2,3). Kısaca enfeksiyonlar ile ÜK arasındaki ilişkide;

GİS'de kolonun en fazla bakteriyel konsantrasyona sahip olması,

Normal intestinal floranın zararsız komponentlerine karşı tolerans kaybı,

ÜK'in başlangıcında mevsimsel değişiklikler ile ilişkili olarak enfeksiyonların önemli bir tetikleyici olduğu gösterilmesi,

ÜK'li hastalarda antibiyotiklerin tedavideki adjuvan rolleri,

Probiyotiklerin yararlı etkilerinin gösterilmesi önemli faktörler olarak karşımıza çıkmaktadır.

İmmün cevap; ÜK'de çeşitli immün sistem mekanizmaları değişiklik göstermekle beraber, hücre yoluyla immün cevaplar da rol oynayabilir, fakat lenfosit popülasyonundaki değişiklik, genellikle medikal tedaviden veya malnütrisyonun ileri gelebilir. İntestinal iltihabi hücrelerden fazla antikor sekresyonu vardır. Özellikle IgM ve IgG sınıfları artmıştır. Halbuki normal reaksiyonda IgA aktivasyonu vardır. Ülseratif kolitte IgG ve IgG 3 sekresyonu artar ki bunlar daha ziyade proteinlere, T hücrelerine bağımlı antijenlere karşı oluşur. Bunlar karbonhidratlar ve bakteriyel antijenlere cevap sonucudur. Ayrıca proinflamatuvar sitokinler (IL-1, IL-6, IL-8) de artma vardır ki lamina propriadaki makrofajlardan salgılanır(3).

Sitokinler özellikle IL-1, TNF ve interferon Gamma epitelyal, endotelyal, mezenkimal ve immün hücreleri stimüle eder. Bunlar ayrıca yara iyileşmesinde ve fibroz oluşumunda rol oynar. İltihabi barsak hastalığında, kandan nötrofillerin migrasyonunu, mukozaya veya submukozaya gelmesini sağlar. Bu durum iltihabi sitokinlere (IL-8, TNF, PAF ve lökotriyen (LTB-4) bağlıdır. Bu hipotezi destekleyen LTB-4'ün iltihabi barsak hastalığında mukozada sağlıklı insanlara göre daha yüksek konsantrasyonda gösterilmesidir. Nötrofillerin aktivasyonu proteazın aktivasyonunu sonuçlandırır ve superoksit ve reaktif oksijen radikallerinin oluşmasına sebep olur ve bu da epitelin harabiyetinde rol oynar(2,3).

2.5.2.Konakçı İmmün Cevabı ve İnflamasyon

Normal intestinal epiteldeki sıkı bileşikler, goblet hücre popülasyonunun ürünleri olan çeşitli peptidler ve müsin glikoproteinler lüminal ajanlara karşı etkili bir

bariyer görevi yaparlar(24). Kronik tekrarlayıcı intestinal inflamasyon lümendeki bakteri ürünleri tarafından mukozal immün sistemin devamlı olarak uyarılmasıyla oluşur. Diyetlerdeki bazı antijenlerde bu olaya katkıda bulunur(2). Bu durum başta dentritik hücreler ve lenfositler olmak üzere immün hücreler ile direkt etkileşime yol açar ve immün cevabı artırır(3). Alternatif olarak bakteriyel ürünler doğal immün sistemin komponentleri olan reseptörler sayesinde yüzey epiteli uyarabilir. Epitel daha sonra sitokinler ve kemokinler üreterek mukozal immün hücreleri aktive eder. Antijen sunan hücrelerin aktivasyonu T hücre farklılaşmasını artırır. Çok önemli olan bu fonksiyonlar hem genetik olarak belirlenmiş varyantlar(NOD2 geni) hem de çevresel faktörler vasıtasıyla değiştirilebilir(27).

ÜK de genetik, çevresel ve diğer etkilerin sonucu mukozal immün cevabın devamlı bir aktivasyonu söz konusudur. Bu aktivasyon lamina propria'da lenfosit, makrofaj ve diğer hücrelerin infiltrasyonu ile anlaşılmaktadır(2). İmmün sistemin, intrensek bir defektinin veya epitelial mukozal bariyerde bir değişikliğin sonucu olarak devamlı uyarılmadan dolayı aktive olup olmadığı ise belli değildir(2). Çeşitli virüsler ve bakteriler (kızamık, mikobakterium paratüberkülozis) sebep olarak ileri sürülmüş ise de spesifik enfeksiyonlara ait bir bulgu yoktur. Diğer bir hipoteze göre diyetdeki antijenler veya patolojik olmayan mikrobik ajanlar anormal immün cevabı aktive ederler. Normal supresör mekanizmanın yetersizliği sonucu iltihabi barsak hastalıklarında immün aktivasyon gereğinden fazla şiddetli ve uzun olur. Sağlam insanlarda lümendeki antijenler lenfoid doku üzerindeki M hücrelerine ekspozit olur. Halbuki ÜK'te epitel harabiyetinden dolayı, luminal antijenler lamina propriadaki immün hücrelere ulaşabilir ve aberant immün sistemi tetikler(3). Diğer bir hipotez ise tetikleme mekanizması hastaların barsak epitelinde eksprese olan otoantijenlerdir. Bu teoride hasta, ilk başta luminal antijenlere karşı immün cevap geliştirir ve daha sonra bu cevap devam eder ve hatta luminal antijen ile host proteinlerinin benzerliği dolayısıyla bu immün cevap kuvvetlenir. Otoimmün hipotezde epitel hücrelerinin harabiyeti antikora bağlı selüler sitotoksiteden dolayı veya direkt hücresel sitotoksiteden dolayı artar(2). Otoantikörlerin (antinötrofil, sitoplazmik antikörler) bazı iltihabi barsak hastalarında mevcudiyeti bu hipotezi desteklemektedir, fakat bu antikörler intestinal tutulması olmayan hastalarda da görülmektedir(3).

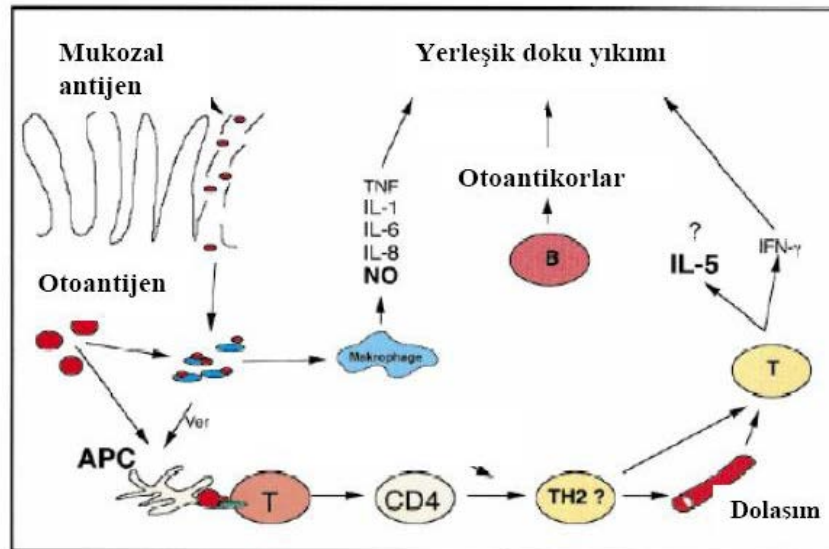
ÜK'li kişilerde etyoloji ile ilişkili olarak immün hücre topluluğunda ve inflamatuvar mediatörlerde önemli ilerlemeler olmuştur. İntestinal epitel en azından üç yaygın mekanizma ile mukozal immün cevabın başlatılmasına katılır. Bunlar;

Geçirgenliği artırarak ve antijen emilmesini yoğunlaştırarak. Bu durum immün sistemin aktivasyonuna neden olur.

Sitokin, kemokin ve diğer proinflamatuvar maddelerin salınması vasıtasıyla tüm duvar boyunca inflamasyonu yayarak.

Antijen sunan hücre gibi davranarak(27).

İnsanların bağırsak lümenindeki “gastrointestinal sistemle ilişkili lenfoid doku”(GALT) bağırsağı çeşitli antijenlerin uyarısından korur. Eğer GALT'nin immün homeostazisi bozulursa bağırsaklarda inflamasyon gelişir. Kısa süreli inflamasyonlar koruyucu etki gösterirken, devamlı (kronik) inflamasyon çevredeki hücrelerin yıkımına ve sitokin salınmasında artışa neden olacaktır. Böyle bir kronik inflamasyon süresinde proinflamatuvar sitokinlerin üretiminde (IL-1, IL-2, IL-6, IL-7, TNF) artış olacaktır (Şekil2.5). Diğer taraftan mononükleer hücrelere ilave olarak normal kolon mukozası ve epitel hücreleri de bioaktif TNF α dönüştürücü enzim (TACE) ekspres ederler. ÜK'da TACE aktivitesi artmaktadır. Sitokinler özellikle IL-1, TNF ve interferon gamma epitelial, endotelial, mezenkimal ve immün hücreleri stimüle eder.



Şekil 2.5. Bozulmuş GALT sonucu gelişen inflamasyon.

ÜK'de, kandan nötrofillerin migrasyonunu, mukozaya veya submukozaya gelmesini sağlar. Bu durum iltihabi sitokinlere (IL-8, TNF, PAF ve LTB-4) bağlıdır. Bu hipotezi destekleyen LTB-4'ün ÜK'li hastaların mukozalarında sağlıklı insanlara göre daha yüksek konsantrasyonda gösterilmesidir. Nötrofillerin aktivasyonu proteazın aktivasyonunu sonuçlandırır ve superoksit ve reaktif oksijen radikallerinin oluşmasına sebep olur ve bu da epitelin harabiyetinde rol oynar(2,27).

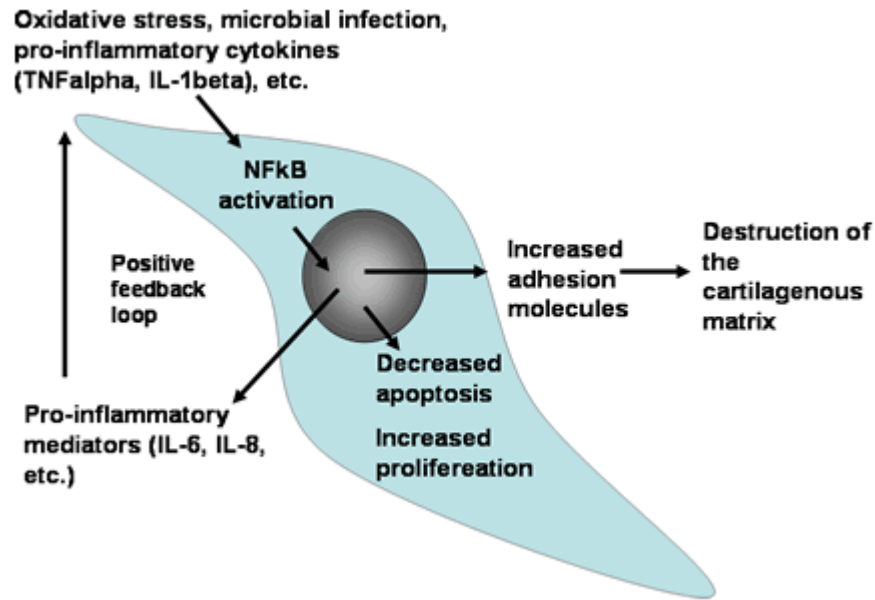
Merkezi immün sistem popülasyonunun aktive olduğunda derhal çeşitli nonspesifik inflamatuvar mediatörlerin üretimine yol açar bu durum diğer sitokinler, kemokinler ve büyüme faktörlerine ilave olarak aroşidonik asit metabolitlerinin ve nitrik oksit (NO) gibi reaktif oksijen metabolitlerinin salınmasına neden olur(27). Serbest radikaller lipid peroksidasyonu ile membran hasarına yol açarak doku hasarını attıran lizozomal enzimlerin salınmasına neden olur. Diğer taraftan protein oksidasyonu sadece hücresel savunma ve diğer fonksiyonlar için esas olan proteinleri inaktive etmez, aynı zamanda mukoza bariyerinin bütünlüğünde bozulmalara neden olan bir seri intraepitelyal reaksiyonları uyarır. Bu bölgeye vasküler alandan lökositlerin gelmesi inflamasyonun sürdürülmesine önemli katkı sağlamaktadır(8,27).

Bir inflamatuvar süreçte proinflamatuvar üretiminden ayrı olarak inflamasyonu baskılayan antiinflamatuvar etkili sitokinlerde üretilir ve böylece denge sağlanır. IL-1, IL-2, IL-6, IL-8 ve TNF gibi proinflamatuvar sitokinlere bağlı aşırı inflamasyon, IL-1ra, sTNF α , IL-10 ve TGF β gibi antiinflamatuvar sitokinler tarafından baskılanır. ÜK'de inflamatuvar sitokinlerin salınması her zaman için antiinflamatuvar sitokinlerden fazladır(3).

2.6. Nükleer Faktör-kappa B

Bir transkripsiyon faktörü olan Nükleer Faktör-kappa B (NF-kB) enfeksiyona karşı hem doğal ve kazanılmış immün cevapta hem de inflamatuvar cevapta çok çeşitli gen ekspresyonunun koordine edilmesinde anahtar rol oynayan bir moleküldür(28,29). Nükleer Faktör kappa B, ilk kez 1986 yılında Sen ve Baltimore tarafından B lenfositlerin gelişimini modüle eden transkripsiyon faktörlerinin araştırılması sırasında immünglobulin kappa hafif zincir genindeki, genin transkripsiyonunu artıran regülatör DNA dizisine bağlanan bir nükleoprotein olarak keşfedilmiştir(30). NF-kB hücre gelişimi ve farklılaşmasına katılan genlerin protein

sentezini etkileyen önemli bir transkripsiyon faktördür. Kompleks protein yapısındadır. NF-kB molekülleri bakteri ve virüsler gibi patojenler, büyüme faktörleri, kemoterapotik ajanlar, iyonize radyasyon, interlökinler, lipopolisakkaritler (LPS), immunoglobulinler, reaktif oksijen türleri ile psikolojik, fizyolojik ve farklı oksidatif stres uyarılarını içine alan çok geniş kitlede ekstraseluler uyarılara karşı oluşacak cevapta hızlı bir şekilde aktive edilirler(5,30) (Şekil 2.6). Sitokin üretimi, hücresel adhezyon molekülleri, inflamasyon ve apoptozisi içeren genlerin düzenlenmesinde rol alır. NF-kB'nin, tümör nekroz faktör-alfa (TNF α) ile indüklenen apoptozise karşı hücreleri koruduğu da bildirilmiştir(31).

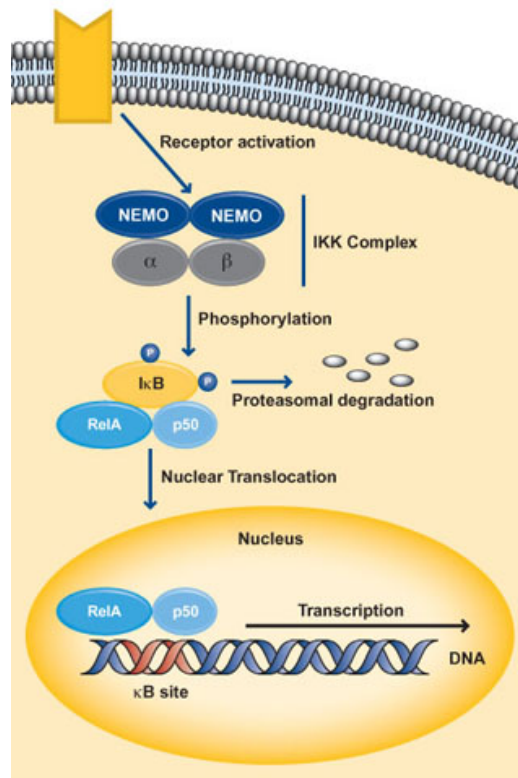


Şekil 2.6.NF-kB aktivasyonu.

Rel ailesi diye adlandırılan bir grup proteinin üyesi olan NF-kB dimerik proteinler şeklinde DNA'ya bağlanan transkripsiyon faktör kompleksleridir(6,32). Memelilerde NF-kB ailesi NF- kB1 (p50=p105), NF-kB2 (p52=p100), RelA (p65), RelB ve cRel olmak üzere 5 grup alt üiteden ibarettir. Aktif NF-kB bu proteinlerin homodimer veya heterodimer kompleksler seklinde bir araya gelmesiyle oluşur. NF-kB'nin asıl aktif formu, p65 alt ünitesinin p50 ya da p52 alt üiteleri ile oluşturduğu heterodimer yapısıdır. P50 ve p65 proteinleri tanımlanan ilk NF-kB proteinleri olup oluşturdukları p50/p65 kompleksi çeşitli hücre tiplerinde en fazla görülen tiptir(6,30-32). NF-kB'nin nükleer translokasyonu ve aktivasyonu özellikle pro-enflamatuar

genlerin transkripsiyonunu indüklediği için inflamasyonda merkezi bir rol oynar(33,34).

I κ B, NF- κ B kompleksinin DNA bağlanma aktivitesini inhibe eden sitoplazmik protein olarak tanımlanmıştır. Sitoplazmada I κ B, NF- κ B ile kompleks oluşturmuş halde bulunur. Hücrenin uyarılmasıyla I κ B parçalanmakta ve κ B faktörleri nükleusa girip DNA bağlanma yerlerinde işlev görerek gen transkripsiyonunu başlatmaktadırlar(30-32). Örneğin TNF- α ile reseptör-bağımlı NF- κ B aktivasyonunun sinyal iletisini incelersek; TNF- α 'nın, TNF reseptör 1'e (TNFR 1) bağlanarak sinyal iletisini başlatıp sonuçta NF- κ B aktivasyonuna yol açtığı bildirilmiştir. TNFR 1'in devreye girmesiyle "NF- κ B indükleyen kinaz" (IKK) aktivasyonu ortaya çıkar. IKK aktivasyonu I κ B kinazların fosforilasyonuna yol açarak yıkılmalarını kolaylaştırır ve NF- κ B serbest kalarak nükleusa transloke olur (Şekil 2.8). NF- κ B'nin TNF- α bağımlı apoptozis indüksiyonunu baskıladığı gösterilmiştir(6). Hatano ve arkadaşları NF- κ B'nin TNF α ve Fas bağımlı apoptozisten hepatositleri korumak için iNOS ifadesini uyardığını göstermişlerdir(31).



Şekil 2.7. Reseptör-bağımlı NF- κ B aktivasyonunu.

NF-kB'nin aktivasyonu sitokinlerin kemokinlerin, endotel-lökosit adezyon moleküllerinin salıverilmeleri ve indüklenebilir nitrik oksit sentaz (iNOS), siklooksijenaz 2 (COX-2) gibi enzimlerin aktivasyonları ile sonuçlanır. NF-kB apoptozise olan direnci de düzenler(5,6). Hücre yaşamında önemli rol oynayan proteinleri sentezlediğinden NF-kB'de olabilecek mutasyonlar genellikle öldürücüdür.

Lipopolisakkaritler ve endotoksinler gibi bakteriyel ürünlere verilen cevapta monosit ve makrofajlarından salgılanan iltihabi sitokinlerin oldukça önemli olduğunu gösteren deliller vardır. NF-kB tarafından regüle edilen çoğu genin ÜK hastalığının ilerleyişini kolaylaştırdığı rapor edilmiştir. Bununla birlikte, son dönemlerde NF-kB'nin direk veya indirek yoldan bazı iltihabi sitokinlerin üretimini etkileyerek ÜK hastalığının patogeneğinde rol oynayabileceği de belirtilmiştir. ÜK hastalığında NF-kB'nin aktive olduğu ve IL-1, IL-6, IL-8 ve TNF gibi proinflamatuvar sitokinlerin üretimini artırdığı bildirilmektedir(20). ÜK'li hastalarda lamina propriadaki T hücreleri Fas bağımlı apoptozise daha yatkındır ve hastaların mukozal hasarında Fas-FasL bağımlı apoptozis kısmi bir rol oynar. ÜK etkili olan bazı inflamatuvar faktörler NF-kB yi aktive ederler. NF-kB daha sonra nükleusa transfer olur ve burada gen transkripsiyonunu etkiler. IL-1 ve TNF gibi inflamatuvar sitokinlerde hücre yüzeyindeki reseptörlerine bağlanarak bu yolu aktive edebilirler. Yine bu yolun ara ürünlerini bakteriyel lipopolisakkarid gibi mikrobiyal ürünler aktive edebilir. Ayrıca bakteriyel lipopolisakkaridin sitoplazma içine girişiyle intrasitoplazmik reseptör olan NOD2 sayesinde de aktive olur(27).

2.7. Nitrik Oksit (NO)

15-20 yıl öncesine kadar nitrik oksidin (NO) basit bir atmosfer atığı olduğu düşünölmekteydi. Ancak 1987 yılında, damar endotelinden endotel kaynaklı gevşeme faktörü (EDRF) olarak bilinen yapının izole edilmesi sırasında nitrik oksit sentetaz (NOS) keşfedilmiş ve daha sonraki yıllarda EDRF'nin NO olduğu tespit edilmiştir(17).

Nitrik oksitin, üzerinde yük taşıması ve çiftlenmemiş elektron bulundurması, hücreden hücreye hiçbir bariyerle karşılaşmadan kolaylıkla geçmesini sağlamaktadır. Aynı zamanda NO, taşıdığı çiftlenmemiş elektron nedeniyle bir radikal molekül olarak isimlendirilebilir. Diğer serbest radikaller her

konsantrasyonda hücreler için zararlı iken NO düşük konsantrasyonlarda çok önemli fizyolojik işlevlerde rol almaktadır. Ancak aşırı ve kontrolsüz NO sentezi hücreler için zararlı olmaktadır. Süperoksit radikali ile NO arasındaki dengenin bozulması, endotel hücreleri ve makrofajlardan PAF (trombosit aktive edici faktör), TNF, IL-1 gibi inflamatuvar mediyatörlerin salınımına neden olur(17).

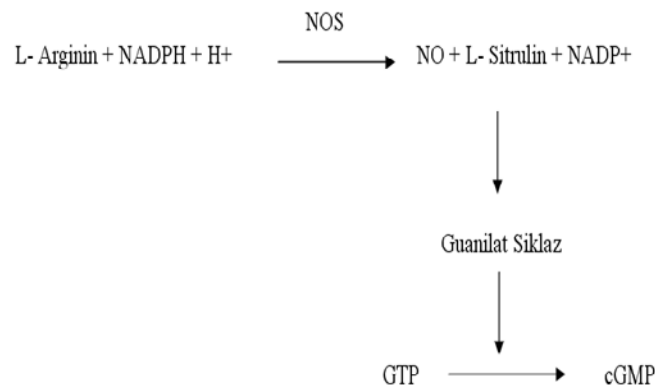
Düşük konsantrasyondaki NO, O²'e nazaran hemoglobine 3000 kat bir affiniteyle bağlanır. Hemoglobin oksijen formunda ise NO'yi kısa sürede nitrata (NO³) oksitleyerek etkisizleştirir. Özellikle dolaşımdaki oksihemoglobin NO için kuvvetli bir inhibitördür. NO, nitrit (NO²) okside olabilir ancak nitrit tekrar oksitlenerek kısa sürede nitrata dönüşüm gösterir(17).

Endotel türevli ve çok önemli bir endojen vazodilatör olan nitrik oksidin biyolojik sistemler üzerinde çeşitli fizyolojik ve patolojik etkisi bulunmaktadır.

Nitrik oksit hem mukus salgısını hem de epitel hücrelerinde sıvı sekresyonunu arttırmak suretiyle mikroplara, toksinlere ve safra tuzu gibi iritan maddelere karşı koruyucu etki gösterir. Oksidatif stres altında ise;

- Apoptozisi artırır
- Sitotoksiteyi artırır
- Mutagenezi ve DNA hasarını artırır
- Demir sülfür içeren enzimlerin fonksiyonunu değiştirir
- Mitokondrial solunumu bozarak zararlı etkiler göstermektedir(35).

NO enzimatik olarak NO sentaz (NOS) enzimi aracılığıyla L-argininin terminal guanido nitrojen atomunun oksidasyonu ile yapılır(17) (Şekil 2.8).



Şekil 2.8. Nitrik Oksit sentezi.

Nitrik oksit sentetaz (NOS) vücudun çok değişik dokularından (damar endoteli, beyin, makrofaj, üriner sistem dokuları vb.) izole edilerek incelenmiştir(17).

NOS'un molekül ağırlıkları 125-160 kDa arasında değişen üç izoformu vardır. **1-** Konstitüsyonel NOS (cNOS): Az miktarda damar endotel idrar yolu dokuları santral ve periferik sinir sistemi gibi dokularda lokalize olmuştur. Bu dokularda nitrik oksit yapımından sorumludur. Ca^{++} ve kalmodulin bağımlıdır. NOS bu dokularda her zaman mevcuttur, ancak aktif değildir. Hücre içi iyonize Ca^{++} konsantrasyonu arttığı durumlarda Ca^{++} kalmodulinle birleşerek NOS enzimini aktive eder. Aktivasyon sonucu saniyeler veya dakikalar içinde düşük veya orta derecede yapılan NO, daha çok fizyolojik amaçlı olaylarda etkilidir. Hücre içi iyonize Ca^{++} konsantrasyonu azalmaya başladığı an enzim inaktif forma geçerek NO sentezi durmaktadır. cNOS denildiğinde, kalsiyum bağımlı eNOS (endotel hücresi) ve nNOS (sinir hücresi) izoformları kastedilir. **2-** indüklenebilir NOS (iNOS): Bu tip NOS konstitüsyonel tipin aksine hücre içinde bulunmaz. Sitokinler ve enzimlere maruz kaldıktan sonra, özellikle makrofaj (monosit, nötrofil, hepatosit) ve damar endotel hücresi NO yapımından sorumludur. Ca^{+2} ve kalmoduline gereksinim göstermez. Bu hücrelerin spesifik sitokinlerle (bakteri lipopolisakkaritleri ve interferon- γ) aktivasyonu, NOS'un indüksiyonu ve NO sentezine yol açmaktadır. Bu enzim daha çok sitotoksik ve immünomodülatör etkilerden sorumlu, uzun sürede fazla miktarda NO yapımı ile ilişkilidir. iNOS aktivasyonu gen transkripsiyonu gerektirdiğinden, NO yapımı birkaç saat sonra görülür ancak birkaç gün devam edebilir. Ancak uzun süreli aşırı miktarda NO sentezi makrofaj ve diğer dokularda da harabiyete yol açar. Enzim induksiyonu l-arjinin analogları ve glukokortikoidlerce inhibe edilebilmektedir. Ülseratif kolitli hastalarda iNOS aktivitesi ve NO üretimi klinik ve hastalığın endoskopik incelemelerinde yapılan çalışmalarda arttığı gözlenmiştir. Yapılan birçok araştırma iNOS aktivitesinin artırılmasında NF-kB'nin sorumlu olduğunu göstermektedir. **3-** Üçüncü tip NOS: Nötrofillerde bulunur, kalsiyuma bağımlıdır ancak kalmoduline gereksinim göstermez(17).

iNOS aktivitesinin artması lipopolisakkaritlerin ve inflamatuvar sitokinlerin NF-kB tarafından düzenlenen transkripsiyonel kontrolü altındadır. Ayrıca TGF-b, steroid, p53 ve NO feedback etkisi ile enzim aktivitesi kısıtlanmaktadır. Nitrik oksitin süperoksit dismutaz (SOD) enzimiyle yarışmaya girmesi ve süperoksit

radikaliyle etkileşmesi sonucu peroksinitrit (ONOO^-) oluşur ve NO toksik etkileri ortaya çıkar. Peroksinitrit, nitrik oksit toksisitesinin başlıca sorumlusudur. Peroksinitritin proteinlere doğrudan zararlı etkileri vardır ve azot dioksit (NO_2^\bullet), hidroksil radikali (OH^\bullet), nitronyum iyonu (NO_2^+) gibi toksik ürünlere dönüşür. Böylece çeşitli protein yapılarına ve DNA'ye zarar verebilir. NO'ye bağlı oluşa DNA hasarında p53 aktivitesinin artar ve DNA hasarını onarmaya çalışır. Biriken DNA hasarı onarılamaz ise apoptosis meydana gelir. Fakat NO'in caspas-3,-8, ve-9 inhibe ederek apoptosisi inhibe ettiği de bilinmektedir(35).

NO, bazal durumlarda vasküler endotel tarafından salınan bir maddedir. Asetilkolin, ATP ve bradikinin gibi vazodilatatörler, reseptör aracılı Ca^{++} iyonunun hücreye akışını sağlayarak endotelden NO'in üretimini ve ekstrasellüler salınımını tetikler. NO hücre membranını geçerek demir ve/veya sülfür içeren proteinlere bağlanarak etkisini göstermektedir. NO, vasküler düz kas ve trombositlerde çözünebilen guanilat siklazı stimüle eder ve intraselüler siklik Guanozin Monofosfat (cGMP) üretimini artırır. Artmış cGMP düzeyi, kendine uyan prosesleri regüle eder(17,36).

NO'ye bağlı direkt ve indirekt etkiler mevcut olup, doku NO yoğunluğuna göre farklılık gösterir. Direkt etkiler düşük doku yoğunluklarında, indirekt etkiler ise yüksek doku yoğunluklarında gözlenir. NO'ye bağlı indirekt etkiler, NO'in oksijen ve süperoksit ile etkileşimi sonucu ortaya çıkan reaktif nitrik asit türleri (dinitrite dioksit, peroxyinitrite) aracılığıyla gerçekleşir. NO'in direkt etkinliği cNOS izoformu tarafından tayin edilirken, indirekt etkinlik iNOS izoformuna bağlıdır(37).

NO'in doku koruyucu özellikleri; vasküler tonus kontrolü, trombosit agregasyonunun engellenmesi, lökosit-endotel etkileşiminin azaltılması, dolaşımdan serbest radikallerin temizlenmesi, seçici damarsal geçirgenliğin düzenlenmesi, düz kas hücre proliferasyonunun engellenmesi, bağışıklık sisteminin aktivasyonu ve endotel hücre rejenerasyonunun uyarılmasıdır(38).

İnterferon veya bakteri lipopolisakkaridleri tarafından aktive edilen makrofajlar büyük miktarda NO sentez ederler. Aktivasyon olmadığı durumlarda makrofajlarda NOS bulunmaz. İndüksiyondan sonra enzim sentezi ve dolayısıyla NO sentezi meydana gelmektedir. L-Arjinin- NO yolunun indüklenmesi, saatlerce hatta

günlerce devam eden NO sentezine neden olmaktadır. Ancak aşırı NO sentezi hücreler için oldukça zararlı etkiler meydana getirmektedir. Makrofaj kaynaklı NO, bakteri, parazit ve tümör hücreleri üzerine sitotoksik etki yapmaktadır(17).

NO bakteri, parazit gibi bir çok patojenin ve tümör hücrelerinin ATP üreten oksidatif fosforilasyonun (ubikinon redüktaz'ı), glikolizin (gliseraldehid-3-fosfat dehidrojenaz'ı), TCA siklusunun (Cis-akonitaz'ı) Fe içeren bazı enzimlerini inhibe etmekte ve sonuçta bakteri, parazit ve tümör hücrelerini öldürmektedir. NO hedef hücrede (bakteri, parazit ve tümör hücresi) DNA sentezinin hız kısıtlayıcı enzimi olan ribonükleotid redüktazı inhibe eder ve hücre DNA'sının deaminasyonu ile bu hücrelerde sitotoksik etki meydana getirir(17). Ayrıca nitrik oksit (NO) Fe-S proteinlerinden demiri çıkararak yerine kendisi bağlanır, böylece Fenton reaksiyonunu stimüle eder ve bu mekanizma ile karsinogenezde rol oynar.

Makrofajlardan özellikle monositlerde L-Arginin-NO yolu; tümör hücreleri intra-ekstraselüler mikroorganizmalara karşı çok önemli bir defans mekanizmasıdır(17).

NO sentezini birçok farmakolojik ajan inhibe eder. Floraprotein, kalmodulin hem bağlayıcıları, substrat analogları ve tetrahidrobiopterini azaltan ajanlar, NO inhibitörlerinin başlıcalarıdır. Kullanım kolaylığı ve bulunabilirlik açısından substrat analogları en sık kullanılan NO sentez inhibitörleridir. L-argininin yapısal analogları olan bu ajanlar, metabolize olduklarında NOS enzimine kovalent olarak bağlanırlar NG-monometil-L- arginin (L-NMMA), N-iminoetil-L-ornitin (L-NIO) ve NG-nitro-L-arginin metil ester (L-NAME) gibi maddeler; L-argininin yapısal analoglarıdır ve selektif olmayan NOS inhibitörleridir, yani hem cNOS hemde iNOS'ı inhibe ederler. L-nitroarginin, cNOS'a spesifik bir inhibitördür. Aminoguanidin ise sadece iNOS'ı inhibe eder(39).

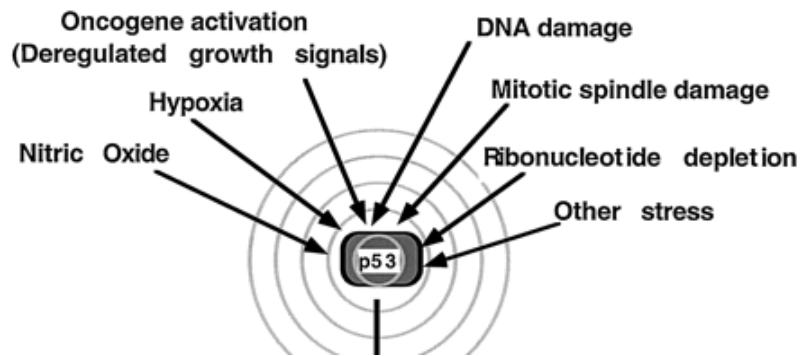
2.8.p53 Geni;

p53 geni ilk defa 1979 yılında Lane ve Crawford, bunların hemen arkasından da Linzer ve Levine tarafından nükleer fosfoprotein olarak tanımlanmıştır. p53 geni 17. kromozomun kısa kolu üzerinde 17p13-1 pozisyonunda bulunan bir tümör supressor gendir(40,41).

p53 geninin iki tipi vardır. Wild tip p53 normal fonksiyonel tiptir. Kısa ömürlü olup, 6-20 dakika kadardır. Dokularda saptanması zordur. Diğer tip ise mutant tip olup ömrü 3-6 saat kadardır ve wild tipten daha uzun ömürlüdür. İmmunhistokimyasal olarak dokularda kolayca saptanır(42,43).

p53 genindeki değişiklikler insan tümörlerinde en sık rastlanan genetik değişiklikler olma özelliğini taşır(41,42). İlk tanımlandığı yıllarda sadece bir onkogen olarak görev yaptığı düşünülen p53 geninin daha sonraları sadece mutant formunun anormal hücre büyümesinde rol oynadığı, normal p53 geninin ise tümör oluşumunu baskıladığı anlaşılmıştır. Kolon, meme, akciğer, mesane, endometrium gibi birçok organın epitelyal tümörleri yanısıra mezenkimal, nöronal ve lenfoid kökenli çeşitli tümörlerde p53 geninin homozigot kaybı saptanmıştır(44-46).

p53 genini diğer tümör baskılayıcı genlerden ayıran en önemli özellik, tümör baskılayıcı fonksiyonunun kaybı için hücrede tek bir allelin inaktivasyonunun yeterli olmasıdır. p53 hücrede normal koşullarda bazal seviyede ve inaktif halde bulunur(40,41). Fizyolojik şartlar altında yaşam süresi 20 dakika gibi oldukça kısadır ve yubikütün aracılığı ile proteolize uğrar. Hücre bölünmesine ya da hücrenin hayatını sürdürmesine müdahale etmez. Normal bölünen hücrede p53'ün bazal seviyede bulunmasının sebebi hatayı fark edebilecek kadar bazal seviyede olması yeterlidir(41,47). Çeşitli stres koşulları p53'ün hızla aktive eder. p53'ü aktive edici sinyallere örnek olarak hipoksi, DNA hasarı, düzensiz büyüme sinyalleri, onkogenler, ısı şoku, nitrik okside maruz kalma gibi örnekler verilebilir (Şekil 2.9).



Şekil 2.9. p53 gen etkileşim modeli.

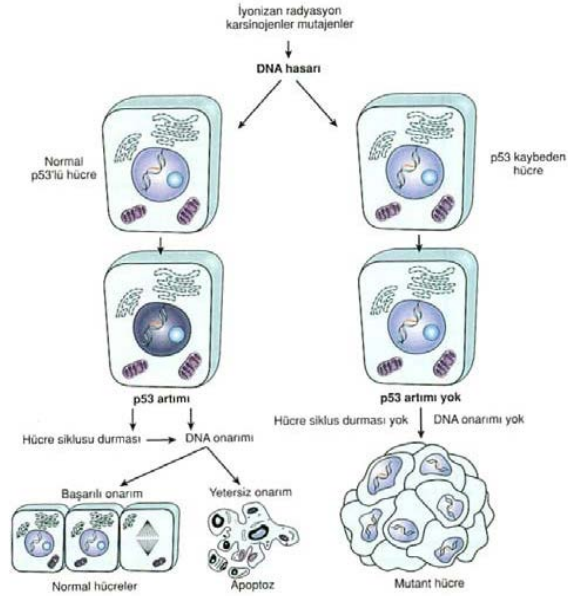
p53 özellikle DNA hasarına hızla tepki verip DNA'nın tamirini sağlayacak mekanizmaları aktive edebilir. p53, DNA'nın ve genel anlamda genomun içerdiği bilginin olduğu gibi korunmasını sağlaması nedeniyle "genomun bekçisi" adını almıştır(8).

Stres koşullarında p53 miktarı hızla artar ve p53 aktif hale gelir. p53'ün miktarının artması hem yarı ömrünün arttırılması ile hem de yüksek oranda p53 mRNA'sından protein translyasyonu yapılması sayesinde sağlanır.

p53'ün aktivitesinin 2 temel etkisi :

1-Hücre siklusunun bloke edilerek büyümenin durdurulması

2-Apoptozis (Şekil 2.10).



Şekil 2.10. Genom bütünlülüğünün devamında p53 geninin rolü.

p53 üzerine etki ettiği ana mekanizma G1'den S fazına geçişi kontrol eden mekanizmadır. Yani hücre siklusunu G1 aşamasında durdurur. DNA tamir genlerini aktive eder, böylece yaratılan zamanda meydana gelen hasarın tamirini sağlar ve siklusu kaldığı aşamadan devam ettirir. Zarar görmüş DNA'sı olan ve bunu tamir demeyen hücre p53 tarafından apoptozis'e gönderilir. Bu aktivitesinden dolayı p53'e "genom bekçisi" denir(8).

p53'ün homozigotik kaybı durumunda hasar görmüş DNA tamir edilemez ve hücre içerisinde mutasyonlar sabitlenir. Sonuçta hücre malign transformasyona doğru giden tek yönlü bir yola girmiş olur.

p53 gen ürünleri apoptozisin kontrolünde rol alan multipl genlerin indükleyicisi olarak bilinir(48). p53'ün apoptoza yol açabilmesi için çeşitli faktörlerin bir araya gelmesi gerekir. Örneğin DNA'nın hasar gördüğü durumlarda ve hücreye yaşaması yönünde az, hatta hiç sinyal gelmediği durumda ya da bir onkogenin hücreyi bölünme siklusuna girmeye zorlaması durumunda, p53 aracılığı ile apoptoz başlatılabilir. p53'ün apoptozu başlatabildiği uzun süredir bilindiği halde, bunu hangi mekanizma ile yaptığı yakın zamanda bulunmuştur. p53 aktive olur, hücre siklusunu G1 fazında durdurur, DNA tamiri için gereken emirleri verir. Eğer DNA başarılı bir şekilde tamir olursa cmyc aktif hale gelir ve p53 miktarını azaltarak hücre siklusunu kaldığı yerden devamını sağlar. Ancak hücre büyümesi için ters yönde dışarıdan sinyaller almaya devam ederse yani hücreye çelişkili sinyaller gelirse hücre apoptozisi başlatır. p53deki değişiklikler kanserin direk etkisi değildir. Ancak p53'e bağlı hücrelerin DNA hasarında kontrol cevabında bir defekt olduğunda bu hücreler malign transformasyon için yüksek risk oluştururlar(49).

p53 geni; bir çok gen ile ilişki içinde genom bütünlüğünü kontrol eden, bu bütünlükte bir sorun olduğu zaman hücreyi mitozdan alıkoyarak diğer sinyal ve genlerin yardımı ile gen onarımı veya hücre diferansiyasyonunu sağlamakta veya hücreleri apoptozise sürüklemektedir(48). p53 gen ürünleri transkripsiyondan bağımsız olarak da apoptozisi indükleyebilmektedir. p53'ün transkripsiyona bağımlı ve bağımsız apoptozis fonksiyonları hücre tipine göre değişebilmektedir. Büyümenin durması veya apoptoz etyolojisindeki faktörlerden hücre tipindeki farklılıklar, DNA hasarı sonrası apoptoza giden hücreler ve normal diploid fibroblastlar hücre siklusu durmasında önemli rol oynarlar. Bazı onkogenlerin ekspresyonu apoptoz oluşumunu büyüme durmasından daha çok etkilemektedirler(50).

2.9. Apoptozis

Apoptoz eski Yunanca '*apo*' (ayrı) ve '*ptosis*' (düşmek) kelimelerinin birleşmesiyle oluşan ve Homeros tarafından sonbaharda yaprak dökümünü tanımlamak için kullanılmış bir sözcüktür. Bu nedenle bazı hücrelerin sonbahar yaprakları gibi adeta kuruyarak vücudu terk etmesi ve arkadan gelen hücrelere yer

açmasıyla gerçekleşen hücre ölüm tipi, klasik Yunan tarihçisi olan James Cormack'ın önerisiyle ‘apoptoz’ olarak adlandırılmıştır(11,51).

Apoptozis terimi ilk kez 1972 yılında Kerr, Wyllie ve Currie tarafından tarif edilmiştir. Kerr fizyolojik olarak ölen hücrelerin çekirdeklerinde yoğunlaşmış kromatin parçalarını gözlemlemiş ve organellerin iyi korunduğunu fark ederek bu olayı “büzüşme nekrozu” olarak adlandırmıştır(11,52).

Hücre proliferasyonu nasıl ki mitoz ile belirlenmekte ise belirli bir dokuda olması gereken hücre sayısı da apoptozis ile belirlenir(53,54). Apoptozis ve mitozis dokuda sürekli bir denge halindedir. Zamanı gelince ölen hücreler daha önceden programlanmış bir şekilde ölürler (programmed cell death). Tüm bu ölümler fizyolojik şartlarda meydana geldiği için bu ölüm şekli fizyolojik hücre ölümü (*physiological cell death*) olarak da adlandırılır. Ayrıca, bir şekilde DNA'sı hasarlanmış (virüs etkisi veya çevresel nedenlerle) hücreler organizmanın zarar görmemesi için kendilerini öldürürler (*cell suicide*) ve bunu organizmanın yararı için yaparlar. Doku homeostazisi için (örneğin yara iyileşmesi veya barsak hücrelerinin “turnover”ında olduğu gibi) hücreler ortamdan ölümlerle kaybolur (*cell deletion*). İşte, tüm bu kavramlar (***programlanmış hücre ölümü, fizyolojik hücre ölümü, hücre intiharı, hücre kaybı***) apoptozisle eş anlamlı olarak kullanılabilen terimlerdir(53,57).

Wyllie, 1980 yılında deneysel apoptozisi, glukokortikoidlere maruz bırakılan olgunlaşmamış timus hücrelerinde gerçekleştirmiş ve apoptotik hücre DNA'sının elektroforetik jel ayrımını yaparak, hücrede DNA bütünlüğünün kalmadığını, apoptotik hücre için karakteristik olan merdiven tarzında DNA bantlarının oluştuğunu göstermiştir(58). 1993 yılında Cohen yüksek dozda kullanılan steroidlerin timus hücreleri üzerine etkilerini incelemiş ve timus hücrelerinin direkt olarak apoptozisi seçmediğini, hücre ölümüne neden olacak genleri oluşturarak hücreleri apoptozise yönlendirdiğini bildirmiştir(59). Böylece apoptozisin genler tarafından düzenlenen bir hücre ölümü olduğu ortaya çıkmıştır. Apoptozis genetik olarak kontrol edilen fizyolojik mekanizmalarla regüle edilir(60).

Nekrozda hücre şişer, mitokondri genişler, organeller çözünür, plazma membranı yırtılır. Sitoplazma materyali hücre dışına geçerek inflamasyona neden olur. Apoptozis sırasında ise plazma membranı yırtılmaz. Apoptozisin gerçekleşebilmesi için yüksek ATP seviyelerine ihtiyaç vardır. Hücre içi ATP

seviyesi hücrenin apoptozis veya nekroz ile öleceğine yön verir. Bu da mitokondrinin önemini apoptozisin erken fazında göstermektedir. Eğer hücre ciddi olarak yaralanırsa apoptotik yol için gerekli olan enerjiyi sağlayamayacak ve nekroz ile ölecektir. Apoptozis, hücre intihar şeklidir ve hücre kendi kendisini aktif olarak yok eder. Bu olay nükleer büzülme ve DNA fragmentasyonu ile karakterizedir(53,61).

2.9.1. Apoptozisin Önemi

İnsan vücudunda her saniyede 10^5 hücre mitoz ile oluşurken, yine benzer sayıda hücre apoptozis ile ölür(62). Apoptozis hem fizyolojik hem de patolojik bir süreçtir. Programlanmış hücre ölümü, embriyolojik gelişim ve erişkin dokunun gelişiminin sürdürülmesinde anahtar rol oynar. Apoptozis, hücrenin yaşam çemberi boyunca yapım, yıkım dengesinin sürdürülmesini sağlar. Örneğin kemik iliğinden devamlı olarak hücre üretimi devam ederken, günde yaklaşık 5×10^{11} kan hücresi apoptozis yolu ile yok edilmektedir(63). Barsak epitel hücrelerinin devamlı yenilenmesi, menstruasyon esnasında uterusun iç yüzündeki hücrelerin öldürülerek uzaklaştırılması apoptozise örnektir. Apoptozis, organizmada hasar görmüş veya organizma için tehlikeli olabilecek hücrelerin yok edilmesinde de görev alır. Örneğin virüsle enfekte hücreler bu yolla ortadan kaldırılır. Hasarlı DNA da apoptozis yolu ile ortadan kaldırılır(63,64). Hücrenin DNA'sında meydana gelen mutasyonlar kanser gelişimine neden olabilecekleri için bu hasarlı hücrelerin apoptozis yolu ile öldürülmesi büyük önem taşımaktadır(65). Apoptozis, doku gelişimi esnasında istenmeyen hücrelerin yok edilmesinde de rol alır. Örneğin böcek ve amfibilerin metamorfozu esnasında larva dokusunun yok edilmesine neden olur. Diğer bir örnek de memelilerde sinir sisteminin gelişimi esnasındaki programlanmış hücre ölümüdür. Fazla sayıda üretilen nöronların %50'den fazlası programlanmış hücre ölümü yoluyla ortadan kaldırılır. Ayrıca akut hücre hasarı durumunda da apoptozis rol almaktadır(63).

2.9.2. Apoptozisde Hücre Morfolojisi

Apoptoz, dokuda belli bir bölgedeki tüm hücreleri etkilemek yerine, dağınık olarak tek tek hücrelerde ortaya çıkar ve tipik olarak yangısal değişiklikler yoktur.

Apoptoziste ana morfolojik olay, nükleusun kondensasyonu ve daha sonra parçalara ayrılmasıdır. Kromatin, normalde mikst kondens bir yapıda olup daha

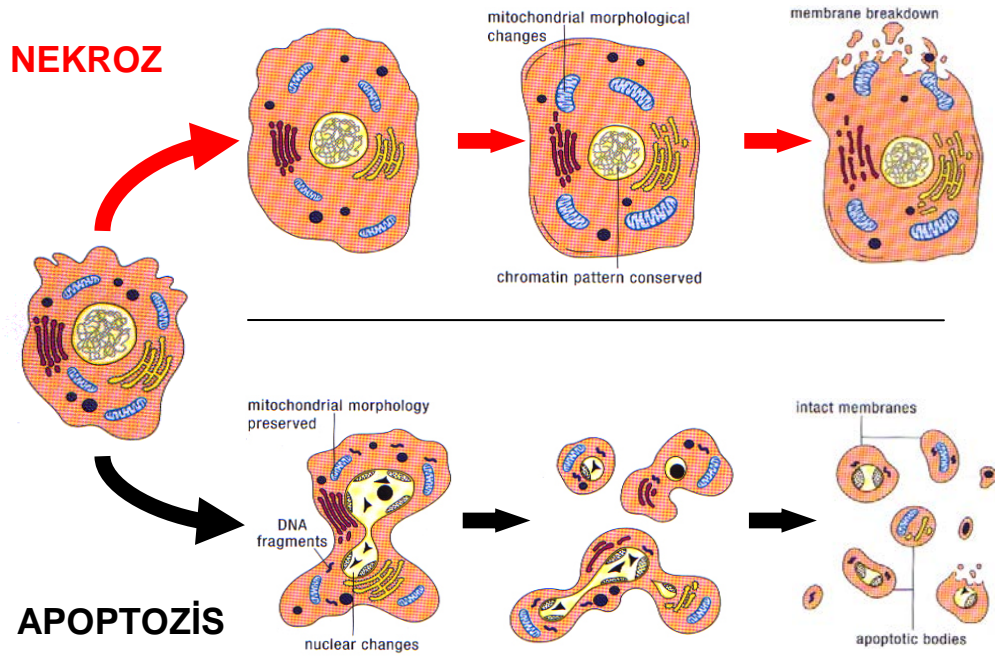
diffüz görünümdeydir. Apoptoziste süperkondens bir hal alarak nükleus zarı altında kresentik görünüm oluşur. Floresan boyamada DNA boncuklanmalar şeklinde görülür, bunun nedeni DNA'nın endonükleaz ile oldukça özgül şekilde internükleozomal bölgelerden 180–200 bp. (baz çifti) büyüklüğünde parçalara ayrılmasıdır. Immün Elektroforezi yapıldığında “*ladder patern*” olarak isimlendirilen merdiven şeklinde bir görünüm oluşur(66). Normalde bir hücrede birbirini takip eden 7 kırılma onarılrken, apoptoziste yaklaşık 30×10^5 kırılma meydana gelir ve hücre onarımı yapılamaz(12).

Apoptozisin erken evresinde hücreler birleşme bölgelerinden ayrılır, özelleşmiş yüzey organellerini kaybeder ve belirgin şekilde büzülür, birkaç dakikada hacimlerinin 1/3'ünü kaybederler. Bu görünüm, muhtemelen plazma membranında bulunan iyon kanalları ve pompalarında aktivasyonun bozulmasına bağlıdır. Apoptotik hücrelerin bulunduğu dokulardan elde edilen kesitler ışık mikroskopunda incelendiğinde, hücreler, etrafında açık bir halo ile görülmektedir Daha sonra plazma membranında tomurcuklanmalar oluşur ve hücre, sitoplazma ile çevrilmiş kromatin parçalarından oluşan apoptotik cisimciklere parçalanır. Hücre henüz yaşamaya devam etmektedir(67).

Apoptotik hücreler komşu hücreler ve makrofajlar tarafından tanınır ve fagosite edilir. Apoptotik hücrelerin tanınması, plazma membranındaki değişikliklerle olur. Normalde hücre membranının iç tabakasında olan fosfatidil serin, aminofosfolipid transferaz enzimiyle membranın dış yaprağına göç eder. Fagositik hücrelerin vitronektin, lektin özelliğindeki reseptörleri fosfatidil serin ile bağlanır ve fagositozu uyarır(60). Diğer bir hücre ölüm şekli olan **nekroz** ise hipoksi, fiziksel hasar, hipertermi, kompleman aktivasyonu, UV ışık gibi zararlı hücre dışı uyaranlar sonucu oluşan istenmeyen bir süreçtir. Hücre plazma membran lipidlerinin peroksidasyonu sonucu hücre içeriği ortama dökülür, inflamatuvar yanıt oluşur ve komşu hücreler de etkilenir(61) (Şekil 2.11) (Tablo 2.1).

Tablo 2.1. Nekrozis ve apoptozis arasındaki farklılıklar.

ÖZELLİK	NEKROZİS	APOPTOZİS
Yol açan Nedenler	İskemi Hipertermi Hipoksi Litik viral enfeksiyon Toksik maddelerin yüksek konsantrasyonları Şiddetli oksidatif stres	Büyüme faktörü eksikliği Hücre yaşlanması HIV Kanser ilaçları Radyasyon Yüksek doz glukokortikoid Fas veya TNFR-1 reseptörlerinin aktivasyonu Sitotoksik T lenfositler Çok şiddetli olmayan oksidatif stres
Morfolojik ve Histolojik Özellikler	Hücre membranı bütünlüğünün kaybı Kromatin "floculation"u Hücre şişmesi Organellerin disintegrasyonu Endoplazmik retikulumun dilatasyonu Büyük vakuollerin oluşumu Hücre lizisi	İntak hücre membranı fakat membranda "bleb"lerin oluşumu Kromatinin nükleer membran civarında toplanması ve yoğunlaşması Hücre küçülmesi Organellerde disintegrasyon yok Hücresinin intak mitokondri, ribozom, nucleus parçaları ve diğer organelleri içeren membranla kaplı apoptotik cisimciklere parçalanması
Biyokimyasal Özellikler	Bozulmuş iyon homeostazisi ATP gerekmez (pasif süreç) +4°C'de gerçekleşebilir DNA rasgele parçalanır (agaroz jel elektroforezinde "smear" görüntüsü) Postlitik DNA fragmentasyonu (ölümün geç safhasında)	İyi kontrollü, bazı aktivasyonların ve enzimatik basamakların olması ATP gereklidir (aktif süreç) +4°C'de gerçekleşmez DNA internükleozomal alanlarda 180 kb çiftinin katları olacak şekilde kırılır mono ve oligonükleozomlara ayrılır (agaroz jel elektroforezinde merdiven paterni→apoptozisin en önemli belirteci) Prelitik DNA fragmentasyonu
Diğer Özellikler	Hücreler gruplar halinde ölür patolojik etkiler sonucu gerçekleşir İnflamasyona neden olur	Hücreler tek veya birkaçı bir arada ölür Fizyolojik şartlarda da gerçekleşebilir İnflamasyon görülmez



Şekil 2.11. Nekroz ve apoptozis arasındaki farklar.

2.9.3. Apoptozis Mekanizmaları

Apoptozisin klasik tanımlaması otonomik ve programlı hücre intiharı olarak da ifade edilebilir. Apoptozis, hücre dışı ve hücresele seviyede oluşan çeşitli sinyaller yoluyla tetiklenebilir(68). Hücresele düzeyde etkili ana fizyolojik aktivatörler, Fas Ligant (FasL) ve Tümör nekrozis faktör (TNF) isimli proteinlerdir. Ölüm faktörü olarak da adlandırılan bu proteinlerin, ilgili reseptörlerine bağlanması ile hücre ölümü gerçekleşir(69). Bunun dışında apoptozis büyüme faktör ya da hormon eksikliği, viral enfeksiyonlar, bakteriyel toksinler, onkogenler, kemoterapötikler, radyasyon gibi bazı faktörler ile de başlatılabilir. Ağır DNA hasarına yanıt olarak aktive olan p53 geni, reaktif oksijen radikalleri (hem mitokondri, hem plazma membran, hem de genom üzerinde oluşturabileceği hasarlara bağlı olarak) apoptozisi tetikleyebilmektedir.

I— Apoptozis Sinyalinin Oluşumu

Apoptozisin indüklenmesinde iki majör sinyal yolunun rol aldığı bilinmektedir. Bunlar "**ekstresek**" hücre dışı ve "**intresek**" hücre içi sinyal yollarıdır (Şekil 2.12).

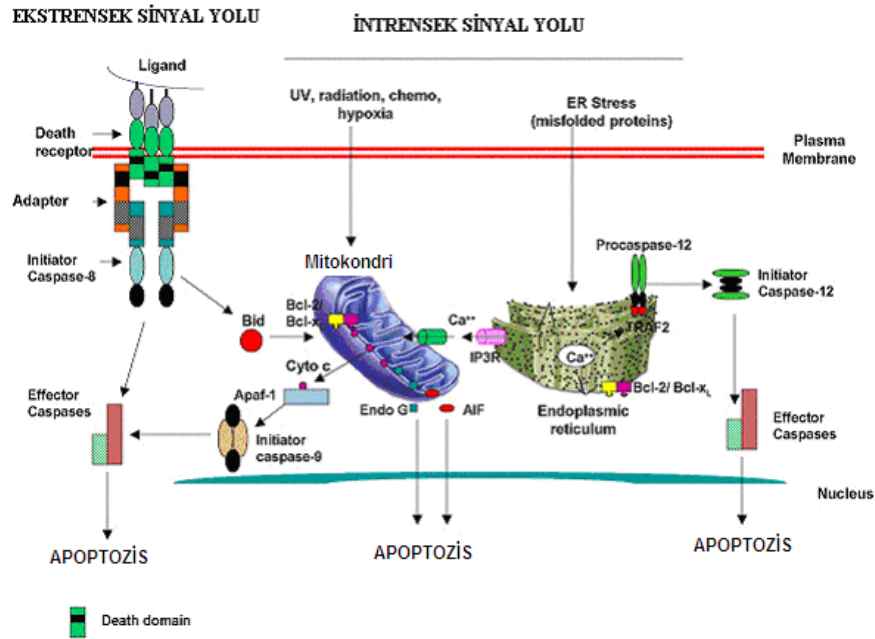
1-Ekstrensek sinyal yolu

Hücre yüzeyindeki ölüm reseptörlerine bağlanma ile tetiklenme

2-İntrensek sinyal yolu

a)Mitokondri/Sitokrom-C aracılı apoptozis oluşturulması

b)Endoplazmik Retikulum aracılı apoptozis oluşturulması



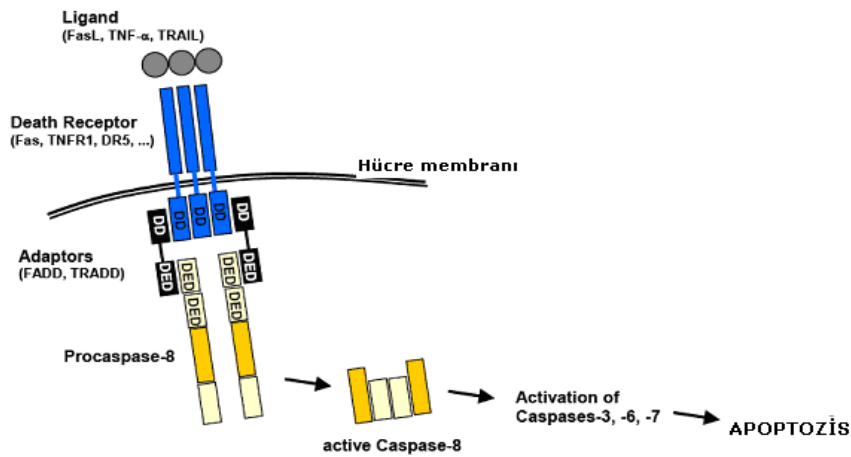
Şekil 2.12. İntrensek ve ekstrensek sinyal yolu tetikleyicileri.

1) Ekstrensek Sinyal Yolu

Fas Ligand (FasL) ve TNF

Hücresele düzeyde etkili ana fizyolojik aktivatörler, Fas Ligand (FasL) ve Tümör nekrozis faktör (TNF) isimli proteinlerdir. Ölüm faktörü olarak da adlandırılan bu proteinlerin, ilgili reseptörlerine bağlanması ile hücre ölümü gerçekleşir. Sitokinler protein yapısında olup hedef hücrelerde spesifik reseptörlere bağlanarak hücre çoğalması ve farklılaşmasını kontrol eder. Sitokinler, yapısal özelliklerine göre; sitokin bağımlı büyüme faktörü, TNF ve helikal sitokinler olmak üzere üç alt gruba ayrılırlar. Önemli bir apoptotik faktör olan Fas Ligand (FasL), TNF ailesinin bir üyesidir(70). TNF, hedef hücredeki TNFR-1 (Tümör nekrozis faktör reseptör-1) ve TNFR-2 (Tümör nekrozis faktör reseptör-2) adlı reseptörleri ile bağlandığında apoptozisi aktive eder. FasL, sitotoksik T lenfositlerde (CTL) ve

natural killer (NK) hücrelerde bulunur. Hedef hücrede bulunan reseptörü Fas ile bağlandığında apoptozisi aktive eder. FasL, Tip-II membran proteini gibi sentezlenir. FasL'in N terminali sitoplazmadadır, C terminali ise ekstrasellüler alana doğru uzanmaktadır(71). Membrana bağlı TNF ve FasL'in metalloproteinaz enzimleri aracılığı ile proteolizi sonucunda membrandan ayrılıp serbest hale geçen formları mevcuttur. Bu serbest formlarına, solubl TNF ve solubl FasL adı verilmektedir(72). Solubl formda bulunan TNF ve FasL'da apoptozisi aktive etmektedir. Ancak membrana bağlı TNF ve FasL'in, spesifik reseptörlerini aktive etmekte solubl formlarından daha etkili oldukları saptanmıştır(73) (Şekil 2.13).



Şekil 2.13. Fas ve TNF ölüm reseptör ve aktivatörleri.

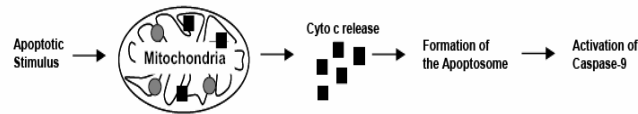
2 İntrensek Sinyal Yolu

a) Mitokondriyal Yolak: Memeli hücrelerinde majör apoptotik sinyal yolu mitokondriyal dir. Radyasyon, toksinler, ısı artışı, çoğu kemoterapötik ajan, tümör supresör genler, DNA hasarında, viral virulans faktör ile intrinsek mitokondriyal yolak üzerinden apoptotik sürecin başlamasına neden olurlar(74) (Şekil 2.14).

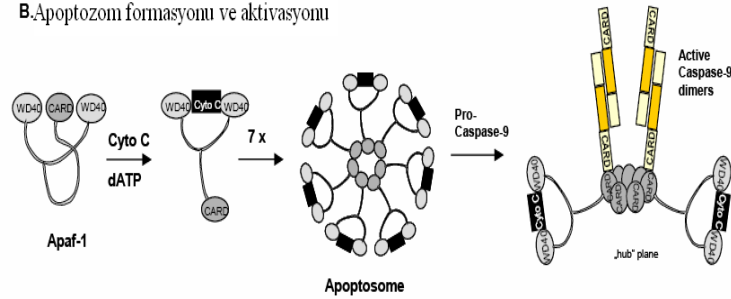
Sitokrom-C mitokondri iç membranında bulunan elektron transport zincirinin bir proteindir. Son yıllarda anlaşılan önemiyle apoptozis sürecinde merkezi bir konuma oturmuştur. Bu yüzden de sitokrom-C'nin mitokondriden sitoplazmaya salıverilmesi apoptozis yoluna girmiş bir hücrede irreversible bir döneme girildiğini

işaret eder. Sitokrom-C mekanizması henüz tam olarak aydınlatılmamış bir şekilde mitokondriyenin apoptozis-indükleyici faktör (AIF, apoptosis-inducing factor) ile birlikte sitoplazmaya salınır. Sitokrom-C sitoplazmik protein olan Apaf-1 (apoptotic protease activating factor-1)'e bağlanır ve onu aktive eder, ardından ATP'nin de katılımıyla apoptozom adı verilen bir kompleks oluşur. Bu kompleks inaktif olan pro kaspaz-9'un aktif kaspaz-9 haline dönüşmesini sağlar. Aktif kaspaz-9 ise efektör kaspazlardan pro kaspaz 3'ü aktive eder. Aktif kaspaz 3, kaspazla-aktifleşen deoksiribonükleaz inhibitörünü (*ICAD*, *inhibitor of caspase-activated deoxyribonuclease*) inaktifleştirir, böylece *ICAD*'ünün bağladığı kaspazla-aktifleşen deoksiribonükleaz (*CAD*, *caspase-activated deoxyribonuclease*) serbestleşir ve bu da apoptozisin karakteristik bulgularından biri olan kromatin kondensasyonuna ve oligonükleozomal DNA fragmentasyonuna neden olur(75).

A. Mitokondriyal sinyal yolu ve Kaspaz aktivasyonu



B. Apoptozom formasyonu ve aktivasyonu



Şekil 2.14. İntrensek apoptotik sinyal yolu.

b) Endoplazmik Retikulum (ER) Aracılı Apoptozis Oluşturulması: Son zamanlarda amiloid β nörotoksitesine katkıda bulunan kaspaz-12'ye bağımlı endoplazmik retikulum aracılı apoptotik yol tarif edilmiştir(76). Bu yol mitokondriyal/sitokrom-C ve ölüm reseptör aracılı apoptozisten farklı bir yoldur. ER hücre içi kalsiyum dengesi, sentezi ve membran proteinlerinin katlanmasını içeren birçok süreçte kritik öneme sahiptir. Kaspaz-12, ER membranında lokalize olan ve

ER aracılı apoptozis için esas teşkil eden bir kaspazdır. Ca^{++} seviyesinin yükselmesi ve kalpainin endoplazmik retikulumu etkilemesi ile pro kaspaz-12 aktiflenir. Ayrıca kaspaz-7 salınımı ile de pro kaspaz-12 salınımı arasında bir bağlantı bulunur. Aktiflenmiş kaspaz-12 sitoplazmaya yönelir. Kaspaz-9 ile karşılıklı olarak etkileşerek sitozolik kaspaz kaskatını aktive eder. Son çalışmalar, *in vivo* ve *in vitro* olarak kaspaz-12'nin kaspaz-9'u aktive ettiğini göstermiştir(77).

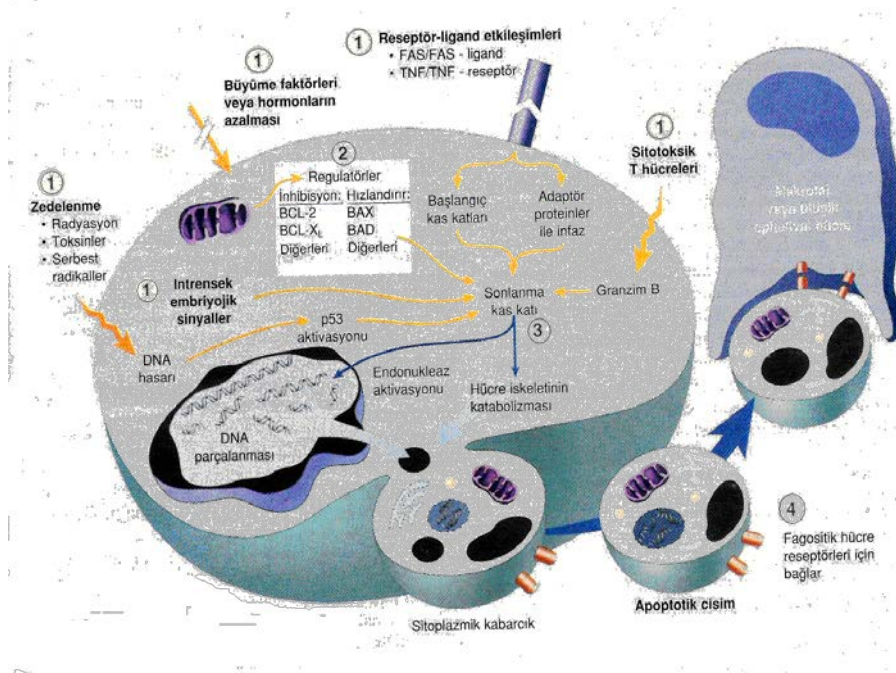
2.9.4. Apoptozis Sürecini Başlatan Diğer Nedenler

Apoptozis genotoksik ajanların etkisiyle yaratılan ağır DNA hasarına yanıt olarak p53'ün indüksiyonuyla da başlatılabilir. İndüklenen p53 bir pro-apoptotik bcl-2 ailesi üyesi olan bax'ın indüksiyonuna yol açarak apoptozisi başlatır. p53 bax'ın indüksiyonu haricinde ayrıca Fas ve DR5 gibi hücre yüzey ölüm reseptörlerinin indüksiyonuna neden olarak da apoptozisi başlatılabilir(78).

Apoptozis ayrıca reaktif oksijen radikallerinin (oksidatif stres) hem mitokondri hem plazma membranı hem de genom üzerinde oluşturabileceği hasarlara bağlı olarak da başlatılabilir(78).

Apoptozisi büyüme faktörlerinin ortamdan eksilmesiyle de başlatılabilir. Hücre kültür ortamında büyütülen hücreler eğer serum açlığına (serum starvation) maruz bırakılırlarsa apoptozisle ölürlür. Buradaki mekanizma, apoptozis indükleyici bir nükleer protein olan p53 aktivasyonuna bağlı olarak gerçekleşir. Ayrıca, bir pro-apoptotik (apoptozis uyarıcı) ve bir bcl-2 ailesi üyesi olan Bad'ın fosforillenmemesi sonucu aktifleşmesi ve böylece mitokondriden apoptozisi başlatıcı bir faktör olan sitokrom-C'nin sitoplazmaya salıverilmesi yoluyla da gerçekleşir(78).

Apoptozisi başlatan bir başka neden ise, sitotoksik T lenfositlerinden salıverilen Granzim B'lerin (GrB) hedef hücrede (örneğin virüsle enfekte hücre veya kanser hücresi) kaspaz sistemini aktifleştirmesidir. GranzimB bir serin proteaz enzimidir. Sitoplazma içine alınan GrB, hem pro-kaspas 10'u hem de pro-kaspas 3 ve pro-kaspas 7'yi aktive eder. Aktive olmuş pro-kaspas 3 bir yandan doğrudan selüler proteolizi başlatırken bir yandan da pro-kaspas 7 üzerinden selüler proteolizi başlatır(78,79) (Şekil 2.15).



Şekil 2.15. Apoptozisteki olayların şematik görünümü.

2.11.5. Apoptozisde Hücre İçi Sinyal İletiminin Regülasyonu

Ca⁺⁺

Hücre içi sinyal iletiminde yaygın olarak kullanılan Ca⁺⁺ apoptoziste de rol oynar. Hücre içindeki Ca⁺⁺ iyonlarının miktarındaki artış hücreyi apoptozise götürmektedir. Kalsiyum iyonları endonükleaz aktivasyonunda, doku transglutaminaz aktivasyonunda, gen regülasyonunda, proteazların aktivasyonunda ve hücre iskeleti organizasyonunda rol alabilirler(59,78).

Kaspazlar (CASPASES): Cysteine dependent Aspartate specific Proteases

Zimojen (inaktif prekürsör) olarak sitoplazmada bulunan ve aktif merkezlerinde sistein yer aldığından sistein proteazlar olarak adlandırılan bir grup enzimlerdir. Şu ana kadar 14 tanesi tanımlanmıştır ve çoğu da apoptoziste rol almaktadır. Kaspazlar birbirlerini aktifleştirerek preteolitik bir kaskad (şelale tarzı reaksiyon dizisi)'a neden olurlar. Bazıları (Kaspaz 2, 8, 9, 10) başlatıcı kaspazlar olarak bilinirken bazıları da (3, 6, 7) efektör kaspazlar olarak bilinir. Başlatıcı kaspazlar apoptotik uyarıyla başlayan ölüm sinyallerini efektör kaspazlara naklederler. Efektör kaspazlar ise ilgili proteinleri örneğin, hücre iskeleti proteinleri

aktin veya fodrin, nükleer membran proteini lamin A, DNA tamirinde rol alan *Poli ADP-Riboz Polimeraz (PARP)*'ı parçalayarak apoptotik hücre morfolojisinin meydana gelmesine neden olurlar. İlk tanımlanan enzim ICE (interlökin 1- β dönüştürücü enzim)'dir ve prokaspaz 1 olarak bilinir. Kaspaz kaskadı, sitokrom C'nin stoplazmaya saliverilmesiyle prokaspaz 9'un aktivasyonu yoluyla aktifleştirildiği gibi, kaspazlar da sitokrom-C'nin saliverilmesine neden olabilirler(80,81).

Kaspazların aktivasyonu; İnaktif (zimojen) formdaki kaspazlar kırılarak aktifleşirler ve dimerize olurlar. Kaspaz aktivasyonu (dimerizasyonu) ya hücre yüzey ölüm reseptörlerinin aktivasyonu ya da kaspaz-9 bağlayıcı protein olan Apaf'nin oligomerize olmak üzere indüklenmesiyle gerçekleşir. Apaf-1'in indüksiyonu ise sitokrom-C'nin mitokondriden saliverilmesi ile gerçekleşir. Apaf -1'in oligomerizasyonu kaspaz-9 monomerlerinin bir araya getirilmesini sağlar. Böylece aktifleşen kaspaz-9 kaspaz-3'ü aktifleştirir. Mitokondriden ayrıca AİF (apoptozis indükleyici faktör) saliverilir. Bunlar bilinmeyen bazı nükleazları aktive ederek DNA'nın degraşyonuna yol açarlar. Her dokunun eksprese ettiği kaspaz tipi farklı olabilir. Kaspazların uyarılması ile hücrelerde proteoliz başlatılır(80,81).

Mitokondri

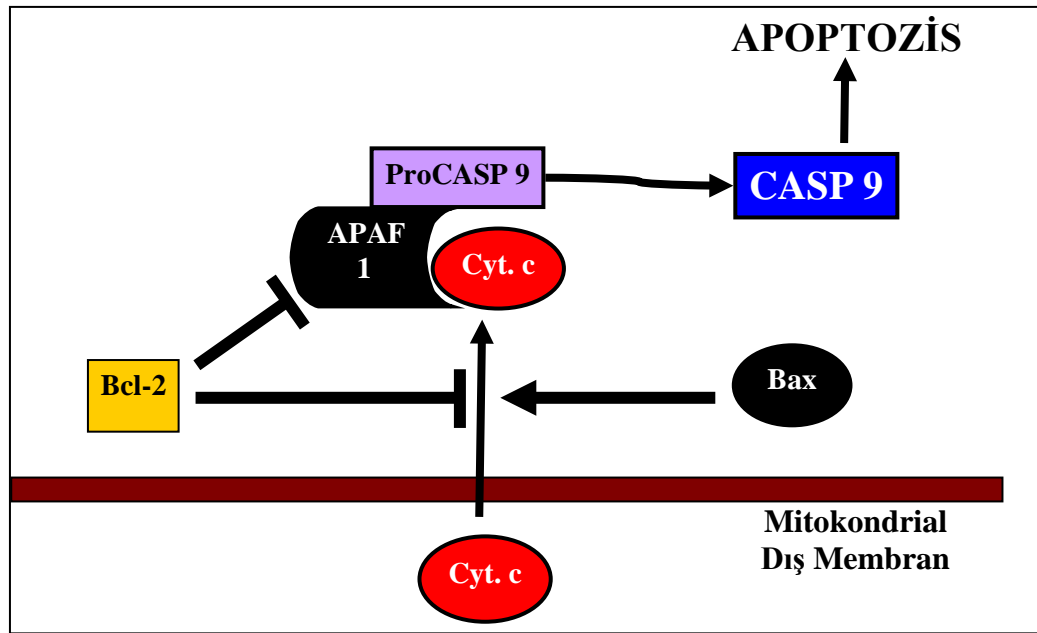
Apoptozisi başlatan yolların kesiştiği kavşak noktanın mitokondri olduğu görülmüştür. Bu nedenle mitokondrinin aktivasyonu (sitokrom-C'nin mitokondriden stoplazmaya saliverilmesi) apoptotik süreçte irreversible basamaktır. Mitokondrinin aktivasyonuna yol açan en önemli faktör bcl-2 ailesidir.

Bcl- 2 ailesi

Bcl-2 geni ilk olarak insan B hücreli foliküler lenfomada tanımlanmıştır. Bu lenfoma tipinde, Bcl-2 normalden uzun yaşam sürelerine neden olur. Böylece malignite oluşumuna zemin hazırlamaktadır.

Bcl-2 ailesi birbirine zıt etkileri olan iki gruptan oluşur. Bu gruptan biri pro-apoptotik yani apoptozisi indükleyici (Bax, Bad, Bid, v.b.), etkiye sahiptir. Diğeri ise anti-apoptotik, apoptozisi baskılayıcı (Bcl-2, Bcl-X1) etkiye sahiptir (Tablo 2.2). Pro-apoptotik olanlar, sitokrom-C'nin mitokondriden stoplazmaya saliverilmesini indüklerler. Anti-apoptotikler ise sitokrom-C saliverilmesini

baskılar. Bcl-2 özellikle mitokondri dış membranında bulunmakta ve iyon transportunu düzenlemektedir. Bax sitozolde bulunur ve apoptotik uyarı alınması halinde mitokondri membranına bağlanır, burada küçük delikçikler “pore” oluşumunu indükler, böylece selektif iyon permeabilitesi kaybolur, sonuçta sitokrom-C ve apoptozis indükleyici faktör olarak bilinen AIF’ün mitokondriden sitozole çıkmasını sağlar(78) (Şekil 2.16).



Şekil 2.16. Bax/ Bcl-2'nin etki mekanizması.

Tablo 2.2. Bcl-2 ailesi.

Bcl-2 Ailesi	
Apoptozisi Baskılayanlar	Apoptozisi İndükleyenler
1.Bcl-2	1.Bad
2.Bcl-Xl	2.Bax
3.BHRL-1	3.Bak
4.Bcl-w	4.Bcl-xs
5.Bfl-1	5.Bik
6.Brag-1	6.Hrk-1
7.Mcl 1	

2.9.6. Apoptozisin Genetik Kontrolü

Coenorhabditis elegans isimli bir nematod ile yapılan çalışmalar sonucunda görülmüştür ki her hücre hayatta kalabilmek için ölümü engelleyici mesaj (Egl-1) yollayabileceği gibi ölümü başlatıcı mesaj da yollayabilir (Ces-1 ve Ces-2). Apoptotik sinyal yandaki hücreden gelebileceği gibi hücrenin kendinden de gelebilir(52,78).

Omurgalılarda apoptozisi düzenleyen genler c-myc, p-53, Rb (retinoblastoma) ve bcl-2 ailesi (bcl-2, bax ve bcl-x) olarak bilinmektedir ve üretimini sağladıkları proteinler de aynı adlarla anılmaktadır(82,83).

2.9.7. Apoptozisin Görüldüğü Olaylar

Bazı organların biyolojik gelişimleri esnasında apoptozise rastlamak mümkündür. Örnek olarak, Müller ve Wolf kanallarının involüsyonu, kalp gibi bazı iç organların lümenlerinin oluşması gösterilebilir(53). Apoptozis ayrıca her türlü neoplastik oluşumda hem büyüme hem gerileme döneminde görülebilir(55). Hafif şiddette fiziksel ve toksik uyarılara maruz kalan dokularda da apoptozis görülür. Örnek olarak hipertermi, düşük doz sitotoksik ilaçlar, iyonize radyasyon, hafif travma, hafif hipoksi gösterilebilir(53). Bu anlamda apoptozis spesifik bir uyarana maruz kalan hücrenin, bu uyarıya aktif olarak verdiği düzenleyici bir cevaptır(54). Apoptozisli hücreler sağlıklı doku içinde dağılmış şekilde bulunur(59).

Apoptozisin görüldüğü başlıca olaylar;

1. Fizyolojik Olaylar

a- Embriyogenez ve metamorfoz sürecinde programlı hücre yıkımı (fetus implantasyonu, organogenezis ve gelişim sürecinde yaşanan involüsyonu).

b- Erişkinde hormona bağımlı involüsyon (menstrüel siklusta endometriyum hücrelerinin yıkımı, menopozda folikül atrezisi, laktasyonun kesilmesinden sonra meme bezlerinin rejenerasyonu).

c- Sürekli çoğalan hücre gruplarında hücre sayısının dengelenmesi amacı ile hücre azaltılması (barsak kripta epitelleri)

d- İmmun hücrelerin seçimi (hem B hem de T hücrelerinin sitokin depleksiyonundan sonra ve timusun gelişimi sırasında otoreaktif T hücrelerinin ortadan kaldırılması) .

2. Patolojik Olaylar

a- Tümörlerde hücre ölümü (hem büyüme hem de regresyon aşamasında).

b- Hormonlara bağlı dokularda patolojik atrofi (kastrasyon sonrası prostat atrofisi, glukokortikoid kullanımı sonrası timusta lenfosit kaybı)(58).

c- Parankimden zengin dokularda duktus tıkanmasından sonra patolojik atrofi (pankreas ve böbrek tübüllerinde olduğu gibi) .

d- Sitotoksik T hücreleri ile oluşturulan hücre ölümü (otoimmün hastalıklar)(60).

e- Çeşitli etkenlerle oluşan hücre ölümü (radyasyon, anti kanser ilaçları, hipertermi, hipoksi, travma)(56).

Son zamanlarda yapılan araştırmalarda apoptozis yoluyla hücre ölümünün artması ya da azalmasının kanser, otoimmün bozukluklar, viral enfeksiyonlar, nörodejeneratif hastalıklar gibi birçok hastalığın patogenezinde rol oynadığı gösterilmiştir(84) (Tablo 2.3).

Tablo 2.3. Apoptozis ile hastalıkların ilişkisi.

Apoptozisin İnhibisyonu ile İlişkili Hastalıklar
1-Kanserler: Foliküler lenfoma P53 mutasyonları ile oluşan karsinomlar, Hormon bağımlı tümörler, Akciğer kanseri, Prostat kanseri, Over kanseri
2- Otoimmün bozukluklar: Sistemik lupus eritamatozus, İmmün ilişkili glomerulonefritler, Otoimmün diabet, Greft rejeksiyonu
3- Viral enfeksiyonlar: Herpes virüs, Poliovirus, Adenovirus
Apoptozisin Aktivasyonu İle İlişkili Hastalıklar
1- AİDS
2-Nörodejeneratif hastalıklar: Alzheimer hastalığı, Parkinson hastalığı, Amyotrofik lateral skleroz, Retinitis pigmentoza, Serebellar dejenerasyon
3- Miyelodisplazik sendromlar: Aplastik anemi
4- İskemik hasarlar: Myokard infarktüsü, İnme, Reperfüzyon hasarı
5- Toksik nedenli karaciğer hasarı

2.9.8. Apoptozisin Saptanmasında Kullanılan Yöntemler

Apoptozisi saptamak için çok çeşitli yöntemler geliştirilmiştir. 1972 yılında, apoptozis terimi ilk kez kullanıldığında hücrenin morfolojik görünümüne göre karar verilmişti. Oysa günümüzde morfolojik değerlendirmenin yanısıra apoptozise özgü olduğu bilinen bazı aktivasyonların (örn: aktif kaspaz-3 tayini) moleküler düzeyde belirlenmesiyle de saptanabilmektedir. İlk kez morfolojik kriterlere göre belirlenen apoptozis, 80'li yılların sonuna doğru DNA kırıklarının oluştuğunun ortaya çıkarılmasıyla birlikte bu kırıkların saptanmasına yönelik yöntemlerle belirlenmeye başlandı. 90'ların ortalarında ise apoptotik hücrelerde kaspazların aktifleştiği bulundu. Böylece kaspaz aktivasyonlarının belirlenmesine yönelik metodlarla saptanabilen apoptozis, 90'ların sonuna doğru fosfatidilserin translokasyonunu belirleyen yöntemlerle de saptanmaya başlandı. Apoptozisin belirlenmesine yönelik geliştirilen tüm metodları 2000'li yılların başlarında, sadece apoptotik epitelyal hücrelerde olmak üzere kaspaz aktivitesiyle kırılan bir protein olan keratin 18'in kırıldıktan sonraki özgün formunu saptayan antikorların kullanılarak daha spesifik olarak saptanması takip etti. Apoptozisin belirlenmesinde kullanılan yöntemler;

1. Morfolojik görüntüleme yöntemleri
2. Immunohistokimyasal yöntemler
3. Biyokimyasal yöntemler
4. İmmünolojik yöntemler
5. Moleküler biyoloji yöntemleri

1.Morfolojik görüntüleme yöntemleri

- I. Işık mikroskobu kullanımı:
 - A. Hematoksilen-Eozin boyama
 - B. Giemsa boyama
- II. Floresan mikroskobu / Lazerli konfokal mikroskop kullanımı
- III. Elektron mikroskobu
- IV. Faz kontrast mikroskobu

2. Histokimyasal yöntemler:

- I. Anneksin V Yöntemi
- II. TUNEL Yöntemi:

TUNEL; Terminal deoxynucleotidyl Transferase Biotin - dUTP Nick End Labeling kelimelerinin kısaltmasıdır.

Apoptotik hücrelere ait DNA'lar hızla parçalanarak, birdenbire hücre içerisindeki kromatin ağ, bütünlüğünü kaybeder ve 3'-OH içeren DNA parçacıklarının sayısı çok yükselir. Hücrede terminal deoxynucleotidyl transferaz (TdT) enzimi, ortama eklenen biotin dUTP'yi, parçalanmış DNA parçacıklarının serbest 3'-OH uçlarına transfer eder. Biotin ile işaretlenmiş DNA parçacıkları ortama FITC gibi floresans veren bir madde ile bağlanmış avidin eklendiğinde görünür hale gelirler. Bu yöntem tek tek hücrelerde insitu apoptozisi gösterebildiği için hücre kültürlerinde ve doku kesitlerinde çok duyarlı bir testtir. Kan hücreleri gibi sayıca çok olan hücrelerde kantitatif sonuçlar elde etmek için, aynı TUNEL tekniği flow-Cytometry'ye uygulanabilmektedir. Tek farkı floresans okuma sisteminin flow-Cytometry'de olmasıdır(78).

III. M30 Yöntemi

IV. Kaspaz-3 Yöntemi

3. Biyokimyasal Yöntemler

L. Agaroz Jel Elektroforezi

II. "Western" Blotting

III. "Flow" Sitometri

4. İmmünolojik Yöntemler

L. ELISA

II. Flourimetrik Yöntem

5. Moleküler Biyoloji Yöntemleri

I. DNA Microarrays

2.10. Alfa Lipoik Asid

Alfa Lipoik asid (ALA; 1,2-dithiolan-3-pentanoik asit; 6,8-dithio-oktanoik asit veya thioktik asit) mikroorganizmalardan insanlara kadar bütün organizmalarda enerji metabolizmasında kofaktör olarak gerekli olan ve son zamanlarda antioksidan özellikleri ortaya konulan bir moleküldür(85,86). İlk olarak 1937'de, bazı bakterilerin gelişimleri için patates ekstraktında bulunan bir maddeye gereksinim duydukları ortaya konulmuş ve bu maddeye "*potato growth factor*" denilmiştir.

1951’de ise Reed ve arkadaşları tarafından bu madde tonlarca karaciğerden birkaç miligram olarak izole edilmiş ve alfa lipoik asit olarak adlandırılmıştır(87,89).

2.10.1. Lipoik Asidin Genel Özellikleri ve Kaynakları

Lipoik asid (LA) bakterilerden insanlara kadar birçok organizmada sentezlenmektedir. İnsanlarda karaciğer ve diğer dokular tarafından sentezlenerek, doğal bir kofaktör olarak görev yapmaktadır(87). LA predominant olarak beyin, böbrek, karaciğer, ince barsak ve iskelet kaslarında bulunmaktadır. Memeli dokuları 5-25 nmol/g LA içermekle birlikte, bunun hemen hemen tümü proteine bağlı formda bulunup, dışarıdan verilmediği sürece hücrede sadece çok az serbest LA bulunmaktadır. Çeşitli sebze ve meyveler ile hayvansal dokular farklı düzeylerde *lipoillizin* formunda R-LA içerirler. Ispanak başta olmak üzere brokoli, domates, bezelye, Brüksel lahanası ve pirinç ALA içeren bitkisel kaynaklardır. Kalp, karaciğer ve böbrek gibi yüksek metabolik aktiviteye sahip hayvansal dokular da ALA bakımından zengin kaynaklardır(89,90).

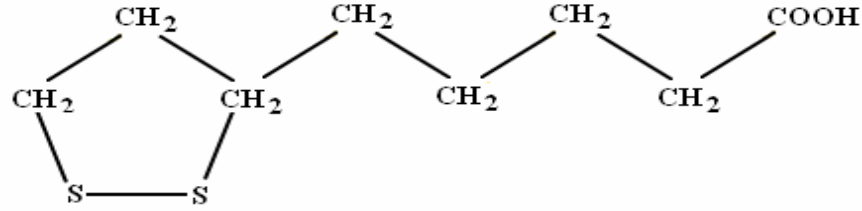
2.10.2. Lipoik Asidin Yapısı

Alfa-Lipoik asid yapısında iki sülfür atomu ve bir karboksilik asit grubu bulunan beşli bir halka içermektedir. Alfa lipoik asid (ALA) kendi orijinal okside formunda ya da dihidrolipoik asit (DHHLA) şeklinde redükte formda bulunabilir. ALA diyetten hızla emilir, transport sonucu hücreler tarafından alınarak, beyin dahil birçok dokuda redükte formu olan DHHLA’ya indirgenir(86,89). ALA; DHHLA’ya indirgendiği zaman molekülün uç kısmındaki atomların oluşturduğu dithiolan halkası kırılır ve sülfür atomları sülfhidril (-SH) grupları şekline dönüşür. ALA ve DHHLA’nın yapıları Şekil 2.17’de verilmiştir.

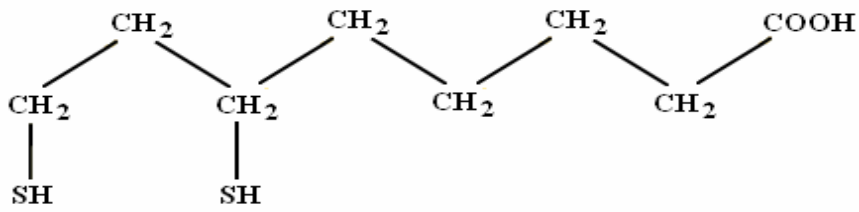
2.10.3. ALA’nın DHHLA İndirgenmesi

Mitokondri bulunan çoğu hücrede ALA dihidrolipoamid dehidrogenaz (E3 enzimi mitokondriyal a-ketoasit dehidrogenaz kompleksi (E.C.1.8.1.4) tarafından NADH-bağımlı bir reaksiyon ile DHHLA’ya indirgenir. Mitokondri bulunmayan hücrelerde ise indirgenme NADPH-bağımlı olarak glutatyon redüktaz ve thioredoksin redüktazlar tarafından gerçekleştirilir(90,92). Ayrıca sentetik olarak

NaBH₄ ile de indirgenme oluşabilir. ALA'nın antioksidan özelliklerine büyük ölçüde indirgenmiş formunun katkıda bulunduğu ileri sürülmektedir(93).



α -Lipoik Asit (α -LA)



Dihidrolipoik Asit (DHLA)

Şekil 2.17. ALA ve DHLA' nın yapıları.

2.10.4. Lipoik Asidin Fonksiyonları

ALA'nın vücutta iki şekilde fonksiyon yaptığı düşünülmektedir. Bunlardan ilki, metabolik süreçlerde koenzim olarak görev alması; ikincisi ise suplementasyon yoluyla ulaşılan dozlarda antioksidan özellikler göstermesidir. Lipoik asit; a-ketoglutarat dehidrogenaz, dallı zincir a-ketoasit dehidrogenaz, pirüvat dehidrogenaz multienzim kompleksleri için kofaktör olarak rol oynayıp, enerji metabolizmasında çok önemli bir yere sahiptir(85,88). ALA'nın karboksilik grubu pirüvat dehidrogenaz komplekslerinin dihidrolipoil transasetilaz subünitine (E2) spesifik lizin e-amino grubuna amid bağı ile kovalent olarak bağlanır. ALA ayrıca glisin dekarboksilaz kompleksinin H proteinine de bağlanır ve glisinin CO₂, amonyak, 5,10-MTHF ve NADH'a reversible oksidasyonunu katalize eden glisin cleavage sistemin de bir bileşendir(85,86,88,94).

2.10.5. Lipoik Asidin Antioksidan Özellikleri

Bir bileşiğin antioksidan potansiyeli değerlendirilirken bazı kriterler göz önünde bulundurulmaktadır. **a)** serbest radikalleri temizleme spesifitesi, **b)** diğer

antioksidanlarla etkileşimi, **c)** metallerle şelat yapma yeteneği, **d)** absorpsiyonu, biyolojik yararlılığı ve hücre konsantrasyonu, **e)** gen ekspresyonuna etkileri, **f)** molekülün membran veya akuöz fazda lokalize olması, **g)** oksidatif hasarı onarma yeteneği(85,86).

Bir maddenin iyi bir antioksidan olması için bu özelliklerin tümüne sahip olması gerekmez. Örneğin Vitamin E vücutta iyi bir antioksidan olarak düşünülmesine rağmen sadece membran ya da lipid fazda etkisini gösterip özellikle lipid peroksil radikallerini nötralize ederken, akuöz fazdaki radikallere karşı çok az ya da hiç etki göstermemektedir(86). İdeal bir antioksidan ise yukarıdaki kriterlerin tümünü sağlamalıdır. Alfa lipoik asit/dihidrolipoik asit redoks çifti, diğer antioksidanlarda bulunmayan bazı özelliklere sahiptir. ALA *“ideal”*, *“eşsiz”* ve *“evrensel antioksidan”* olarak tanımlanmaktadır. Bunun nedenleri:

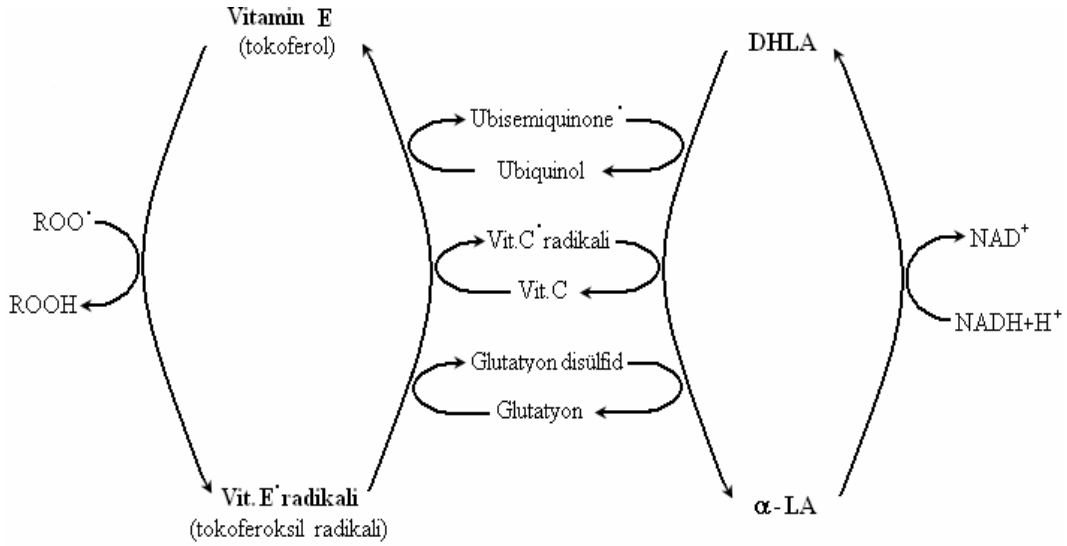
1. Hızla absorbe edilmesi: Diyet ya da dışarıdan alınan ALA hızlı bir şekilde absorbe edilir. Birçok dokuya dağılır ve kan-beyin bariyerini de geçer (86,95).

2. Redükte ve okside formlarının antioksidan etkiye sahip olması: ALA hücre içerisinde DHLA'ya indirgenir ve antioksidan yeteneklerine büyük ölçüde indirgenmiş formunun katkıda bulunduğu ileri sürülmektedir(93). Çoğu antioksidan bileşik sadece indirgenmiş formda buldukları zaman antioksidan olarak rol oynamasına rağmen (örn: redükte glutatyon), ALA'nın hem okside hem de redükte formu kuvvetli antioksidanlar olarak rol oynarlar(86). DHLA' nın tiyol grupları için yüksek pKa'sı (10.7) bu molekülün, pKa'sı 9.45 olan GSH' dan bile daha kuvvetli bir nükleofil olduğunu göstermektedir(93).

3. Hem sıvı, hem de lipid fazda çözünmesi: ALA, amfililik özellik gösterip hem sıvı hem de lipid fazda çözünebilmektedir. Bu özelliği oldukça önemlidir. Çünkü suda çözünen antioksidan bileşikler (örn: Vit C) hücre içinde, yağda çözünen antioksidanlar (örn: Vit E) ise hücre membranında bulunurken; ALA ve DHLA hem hücre içinde hem de membran düzeyinde etki göstererek çift koruma sağlamaktadır(86,93,96,97).

4. Glutatyon düzeylerini arttırması: ALA, hücrelerde başlıca antioksidan olan glutatyon üretimini stimüle etmektedir.

5. Diğer antioksidanlarla etkileşimi: ALA; Vitamin C, Vitamin E, glutatyon ve koenzim Q'yu da kapsayan çeşitli antioksidanları aktif durumlarına dönüştürüp yeniden oluşturma yeteneğine sahiptir(88,89) (Şekil 2.18).



Şekil 2.18. Lipoik asidin diğer antioksidanlarla etkileşimi.

6. Serbest metal iyonlarıyla şelat yapması: ALA; geçiş metal iyonlarıyla şelat yapma yeteneğine sahiptir. Arsenik, kadmiyum, kurşun, cıva gibi toksik metallerle çözünmeyen kompleksler oluşturduğu ortaya konulmuştur. ALA ve DHLA'nın şelasyon yaptığı geçiş metalleri: Pb^{+2} , Cu^{+2} , Zn^{+2} , Mn^{+2} , Cd^{+2} , Co^{+2} , Hg^{+2} , Fe^{+3}/Fe^{+2} , Ni^{+2} (90-93).

7. Serbest radikalleri nötralize etmesi: ALA ve DHLA; OH^- , $^-\text{O}_2$, LOO^- , NO^- ve $HOCl$ 'yi içeren çeşitli radikallere karşı antioksidan olarak rol oynarlar. Ayrıca $^-\text{O}_2$ ve H_2O_2 ile de etkileşime girdikleri bilinmektedir(89,93). DHLA mükemmel bir indirgeyici ajandır ve serbest radikale bağlı patolojilere karşı insanlardaki antioksidan defansları artırıcı potansiyele sahiptir(97).

8. Normal gen ekspresyonunu artırması.

9. Birçok hastalıkta terapötik olarak kullanılabilme potansiyeline sahip olması: ALA'nın; klinik olarak mantar zehirlenmesi ve metal toksisitesinin tedavisinde kullanılmanın yanı sıra; yukarıda bahsedilen önemli etkileri ile iskemi-reperfüzyon hasarı, diyabet, katarakt oluşumu, HIV aktivasyonu, nörodejenerasyon ve radyasyon hasarı gibi çeşitli oksidatif stres modellerinde yararlı olduğu ortaya konulmuştur(86).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Araştırmamızda 5–6 aylık ve 200 - 250 gr ağırlığında, toplam 30 adet dişi Sprague-Dawley türü sıçan kullanıldı. Sıçanlar Eskişehir Osmangazi Üniversitesi (ESOGÜ) Tıbbi Cerrahi Araştırma Merkezi (TICAM) tarafından sağlandı. Hayvanlara yapılacak uygulamalar için ESOĞÜ Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan 23.06.2010 tarihli, 27 sayılı ve 165 karar numaralı kurul onayı alındı.

Sıçanlar deney süresince 12 saat aydınlık/karanlık ışıklandırması olan, ısı 24±2°C ve nemi %55±5 olarak ayarlanmış ortamda yaşatıldı. Hayvanlar deneye başlamadan 1 hafta önce polikarbon şeffaf kafeslere konularak ortam koşullarına adaptasyonları sağlandı. Yiyecek ve su ihtiyaçları sınırsız ve günlük olarak sağlandı. Her grupta 10 sıçan olacak şekilde kontrol, sham ve tedavi deney grubu oluşturuldu.

3.1. Kimyasal Maddeler ve Uygulamaları

Gruplara Alfa Lipoik Asit (ALA) ve Serum Fizyolojik (SF) içinde çözdürülerek 1 ay boyunca intraperitoneal (i.p.) olarak verildi. Her bir hayvan için ayrı enjektörler kullanıldı ve enjeksiyonlar her gün aynı saatte (10 -12 arasında) yapıldı.

3.2. Deney Grupları

Araştırmamızda sıçanlar rastgele seçilerek her grupta 10'ar hayvan bulunacak şekilde toplam 3 grup oluşturuldu;

Grup 1: Kontrol grubu (n=10).

Grup 2: Sham grubu (ülseratif kolit oluşturuldu). Bu gruptaki hayvanlara sadece SF 0,02 ml i.p. olarak verildi (n=10).

Grup 3: Ülseratif kolit + Alfa Lipoik Asid (ALA) tedavi grubu (n=10). Bu gruptaki hayvanlara 100mg/kg ALA (T5625-5G, Sigma Chemical Co. St. Louis, MO, USA) SF içinde çözdürülerek 0,02 ml i.p. olarak verildi(153).

3.3. Deney Protokolü

Sıçanlar 12 saatlik açlığı takiben Ketamine HCL (*Ketalar 500mg enjektör flakon, Pfizer*) 75mg/kg. intraperitoneal ve Xylazine (*Rompun, Bayer*) 15mg/kg. intraperitoneal enjeksiyon ile anestezi protokolü uygulanarak genel anestezi sağlandı. Ratlar anestezi sonrası supin pozisyonunda operasyon masasına alınarak cerrahi kesi

yapılacak alan traş edildikten sonra povidon iyod ile temizlendi, median laparotomi uygulandı.

Grup 1: Kontrol Grubu

Bu gruptaki sıçanlara, herhangi bir uygulama yapılmadan 4 haftalık süre sonunda, suprapubik insizyonla batın açılarak kolona ulaşıldıktan sonra rektum mümkün olan en distal kısmından kesilip çıkarıldı. Daha sonra buradan proksimale kadar olan yaklaşık 10 cm'lik kolon segmenti total olarak çıkartıldı.

Grup 2: Sham Grubu

Sham grubunda ise öncelikle anüsten transrektal olarak kolona 1,2 mm çapında kateter yaklaşık 8 cm ileriye uzatılacak şekilde yerleştirildi. Hayvanlar bu işlem sırasında Trendelenburg pozisyonuna getirilerek % 4'lük asetik asit çözeltisinden 1 cc. yavaş bir şekilde transrektal olarak uygulandı. Asitin dışarı kaçmaması için ratlar başaşağı pozisyonda 30 sn kadar süreyle tutulup verilen asetik asit çözeltisinin kalan kısmı aynı kateterle aspire edildi. Ratların transrektal asetik asit uygulamasından sonraki dönemde normal yemlerini yemelerine izin verildi. 4 haftalık sürenin sonunda ratların karınları pubisten göbek hizasına kadar açılarak rektum mümkün olan en distal kısmından kesilip proksimale kadar olan yaklaşık 10 cm'lik kolon segmenti total olarak çıkartıldı. Çıkarılma sırasında kolon içerisindeki feçes temizlenip, kolon segmenti serum fizyolojikle yıkandı.

Grup 3: Alfa Lipoik Asid + Ülseratif Kolit oluşturulan Grup

Bu gruptaki ratlara da yine sham grubundaki gibi % 4'lük asetik asit çözeltisiyle ülseratif kolit oluşturulduktan sonra 4 hafta boyunca günlük alfa lipoik asid (100mg/kg, i.p) uygulandı. Alfa lipoik asit tedavisinden sonra ratların karınları pubisten göbek hizasına kadar açılarak rektum mümkün olan en distal kısmından kesilip çıkarıldı. Daha sonra buradan proksimale kadar olan yaklaşık 10 cm'lik kolon segmenti total olarak çıkartıldı.

Deney sonunda ratlardan 20 ml kan alınarak hayatlarına son verildi. Daha sonra kolon iki eşit parçaya kesildi. 1/2 kısmında histolojik olarak, apoptozisdeki değişimi ortaya koymak için alındı. Bu aşamada alınan örnekler Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalındaki öğretim elemanı tarafından direk mikroskopi, immün boyama ve TUNEL gibi yöntemler kullanılarak değerlendirildi. Fizyoloji

Anabilim Dalı tarafından kolon dokusunun kalan 1/2 kısmında iNOS gen ekspresyonu Real-Time PCR ile değerlendirildi. Tüm sonuçlar daha sonra Biyoistatistik Anabilim Dalı tarafından istatistiksel olarak değerlendirildi.

3.4. Histolojik İnceleme

Kolon içeriği temizlenip SF ile yıkandıktan sonra bir kısım doku formaldehit fiksatifine alındı. İşlemler organların otoliz olmaması için hızlı bir şekilde yapıldı. Fiksasyon işleminden sonra alınan dokulara uygun takip işlemi yapılarak parafin blokları hazırlandı.

3.4.1. Kolon İçin Uygulanan Doku Takibi

Tüm spesmenler nötral formalinde fikse edildi. Artan alkol serilerinden geçirilerek dehidrate edildikten sonra ksilol ile seffaflaştırma yapıldı ve parafine gömüldü. Parafin bloklardan her biri 4 µm kalınlığındaki seri kesitler alındı. Kesitlerde genel yapı özelliklerini belirlemek ve inflamatuvar reaksiyonun derecesini belirlemek için spesmenlerin bir kısmında hematoksilin ve eozin (H&E) boyası uygulanırken; diğerlerinde p53, NF-kB ekspresyonları için klasik immunohistokimyasal boyama ve apoptozis tespiti için TUNNEL bazlı kit ile immunohistokimyasal boyama yapıldı.

p53 ve NFkB ekspresyonları yanında inflamasyon kriterleri olan inflamatuvar hücre göçü, ödem ve vasküler yapıda değişiklikler semikantitatif olarak her grup için ayrı ayrı değerlendirildi. Hafif değerler (+), orta değerler (++) ve yoğun değerler (+++) olarak değerlendirildi. Apoptosis değerlendirmesinde ise her gruptan alınan ve boyanan preparatlar tek histolog tarafından ışık mikroskopunda (Nikon E600, Japan) incelendi. Her preparatda mevcut olan apoptotik hücreler x20 objektif büyütmede birbirinden farklı 10 alanda sayıldı ve elde edilen değerler istatistiksel olarak değerlendirildi. Hücre sayımı için UTHSCSA Image Tool for Windows 3.0 programı kullanıldı.

3.4.2. Hematoksilin-Eozin Boyama Yöntemi

Rutin Hematoksilin-Eozin boyama yöntemi ile kesitler boyandı.

3.4.3. İmmünohistokimyal Değerlendirme

p53 ve NF- κ B değerlendirmesi:

p53 ve NF- κ B ifadesinin tespiti için immünohistokimyasal değerlendirme uygulandı. Spesmenler önce deparafinize edilip hidrate edildikten sonra antijen yapısını tekrar ortaya koyabilmek için mikrodalga fırında 10mM sitrat tampon uygulandı. Ardından endojen peroksidaz %10'luk H₂O₂ ile inaktive edildi. Daha sonra primer antikolar ekildi. NF- κ B için, AEC p53 için DAB ve sekonder antikor olarak HRPS kullanıldı. (Mayers Hematoxyline Sigma, St Louis, MO'dan diğer tüm kimyasallar Labvision Corp., Fremont, CA'dan temin edildi.)

TUNEL Boyama Yöntemi

Kullanılan kit: ApopTag Plus Peroxidase In Situ Apoptosis Detection Kit S7101- Chemicon International. USA & Canada.

- a. Kesitler önce 3 kez değiştirilen ksilollerde 15'er dk. bekletildiler ve deparafinize edildiler. Daha sonra sırasıyla;
- b. 2 kez % 100 alkolde 5'er dk. tutuldular.
- c. %95'lik alkolde 3 dk. tutuldular.
- d. %70'lik alkolde 3 dk. tutuldular.
- e. PBS solüsyonunda 5 dk. yıkandılar.
- f. Proteinaz K solüsyonunda oda ısısında 15 dk. tutuldular.
- g. 2 kez değiştirilmiş distile suda 2'şer dk. yıkandılar.
- h. %3'lük Hidrojen Peroksidaz içerisinde oda ısısında 5 dk. tutuldular.
- i. PBS içerisinde 5–10 dk. çalkalandılar.
- j. Equilibration Buffer içinde oda ısısında 5 dk. inkübe edildiler.
- k. Kesitlere TdT enzimi uygulanarak etüvde 37 derecede nemli ortamda 1 saat tutuldular.
- l. 3 kez değiştirilmiş PBS solüsyonunda 1'er dk. olmak üzere bekletildiler.
- m. Oda ısısındaki kesitlere anti-digoxigenin peroksidaz damlatılarak üzerleri plastik coverslip ile kaplandı ve oda ısısında nemli ortamda 30 dk. bekletildiler.
- n. 4 kez değiştirilen PBS solüsyonunda oda ısısında 2'şer dk. yıkandılar.
- o. Kesitler üzerine DAB solüsyonu damlatılarak 10 dakika bekletildiler.

p. Kesitler 3 kez değiştirilmiş distile suda 1'er dk. yıkandı ve son distile suda 5 dk. tutuldular.

q. Metil Green'de 10 dk. boyandılar.

r. 3 kez değiştirilmiş distile suda 30'ar saniye çalkalandılar.

s. Kesitler 3 kez değiştirilmiş %100 lük butanolden hızlı bir şekilde çalkalanarak geçirildiler.

t. Xylol I'de 2 dk. , Xylol II'de 2 dk. ve Xylol III'de - 5 dk. bekletildiler.

u. Kesitler en son olarak üzerlerine kapatma mediumu damlatılarak kapatıldılar.

Apoptotik İndeks (AI)=Apoptotik Hücre Sayısı/50

Daha sonra elde edilen bulgular, istatistiksel olarak karşılaştırıldı.

3.5. Fizyolojik İnceleme

3.5.1. Real Time-PCR (RT-PCR) Tekniği İle iNOS Tayini

Deney süresi sona erdiğinde her bir gruba ait sıçanlara servikal dislokasyon uygulandıktan sonra laparotomi kesisi açılarak kolon dokusu hızlı bir şekilde çıkarıldı. Real-Time PCR çalışmaları için dokular RNA later stabilizasyon solüsyonu (Qiagen, Manheim, Germany) içinde muhafaza edildi.

3.5.2. RNA İzolasyonu

Total RNA izolasyonu için RNA Easy mini kit 50 ve cDNA sentezi için QuantiTect Reverse Transcription cDNA kiti (Qiagen, Manheim, Germany) kullanılmıştır

1. Kolon dokusu eppendorf tüp içerisine alındı ve tüm dokuyu kaplayacak şekilde RNA Later stabilizasyon solüsyonu ilave edildi. Doku içerisine nüfuz etmesini sağlamak amacı ile 24 saat oda ısısında bekletildikten sonra çalışılacağı güne kadar -20°C'de muhafaza edildi.

2. Dokular RNA later stabilizasyon solüsyonu içerisinden çıkartılarak 600 µl Buffer RLT+6 µl β- mercaptoethanol (β-ME) çözeltisi ile birlikte içerisinde 1 adet steril çelik bilye bulunan plastik tüplere konuldu ve homojenizasyon cihazı (Tissue Lyser; Qiagen, Manheim, Germany) ile 2 dakika 30 Hz olacak şekilde homojenize edildi.

3. Homojenizasyon işleminden sonra süpernatant yeni bir eppendorf tüp içerisine alındı ve 3 dakika 13.000 rpm devirde santrifüj edildi.

4. Santrifüjden sonra süpernatant yeni bir eppendorf tüpe alındı ve üzerine 600 µl %70'lik etanol eklendi. Daha sonra pipetle dikkatli bir şekilde karıştırıldı.

5. Eppendorf tüpü içerisindeki süpernatantın 700 µl'si kolonlara (RNeasy mini spin colon 2 ml) yüklendi. Daha sonra 20 saniye 8.000 g de santrifüj edildi ve alttaki toplama tüpünde kalan süzüntü döküldü. Süpernatantın geri kalanı tekrar kolonlara yüklendi ve yeniden 20 saniye 8.000 g devirde santrifüj edildi.

6. Santrifüj sonrası alttaki toplama tüpü değiştirildi kolonlara (RNeasy mini spin colon) 700 µl Buffer RW1 eklendi. Böylece kolon istenmeyen parçalardan temizlenmiş oldu. Sonra 20 saniye 8.000 g devirde santrifüj edildi.

7. Altteki toplama tüpü döküldü ve kolon üzerine 500 µl Buffer RPE eklenip 20 saniye 8.000 g devirde santrifüj edildi.

8. Aynı işlem tekrarlanarak 2 dakika 8.000 g devirde santrifüj edildi.

9. Altteki toplama tüpü döküldü ve kuruması için 1 dakika en yüksek hızda santrifüj edildi.

10. Altteki toplama tüpü atıldı ve kolon yeni temiz eppendorf tüpü içerisine yerleştirildikten sonra üzerine 40µl RNase Free Water tam orta kısma gelecek şekilde dikkatlice eklendi ve 1 dakika 8.000 g devirde santrifüj edildi.

11. Eppendorf tüpü içerisinde elde edilen RNA -80°C de saklandı.

3.5.3.RNA Konsantrasyonunun Hesaplanması

RNA'nın miktarı ve saflığını belirlemek amacıyla 1 µl RNA nanometrede(Thermo Scientific, Nanodrop 1000, USA) 260 nm dalga boyunda optik dansite ölçülerek hesaplandı.

3.5.4.cDNA Sentezi

Önce genomik DNA (gDNA) uzaklaştırmak için tablo 3.1'de gösterildiği gibi toplam hacim 14 µl olacak şekilde reaksiyon hazırlandı ve Thermal Cycler PCR'da (Qiagen, Manheim, Germany) 42 °C da 2 dk olacak şekilde programlanıp gDNA uzaklaştırıldı.

Tablo 3.1. gDNA uzaklaştırmak için reaksiyon hazırlanması.

<i>Karışım</i>	<i>Miktar(µl)</i>
gDNA wipeout	2
Örnek RNA'sı	X
RNAase free water	12- X
Toplam	14

gDNA'sı uzaklaştırılmış örneklerle, tablo 3.2'de gösterilen oranlarda hazırlanan karışımdan 6 µl eklenerek Thermal Cycler PCR'da 42 °C da 15 dk ve 4 °C da 10 dk olacak şekilde programlanıp cDNA oluşturuldu.

Tablo 3.2. cDNA sentezi için kullanılan karışım içeriği.

<i>Karışım</i>	<i>Miktar(µl)</i>
Quantiscrypt Reverse Transcriptase	1
Quantiscrypt RT Buffer 5X	4
RT primer mix	1

Thermal cycler koşulları;

42 °C da 15 dk
4° C'de 10 dk

3.6.Real-Time PCR (RT- PCR)

iNOS (hedef gen) ve GAPDH (referans gen) mRNA düzeyleri, Dual Label (Taqman prob) kullanılarak Real Time PCR Rotor Gene 6000 (Qiagen, Manheim, Germany) ile ölçüldü. RT-PCR için tablo 3.3'deki karışım hazırlanıp reaksiyon gerçekleştirildi.

Tablo 3.3. RT PCR için miks içeriği.

<i>Karışım</i>	<i>Miktar (μl)</i>
Reconstituted primer /probe miks (iNOS veya GAPDH)	1
2X qPCR Mastermiks	10
PCR-Grade water	4
cDNA	5
Toplam	20

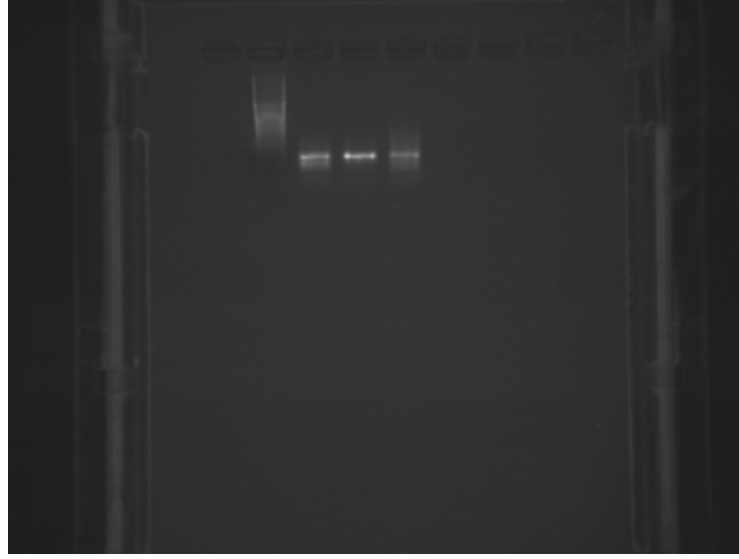
Toplam 20 μ l RT-PCR reaksiyonu aşağıdaki koşullarda gerçekleştirildi:

95° C'de	10 dk	
95° C'de	20 sn	} 50 döngü
55° C'de	30 sn	
72° C'de	20 sn	

Çalışmanın sonuçları Rotor-Gene 6000 Series Software 1.7 kullanılarak analiz edildi.

3.7.RT- PCR Ürünlerinin Jel Elektrofrez İle İncelenmesi

Real-Time PCR reaksiyonu sonrası amplifikasyon ürünlerinin sadece hedef gene (iNOS) özgü olup olmadığını tespit etmek amacıyla % 1.5 agaroz jel (1×TBE içerisinde) hazırlanarak (5 μ l Ethidium Bromide eklendi) jelde yürütüldü. 10 μ l üründen alınıp, üzerine 2 μ l yükleme boyasından konarak karıştırıldı ve jeldeki kuyucuklara yüklendi ve 100 volta yürütüldü. Elektrofrez tamamlandıktan sonra jel görüntüleme ve dökümantasyon sistemi ile incelenerek görüntüsü alındı.



Şekil 3.1. Her gruptan bir örnek olmak üzere seçilmiş PCR ürünlerinin jel görüntüsü. Sırasıyla 1. kuyucuk marker , kontrol, sham, tedavi gruplarından rastgele alınan birer örneğe ait bantlar görülmektedir.

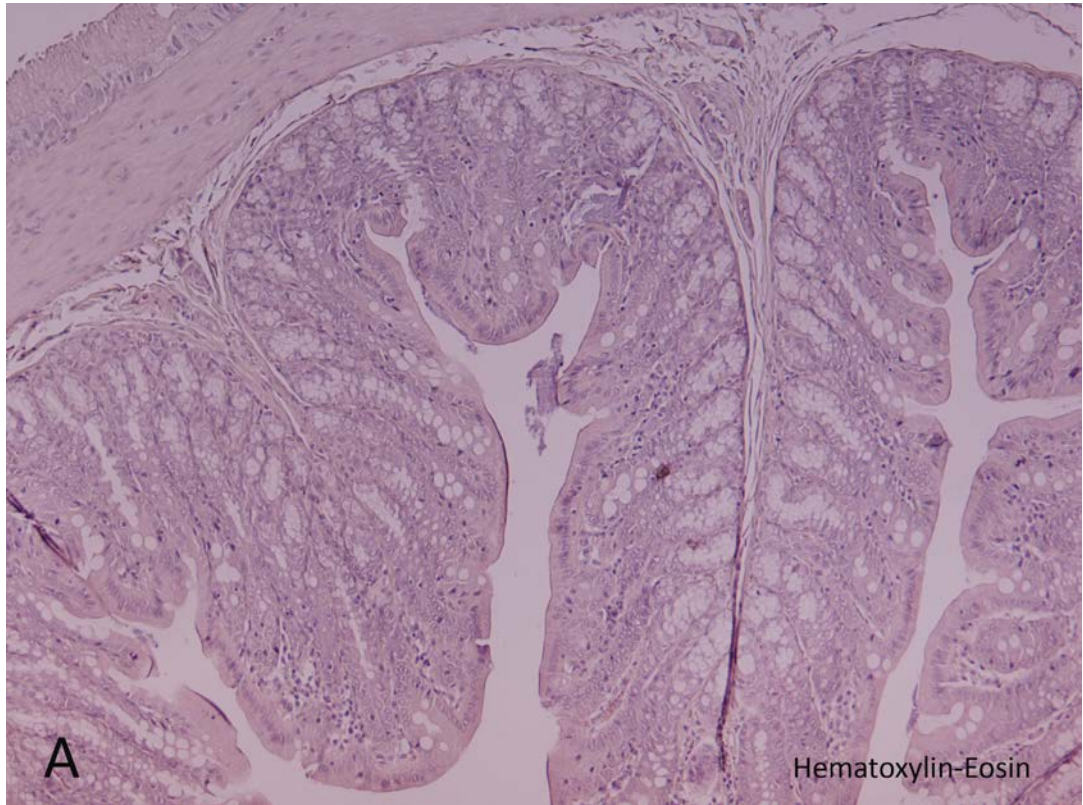
3.8. İstatiksel İnceleme

Çalışmamızdaki tüm veri analizleri için SPSS 15.0 ve SigmaStat 3.1 paket programları kullanıldı. Sürekli nicel veriler; n, ortalama ve standart sapma olarak, nitel veriler ise n ve oran olarak ifade edildi. Bağımsız ölçümlerden oluşan ve normal dağılım gösteren sürekli veriler, grup sayısına bağlı olarak, One Way Anova. Bağımsız ölçümlerden oluşan ve normal dağılım göstermeyen değişkenlere ise grup sayılarına bağlı olarak Kruskal-Wallis testi ile analiz edildi, ayrıca değişkenler arasındaki ilişkiyi belirlemek amacı ile Correlations analizinden yararlandı. $P < 0.05$ olasılık değerleri önemli olarak kabul edildi.

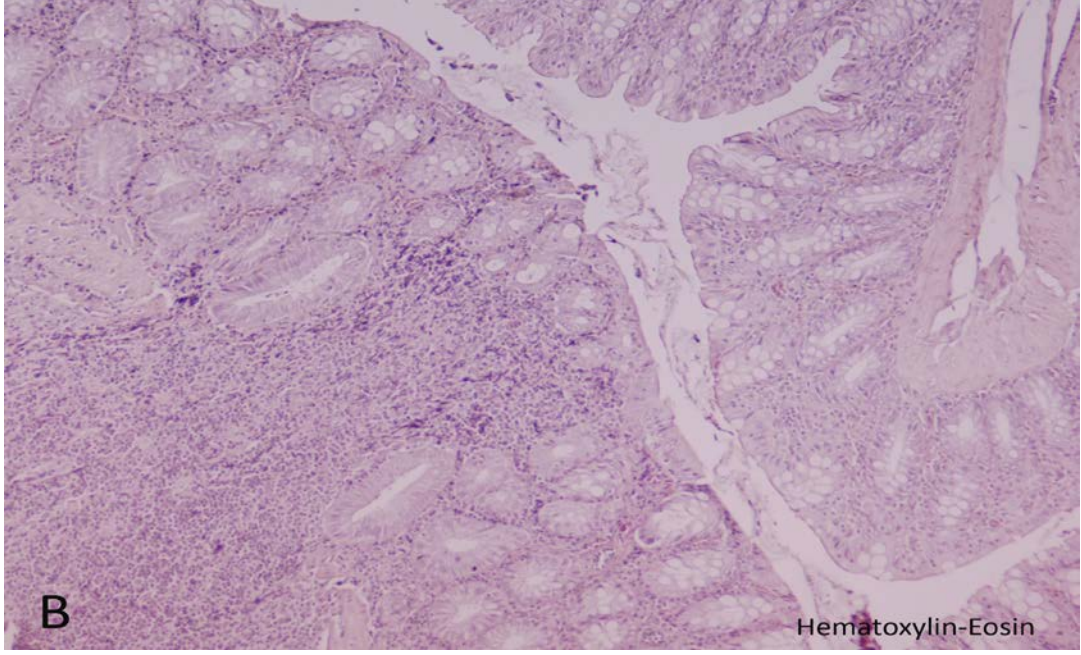
4. BULGULAR

4.1. Histolojik Bulgular

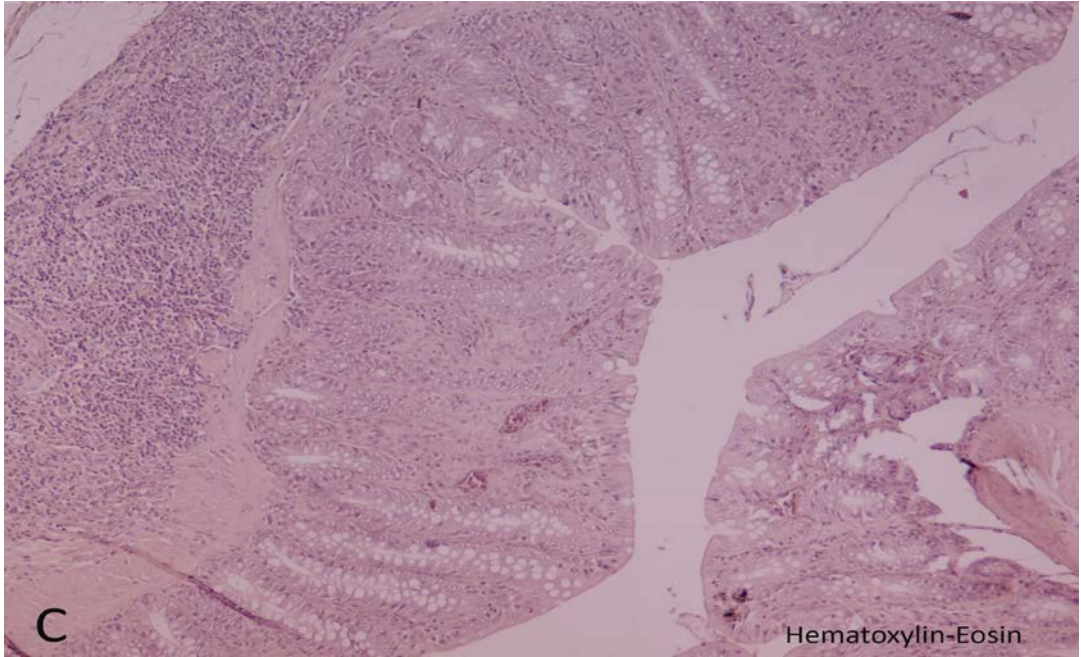
Kontrol grubuna ait kolon kesitlerinde lümeden itibaren tunika mukozayı oluşturan tek sıralı silindirik epitel ve altında gevşek bağ doku tabakası olan lamina proprianın yer aldığı gözlemlendi. Hematoxylen Eosin ile boyanmış kesitlerde mukoza ve submukozada normal olarak değerlendirilen önemsenmeyecek kadar az inflamatuvar hücre grupları gözlemlendi (Şekil4.1A). ÜK oluşturulan sham grubunda ise özellikle lamina propriada olmak üzere mukoza ve submukozada aşırı derecede inflamatuvar hücre göçü gözlemlendi (Şekil4.1B). Fakat tedavi grubunda özellikle lamina propriada olmak üzere mukoza ve submukozadaki inflamatuvar reaksiyonda azalma olduğu tespit edildi (Şekil4.1C). Öte yandan ödem ve vaskülarizasyon değerlendirmesinde gruplar arası anlamlı bir fark yoktu.



Şekil 4.1A. Kontrol grubuna ait Hematoxylen Eosin ile boyanmış kesit.

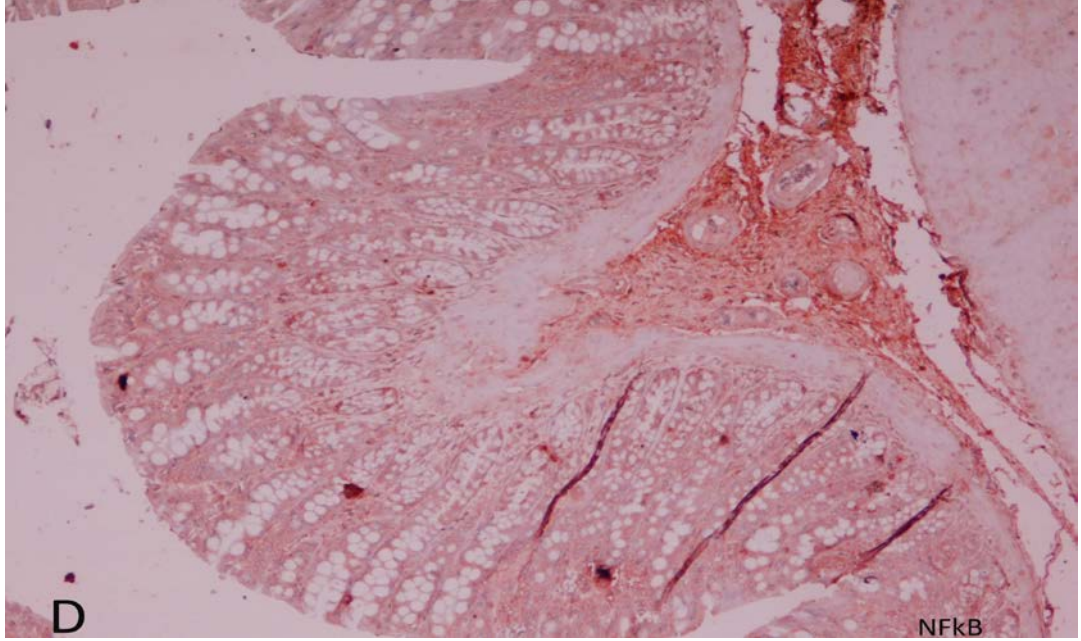


Şekil 4.1B. Sham grubuna ait Hematoxylen Eosin ile boyanmış kesit.

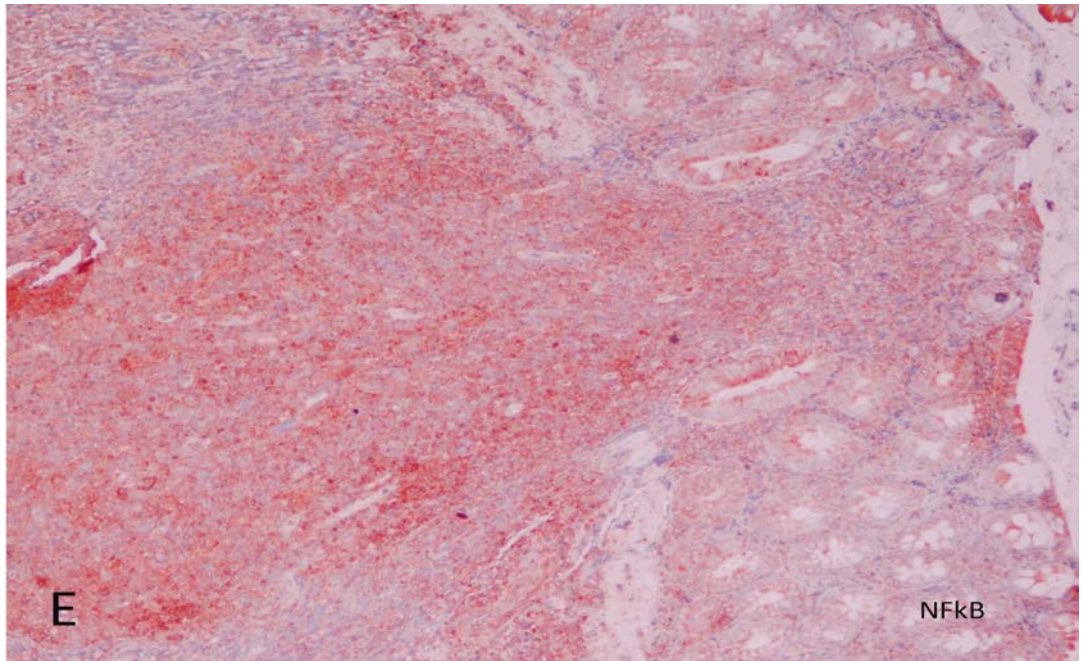


Şekil 4.1C. Tedavi grubuna ait Hematoxylen Eosin ile boyanmış kesit.

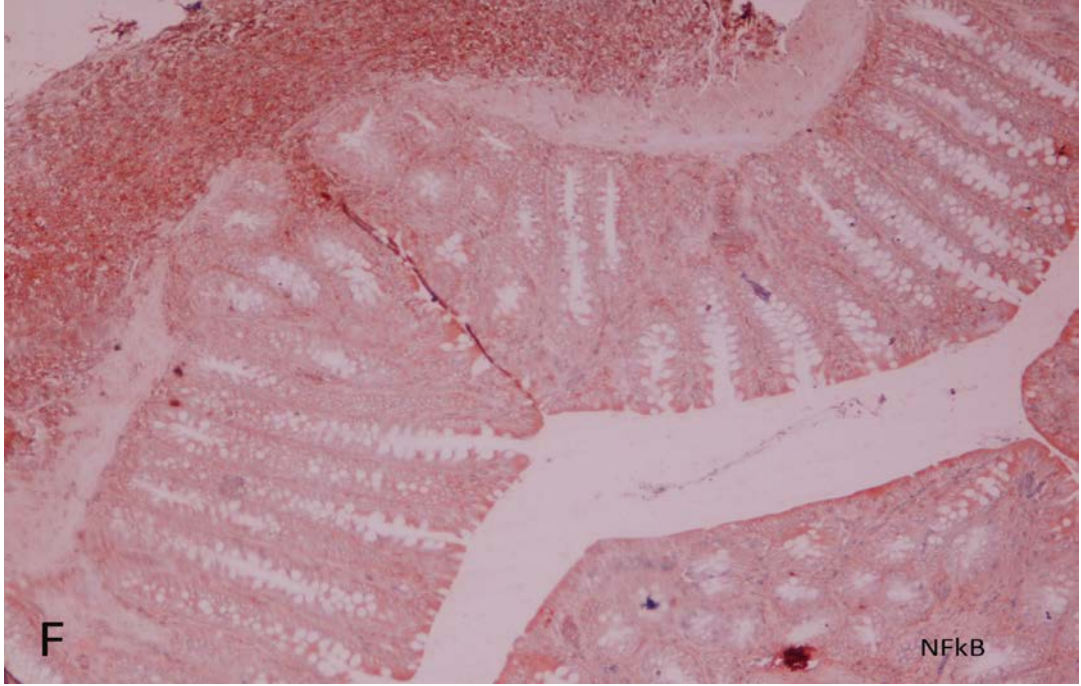
Tüm grublarda NF-kB ifadesinin gözlemlediğimiz halde kontrol grubuna (Şekil4.1D) kıyasla sham grubunda (Şekil4.1E) oldukça açık bir şekilde bu ifadenin artığını gözlemledik. Diğer yandan tedavi grubunda (Şekil4.1F) belli belirsiz bir azalma olduğunu gözlemledik.



Şekil 4.1D. Kontrol grubunda NF-Kb ifadesi.

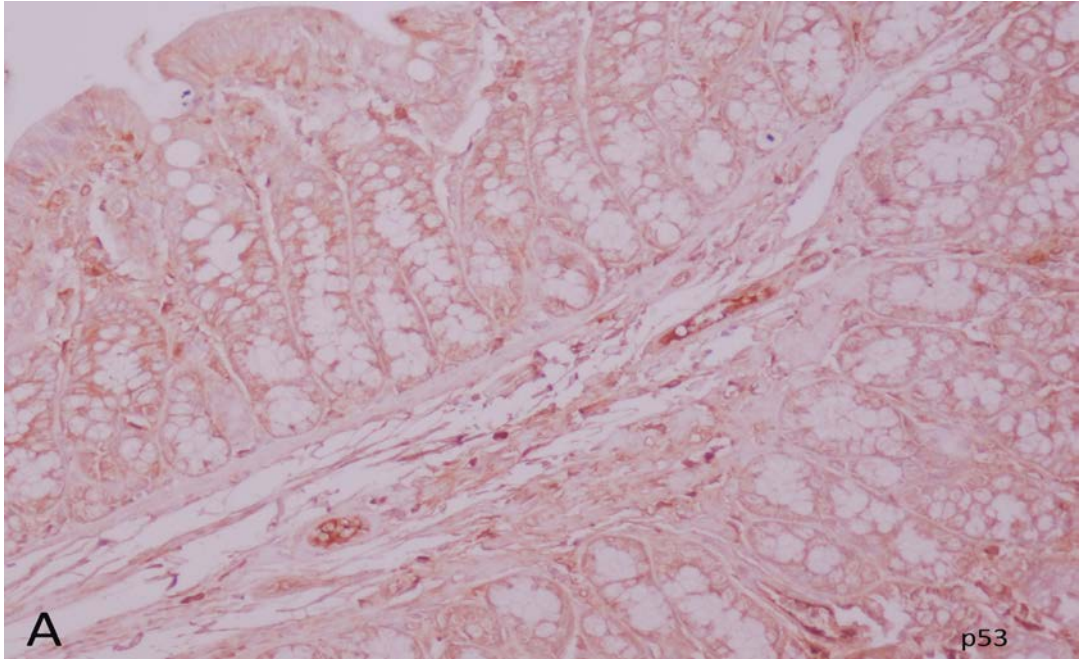


Şekil 4.1E. Sham grubunda NF-kB ifadesi.

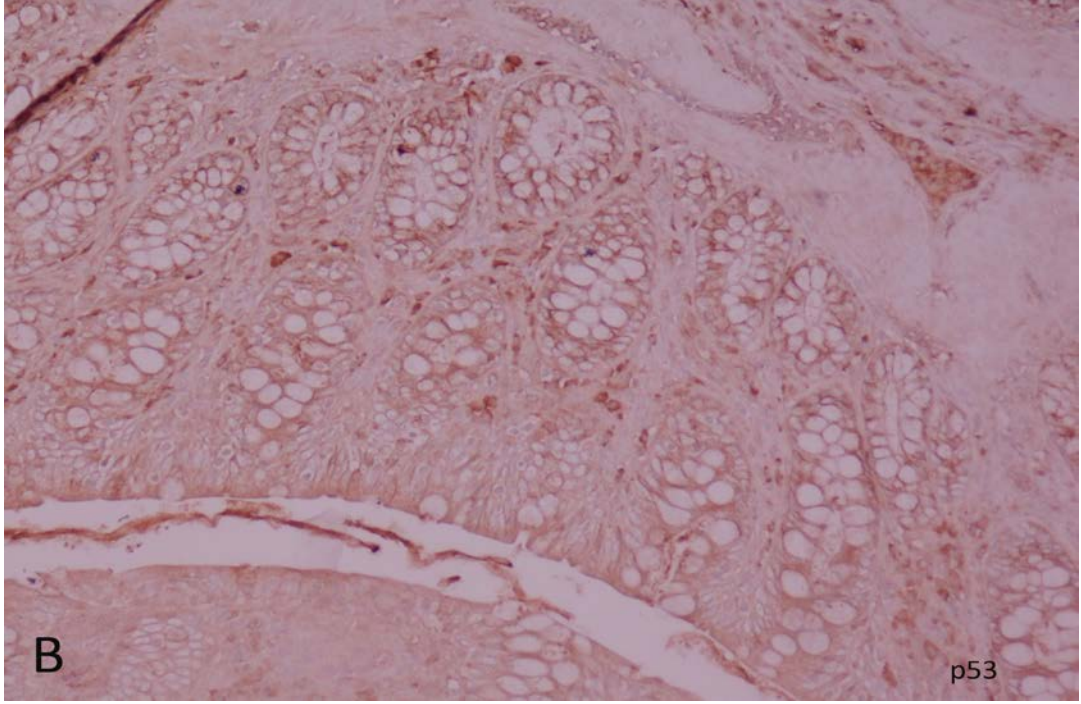


Şekil 4.1F. Tedavi grubunda NF-kB ifadesi.

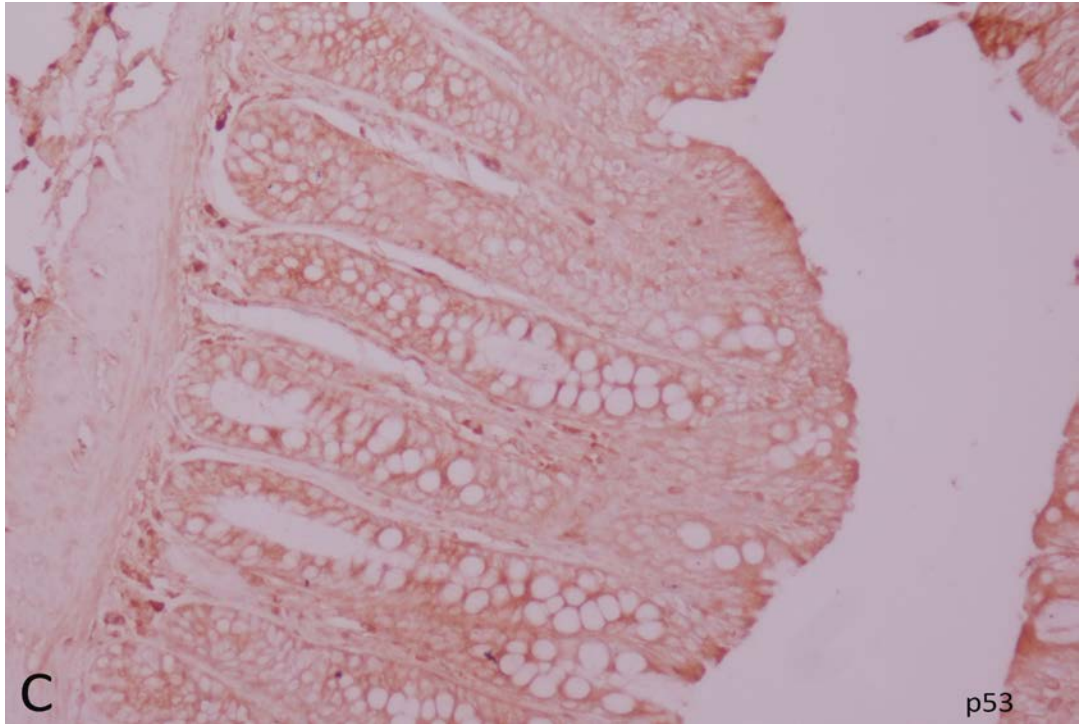
Kontrol grubunda p53 ifadesinde çok az olarak saptadık (Şekil4.2A). Oysa ki sham grubunda p53 ifadesinin açıkça arttığını gözlemledik (Şekil4.2B). Tedavi grubunda ise bu artışta azalma tespit ettik (Şekil4.2C).



Şekil 4.2A. Kontrol grubunda p53 ifadesi.

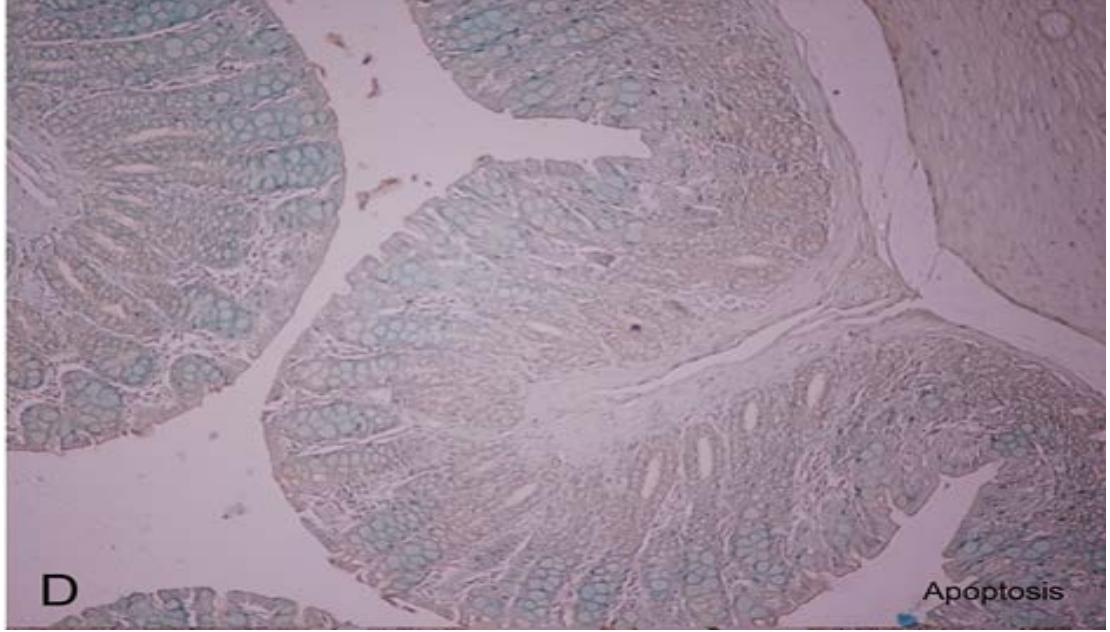


Şekil 4.2B. sham grubunda p53 ifadesi.

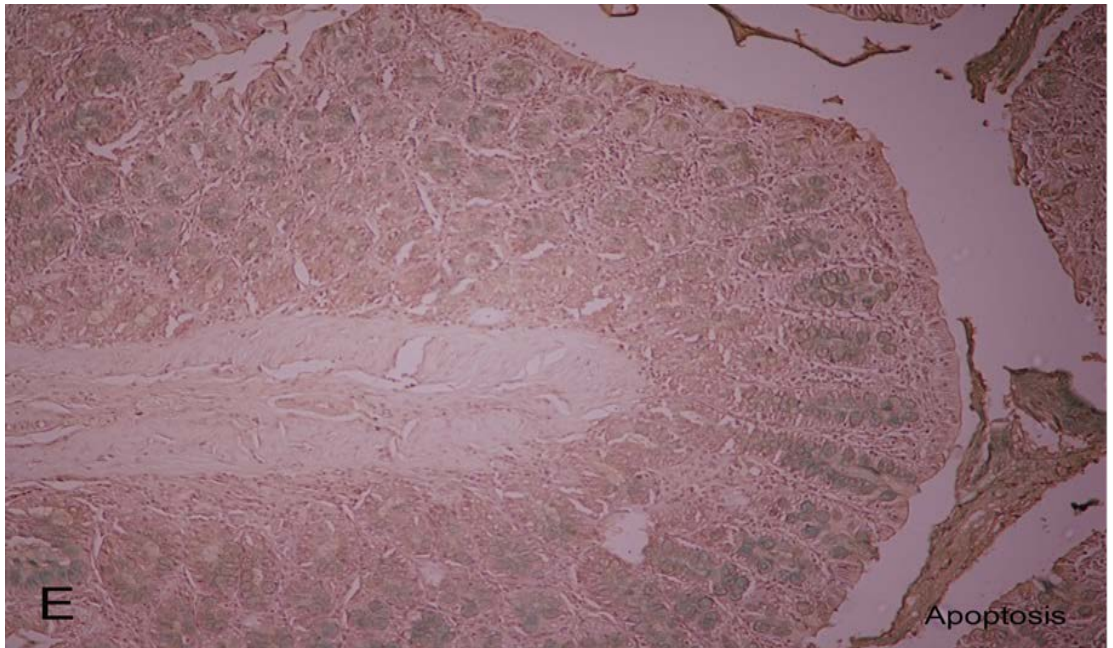


Şekil 4.2C. Tedavi grubunda p53 ifadesi.

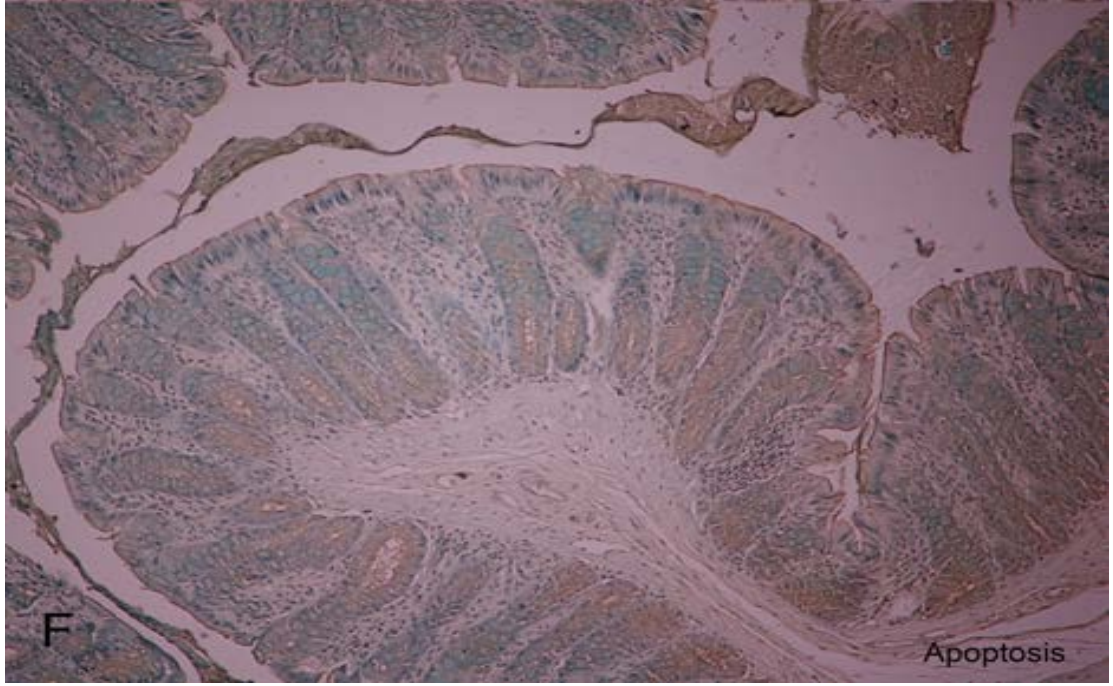
Apoptosis değerlendirmesinde benzer sonuçlar elde edildi. Kontrol grubunda epitelde oldukça az sayıda apoptotik hücreler var olmasına karşın (şekil4.2D), sham grubunda sayıları oldukça artmıştı (şekil4.2E). Bununla birlikte tedavi grubunda yine apoptotik hücre sayısının belirgin derecede azaldığı gözlendi (şekil4.2F).



şekil 4.2D. Kontrol grubunda Apoptosis ifadesi.



şekil 4.2E. Sham grubunda Apoptosis ifadesi.



Şekil 4.2F. Tedavi grubunda Apoptosis ifadesi.

Tüm bu bulgular bir tablo şeklinde aşağıda özetlenmiştir.

Tablo:4.1: Grupların histolojik değerlendirilmesi

	Kontrol Grubu	Sham Grubu	Tedavi Grubu
Inflamasyon Kriterleri			
Inflamasyon	+	+++	++
Ödem	-	-	-
Vaskülarisasyon	+	++	++
NFkB ifadesi	+	+++	++
P53 ifadesi	+	++	++
Apoptosis	+	+++	++

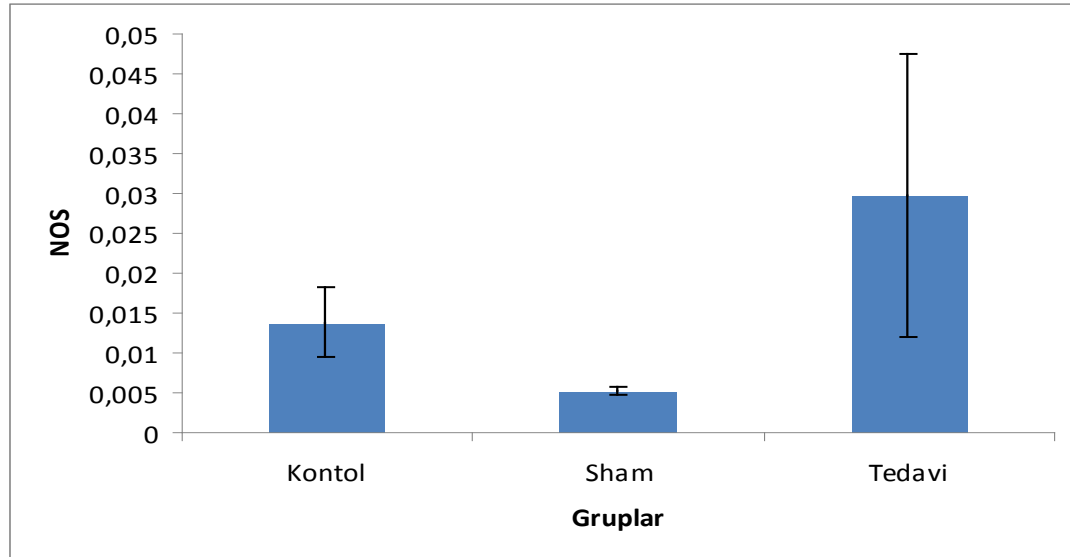
(+=hafif, +=orta, +=yoğun)

4.3. Fizyolojik Bulgular

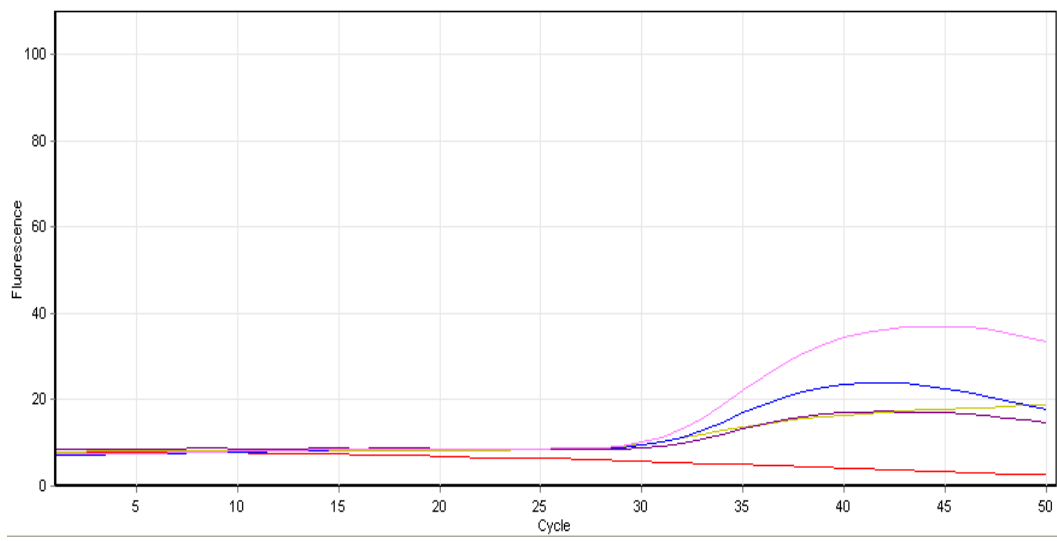
Çalışmamızdan elde ettiğimiz iNOS yüzde kat artışı sonuçları tek yönlü varyans analizi ve Tukey HSD çoklu karşılaştırma testi ile incelendi. Gruplar arası istatistiksel olarak anlamlı sonuç bulunamadı (Tablo 4.2 ve Şekil 4.3).

Tablo 4.2. Gruplara göre iNOS mRNA düzeyi kat artışı (%).

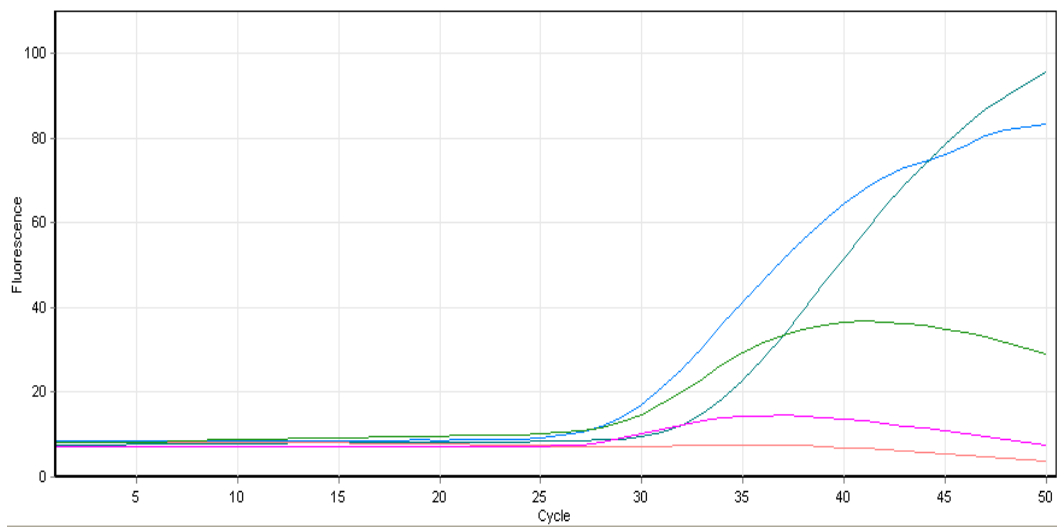
Gruplar	Ortalama \pm standart hata	İstatistik ve p
Kontrol	0.0138359 \pm 0,004421	F=1.392 p>0.05
Sham	0.0052882 \pm 0.000539	
Tedavi	0.0297665 \pm 0.017686	



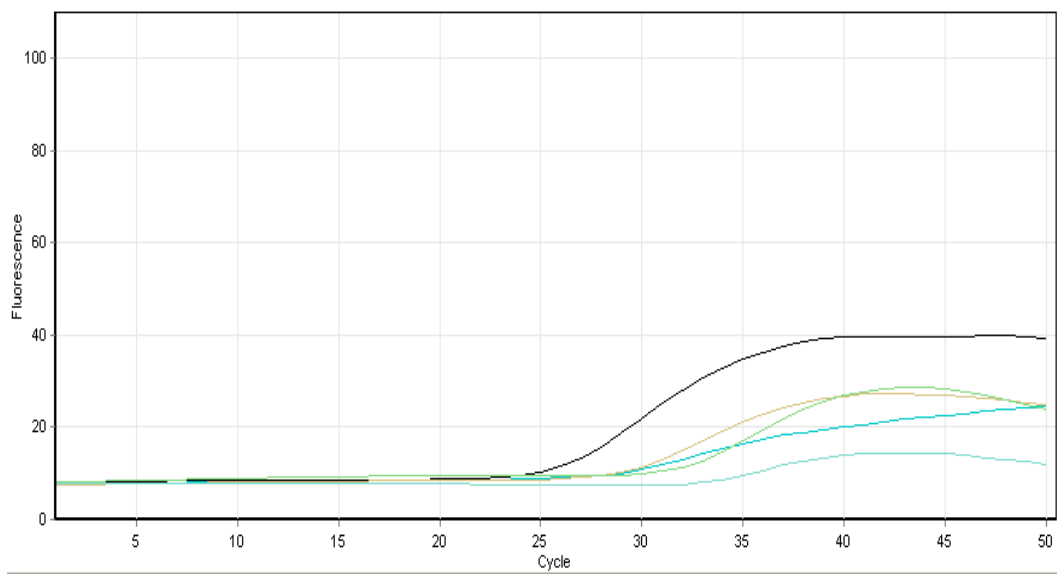
Şekil 4.3. Gruplara göre iNOS mRNA düzeyleri ve kat artışı ilişkisi.



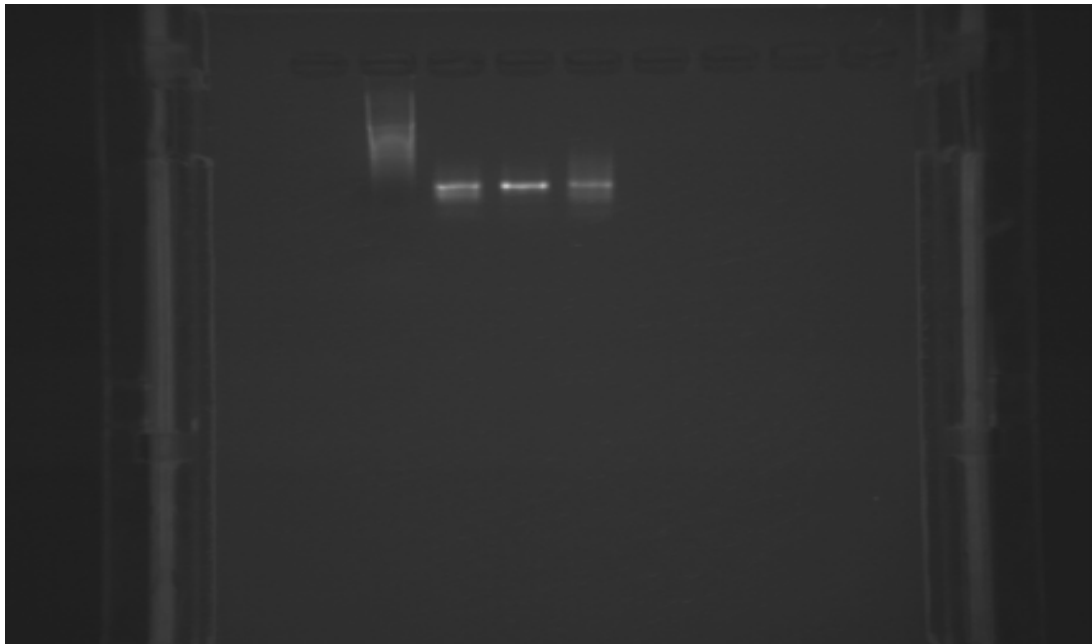
Şekil 4.4. Kontrol grubuna ait iNOS geni RT-PCR verileri.



Şekil 4.5. Sham grubuna ait iNOS geni RT-PCR verileri.



Şekil 4.6. ALA grubuna ait iNOS geni RT-PCR verileri.



Şekil 4.7. Her gruptan rastgele birer örnek olacak şekilde RT-PCR ürünlerinin jel görüntüsü. Sırasıyla 1. kuyucuk marker, kontrol, sham, ALA.

5. TARTIŞMA

Ülseratif kolit (ÜK); klinik olarak kanlı mukuslu ishale seyreden, lokal ve sistemik komplikasyonları bulunan, spontan iyileşme ve şiddetlenmeler gösteren, kolon ve rektum mukozasının ülserli nonspesifik inflamatuvar hastalığıdır(1). Hastalığın nedeni bugün hala kesin olarak bilinmemektedir. Genetik, çevresel ve konakçı immün cevabı gibi faktörlerin önemli rol oynadığı düşünülmektedir(1,2).

ÜK'in günümüzde görülme sıklığı artarken, cerrahi girişim dışında kalan tedaviler halen palyatif olarak devam etmektedir. Hafif vakalarda, diyetin düzenlenmesi, sulfosalazin, 5-aminosalisilik asit deriveleri ve steroid kullanılmaktadır. Bu tedaviye yanıt vermeyen vakalarda azotiopurin, siklosporin gibi önemli yan etkilere sahip immün supresif ajanlar kullanılmaktadır(1,2).

Literatür incelendiğinde, ÜK'nin tedavisine yönelik birçok çalışma yapılmıştır ve yapılmaktadır. Son dönem çalışmalar ÜK'de immünolojik hiperaktivasyona neden olan bir mukozal bağışıklık defekti üzerine odaklanmaktadır. Bu defekt çevresel ajanlara ve antijenlere karşı başlayan kontrol dışı immün reaksiyonlara neden olmaktadır(1,2). Ortaya çıkan kontrol dışı immün yanıt da lenfosit proliferasyonu, sitokinlerin salınımı, diğer hücre birikimleri, aşırı nötrofil üretimine neden olur ve sonuçta hücre hasarı gelişir. İmmün sistem aktivasyonu sonucu proinflamatuvar ve antiinflamatuvar sitokinler arasındaki denge bozulur ve IL-1,IL-2,IL-6,IL-8,IFN- γ ve TNF gibi proinflamatuvar sitokinlerde artma IL-4 gibi antiinflamatuvar sitokinlerde azalma meydana gelir(3,4,27). IL-1, TNF ve IFN- γ intestinal epitel hücresinden makrofajdan ve ortamdaki diğer hücrelerden NO salınmasını artırır ve ortamdaki serbest oksijen radikalleri artar(4,17,18). Günümüzde çalışmalar, serbest oksijen radikalleri üzerine yoğunlaşmıştır.

Deneyisel kolit oluşturma yöntemleri olarak çalışmalarda; iritanlar ya lüminal olarak (TNBS, asetik asit, oksazolun), ya içme suyuyla (dekstan sodyum sülfat) uygulanarak oluşturulmuştur. Biz de çalışmamızda ÜK oluşturmak için Oruç ve arkadaşları ile Hagar ve arkadaşlarının kullandıkları yöntemi kullandık(19,20). Ratlara yumuşak pediatrik sonda, rektal yolla 8cm ileriye ulaşacak şekilde yerleştirdik. Hayvanları bu işlem sırasında trendelenburg pozisyonuna getirdik. Asetik asit %4 çözeltisini (1 ml, pH:2,3) yavaş şekilde intrarektal kateterle rektuma uyguladık ve böylece deneysel kolit oluşturduk.

Obermeir ve arkadaşları deneysel olarak kolit oluşturdukları farelerin histolojik incelemelerinde; goblet hücrelerinde ve kriptlerde azalma olduğunu ve esas olarak nötrofilleri içeren lenfosit ve makrofajların bulunduğu yoğun bir inflamatuvar reaksiyonun olduğunu gözlemlemişlerdir. TNF ve IFN- γ antikoruyla nötralize edildiğinde histolojik bulgularda gerileme gözlemlemişlerdir. Kolon epitel hücrelerinde ve lamina propriadaki mononükleer hücrelerde iNOS aktivitesinin artmasından dolayı aşırı miktarda NO üretildiğini bunun IL-1 TNF ve IFN- γ cevap olarak gerçekleştiğini söylemişlerdir(4).

Hagar ve arkadaşlar asetik asitle kolit oluşturdukları farelerin histolojik incelemelerinde ödem nekroz, epitelde kayıp ve mukozada yaygın inflamatuvar reaksiyon görmüşlerdir. Antioksidan olan Pyrrolidinedithiocarbamate (PDTC) ile tedaviden sonra histolojik bulgularda gerileme, mukozadaki inflamasyonda azalma ve epitel hasarında onarım görmüşlerdir. Yine kolit oluşturulmuş hayvanlarda kontrol grubuna göre TNF seviyesinde artma ve tedavi ile belirgin azalma tespit etmişlerdir. Ayrıca bu çalışmada iNOS gen ifadesi de incelenmiş olup kontrol grubunda esas olarak nötrofillerde ve seyrek olarak epitel hücrelerinde saptanmış olmasına rağmen kolit grubunda mukozayı işgal etmiş inflamatuvar hücrelerden kaynaklanan aşırı miktarda NO üretimine neden olan iNOS aktivitesi gözlemlemişlerdir(20).

Yapmış olduğumuz çalışmada ÜK oluşturulan sham grubunda özellikle lamina propriada olmak üzere mukoza ve submukozada aşırı derecede inflamatuvar hücre göçü gözlemlendi. Bununla birlikte tedavi grubunda özellikle lamina propriada olmak üzere mukoza ve submukozadaki inflamatuvar reaksiyonda azalma olduğu tespit edildi. Öte yandan ödem ve vaskülarizasyon değerlendirmesinde gruplar arası anlamlı bir fark gözlenmedi. Yine bu çalışmada iNOS gen ifadesinde incelenmiş olup gruplar arası anlamlı bir fark görülmemiştir.

İnaktif ÜK'li hastalara kıyasla aktif ÜK'li hastalarda kolon epitel hücrelerinde büyük miktarda NO üretilmektedir(7,98). ÜK'li hastaların inflamasyonlu kolon epitelinden yüksek miktarda iNOS içermesi bunu doğrulamaktadır. Moshage ve arkadaşları kronik ÜK'li hastaların endoskopik takiplerinde inflamasyonsuz bölgelerden alınan örneklerde iNOS boyanmasının olmadığını inflamasyon olan bölgelerden alınan örneklerde iNOS boyanmasının

olduğunu gözlemlemişlerdir(7). Fazla miktarda üretilen NO mitokondirial solunumu bozarak serbest radikallerin oluşumunu artırmaktadır.

Artmış inflamatuvar yanıtı bağı olarak doku hasarını başlatan en önemli faktör, serbest oksijen radikalleridir (SOR)(16,18). Aerobik canlılar, metabolizmaları sırasında fizyolojik olarak oksidatif strese maruz kalırlar. Dokuların tükettiği oksijenin büyük bir kısmı (%95) aerobik metabolizma için kullanılırken, %5'inin SOR'e çevrildiği tahmin edilmektedir. Oksijenden üretilen en önemli reaktif türler arasında süperoksit anyonu (O_2^-), hidrojen peroksit (H_2O_2), hidroksil radikali (OH^-), peroksinitrit anyonu ($ONOO^-$) vardır(18). Bu radikaller membran hasarı, DNA yıkımı, proteaz aktivasyonu, lipid ve protein peroksidasyonu, takiben apoptozis ve nekrozla sonuçlanan hücre ölümüne neden olmaktadır(16,18). Tsunada ve arkadaşları; ÜK'deki mukozal hasarın etiolojisinde ve devamında anahtar rol oynayan oksidatif stresi, serbest radikal toplayıcısı olarak bilinen salazosulfaridine ile etkili bir şekilde tedavi etmiş ve mukozadaki düzelmeyi gözlemlemişlerdir(99). ALA ve metaboliti DHLA'nın metabolizmanın düzenlenmesi ile ilgili multi enzim kompleksinin kofaktörü, SOR'lerinin toplayıcısı, vitamin C ve E gibi vitaminlerin yenilenmesi ve tümör hücrelerinde apoptozisi artırıcı etkisi bildirilmiştir(92,93). Biz de çalışmamızı planlarken kolon epitelindeki hasarın asıl sorumlusu olan proinflamatuvar ve antiinflamatuvar sitokinler arasında dengenin bozulmasıyla ortaya çıkan serbest oksijen radikallerinin (SOR) etkilerini önlemek amacıyla antioksidan ajan olan ALA'ı seçtik.

Literatür taramalarında ÜK oluşturulmuş hayvan modellerinde ideal, eşsiz ve evrensel antioksidan olan ALA ile apoptozis ve iNOS ifadesi üzerine yapılan bir çalışmaya rastlayamadık. Biz bu çalışmayı planlarken ÜK'in etiolojisini daha iyi anlamak, kanser gelişmesinden korunmak ve mevcut olan medikal tedavilere alternatif ve tamamlayıcı bir tedavi modeli oluşturmayı amaçladık.

Programlı hücre ölümü anlamına gelen "apoptozis", hem hücrel homeostazisin devamlılığı hem de hücre çoğalması ve farklılaşmasında çok önemli olan hücre eliminasyonu için gerekli fizyolojik bir işlemdir(51,63). Apoptotik süreci başlatan, indükleyen ve baskılayan birçok faktör tanımlanmıştır(68,69). Apoptozis ile organizmada hasar görmüş veya tehlike potansiyeli olan hücreler, çevreye zarar vermeksizin ortadan kaldırılır. SOR' un orta düzeyleri birçok farklı hücrede

apoptozise neden olur. Oysa tümör hücreleri gibi normal davranışını kaybetmiş hücrelerde artan SOR miktarı hücrelerin çoğalmasına katkı sağlarken apoptozisine engel olmaktadır(13). Aktive ÜK'li hastalarda apoptozisin arttığı ve mukozal hasara katkı sağladığı belirtilmektedir(100). Leal ve arkadaşlarının mukoza biopsilerinde yaptığı çalışmada apoptozisi uyaran Bax, APAF-1 ve caspas-9 seviyelerinin kontrol gurubuna göre anlamlı derecede yüksek olduğu bildirilmiştir. Ayrıca proinflamatuvar sitokinlerin ÜK'li hastalarda yükselmiş olduğunu bunların bazılarının (TNF) da apoptozisin mekanizmasında görev aldığını belirtilmiştir(100). Seidelin ve arkadaşları endoskopik tarama ile yaptıkları bir çalışmada inflamasyonlu kolon bölgesinden alınan örnekte apoptozis oranının, normal kolon kısmından alınana göre artmış olduğunu tespit ettiler. Histolojik verilere göre ise Fas-ligan ilişkisinin incelendiği aynı çalışmada artan inflamasyonda Fas-ligana apoptozis cevabının azaldığı tespit edilmiştir. Histolojik inflamasyon derecesi ile Fas cevabının ters korelasyonu, immünokompetant mukozal hücrelerin salgıladığı proinflamatuvar sitokinlerin, NF-kB bağımlı apoptozis inhibitör proteinleri yoluyla Fas cevabının azalmasıyla açıklanabilir(14).

Bilindiği gibi SOR'lerinin artması hücreyi oksidatif strese maruz bırakır ve hücre fonksiyonlarını kaybetmeye başlar. Bunun sonucu olarak hücrede ya apoptozis ya da nekroz gözlenir(13). ALA'nın ortamdaki zararlı etkilere karşı hücreyi koruduğu direkt uygulamalara karşı proapoptoik etki gösterdiği birçok yayında mevcuttur(92-95). Ayrıca ALA tümör hücresinde düşük konsantrasyonda proliferatif etki gösterirken yüksek konsantrasyonda anti-proliferatif etki göstermektedir. Fujita ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada artan SOR üretiminde hücre içi apoptozis sinyalinin daha kolay başladığı belirtilmiştir(13). Artan dozlarda ALA uyguladıklarında ise SOR üretiminin baskılandığını bildirmişlerdir. Bir sonraki aşamada ALA'nın apoptozisi azaltan özelliğini SOR'ine maruz kalmış hücrede artan caspas3 ve caspas9 aktivitesini ALA ile baskılayarak göstermişlerdir. Yani ALA hücreyi SOR'inin hücre membranına verdiği zarardan korumaktadır. Yine aynı çalışmada ALA ile tedavinin antiapoptoik protein(Bcl-x1) ile proapoptoik(Bax) arasındaki oranı arttırdığını fakat bunun ALA'nın apoptozisi baskılaması ile ilgili olmadığını belirmişlerdir(13).

Karakoyun ve arkadaşları yaptıkları çalışmada ALA ve metaboliti DHLA'nın tümör hücrelerinde proliferasyonu inhibe ettiği apoptozisi arttırdığı oysa normal hücrelerde apoptozisi inhibe ettiğini söylediler. ALA tarafından apoptozis inhibisyonunun NF-kB'nin azalmasına paralel olduğunu belirttiler. ALA ile tedavi esnasında NF-kB'nin DNA'ye bağlanmasının zayıfladığını ve TNF ile uyarılan NF-kB aktivasyonunun inhibe olduğunu söylediler. ALA ile sağlanan NF-kB inhibisyonun inflamatuvar süreci baskılayarak SOR üretimini azalttığını ve apoptozisi inhibe ettiğini belirttiler(101).

SOR'leri hücre için kritik önem taşıyan sinyal iletili molekül olarak da karşımıza çıkar. Daha önce yapılan çalışmalarda düşük konsantrasyonda SOR'lerinin tümör hücrelerinde proliferasyonu kolaylaştıracağı antioksidanlarla SOR'lerinin ortamdaki uzaklaştırıldığında ise proliferasyonun inhibe olacağı apoptozisin artacağı belirtilmiştir(13,102). Antioksidan bir ajan olan ALA ile apoptozis arasındaki ilişkiyi anlayabilmek için Shi ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada ALA ile tedavi edilen gruplarda hücre içi SOR aktivitesinde azalma olduğu ve bunun tümör hücrelerinin çoğalmasını inhibe edeceğini belirtmişlerdir. Tümör hücrelerine ALA uyguladıkları zaman ise apoptozisde artma olduğu ve bunun azalan SOR'dan kaynaklandığı dahası ALA'nın caspas 3 ve 9'un seviyelerini doz bağımlı olarak arttırarak apoptozise yol açtığını belirtmişlerdir(102).

ALA ve metaboliti DHLA'nın güçlü bir antioksidan olduğu bilinmektedir. SOR'ini ortamdaki uzaklaştırması, şelasyon aktivitesi göstermesi ve redaksiyon tepkimelerine katılması gibi çok yararlı etkileri vardır(92,93). ALA'nın ortamdaki zararlı etkilere karşı hücreyi koruduğu direkt uygulamalara karşı proapoptoik etki gösterdiği birçok yayında mevcuttur. Ayrıca tümör hücresinde düşük konsantrasyonda proliferatif etki gösterirken yüksek konsantrasyonda anti-proliferatif etki göstermektedir(103). Lee ve arkadaşlarının ALA'nın canlı dokular üzerindeki etkilerini araştıran çalışmalarında ALA'nın apoptozisi arttırdığını ancak ortamdaki oksidatif stresi arttırdıklarında oksidatif strese bağlı olarak hücrelerin canlılıklarını kaybettiklerini, ALA uygulamasından sonra ise önce oksidatif stresin azaldığını ve daha sonra apoptozisin azaldığını tespit etmişlerdir. Bu bulgular ışığı altında Oksidatif stres altında ALA'nın sitoprotektif etki gösterdiğini bildirmişlerdir(103). Meng ve arkadaşları yüksek glukoz konsantrasyonu ile oksijen

radikallerini artırarak endotel hücresinde apoptozis cevabını araştırmışlardır. Yüksek glukoz konsantrasyonu altında Bax proteinin arttığını ve Bcl-2'nin azaldığını görmüşlerdir. ALA ile tedaviden sonra Bcl-2'de anlamlı bir değişiklik olmazken Bax proteininde azalma ve dahası ALA'nın caspas 3 ve 9 aktivasyonunu engellediğini gözlemlemişlerdir. Sonuç olarak yüksek glukoz konsantrasyonu ile oluşan oksidatif stresin apoptozise neden olduğunu, ALA tedavisiyle apoptozisin azaldığını saptamışlardır(104). Bizim yapmış olduğumuz çalışmada da inflamasyonlu bölgelerden alınan örneklerde apoptotik hücre sayılarının oldukça fazla olduğu gözlemlendi. Bununla birlikte ALA uygulanan tedavi grubunda apoptotik hücre sayısının belirgin derecede azaldığı görüldü.

Genetik çalışmalarda, HLA sisteminin yanısıra, proinflamatuvar ve regülatuvar sitokinleri kodlayan genler araştırılmış ve çeşitli genlerin hastalığın predispozisyonu, şiddeti ve prognozu üzerine etkili olabileceği yolunda bulgular elde edilmiştir(2).

Birçok hastalığın başlaması ve ilerlemesinde hücrel gen aktivasyonlarının ve ekspresyonlarının önemli rol oynadığı iddia edilmiştir. Fizyolojik ortamda durağan olan veya minimal aktivite gösteren bu genler patolojik durumlarda hastalık patogenezinin başlaması veya ilerlemesi için gerekli olan mekanizmaların tetiklendiği aşırı aktivite gösterirler. Özellikle immün ve inflamatuvar cevaplarda birçok genin ekspresyonu NF-kB tarafından düzenlenir. Bir transkripsiyon faktörü olan NF-kB enfeksiyona karşı hem hücrel hem de humoral seviyede faaliyet göstererek konak dokuda yıkıma neden olabilecek inflamatuvar cevabın aktivasyonunda rol alabilen bir moleküldür(28,29). NF-kB, direk veya indirek yoldan Tümör Nekrotizan Faktör- α (TNF α), interlökin 1 (IL-1) gibi bazı iltihabi sitokinlerin ve iNOS gibi enzimlerin aktivasyonunu arttırarak hastalıkların patogenezinde rol oynayabilir(5,31). Hürdağ ve arkadaşları ALA ile yaptıkları bir çalışmada NF-kB aktivasyonu ile artan iNOS'un doku hasarı oluşturan reaktif oksijen radikallerini arttırdığını ALA ile tedaviden sonra ise NF-kB ve iNOS aktivitesinin azaldığını belirtmişlerdir(105).

NF-kB inflamatuvar yanıtı düzenlemede anahtar rol oynamaktadır. NF-kB'nin aktivasyonu TNF, IL-1, IL-6 ve IL-12 gibi proinflamatuvar sitokinleri, VCAM-1 ve ICAM-1 gibi hücrel adezyon moleküllerini, İNOS ve COX2 enzim

ifadesini artırmaktadır(7,31). Oruç ve arkadaşları NF-kB inhibitörü olan leflunomid ile kolit oluşturulmuş farelerde yapılan çalışmanın sonucunda sitokinler, NO ve SOR miktarında azalma saptamışlardır(19). Bizim yapmış olduğumuz çalışmada tüm grublarda NF-kB ifadesini tespit ettiğimiz halde kontrol grubuna kıyasla sham grubunda oldukça açık bir şekilde bu ifadenin arttığını, tedavi grubunda ise artışın az olduğunu gözlemledik.

NO düşük konsantrasyonlarda çok önemli fizyolojik işlevlerde rol almaktadır. Ancak aşırı ve kontrolsüz NO sentezi hücreler için zararlı olmaktadır. Süperoksit radikali ile NO arasındaki dengenin bozulması, endotel hücreleri ve makrofajlardan PAF (trombosit aktive edici faktör), TNF, IL-1 gibi inflamatuvar mediyatörlerin salınımına neden olur(17). Oksidatif stres altında NO sentezi apoptozisi, sitotoksiteyi artırır ve DNA hasarı oluşturur. iNOS aktivitesinin artması lipopolisakkaritlerin ve inflamatuvar sitokinlerin NF-kB tarafından düzenlenen transkripsiyonel kontrolü altındadır. Ayrıca TGF-b, steroid, p53 ve NO feedback etkisi ile enzim aktivitesi kısıtlanmaktadır. Nitrik oksit in süperoksit dismutaz (SOD) enzimiyle yarışmaya girmesi ve süperoksit radikaliyle etkileşmesi sonucu peroksinitrit (ONOO^-) oluşur ve NO toksik etkileri ortaya çıkar. Peroksinitrit, nitrik oksit toksisitesinin başlıca sorumlusudur. Peroksinitrit çeşitli protein yapılarına ve DNA'ye zarar verebilir. NO'ye bağlı oluşa DNA hasarında p53 aktivitesinin artar ve DNA hasarını onarmaya çalışır. Biriken DNA hasarı onarılamaz ise apoptozis meydana gelir. Fakat NO'nin caspas-3,-8, ve-9 inhibe ederek apoptozisi inhibe ettiği de bilinmektedir(35).

Sklyarov ve arkadaşları yaptıkları çalışmada ise ÜK oluşturdukları sıçanlarda aminoguanidine tedavisi ile histolojik iyileşme sağlamışlardır. Çalışmada kolon mukozasında NO miktarının azaldığı, plazmada ise L-arginin konsantrasyonunun arttığı tespit edilmiş, bu bulgular ışığı altında aminoguanidine ile iNOS aktivitesinin azaldığı sonucuna vararak aminoguanidine ile iNOS aktivitesi inhibisyonunun sitoprotektif etki gösterebileceğini ileri sürmüşlerdir. Aynı çalışmada selektif COX-2 inhibitörü tedavisi ile de iNOS aktivitesinde azalma ve histolojik iyileşme sağlanmakla birlikte; aminoguanidine ve selektif COX-2 inhibitörünün birlikte kullanılmasıyla daha iyi sonuçlar elde etmişlerdir(106).

Kolondaki inflamasyon esnasında NF-kB aktivasyonunun artışı bununda apoptozisle ilgili genler dahil yaşamla ilgili bir çok gen ifadesini etkilediği

bildirilmiştir. Moshage ve arkadaşları yapmış oldukları çalışmada iNOS aktivitesinin NF-kB ile düzenlendiğini, artan NF-kB düzeylerinde iNOS düzeyinin de artarak NO üretimini arttırdığını; hücrenin ise akut artan NO'ye karşılık apoptozisi artırdığını, kronik olarak salgılanan NO'ye karşılık ise apoptozisi azalttığını tespit etmişlerdir. Aynı çalışmada NF-kB'nin Bcl-2 ailesi ve Fas reseptörü dahil apoptozis ve tümör gelişimi ile ilgili bir çok proteinin sentezini düzenlediğini söylemişlerdir. Çalışma sonucunda aktive ÜK'li hastalarda iNOS ifadesinin arttığını ve Bcl-x1 ifadesinin yetersiz olduğunu oysaki karsinomla ilişkili ÜK'li hastalarda iNOS ifadesinin yetersiz olduğunu ve Bcl-x1 ifadesinin arttığını buldular. Bu çalışmada aktive olmuş caspas 3'ü tüm örneklerde zayıf bir şekilde görüldü ve bunun sadece sınırlanmış bir şekilde devam eden apoptozisin göstergesi olduğunu söylediler. Öte yandan ÜK ile ilgili kanserleşme sürecinde Fas ifadesinin de arttığını söylediler. Bu yüzden ÜK'li hastalarda kanser gelişimini önlemek için inflamasyonu minimize etmek gerektiğini ifade ettiler(7). Bax ve Bcl-2 ifadesi üzerine ALA'nın etkisinin araştırıldığı Dozio ve arkadaşlarının tümörlü hücrelerde yaptıkları bir çalışmada ise ALA'nın doz bağımlı olarak Bcl-2 proteinini azalttığı ve Bax proteinin etkilemediğini bulmuşlardır(107). Bizim çalışmamızda ise tüm gruplarda iNOS mRNA düzeyi tespit edilmiş olmakla birlikte; sham grubunda iNOS mRNA düzeyi kontrol grubuna göre azalmış, tedavi grubunda ise kontrol grubuna göre artmış olarak saptandı.

Artmış inflamatuvar yanıtı bağı olarak ortamda biriken sitokinler ve serbest oksijen radikalleri hücreye ve genomuna zarar vermeye başladığında bekçi gen olarak da bilinen p53 genini devreye girer. Hücre içerisinde biriken p53 proteini hücre siklusunu G1 fazında tutarak S fazına geçmesini engeller. Bu süreç içerisinde DNA onarımı gerçekleştirilir ve hücre siklusu tamamlanır. Onarım yapılamazsa hücre apoptozise gider. p53 hücre siklusunu durduramazsa kanserleşme görülür(8). ÜK kolonda kanser gelişimini artıran risk faktörüdür(10). Eren ve arkadaşları yapmış oldukları çalışmada p53 polimorfizinin kolon kanseri gelişmesinde riski arttırdığını öte yandan ÜK ile ilişkisinin çok da anlamlı olmadığını bildirmişlerdir. Rapoza ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada ise neoplastik transformasyon gösteren ÜK'li hastalarda p53 mutasyonunun gösterildiğini ancak neoplazi içermeyen mukozada p53 mutasyonunun saptanamadığını belirtmişlerdir(108).

Venkata ve arkadaşları deneysel olarak kolit oluşturdukları farede antioksidan olarak Ginkgo biloba'ı kullanmışlardır(109). Çalışma sonucunda Ginkgo biloba'nın etkisini, TNF ve IFN- γ gibi proinflamatuvar sitokinlerin etkisini ve iNOS aktivitesini azaltarak oluşturduğunu saptamışlardır. Aynı zamanda inflamasyonun azalması p53 genindeki aktivasyonu da azaltmıştır. Yoshida ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada da inflamatuvar aktivitenin arttığı kolon mukozasında p53 aktivitesinin de arttığını bulmuşlar ve bunun inflamatuvar strese karşı koruyucu olduğunu belirtmişlerdir(9). Bu yüzden p53 genindeki mutasyonların ÜK'li hastalarda neoplastik değişime yol açabileceğini vurgulamışlardır. Bizde yaptığımız çalışmada p53 ifadesinin kontrol grubunda çok az artmasına rağmen sham grubunda belirgin artış gösterdiğini, tedavi grubunda ise bu artışta bir azalma olduğunu tespit ettik.

6.SONUÇ VE ÖNERİLER

1. Asetik asit uygulaması ile akut kolit oluşturulan grupta özellikle lamina propriada daha belirgin olmak üzere hem mukoza hemde submukozada yoğun inflamatuvar hücre göçü kontrol grubuna göre oldukça fazla gözlemledik. ÜK+ALA grubunda ise mukoza ve submukozada inflamatuvar reaksiyonun zayıflamış olduğu gözlemledik. ALA ÜK'te inflamasyonun azalmasında oldukça etkilidir.

2. Kontrol grubunda epitelde oldukça az sayıda apoptotik hücreler görülmesine karşın, sham grubunda sayıları oldukça artmıştı. Bununla birlikte ALA tedavisi uygulanan grupta apoptotik hücre sayısında belirgin derecede azalma gözlemledik. ALA tedavisi hücrelere etki eden oksidatif stresi azaltarak apoptosisi azaltabilir.

3. Enfeksiyona karşı hem doğal ve kazanılmış immün cevapta hem de inflamatuvar cevapta çok çeşitli gen ifadesinin koordine edilmesinde anahtar rol oynayan NF-kB'nın değerlendirilmesinde bu gen ifadesinin tüm gruplarda var olduğu gözlemledik. Ancak sham grubunda bu ifadenin kontrol grubundan çok daha yüksek olduğunu, diğer yandan tedavi grubunda belli belirsiz bir azalma olduğunu belirledik. Uzun süre ALA tedavisi ile NF-kB aktivasyonunu etkileyerek proinflamatuvar mediatörler ve apoptosis üzerindeki etkilerini değiştirebilir.

4. Kontrol grubunda oldukça az p53 ifadesi var olmasına karşın sham grubunda aşırı bir ifade artışı gözlemledik. Tedavi grubunda ise bu ifade artışında azalma olduğunu belirledik. Artmış inflamatuvar yanıtı bağlı olarak ortamda biriken sitokinler ve serbest oksijen radikalleri hücreye ve genomuna zarar vermeye başladığında p53 genini aktifleşir ve hücre onarımını gerçekleştirir. İnflamasyonun azalması ile p53 genindeki aktivasyon azalmaktadır. ALA tedavisi ile inflamasyona bağlı hücre hasarı önlenir.

5. Bilindiği gibi iNOS sitokinler ve enzimlere maruz kaldıktan sonra, özellikle makrofaj (monosit, nötrofil, hepatosit) ve damar endotel hücresi NO yapımından sorumludur. Bu hücrelerin spesifik sitokinlerle (bakteri lipopolisakkaritleri ve interferon- γ) aktivasyonu, NOS'ın indüksiyonu ve NO sentezine yol açmaktadır. Bu enzim daha çok sitotoksik ve immünomodülatör etkilerden sorumlu, uzun sürede fazla miktarda NO yapımı ile ilişkilidir. iNOS aktivasyonu gen transkripsiyonu gerektirdiğinden, NO yapımı birkaç saat sonra

görülür ve birkaç gün devam edebilir. Ancak uzun süreli ve aşırı miktarda NO sentezi makrofaj ve diğer dokularda da harabiyete yol açar(17). Bu da deney grubunda makrofaj harabiyeti ve doku hasarına yol açar.

Ülseratif kolitli hastalarda daha önce yapılan çalışmalarda iNOS aktivitesi ve NO üretiminin arttığı gözlenmiştir(16). Bizim çalışmamızda ise iNOS gen ekspresyonu açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamıştır. Bizim çalışmamıza benzer şekilde sıçan böbrek iskemi/reperfüzyon hasarında Quercetin'in etkisi başlıklı çalışmada da iNOS gen ekspresyonu açısından gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır(110). Bu durumda kolit grubunda iNOS değerlerinin beklenilenin altında kalması kolit sürecinin 4 hafta kadar uzun bir periyotda oluşturulması ve 4. hafta sonunda iNOS değerlerinin belirli bir düşüşe geçmesi sonucu kolit grubu kontrol grubuna göre anlamlı oranda artış göstermeyebilir. Kolit grubunda oluşan makrofaj harabiyeti sonucu iNOS aktivasyonu ve NO sentezi yeterince yapılamamış olabilir. Tedavi grubunda ise histopatolojik olarak bir iyileşme görülürken iNOS düzeyinin düşmemesi ALA' nin koruyucu etki mekanizmasının tek başına iNOS üzerinden olmayıp farklı mekanizmaları tetikleyerek yaptığını düşündürmektedir.

Öneriler:

ÜK birbirini izleyen intestinal inflamasyon atakları kısmı iyileşme dönemleri şeklinde gelişen kronik bir hastalıktır. Hastalarda tipik olarak kanlı diyare, abdominal ağrı ve ateş görülmektedir. ÜK'in bağırsak dışı belirtileri birçok sistemde ortaya çıkabilir. Henüz tek bir etiyolojik belirlenmemiş olsa da hastalığın, konak faktörlerinin bastıramadığı devamlı mukozal inflamasyon yüzünden oluştuğuna kuvvetle inanılmaktadır. Yanıt mekanizmasındaki bu bozukluk birçok immün ve inflamatuvar hücrelerin aktivasyonuna ve proinflamatuvar medyatörlerin de etkisiyle inflamasyonun tetiklenip intestinal dokulara zarar vermesine yol açmaktadır. Sulfasalazin kortikosteroidler, immunomodülatörler, süpresif antimetabolitler, infliximab dahil anti-tümör nekroz faktör- α biyolojikler ve bazı antibiyotikler ÜK tedavisinin çeşitli evrelerinde kullanılan ilaçlardır. ÜK'te ilaç tedavisinin yetersizliği, kronik fiziksel bozukluk ve fiziksel disfonksiyon ile kendini gösterir. Medikal olarak tedavi edilemeyen hastalara cerrahi tedavi uygulanır. ÜK'te ALA kullanarak bozulmuş immün yanıtı karşı hücreleri korumak ve kolon mukozasındaki

inflamasyonu azaltmayı planladık. ALA'nın kolon mukozasındaki inflamasyonu önlemede oldukça etkili olduğunu gördük. ALA'nın ÜK'te cerrahi tedavi öncesi veya cerrahi açıdan yüksek riskli olup cerrahi uygulanamayacak hastalarda ve mevcut tedavilerle kombine kullanımını önerilebilir.

ÜK'te kanser gelişmesi en önemli komplikasyonlardan biridir. Kanser gelişme riski inflamasyon şiddetine değil, kolonik mukoza tutulumunun boyutuna ve hastalığın süresine bağlıdır. Ortalama yaşam süresinin arttığı günümüzde kanser gelişmesi sık görülmektedir. ALA tedavisi ile tekrarlayan inflamasyon kontrol altına alınarak uzun sürede kanser gelişiminin önüne geçilebilir. Bu nedenle ALA koruyucu ve tedavi amacıyla ÜK'te kullanılabilir umut verici bir ajan olabilir.

KAYNAKLAR

1. Sayek, İ. Temel Cerrahi, Ülseratif Kolit, Güneş Kitabevi 3.Baskı; 2004.s.1203-1214
2. Schwartz, S. Cerrahinin İlkeleri, İnflamatuvar Barsak Hastalığı, Antıp A.Ş;1999.s.1329-1346
3. Oktay E. İnflamatuvar Barsak Hastalıkları: Etyopatogenez, Semptomatoloji, Tanı ve Komplikasyonlar. İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Gastrointestinal Sistem Hastalıkları 2001: 199-206
4. Obermeier F. Kojouharoff G. Interferon –gamma (IFN- γ)-and tumour necrosis factor (TNF)-induced nitric oxide as toxic effector molecule in chronic dextran sulphate sodium (DSS)-induced colitis in mice. Clin. Exp. Immunol. 1999; 116:238-245
5. Pescarmona G. Transcription factors NF-kB. Biochem Biophys Res Commun. 2003 Oct 24;310(3):720-4.
6. Cinel İ, Oral U. Son Gelişmelerle; SIRS, PARS ve NF-kB, Türk Anest Cem Mecmuası 28;236-241,2000
7. Moshage H, Van der Woude C J. Expression of apoptosis related proteins during malignant progression in chronic ulcerative colitis. J Clin Pathol 2005;58:811–814
8. Robbins S, Kumar V, Contran R. Neoplazi, Nobel Kitabevi 6.Baskı: 2000.s.133-174
9. Yoshida T, Sekine T, Aisaki K. CITED2 is activated in ulcerative colitis and induces p53-dependent apoptosis in response to butyric acid. J Gastroenterol 2010; s00535-010-0355-9
10. Goldman H. Significance and Detection of Dysplasia in Chronic Colitis. Cancer December 1, 1996 / Volume 78 / Number 11 2261-2263
11. Akşit H, Bildik A. Apoptozis. YYÜ VET Fak DERG.2008;19(1):55-63
12. Öktem S, Özhan M. Apoptozisin önemi. Toraks dergisi.2001;2 (1):91-95

13. Fujitaa H, Shiosakaa M. α -Lipoic acid suppresses 6-hydroxydopamine-induced ROS generation and apoptosis through the stimulation of glutathione synthesis but not by the expression of heme oxygenase-1. *Bram Research* 1206(2008).s. 1-12
14. Seidelin J, Nielsen O. Epithelial apoptosis: Cause or consequence of ulcerative colitis? *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 2009; 44: 1429–1434
15. Woude C.J. van der, Kleibeuker J.H, Jansen P.L.M and Moshage H. Chronic inflammation, apoptosis and (pre-)malignant lesions in the gastro-intestinal tract. *Kluwer Academic Publishers; Apoptosis* 2004; 9: 123–130
16. Sahna E, Deniz E, Aksulu HE. Myocardial ischemia-reperfusion injury and melatonin. *Anadolu Kardiyol Derg.* 2006; 6(2):163–8.
17. Türköz Y, Özerol E. Nitrik Oksit'in Etkileri ve patolojik Rollerini. *Journal of Turgut Özal Medical Center*4(4):1997
18. Lee J, Koo N, Min.D.B. Reactive oxygen species, Aging, and Antioxidative Nutraceuticals. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety.* 2004:21-33
19. Oruç N, Kutluana U, Sezak M, Yenisey Ç. Asetik asitle oluşturulan deneysel kolit modelinde leflunomid'in etkinliğinin araştırılması. *Akademik Gastroenteroloji Dergisi*, 2008; 7 (2): 67-72
20. Hagar H, Medany A, Eter E. Ameliorative effect of pyrrolidinedithiocarbamate on acetic acid-induced colitis in rats. *European Journal of Pharmacology* 554 (2007) 69–77
21. Sadler.T.W. *Langman's Medical Embryology, Sindirim Sistemi.* Palme Yayıncılık 7.Baskı. 1996:231-259
22. Arıncı K. *Anatomi, Sindirim Sistemi, Güneş Kitabevi:* 1995:281-356
23. Welsch U, Sobotta *Histoloji, Sindirim Sistemi:* 5.Baskı 1999: 134-158
24. Guyton A. *Tıbbi Fizyoloji, Gastrointestinal Fizyoloji, Nobel Tıp Kitabevleri* 9.Baskı 1996:793-855

25. Ganong W.F. Tıbbi Fizyoloji, Gastrointestinal Fonksiyon, Barış Kitabevi 17.Baskı 1996:575-630
26. Törüner M. İnflamatuvar Barsak Hastalığı mı? İnfeksiyon mu? Güncel Gastroenteroloji 2009:166-167
27. Baykal Y. İnflamatuvar Barsak Hastalığı, GATA Bülteni: 2001;2:23-40
28. Verma IM, Stevenson JK, Schwarz EM, Van Antwerp D, Miyamoto S. Rel/NF-kB/IkB family: intimate tales of association and dissociation. Genes Dev 1995; 9: 2723-2735.
29. Tripathi P, Aggarwal A. NF-kB transcription factor: a key player in the generation of immune response. Current Science 2006; 90: 519-531.
30. Arabacı T, Çiçek Y, Albayrak M. Agresif periodontitisli nükleer faktör kapp B aktivasyonunun immunohistokimyasal olarak incelenmesi. Atatürk Üniv. Dis Hek. Fak. Derg. Cilt:20, Sayı: 2, Yıl: 2010, Sayfa: 84-91
31. Fouad D, Siendones E, Role of NF-kB activation and nitric oxide expression during PGE1 protection against D-galactosamine-induced cell death in cultured rat hepatocytes. Liver International 2004; 24: 227–236
32. Batsi C, Markopoulou S, Vartholomatos G. Chronic NF-kB activation delays RasV12-induced premature senescence of human fibroblasts by suppressing the DNA damage checkpoint response. Mechanisms of Ageing and Development 130 (2009) 409–419
33. Yıldız OG, Soyuer S, Soyuer I, Uçar K, Gundog M, Kaplan B, Özkan M. Gastrektomi sonrası adjuvan kemoradyoterapi uygulanan mide karsinomlu olgularda NF-kB'nin prognostik önemi. Türk Onkoloji Dergisi. 2007; 22: 69-73.
34. Imler JL, Hoffmann JA. Toll and Toll-like proteins: an ancient family of receptors family signaling infection. Rev. Immunogenet. 2000; 2: 294-304.
35. Jaiswal M, Nicholas F. LaRusso and Gregory J. Gores. carcinogenesis: linking inflammation to oncogenesis Nitric oxide in gastrointestinal epithelial cell. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 281:G626-G634, 2001.

36. Bassenge E. Clinical relevance of endothelium-derived relaxing factor (EDRF). *Br J Clin Pharmacol.* 1992; 34 (1):37-42.
37. Wink DA, Mitchell JB. Chemical biology of nitric oxide: Insights into regulatory cytotoxic, and cytoprotective mechanisms of nitric oxide. *Free Radic Biol Med.* 1998; 25 (4-5): 434-56.
38. Nathan C, Xie QW. Nitric oxide synthases: Roles, tolls, and controls. *Cell.*1994; 78 (6): 915-8.
39. Toledo-Pereyra LH, Toledo AH, Walsh J, Lopez-Neblina F. Molecular signaling pathways in ischemia/reperfusion. *Exp Clin Transplant.* 2004; 2(1):174-7.
40. Nigro MJ, Baker SJ, Preisinger AC, Jessup JM, Hostetter R, ClearyK, Bigner SH, Davidson N, Baylin. Mutations in the p53 gene occur in diverse human tumour types. *Nature*,340:705-707,1989.
41. Levine JA. P53, the cellular gatekeeper for growth and division, *Cell*, 88:323-331,1997.
42. Harris CC, Structure and function of the p53 tumor supressor gene: clues for rationalcancer therapeutic strtegies, *Journal of The National Cancer Institue*, 88: 1442-1546,1996.
43. Prives C, Hall PA, An overview of p53 structure and functior, *Journal of pathology*, 187:112-126, 1999.
44. Greenbatt MS, Bennett WP, Hollstein M, Harris CC, Mutations in the p53 tumor supressor gene:clues to cancer etiology and moleculer pathogenesis. *Cancer Res*, 54: 4855-4877,1994.
45. Lane DP. P53, A dieth in the life of p53. *Nature*, 358: 15-16,1993.
46. Yin Y, Tainsky MA, Bischoff FZ, Strong LC, Whal GM. Wild-type p53 restores cell cycle control and inhibitis gene amplification in cells with mutant p53 alleles. *Cell*,70: 923-935,1992.
47. Haupt Y,Maya R,Kazas A,Oren. Mdm2 promotes the rapid degradation of p53, *Letters to Nature*,387:295-298,1997

48. Saeed M, J Albert, Jr Fornace. Role of p53 family members in apoptosis. *Journal of cellular physiology* 182:171-181 2000
49. Augustu L, Dennis A, Cancer progression and p53, 346;1009-112,1995.
50. Timothy F, Burns S, Wafik S. The p53 pathway and apoptosis. *Journal of cellular physiology* 181:231-239 1999.
51. Cummings MC, Winterfold CM, Walker NI. Apoptosis. *Am J Surg Pathol.* 1997; 21: 88–101.
52. Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis; A basic biological phenomenon with wide ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer.* 1972; 26: 239–245.
53. Bellamy CO, Malcomson RD, Harrison DJ, Wyllie AH. Cell death in health and disease: the biology and regulation of apoptosis. *Cancer Biology.* 1995; 6: 3–16.
54. Cummings MC, Winterford CM, Walker NI. Apoptosis. *Am J Surg Pathol.* 1997; 21: 88–101.
55. Majno G, Torisl A. Apoptosis oncosis and necrosis. *Am J Pathol.* 1995;146: 3–15.
56. Schwartzman RA, Cidloski JA. Apoptosis; the biochemistry and molecular biology of programmed cell death. *Endocrine Reviews.* 1993; 14:133–144.
57. Çalışkan M. Apoptosis: Programlanmış Hücre ölümleri, *Türk J Zool* 2000:31-35
58. Wyllie AH. Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature.* 1980;284:555–556.
59. Cohen JJ. Apoptosis. The physiological pathway of cell death. *Hosp Pract.* 1993;15:35–43.
60. Cohen JJ. Apoptosis. *Immunol Today.* 1993; 14:126–130.
61. Searle J, Kerr JFR, Bishop CJ. Necrosis and apoptosis. *Pathology Annual.* 1982;17: 229–59.
62. Vaux DL, Korsmeyer SJ. Cell death in development. *Cell.* 1999;96(2):245–54.

63. Cooper GM. Programmed cell death. *The cell*. In: Cooper GM ed. Chapter 14. Washington: ASM Pres;1994.p.592–6.
64. Nagata S. Apoptosis by death factor. *Cell* 1997; 88:355–65.
65. Perkins AS, Stern DF. Apoptosis. In: Devita VT, Hellman S, Rosenberg SA eds. *Cancer Principle and Practice of Oncology*. Philadelphia: Lippincott-Raven; 1997.p.96–100.
66. Gavrieli Y, Sherman Y, Sasson SAB. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *The Journal of Cell Biology*. 1992;119:493–501.
67. Wyllie AH. What is apoptosis? *Histopathology*. 1986;10:995–8.
68. Thompson CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science*. 1995; 267:1456–62.
69. Lewin B. Apoptosis. In: Lewin B (ed). *Genes VI*, Chapter 36. New York: Oxford Universty Press; 1997.p.1122–9.
70. Nagata S, Golstein P. The Fas death factor. *Science*. 1995;267:1449–56.
71. Nagata S. Apoptosis by death factor. *Cell*. 1997; 88:355–65.
72. Cheng J, Zhou T, Liu C, Shapiro JP Brauer MJ, Kiefer MC, Barr PJ, Mountz JD. Protection from Fas-mediated apoptosis by a soluble form of the Fas molecule. *Science*. 1994;263:1759–62.
73. Grell M, Douni E, Wajant H, Löhden M, Clauss M, Maxeiner B, Georgopoulos S, Lesslauer W, Kollias G, Pfizenmaier K, Scheurich P. The transmembrane form of the tumor necrosis factor is the prime activating ligand of the 80 kDa tumor necrosis factor receptor. *Cell*. 1995;83: 793–802.
74. Kroemer G. Mitochondrial control of apoptosis: an introduction. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003;304:433–5.
75. Khosravi-Far R, Esposti MD. Death receptor signals to mitochondria. *Cancer Biol Ther*. 2004;3(11):1051–7.
76. Nakamura K, Bossy-Wetzel E, Burns K, Fadel MP, Lozyk M, Goping IS, Opas M, Bleackley RC, Green DR, Michalak M. Changes in endoplasmic reticulum

- luminal environment affect cell sensitivity to apoptosis. *J Cell Biol.* 2000;150:731–740.
77. Rao RV, Hermel E, Castro-Obregon S, del Rio G, Ellerby LM, Ellerby HM, Bredesen DE. Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program: mechanism of caspase activation. *J Biol Chem.* 2001;276: 869–874.
 78. Ulukaya E. 11/04/2003. Apoptozis Ders Notlari. http://www20.uludag.edu.tr/~biokimya/apoptozis_ders_notu.pdf (08/05/2008)
 79. Srinivasula SM, Ahmad M, Fernandes Alnemri T, Litwack G, Alnemri ES. Molecular ordering of the Fas-apoptotic pathway: the Fas/APO-1 protease Mch5 is a CrmA-inhibitable protease that activates multiple Ced-3/ICE-like cysteine proteases. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1996; 93:14486–91.
 80. Hirata H, Takahashi A, Kobayashi S, Yonehara S, Sawai H, Okazaki T, Yamamoto K, Sasada M. Caspases are activated in a branched protease cascade and control distinct downstream processes in Fas-induced apoptosis. *J Exp Med.* 1998;187:587–600.
 81. Nicholson DW, Thornberry NA. Caspases: killer proteases. *Trends Biochem Sci.* 1997; 22: 299–306.
 82. Wyllie AH. The genetic regulation of apoptosis. *Curr Opin Genet Dev.* 1995; 5: 97–104.
 83. Newton K, Strasser A. The Bcl-2 family and cell death regulation. *Curr Opin Genet Dev.* 1998;8: 68–75.
 84. Hets SW. To die or not to die: An overview of apoptosis and its role in disease. *JAMA.* 1998;278: 300–307.
 85. Navari-Izzo F, Quartacci MF, Sgherri C. Lipoic acid: a unique antioxidant in the detoxification of activated oxygen species. *Plant Physiol. Biochem.* 2002; 40: 463-470.
 86. Packer L, Tritschler HJ. Alpha-lipoic acid: the metabolic antioxidant. *Free Radic Biol Med.* 1996; Vol 20: 625-626.

87. Evans J, Goldfine ID. α -lipoic acid: a multifunctional antioxidant that improves insulin sensitivity in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Technology & Therapeutics*, 2000; Vol: 2: 401-413.
88. Packer L. α -lipoic acid: a metabolic antioxidant which regulates NF- κ B signal transduction and protects against oxidative injury. *Drug Metab Rev.* 1998; 30: 245- 275.
89. Packer L, Kraemer K, Rimbach G. Molecular aspects of lipoic acid in the prevention of diabetes complications. *Nutrition*, 2001; 17: 888-895.
90. Moini H, Packer L, Saris NL. Antioxidant and prooxidant activities of α - lipoic acid and dihydrolipoic acid. *Toxicology and Applied Pharmacology.* 2002; 182: 84- 90.
91. Jones W, Li X, Qu ZC, Perriott L, Whitesell RR, May JM. Uptake, recycling and antioxidant actions of α -lipoic acid in endothelial cells. *Free Radic Biol Med.* 2002; 33: 83-93.
92. Arner ESJ, Nordberg J, Holmgren A. Efficient reduction of lipoamid and lipoic acid by mammalian thioredoxin reductase. *Biochem Biophys Res Commun.* 1996; 225: 268-274.
93. Biewenga GP, Haenen GRMM, Bast A. The pharmacology of the antioxidant lipoic acid. *Gen Pharmac.* 1997; 29: 315-331.
94. Nordberg J, Arner ESJ. Reactive oxygen species, antioxidants and the mammalian thioredoxin system. *Free Radical Biology Medicine.* 2001; 31: 1287-1312.
95. Moini H, Packer L, Saris NL. Antioxidant and prooxidant activities of α -lipoic acid and dihydrolipoic acid. *Toxicology and Applied Pharmacology.* 2002; 182: 84- 90.
96. Packer L, Tritschler HJ. α -lipoic acid: the metabolic antioxidant. *Free Radic Biol Med.* 1996; 20: 625-626.
97. Kagan VE, Shvedova A, Serbinova E, Khan S, Swanson C, Powell R, Packer L. Dihydrolipoic acid a universal antioxidant both in the membrane and in the

- aqueous phase. Reduction of peroxy, ascorbyl and chromanoxyl radicals. *Biochem Pharmacol.* 1992; 44: 1637-1649.
98. Guslandi M. Nitric oxide and inflammatory bowel diseases. *European Journal of Clinical Investigation* (1998) 28, 904–907
 99. Tsunada S, Iwakiri R, Ootani H. Redox Imbalance in the Colonic Mucosa of Ulcerative Colitis. *Scand J Gastroenterol* 2003;38:1002–1003.
 100. Leal R.F, Lourdes M, Ayrizono S. Detection of epithelial apoptosis in pelvic ileal pouches for ulcerative colitis and familial adenomatous polyposis. *Journal of Translational Medicine* 2010, 8:11
 101. Karakoyun B, Yüksel M, Ercan F. Alpha-Lipoic Acid Improves Acetic Acid-Induced Gastric Ulcer Healing in Rats. *Springer Science* vol.32, february 2009
 102. Dong-yun Shia, Hong-lei Liub, Jeremy S. Stern. Alpha-lipoic acid induces apoptosis in hepatoma cells via the PTEN/Akt pathway. *FEBS Letters* 582 (2008) 1667–1671
 103. Lee B. W, Kwon S. J, Chae H. Y. Dose-related cytoprotective effect of a-lipoic acid on hydrogen peroxide-induced oxidative stress to pancreatic beta cells. *Free Radical Research*, January 2009; 43(1): 68_77
 104. Meng X, Li Z.M, Zhou Y.J. Effect of the antioxidant a-lipoic acid on apoptosis in human umbilical vein endothelial cells induced by high glucose. *Clin Exp Med* (2008) 8:43–49
 105. Hürdağ C, Uyaner İ, Gürel E. The effect of a-lipoic acid on NOS dispersion in the lung of streptozotocin-induced diabetic rats. *Journal of Diabetes and Its Complications* 22 (2008) 56– 61
 106. Sklyarov A.YA, Panasyuk N.B, Fomenko I.S. Role of Nitric Oxide-Synthase and Cyclooxygenase/Lipoxygenase Systems in Development of Experimental Ulcerative Colitis. *Journal of Physiology and Pharmacology* 2011,62,1,65-73
 107. Elena Dozio E, Massimiliano Ruscica b,1, Luca Passafaro. The natural antioxidant alpha-lipoic acid induces p27Kip1-dependent cell cycle arrest and

- apoptosis in MCF-7 human breast cancer cells. *European Journal of Pharmacology* 641 (2010) 29–34
108. Eren F, Akkiprik M, Atuğ Ö. R72P Polymorphism of TP53 in Ulcerative Colitis Patients is Associated with the Incidence of Colectomy, Use of Steroids and the Presence of a Positive Family History. *Pathol. Oncol. Res.* (2010) 16:563–568
109. Venkata S.Kotakadiy, Yu Jiny, Anne B.Hofseth. Ginkgo biloba extract EGb 761 has anti-inflammatory properties and ameliorates colitis in mice by driving effector T cell apoptosis. *Carcinogenesis* vol.29 no.9 pp.1799–1806, 2008
110. Kınacı K. İskemi/Reperfüzyon hasarı oluşturulan sıçan böbrek dokusunda Quercetin'in apoptozis ve Real-Time PCR ile tayin edilen iNOS gen ifadesi üzerine etkisi. *Fizyoloji Anabilimdalı Yüksek lisans Tezi. Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Eskişehir,2008*

