T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

1. Tez Yöneticisi
Prof. Dr. Dikmen DÖKMECİ
2. Tez Yöneticisi
Yrd. Doç. Dr. Özgür GÜNDÜZ

DENEYSEL ARTRİT MODELİNDE HEDERA HELİX FOLİUM EKSTRESİ (PROSPAN®) İLE TEDAVİNİN ETKİSİ

(Yüksek Lisans Tezi)

Fatma ÇİÇEK YOLLU

EDİRNE-2015

T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

1. Tez Yöneticisi
Prof. Dr. Dikmen DÖKMECİ
2. Tez Yöneticisi
Yrd. Doç. Dr. Özgür GÜNDÜZ

DENEYSEL ARTRİT MODELİNDE HEDERA HELİX FOLİUM EKSTRESİ (PROSPAN®) İLE TEDAVİNİN ETKİSİ

(Yüksek Lisans Tezi)

Fatma ÇİÇEK YOLLU

Destekleyen Kurum: TÜBAP-2012/198

Tez No:

EDİRNE-2015

TEŞEKKÜRLER

Yüksek lisans eğitimimde ve tez çalışmamda değerli katkıları olan danışman hocam Prof. Dr. Dikmen DÖKMECİ'ye; ayrıca Yrd. Doç. Dr. Özgür GÜNDÜZ, Prof. Dr. Ufuk USTA, Prof. Dr. Hakan ERBAŞ, Prof. Dr. Ahmet ULUGÖL, Prof. Dr. Ç. Hakan KARADAĞ, Prof. Dr. Nurettin AYDOĞDU, Yrd. Doç. Dr. F. Nesrin TURAN, bölüm sekreteri Gülçin AKIN ve desteklerinden dolayı TÜBAP birimine teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

GİRİŞ VE AMAÇ 1

GENEL BİLGİLER 3

- **ROMATOİD ARTRİT** 3
- **SERBEST RADİKALLER** 11
- **ANTİOKSİDAN SAVUNMA SİSTEMLERİ** 15
- **SİTOKİNLER** 17
- **HEDERA HELİX FOLİUM EKSTRESİ (PROSPAN®)** 19

GEREÇ VE YÖNTEMLER 22

BULGULAR 37

TARTIŞMA 57

SONUÇLAR 63

ÖZET 65

SUMMARY 66

KAYNAKLAR 68

ŞEKİLLER LİSTESİ 76

ÖZGEÇMİŞ 78

SİMGE VE KISALTMALAR

ARA	:	Amerikan Romatizma Derneği
α	:	Alfa
β	:	Beta
DİF	:	Distal interfalanjial
ELISA	:	Enzyme-linked immunosorbent assay
FCA	:	Freund's Complete Adjuvant
GSH-Px	:	Glutatyon peroksidaz
HE	:	Hematoksilen eozin
HLA	:	Human lökosit antijen
H_2O_2	:	Hidrojen peroksit
IL	:	İnterlökin
MDA	:	Malondialdehit
MTF	:	Metatarsofalanjial
NSAİİ	:	Nonsteroid antiinflamatuvar ilaçlar
O_2	:	Oksijen
PAM	:	Pressure application measurement
PİF	:	Proksimal interfalanjial
RA	:	Romatoid artrit
RF	:	Romatoid faktör
ROS	:	Reaktif oksijen türleri

SOD	:	Süperoksit dismutaz
TBA	:	Tiyobarbitürik asit
TMB	:	Tetrametil-benzidin
TNF	:	Tümör nekroz faktör
VEGF	:	Vascular endothelial growth factor

GİRİŞ VE AMAÇ

Romatoid artrit (RA), sinovyal eklemlerde inflamasyon (şişme, hareket zorluğu ve ağrı) ile tanımlanan sistemik etkilere yol açan kronik inflamatuvar bir hastalıktır. Toplumda görülme sıklığı %1 oranındadır (1-5).

Erken dönemde gece ve sabahları eklem ağrıları, sabahları 15 dakikayı geçen eklem katılığı görülür. İleri dönemde ise eklemlerde şişme, ağrı ve yorgunluk ile başlayıp şekil bozuklukları ile seyreder. RA eklemler dışında cildi, tükrük ve gözyaşı bezlerini, solunum, kardiyovasküler ve görme sistemini etkileyebilir (1-5).

Romatoid artrit hastalığının patogenezinde hastalık gelişimine etkisi bilinen iki önemli sitokin tümör nekroz faktör (TNF) alfa (α) ve interlökin (IL)-1'dir. TNFα inflamasyonun devamlılığını sağlarken; IL-1, kıkırdak ve kemiğin yıkımından sorumludur (4,5).

Hedera helix folium, *Araliaceae* familyasından Hedera cinsine aittir. İngiliz sarmaşığı olarak da bilinir ve her zaman yeşil bir bitkidir. Yapraklarında bulunan saponin bileşikleri alyuvarları parçalarlar. Özellikle patojenlerle mücadele için kullanılmaktadır. Bu etkinliğin sebebi funguslar için antibiyotik özelliklere sahip hederin saponinlerdir. İlk kez 1950 yılında Prospan® ismiyle kullanılmaya başlanmıştır. Avrupa İlaç Değerlendirme Ajansı 2010 verilerine göre bu bitkinin yaprakları İtalya'da yakı olarak kullanılabilmektedir. Özellikle 2005'te Rooney ve Ryan Hedera helix ekstraktlarından elde edilen α-hederin saponinin kanserli hücreler üzerindeki etkisini incelemişlerdir (6). Günümüze kadar bu bitkinin ekstraktlarının antiinflamatuvar, antioksidan, antispazmodik, antialerjik ve antitümör özellikleri konusunda birçok çalışma yapılmıştır (7-10).

Bu çalışmada, Hedera helix folium ekstresi (Prospan®) uygulamasının sıçanlarda deneysel olarak oluşturulan artrit modelinde etkisi olup olmadığını, etkisi varsa kısa vadede bu etkinin mekanizmasını açıklamaya yönelik, uzun vadede de artrit hastalarında tedavi amaçlı kullanılabilmesi yönünde veriler elde etmeyi amaçladık.

GENEL BİLGİLER

ROMATOİD ARTRİT

Romatoid artrit; etyolojisi belli olmayan, birçok eklemi özellikle diartrodial eklemleri tutan ve şekil bozuklukları ile seyreden, tüm ırk ve etnik gruplarda görülebilen, destrüksiyon yapan kronik, ağrılı, multisistemik, eroziv ve inflamatuvar bir otoimmün hastalıktır. Eklem tutulumu şekil bozukluğu yaparak zamanla ciddi deformite ve sakatlanmalara yol açar. Genellikle alevlenmelerle başlayıp uygulanan tedaviye rağmen kronikleşerek erken mortalite ve morbiditeye neden olur (11-15).

Hastalık sadece kas ve iskelet sisteminde kısıtlı kalmayıp; kalp-damar, akciğer ve sinir sistemi gibi hayati önem taşıyan tüm sistemleri de etkileyerek hastaların yaşam sürelerini kısaltmaktadır (16).

En sık görülen iltihabi hastalıkların başında gelen RA'nın tüm toplumlarda görülme prevelansı %0,5-1 arasında değişmektedir. Dünyada tüm ırklarda görülmekle birlikte kadınlarda görülme sıklığı erkeklere oranla 3 kat daha fazladır. En sık 30 ile 50 yaş aralığında görülür (17-19).

Etyoloji

Romatoid artritin etyolojisi tam olarak bilinmemekle birlikte genetik, travma, stres, cinsiyet, çevresel, psikososyal, nütrisyonel, hormonal ve enfeksiyöz ajanlar gibi birçok faktörün üzerinde durulduğu çok nedenli bir hastalık olduğu kabul edilir (19).

1) Genetik yatkınlık: Genetik hastalığın şiddetinin ve RA'ya yatkınlığının belirlenmesinde önemli rol oynamaktadır**.** Hastalık aynı aile içinde birden çok kişide

görülmekle birlikte birinci derece akrabalarda yaklaşık 5 kat daha fazla görülmektedir. Tek yumurta ikizlerinde de görülme sıklığı çift yumurta ikizlerine oranla 4 kat fazla bulunmuştur (20,21). Bu sonuçlar RA gelişiminde genetik faktörlerin çevresel faktörlere göre daha etkili olduğunu göstermektedir. RA'ya yatkınlık gösteren genlerin başında *Human leucocyte antigen* (HLA) DR4 ve HLA DR1 gelmektedir. HLA DR4 geni en az 22 alelden oluşmaktadır. Bu alellerden RA ile ilişkili olanların hepsinde benzer aminoasit dizilimi gösteren bir bölge olduğu görülmüştür. Bu bölge HLA DR4'ün alt gruplarından olan DRB molekülün 67-74 aminoasitleri arasında bulunur ve ortak epitop ismini alır. Bugün için RA'nın genetik yatkınlığını oluşturan ortak epitop bölgesidir. Ayrıca RA ile ilişkili aynı alelleri taşıyan bireylerde hastalığın daha ağır seyrettiğini gösteren çalışmalar da mevcuttur (22-24).

2) Çevresel faktörler: RA gelişiminde genetik faktörlere ilaveten çevresel faktörler de önemlidir. Sigara kullanımı, RA gelişimine neden olan en önemli risk faktörlerinden birisidir. Rubella, parvovirüs B19, Epstein-Barr virüsü gibi enfeksiyöz ajanlarla ilgili çalışmalar da ileri sürülmüş fakat kesin bir ilişki bulunamamıştır (25-27).

Kadınlarda RA erkeklere oranla 3 kat fazla görülmektedir. Cinsiyet farkının nedeni bilinmemekle birlikte hastalığın nedeninin hormonlarla ilişkili olduğu düşünülmektedir. Ayrıca oral kontraseptiflerin kullanımının RA riskini azalttığı bildirilmiş olup; RA'nın hamilelikte remisyona girmesine rağmen postmenapozal dönemde alevlendiği ileri sürülmüştür (28-31).

Patogenez

Romatoid artritin patogenezinde hem hümoral hem de hücresel bağışıklık mekanizmaların rol oynadığına ilişkin birçok kanıt mevcuttur. Hastalığı başlatan olaylar henüz bilinmemektedir. RA patogenezinde etkili olan otoimmün bir süreç tanımlanmıştır (32,33).

Otoimmün süreç, immün sistem hücreleri (T ve B lenfositler) ile makrofajların eklem üzerindeki etkilerine bağlıdır. Antijen spesifik ve çoğunluğu CD4 pozitif olan T lenfositleri; tip A sinoviyosit, makrofajlar, dendritik hücreler ve B lenfositler gibi DR pozitif hücreler tarafından kendilerine sunulan antijenler ile aktive olmaktadırlar. Birbirleri ile ilişkiye giren bu hücreler, değişik proinflamatuvar sitokinler salgılayarak; sinovyal hiperplazi ve inflamasyonla birlikte özellikle makrofaj benzeri (tip A sinoviyal) ve fibroblast benzeri (tip B sinovyal) sinoviyositler artar. Bu artışın ardından

sinoviyositlerin infiltrasyonu ve yayılması, lökositlerin retansiyonu ve anjiogenezin ardından pannus formasyonu oluşarak kıkırdak ve kemik harabiyeti meydana gelir (34-37).

Kıkırdak ve kemik harabiyetine neden olan sitokinlerden en önemlileri, IL-1 beta (β), IL-12, interferon gama ve TNFα'dır. Nitekim tedaviye girmiş olan anti-sitokin ajanların temel hedefleri proinflamatuvar T helper-1 yanıtını engellemeye dayanır (35,37).

Hümoral sistem aktivasyonunun kanıtları ise sinovyumda romatoid faktör (RF)'ün bulunması, immün komplekslerin oluşumu ve kompleman aktivasyonudur. Ayrıca B lenfosit yüzey antijeni olan CD20'ye karşı geliştirilmiş antikorların RA tedavisinde başarılı bulunması da B lenfositlerin hastalık patogenezinde önemli bir rolü olduğunu gösterir (35).

Romatoid artrit patogenezinde oksijen metabolizması da çok önemlidir. Reaktif oksijen türleri (ROS)'nin oluşumu ve canlı organizmanın normalde üretebileceğinden fazla oksidan üretmesine "oksidatif stres" denir. Aşırı ROS üretimi protein, lipid, nükleik asid ve DNA koenzim gibi biyolojik materyallerde hasara neden olmaktadır. Nükleer faktör-kappa B, hücresel oksijenasyonu ve sitokin stimülasyonunu düzenleyen anahtar bir faktördür (33,38).

Patoloji

Romatoid artrit ile ilgili histopatolojik değişiklikler sinoviyal zar içeren tüm eklemler, tendon kılıfları ve bursalarda görülür. RA patolojisinde inflame olmuş sinoviyum vardır. Primer dönemde romatoid sinovyumunda ilk olarak sinoviyal dolaşımında tıkanma ve hücreler arası artış meydana gelir. Önce T hücrelerinde sonra makrofajlar ve bunların salgıladığı sitokinlerde artış olup sinoviyumda inflamasyon artar. Hastalık ilerledikçe sinoviyum değişikliğe uğrar (14,28,33). Değişiklik, sinovyal hücrelerde kronik iltihaba bağlı hipertrofi ve çoğunlukla nötrofillerden oluşan infiltrasyondur. Zamanla hücresel elemanların prolifere olması sonucu hipertrofiye olan sinoviyum villöz bir hal alır ve kıkırdak içine parmak gibi uzanan "pannus" adı verilen oluşum gelişir. Anjiogenez, pannus oluşumundan sonra makrofaj ve mast hücreleri gibi inflamatuvar hücrelerin romatoid sinoviyum içine salgıladıkları vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF), TNFα ve bazı adhezyon molekülleri tarafından tetiklenmektedir. Anjiogenez, inflamasyonun kronik hale gelmesinde rol almakla birlikte eklem harabiyetine de neden olur (37,39,40).

Klinik Bulgular

1) Eklem bulguları: Hastaların yaklaşık %70'inde sinsi bir başlangıç söz konusudur. Bu süre içinde hafif bir ateş ile birlikte halsizlik, yorgunluk, kilo kaybı ve küçük eklemlerde ağrı görülür. Hastaların eklem ağrısı dışında önemli bir yakınması da uyku veya uzun istirahat dönemi sonrası eklem ve çevrelerinde oluşan sabah tutukluğu olarak adlandırılan sertlik hissidir. Bu sertlik hissi aktif hastalık döneminde geç saatlere kadar devam edebilir. Sabah tutukluğuna ilaveten şişlik ve eklem tutulumları görülür. En çok tutulan eklemlerin başında metakarpofalanjial (MKF), el bilekleri, proksimal interfalanjial (PİF) eklemler gelir. Dizler, dirsekler, metatarsofalanjial (MTF) eklemlerde de görülme oranı yüksektir (32,33,36,37).

Kalça, omuz, ayak bilekleri ve servikal bölgede (özellikle C1 ve C2) tutulum daha az olmasına rağmen dorsal, lomber vertebralar, sakroiliak ve distal interfalanjial (DİF) eklemlerde tutulum olmaz. Eklem tutulumu simetriktir (41).

Büyük eklem tutulumları hastalığın ilerleyen evrelerinde daha çok görülmeye başlar. Ellerde hastalığın her evresinde tutulum gözlenir. Kıkırdak ve kemik dokuda inflamasyon, sekonder yıkım, tendonlarda gevşeme ile hareket kısıtlılığına, ellerde deformiteye ve medyan sinir sıkışmasına (karpal tünel sendromu) neden olabilir. (32,33).

İlerlemiş evrelerde parmaklarda görülen belirgin deformitelerin başında düğme iliği deformitesi, ulnar deviasyon, kuğu boynu deformitesi ve başparmakta Z deformitesi gelir (13). Kuğu boynu deformitesi; PİF eklemlerde hiperekstansiyon ve DİF eklemlerinde fleksiyon ile kendini belli eder. Bu olayın tam tersi düğme iliği deformitesi oluşmasına neden olur (36,37,40).

Metakarpofalanjial eklemlerinin tutulması sonucu metatars başlarının süblüksasyonu sonucu, ayak dorsaline doğru gelişerek yürüme ve ayakkabı kullanmayı olumsuz etkileyen "çekiç parmak" veya "pençe parmak" denen deformiteler görülebilir (41).

Dizler, RA'da tutulan ve sinoviyal sıvı fazlalığının hemen fark edildiği eklemdir. Diz tutulumu başlandıktan kısa bir süre sonra dizin tam ekstansiyonunda kısıtlama meydana gelir ve zamanla "Baker kisti " denen yapı oluşabilir (33).

2) Eklem dışı bulgular: RA, sistemik inflamatuvar bir hastalık olup birçok eklem dışı bulgusu vardır. Genel olarak eklem dışı tutulum hastalığın süresi ve

şiddeti ile ilgilidir. Ciddi eklem dışı tutulum mortalitenin en önemli bulgusudur (24,33,37).

a) Hematolojik bulgular: En klasik bulguların başında hastalık aktivasyonu ile ilişkili kronik hastalık anemisi vardır. Demir kullanımının bozulması, inefektif eritropoez, eritrosit yaşam süresinin kısalması, eritropoietin seviyesinde ve kemik iliğinin eritropoietine duyarlılığında azalma bu anemide rol oynar (19,24).

Anemi, beslenme bozukluğuna ilaveten gastrointestinal sistem kanaması geçirmiş ve progresif hastalığı olanlarda daha ağır seyreder. Serum demir ve transferrin düzeyi düşüktür. Poliartiküler tutulumu olanlarda trombositoz vardır (40).

b) Nodüller: Derialtı nodülleri, RA'nın tipik karakteristik bulgularından birisidir. Vakaların %15'inde özellikle RF'si pozitif olan olgularda ağrısız, birkaç mm'den birkaç cm'ye kadar değişen boyutta sıklıkla alttaki periosta yapışık ve sert kıvamda şişliklerdir. Genelde basınç altında kalan dirsek ekstansör yüzeyi, el sırtı, oksipital bölge, sakrum ve aşil tendonunda daha sık görülür. Hastalığın aktif döneminde görülen bu bulgular hastalığın remisyon döneminde kaybolabilir (40,41).

c) Akciğer bulguları: RA solunum sistemini tutabilir. RA'da görülebilen akciğer hastalıkları şunlardır: 1) Plörezi 2) İnterstisyel akciğer fibrozu 3) İntrapulmoner romatoid nodüller 4) Bronşiolit 5) Pulmoner hipertansiyona yol açan arterit 6) Küçük hava yolu hastalığı

Plörezi, hastalığın ilk belirtisi olup asemptomatiktir. Ayırıcı tanıda zorluğa yol açar. Plevra sıvısı, hücre sayısı düşük, lenfosit hâkimiyeti gösteren, düşük glikoz düzeyi ve RF içeren eksuda şeklindedir. Parankimal tutulum için en klasik örnek interstisyel akciğer fibrozudur ve geç ortaya çıkar (32,33).

Bronşiolit, akciğer tutulumununda nadir görülür ve hızlı ilerler. Pulmoner nodül ise kömür tozu ile çalışan işçilerde daha çok görülür. Pulmoner arterit, romatoid vaskülit sonucu gelişir ve ağır prognozludur (32,40).

d) Kalp bulguları: En sık gözlenen kardiyak bulgu perikarditttir. Asemptomatiktir ve hastalığın süresi ile ilişkisizdir. Hastalığın ilk belirtisi olabilir (37).

e) Dolaşım bulguları: RA arteryal elastikiyeti azaltır. Vaskülitli vakalar genellikle seropozitifli hastalarda gözlenir ve RF seviyeleri yüksektir. Vaskülit değişik tipte olabilir. En çok tırnak dibi kapillerinde tromboz, parmak uçlarında infarktlar ve bacak ülserleri şeklinde görülebilir (32,37).

f) Nörolojik bulgular: RA'da nörolojik komplikasyonlar daha çok periferik sinirleri etkiler. Mekanik nedenlere bağlı olarak gelişen nöropatiler olarak karşımıza çıkar. Bası nöropatisi de nörolojik tutulumlar arasındadır. Ekleme yakın bölgelerde tendonlarda oluşan ödem ve yangı basıya neden olur. "Karpal tünel sendromu" RA'lı vakalarda en sık rastlanan bası nöropatisidir ve hastalığın erken döneminden itibaren oluşabilir (40). RA'da nadir olarak servikal tutuluma bağlı servikal nöropati, baş-boyun ağrıları, radikülonöritler (sıkışma) görülebilir (41).

g) Göz bulguları: *Keratokonjonktivit sikka* RA'da en sık görülen göz bulgusudur. Lakrimal bezde, lenfosit infiltrasyonu ile birlikte gözyaşı salgısı azalmıştır. Bu olay "sikka sendromu" adını alır. RA ile birlikteliği "Sjögren sendromu"nu oluşturur (32,33).

h) Kas-isket sistemi bulguları: RA'lı hastaların çoğunda kaslarda güçsüzlük söz konusudur. Ekleme yakın kaslarda kısa sürede gerçekleşen kas atrofisi sık görülür. Lenfositik nodüller ve infiltrasyon, artrite bağlı kas nekrozları ve dejenerasyonla seyreden bir miyopati görülebilir. RA'da kemik tutulumu daha çok eklemler civarındaki değişiklikler şeklinde olur. Periartriküler osteoporoz en sık rastlanan bir komplikasyondur (37,40).

ı) Lenf düğümleri, dalak ve karaciğer bulguları: Lenfoadenomegali, daha çok eklemlere yakın, bölgesel, ağrısız ve orta sertliktedir. Ayrıca RA'da lenfoma sıklığı yüksektir. Splenomegali daha çok erişkinlerde görülmektedir (33).

Geç dönem komplikasyonlarından biri olan Felty sendromu ise ağır RA'lı hastalarda lökopeni ve splenomegali ile karakterizedir (33).

i) Böbrek bulguları: Renal tutulum RA'da nadirdir. Düşük dereceli glomerulonefrit, vaskülit ve amiloidoz görülebilir (33).

Laboratuvar ve Radyolojik Bulgular

Laboratuvar bulguları nonspesifiktir. Klinik belirti ve bulgulara göre konulan tanıyı desteklemede veya hastalığın gidişini değerlendirmede kullanılır. En sık görülen laboratuvar bozukluğu RF pozitifliğidir ve hastaların %80'inde mevcuttur. RF, IgG'nin Fc bölümüne karşı gelişmiş antikorlardan (IgM, IgG ve IgA tipinde) oluşmaktadır. RF'nin patogenezde rolü bilinmemekle birlikte eklem dışı tutulum ile ilişkilidir. RF yalnız RA'ya özgül olmayıp otoimmün diğer hastalıklar ve bazı malignitelerde de bulunabilir (33,38).

Romatoid artritte aynı zamanda birçok otoantikor bulunabilir. Örneğin; anti-keratin antikorlar RA'ya özgündür ve %30 hastada da anti-nükleer antikor bulunabilmektedir (28,30).

Hastaların çoğunda kronik hastalık anemisi mevcuttur. Eritrosit sedimantasyon hızı ve C-reaktif protein hastalık aktivitesi ile paralel bir artış gösterir. Lökosit sayısı artmış veya azalmış olabilir. RA'ya özgün sinovyal sıvı bulgusu bulunmamaktadır (33,36)

Radyolojik belirtiler olarak ise; en erken olarak eklem çevresinde yumuşak doku şişliği, juksta-artiküler osteoporoz ve erozyon görülür. Geç dönemde yumuşak doku şişliği azalır, eklem aralığı azalır ve diffüz osteoporoz oluşur (33-35).

Romatoid Artritte Tanı Kriterleri

Romatoid artrit klinik tanı gerektiren bir hastalıktır ve hastalığın erken dönemlerinde tanı, diğer hastalıkların dışlanması ile konur (33). Her ne kadar simetrik eklem tutulumu ve RF pozitifliği ayırıcı tanıda yardımcı olsalar da, sistemik lupus eritematozus, sedef artriti gibi hastalıklar, rubella, hepatit gibi viral enfeksiyonlar, yaşlılıkta yaygın osteoartroz, poliartiküler gut hastalığı RA ile karıştırılabilir. Bu nedenle 6-8 haftadan daha kısa süreli belirti ve bulgularla gelen hastalarda kesin tanı koymaktan kaçınılmalıdır (19,22,23). Amerikan Romatizma Derneği (ARA)'nin 1987 yılında geliştirdiği tanı kriterleri bugün için RA'yı en iyi tanımlayan bir araç olarak görülmektedir (41). Kesin tanı koyulurken bu kriterlerin en az 4 tanesinin bulunması ve hasta yakınmalarının 6 haftadır devam ediyor olması gerekir (32,39,41).

1987 ARA kriterleri:

1) Sabah tutukluğu: En az bir saat sürmeli

2) Üçten daha fazla eklem bölgesinin tutulumu: Doktor tarafından görülen yumuşak doku şişliği

3) El eklemlerinin tutulumu

4) Simetrik artrit

5) Romatoid nodül

6) RF pozitifliği

7) Özellikle el ve bilek eklemlerinde röntgende erozyonlar (42).

Tedavi

Romatoid artritte tedavinin amacı, geleneksel olarak ağrıyı dindirmek, eklem harabiyetini ve diğer komplikasyonları önlemek ve hastaların günlük yaşam aktivitelerini sürdürmesini sağlamak şeklinde söyleyebiliriz (43,44). Bu amaçla ilaç tedavisi dışında hasta eğitimi ve düzenli kontroller yanında tıbbın birçok dalı arasında iş birliği şarttır (33).

Günümüzde çok geniş ilaç grupları ve biyolojik ilaçlar tedavide kullanılmasına karşın hastalıkta tam bir remisyon sağlanamamaktadır. RA tedavisinde kullanılan ilaçları, a) Nonsteroid antiinflamatuvar ilaçlar (NSAİİ) b) Kortizon c) Hastalığın seyrini değiştiren ilaçlar olarak özetlemek mümkündür. Tedavi bu ilaçların bir arada kullanılmasından ibarettir (19,33).

Nonsteroid antiinflamatuvar ilaçlar, sabah tutukluğunu ve eklem ağrısını gidermede oldukça etkilidir. İlk bilinen NSAİİ aspirindir. Daha sonra en çok kullanılan, ibuprofendir. NSAİİ'lar genelde her RA hastasına uzun süreli olarak kullanılmasına karşın hastalığın seyrini değiştirmezler (32,33). En önemli yan etkileri gastrik iritasyondur (24,32).

Kortizon ilaçlarından prednizalon, erozyon gelişmesini önlemektedir ve kısa süreli hastalığın alevlenme dönemlerinde kullanılmaktadır (33).

Hastalığın seyrini değiştiren ilaçlardan özellikle metotreksat ve hidroksiklorokin en çok kullanılan ilaçlardandır. RA'da erozyon ve inflamasyonu yavaşlatarak hastalığın seyrini değiştirirler (32,36). Metotreksat bir folik asit antagonisti olduğundan kullanılırken folik asit ile birlikte alınmalıdır. Böylece folik asit, metotreksatın yan etkilerini (bulantı, kusma, kemik iliği baskılanmasını) azaltır (19).

Romatoid artrit tedavisinde kullanılan hiçbir ilaç, yeni geliştirilenler de dahil olmak üzere hastalığı tamamen ortadan kaldıramamaktadır. Bu yüzden RA tedavisi hakkında çok fazla sayıda çeşitli çalışmalar yapılmaktadır. Çalışmaların çoğunda hayvanlarda oluşturulan deneysel artrit modellerinden yararlanılmaktadır (33).

Adjuvant artrit, hücresel immün yanıtla oluşması ve histopatolojik görünümlerinin benzerliği nedeniyle RA modeli olarak sıklıkla kullanılmaktadır. Adjuvant artrit, ısıda öldürülmüş ve kurutulmuş *Mycobacterium tuberculosis* içeren sıvı parafin emülsiyonunun *(Freund's Complete Adjuvant, FCA*) deney hayvanlarına injeksiyonu ile oluşturulur (33,45).

SERBEST RADİKALLER

Serbest radikaller, eşleşmemiş elektron içeren yüksek enerjili stabil olmayan atom veya moleküllerdir. Demir, bakır, manganez geçiş metalleri de eşlenmemiş elektronlara sahip oldukları halde serbest radikal olarak kabul edilmezler, fakat serbest radikal oluşumunda önemli rol oynarlar. Serbest radikaller, tek elektronu ile birlikte pozitif yüklü, negatif yüklü veya yüksüz olabilirler (43,46-48).

Serbest radikal tanımına göre moleküler oksijen, biradikal olarak değerlendirilir. Biradikal oksijen, radikal olmayan maddelerle yavaş reaksiyona girmesine rağmen diğer serbest radikallerle kolayca reaksiyona girer. Moleküler oksijen, biradikal doğasının bir sonucu olarak yüksek derecede ROS oluşturma eğilimindedir. Serbest radikaller, homolitik bağ kırılması (bağı oluşturan iki elektrondan her birinin tek olarak bir atom üzerinde kalması) veya elektron transfer reaksiyonları sonucu oluşurlar (43,47,48).

Serbest radikalde bulunan çiftlenmemiş tek elektron, serbest radikallere büyük bir reaktiflik kazandırarak protein, lipid, DNA ve nükleotid koenzimler gibi birçok biyolojik materyale zarar vermelerine neden olmaktadır. Bu zararın yaşlanmayı teşvik ettiği ve kalp-damar hastalıkları, çeşitli kanser türleri, katarakt, bağışıklık sisteminde zayıflama ve sinir sistemi dejenaratif hastalıkları gibi birçok hastalığa neden olduğuna dair bilgiler bulunmaktadır (2,38,43).

Canlı hücrelerdeki oksijen metabolizması, çevre kirleticileri, radyasyon, pestisitler, çeşitli tıbbi tedavi yolları ve kontamine sular gibi birçok etmen ROS'ların oluşumuna yol açmaktadır (43,46).

Reaktif oksijen türleri de çeşitli serbest radikallerin oluştuğu serbest radikal zincir reaksiyonlarını başlatabilirler ve hücrede karbon merkezli organik radikaller (R), peroksit radikalleri (ROO), alkoksi radikalleri (RO), tiyol radikalleri (RS), sülfenil radikalleri (RSO), tiyol peroksit radikalleri (RSO_2) gibi çeşitli serbest radikallerin oluşumuna neden olurlar (43,46).

Reaktif oksijen türleri, normal oksijen metabolizması sırasında az miktarda oluşan süperoksit radikali ($O_2^{\cdot -}$), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve hidroksil radikali ($OH^{\bullet}$)' dir (43,46-48).

Süperoksit Radikali

Süperoksit radikali, tüm aerobik hücrelerde moleküler oksijenin (O_2) bir elektron alarak indirgenmesi sonucu oluşur. İndirgenmiş geçiş metallerinin otooksidasyonu süperoksit radikali meydana getirebilir (49).

$$Fe^{+2} + O^{+2} \leftrightarrow Fe^{+3} + O_2^{-}$$

$$Cu^{+2} + O^{+2} \leftrightarrow Cu^{+2} + O_2^{-}$$

Süperoksit radikali kendisi direkt olarak zarar vermez. Bu radikal anyonun asıl önemi, H_2O_2 kaynağı olması ve geçiş metalleri iyonlarının indirgeyicisi olmasıdır (43).

Süperoksit radikalinin fizyolojik bir serbest radikal olan nitrik oksit (NO) ile birleşmesi sonucu peroksinitrit (ONOO) meydana gelir. Peroksinitrit, nitrit (NO_2) ve nitrat (NO_3) oluşturmak üzere metabolize edilir. Peroksinitrit, azot dioksit (NO_2), hidroksil radikali (OH), nitronyum iyonu (NO_2) gibi toksik ürünlere dönüşebilir ki NO'nun zararlı etkilerinden peroksinitrit sorumludur (43,44,46,49).

Hidrojen Peroksit

Hidrojen peroksit, O_2^{-} çevresindeki moleküllerden bir elektron alması veya moleküler oksijenin çevresindeki moleküllerden iki elektron alması sonucu oluşan peroksitin iki proton (H) ile birleşmesi sonucu meydana gelir (47,49).

Bu reaksiyon, radikal olmayan ürünler meydana geldiğinden dismutasyon reaksiyonu olarak bilinir, ya spontan gerçekleşir ya da süperoksit dismutaz (SOD) enzimi tarafından katalizlenir (47).

Hidrojen peroksit bir serbest radikal olmadığı halde ROS kapsamına girer ve serbest radikal biyokimyasında önemli bir rol oynar (44).

Hidroksil Radikali

Hidroksil radikali, Fenton reaksiyonu ve Haber-Weiss reaksiyonu sonucu H_2O_2'den oluşmaktadır. Ayrıca suyun yüksek enerjili iyonize edici radyasyona maruz kalması sonucunda oluşur. OH son derece reaktif bir oksidan radikaldir ve yarılanma ömrü çok kısadır (31,36,39).

Hidroksil radikali olasılıkla ROS'un en güçlüsüdür. Oluştuğu yerde tiyoller ve yağ asitleri gibi çeşitli moleküllerden bir proton koparak tiyil radikalleri (RS), karbon

merkezli organik radikaller (R), organik peroksitler (RCOO) gibi yeni radikallerin oluşmasına ve sonuçta büyük hasara neden olur (46,49).

Singlet Oksijen

Singlet oksijen, eşleşmemiş elektronu olmadığı için radikal olmayan reaktif oksijen molekülüdür. Serbest radikal reaksiyonlarının oluşmasına neden olur (43).

Malondialdehit

Üç veya daha fazla çift bağ içeren yağ asitlerinin peroksidasyonunda malondialdehit (MDA) meydana gelir. MDA kanda ve idrarda ortaya çıkar, yağ asidi oksidasyonunun spesifik ya da kantitatif bir indikatörü olmamakla beraber lipid peroksidasyonunun derecesiyle iyi korelasyon gösterir. Bu nedenle biyolojik materyalde MDA ölçülmesi lipid peroksit seviyelerinin indikatörü olarak kullanılır. En yaygın olarak tiyobarbitürik asit (TBA) yöntemiyle ölçülür (43).

Serbest Radikallerin Etkileri

Reaktif oksijen türlerinin oluşumu, inflamasyon, radyasyon, yaşlanma, kimyasal maddeler, yüksek parsiyel oksijen basıncı, ozon, azot dioksit ve ilaçlar gibi bazı uyarıların etkisiyle artar. Serbest radikaller hücrelerin lipit, protein, karbonhidrat, DNA ve enzim gibi bileşiklerine etki ederler (50).

Serbest oksijen radikallerinin tüm bu etkilerinin sonucu olarak hücre hasarı meydana gelir. ROS'un ve serbest radikallerin artışı hücre hasarının önemli bir nedenidir (43).

Serbest oksijen radikallerinin neden olduğu hücre hasarının birçok kronik hastalığın komplikasyonlarına katkıda bulunduğu düşünülmektedir. Aterogenez, amfizem/bronşit, Parkinson hastalığı, Duchenne tipi musküler distrofi, gebelik preeklampsisi, serviks kanseri, alkolik karaciğer hastalığı, hemodiyaliz hastaları, diyabetes mellitus, akut renal yetmezlik, Down sendromu, yaşlanma, retrolental fibroplazi, serebrovasküler bozukluklar, iskemi, reperfüzyon hasarı gibi durumlarda serbest oksijen radikallerinin neden olduğu hücre hasarı söz konusudur (2,43,50).

Serbest radikallerin lipitlere etkileri: Lipitler serbest radikallerin etkilerine karşı en hassas olan moleküllerdir. Membran kolestrolü ve yağ asitlerinin doymamış bağları serbest radikallerle reaksiyona girerek peroksidasyona uğrarlar (46,47).

Poliansatüre yağ asitlerinin oksidatif yıkımı lipit peroksidasyonu olarak bilinir. Lipit peroksidasyonu kendini devam ettiren zincir reaksiyonu şeklinde ilerler ve oldukça zararlıdır. Serbest radikallerin neden olduğu lipit peroksidasyonuna "nonenzimatik lipit peroksidasyonu" denir (49,50).

Üç veya daha fazla çift bağ içeren yağ asitlerinin peroksidasyonu sonucu, MDA oluşur. Küçük bir molekül olan MDA, kolay difüzlenebildiği için DNA bazları ile rahatlıkla reaksiyona girer. Bütün bu olumsuz etkiler, MDA'ya mutajenik, genotoksik ve kanserojenik bir özellik verir. Böylece doku hasarına ve birçok hastalığa neden olur (49,50).

Serbest radikallerin proteinlere etkileri: Proteinler, serbest radikallere karşı poliansatüre yağ asitlerinden daha az hassastırlar. Proteinlerin serbest radikal harabiyetinden etkilenme derecesi amino asit kompozisyonlarına bağlıdır. Doymamış bağ ve kükürt içeren triptofan, tirozin, fenilalanin, histidin, metiyonin, sistein gibi amino asitlere sahip proteinler serbest radikallere karşı daha duyarlıdır ve kolay etkilenirler. Bu etki sonucunda özellikle sülfür radikalleri ve karbon merkezli organik radikaller oluşur. Böylece albümin, immünglobulin gibi çok fazla sayıda disülfit bağı bulunduran proteinlerin üç boyutlu yapıları bozularak normal fonksiyonlarını yerine getiremezler (44,47,49,50).

Serbest radikallerin nükleik asitler ve DNA'ya etkileri: Her türlü radyasyon, görünür ısı, ışık ve X ışınları hücrelerde iyonların, serbest radikallerin ve enerji kazanmış moleküllerin oluşmasına neden olur. İyonize edici radyasyonla oluşan serbest radikaller DNA'yı etkileyerek hücrede mutasyona ve ölüme yol açarlar. Hidroksil radikali, deoksiriboz ve bazlar ile kolayca reaksiyona girer ve değişikliğe yol açar. Aktive olmuş nötrofillerden kaynaklanan H_2O_2 membranlardan kolayca geçerek ve hücre çekirdeğine ulaşarak DNA hasarına, hücre disfonksiyonuna ve hücre ölümüne neden olabilir (44,47,49,50).

Serbest radikallerin karbonhidratlara etkileri: Serbest radikallerin karbonhidratları etkilemesiyle çeşitli ürünler meydana gelir. Özellikle monosakkaritlerin otooksidasyonu sonucu H_2O_2 ve okzoaldehitler meydana gelir. Bir okzoaldehit olan glikozil de DNA, RNA ve proteinlere bağlanabilme ve aralarında çapraz bağlar oluşturma özelliğinden dolayı antimitotik etkiye sahiptir (49,50).

ANTİOKSİDAN SAVUNMA SİSTEMLERİ

Reaktif oksijen türlerinin oluşumunu ve bunların meydana getirdiği hasarı önlemek için birçok savunma mekanizmaları mevcuttur. Bu mekanizmalar "antioksidan sistemler" veya kısaca "antioksidanlar" olarak bilinir. Antioksidanlar, endojen ve eksojen kaynaklı olabilirler (43,48).

Antioksidanlar dört ayrı şekilde etki ederler:

1) Toplayıcı etki: Serbest oksijen radikallerini etkileyerek onları tutma veya daha zayıf yeni moleküle çevirme işlemidir. Antioksidan enzimler ve trakeobronşiyal mukus bu tip etki gösterir (47).

2) Bastırıcı etki: Serbest oksijen radikalleriyle etkileşip onlara bir hidrojen aktararak aktivitelerini azaltma veya inaktif bir şekle dönüştürme işlemidir. Vitaminler, flavanoidler bu tarz etki gösterir (47).

3) Zincir kırıcı etki: Serbest oksijen radikallerini bağlayarak zincirlerini kırıp fonksiyonlarını engelleyici bir etkidir. Hemoglobin ve mineraller zincir kırıcı etkiye sahiptir (47).

4) Onarıcı etki: Serbest radikallerin oluşturdukları hasarın onarılmasıdır (47).

Endojen Antioksidanlar

Endojen antioksidanlar enzim ve enzim olmayanlar olmak üzere iki sınıfa ayrılır:

a) Enzim olan endojen antioksidanlar şunlardır: 1) SOD 2) Glutatyon peroksidaz (GSH-Px) 3) Glutatyon S-Transferazlar 4) Katalaz 5) Mitokondriyal sitokrom oksidaz sistemi 6) Hidroperoksidaz

b) Enzim olmayan endojen antioksidanlar şunlardır: 1) Melatonin 2) Seruloplazmin 3) Transferrin 4) Miyoglobin 5) Hemoglobin 6) Ferritin 7) Bilirubin 8) Glutatyon 9) Sistein 10) Metiyonin 11) Ürat 12) Laktoferrin 13) Albumin

Eksojen Antioksidanlar

Eksojen antioksidanlar; vitaminler, ilaçlar ve gıda antioksidanları olmak üzere üçe ayrılır:

1) Vitamin eksojen antioksidanlar: α-tokoferol (Vitamin-E), β-karoten, askorbik asit (vitamin-C), folik asit (folat)

2) İlaç olarak kullanılan eksojen antioksidanlar: Ksantin oksidaz inhibitörleri (allopürinol, oksipürinol, pterin aldehit, tungsten), NADPH oksidaz inhibitörleri (adenozin, lokal anestezikler, kalsiyum kanal blokörleri, NSAİİ, difenilin iyodonium),

rekombinant SOD, troloks-C (vitamin E analoğu), endojen antioksidan aktiviteyi artıranlar (GSH-Px aktivitesini artıran ebselen ve asetilsistein), nonenzimatik serbest radikal toplayıcılar (mannitol, albümin), demir redoks döngüsü inhibitörleri (desferroksamin), nötrofil adezyon inhibitörleri, sitokinler (TNF ve IL-1), barbitüratlar, demir şelatörleri (38).

3) Gıdalardaki eksojen antioksidanlar: Butillendirilmiş hidroksi tolüen, butillendirilmiş hidroksi anisol, sodyum benzoat, etoksikuin, propil gallat, Fe-SOD (51).

Süperoksit Dismutaz

Aerobik tüm hücreler SOD içerirler. Hem sitozol hem de mitokondrilerde bulunan bu enzim süperoksit radikallerini etkisizleştirerek, hücreleri süperoksit radikalinin zararlı etkilerinden korur. Dokularda oksijen basıncının yükselmesi ile SOD aktivitesi artar. Enzim fagosite edilmiş bakterilerin intraselüler olarak öldürülmesinde rol oynar ve granülosit fonksiyonu için önemlidir. İçeriğindeki metal iyonuna göre sitozolik dimerik Cu, Zn-SOD ve mitokondriyal tetramerik Mn-SOD olarak adlandırılır (47,48,51).

Glutatyon Peroksidaz

Glutatyon peroksidaz, serbest radikal peroksidasyonu sonucu fagositik hücrelerin zarar görmesini önler ve eritrositlerde oksidatif strese karşı en etkili antioksidandır. Eritrosit GSH-Px aktivitesi yaşlılarda ve Down sendromlu hastalarda yüksek, prematürelerde düşük bulunmuştur (43,51).

Katalaz

Peroksizomlarda ve sitozolde bulunan ve yapısında dört hem grubu bulunan bir hemoprotein olan katalaz, H_2O_2'nin moleküler oksijen ve suya çevrilmesini katalizler. Katalaz metil hidroperoksit ve etil hidroperoksit gibi küçük moleküllerin indirgenmesini de sağlar, ancak büyük molekül ağırlıklı lipit hidroperoksitlere karşı etki göstermez (47,48,51).

Glutatyon

Tiyol grubu taşıyan bir tripeptid olan glutatyon, serbest radikallerin yıkıcı etkilerini önleyen veya azaltan transferazlar, peroksidazlar gibi birçok enzimin substratı olarak görev yapmaktadır. Suda çözünebilen bir tiyol olan ve birçok hücrede

çok yüksek konsantrasyonlarda bulunan glutatyon, biyolojik membranları lipid peroksidasyonuna karşı korumaktadır (48,51).

SİTOKİNLER

Sitokinler, immün sistem tarafından salgılanırlar. İmmün cevapta rol alan hücrelerin intrasellüler iletişimine yardım eden çözünebilir proteinler olup hücre bölünmesini, farklılaşmasını ve kemotaksisini etkiler ve birçok proinflamatuvar ve inflamatuvar olayda rol alırlar (52-55).

Sitokinler hormona benzemekle birlikte tam hormon değildirler. Sitokin sekresyonları kendini sınırlayıcı özelliktedir. Birbirlerinin sentez ve etkilerini değiştirebilirler. Sitokinlerin etkileri lokal veya sistemik olabilir. Üretildikleri hücreye etki ederlerse otokrin, yakınındaki hücrelere etki ederlerse parakrin, daha uzak hücrelere etki ederlerse endokrin etkiden bahsedilir. Sitokinlerin etkileri hedef hücrelerdeki membran reseptörlerine bağlanmasıyla başlar (54).

Romatoid artritte sinoviyada sitokinlerin düzeyi artar. Sitokinler sinovyal hücre proliferasyonu meydana getirerek membran hiperplazisi ve pannus oluşumundan sorumlu tutulmuşlardır (54). RA patogenezinde başlıca TNFα ve IL-1 olmakla birlikte IL-2, IL-6, IL-10 gibi sitokinlerin de önemli rolü olduğu gösterilmiştir. RA'da en aktif rol oynayan sitokinlerden TNFα ve IL-1 esas olarak eklem kıkırdağının yıkımını indükler ve osteoblastların aktivitelerini inhibe ederler (37,52).

İnterlökin-1

Esas olarak makrofajlar tarafından üretilen ve pek çok hedef hücrenin farklılaşmasını ve özgül ürünler sentezlemesini sağlaması yanında özellikle IL-2 üretme yönünden etkinleştiren bir proteindir. IL-1 iki farklı proteinden meydana gelmekte olup bunlar IL1-α ve IL1-β'dır. IL1-α ve IL1-β'nın antijenik yapıları farklı olmalarına rağmen biyolojik aktiviteleri ve etkinlikleri aynıdır (31,56).

İnterlökin-1 hücreler üzerinde daha çok koruyucu etkiye sahiptir ve bu etki kemik üzerinde daha belirgindir. IL-1, T hücrelerinden IL-2 salgılanmasını ve bu hücrelerin yüzeyinde IL-2 reseptörlerinin sayısını arttırarak da T hücrelerinin çoğalmasını sağlar (31,56).

İnterlökin-1, fibroblast ve sinoviyal hücrelerin proliferasyonunu arttırıcı etki gösterir. Endojen bir pirojen olup SSS üzerine etkisiyle ateşin yükselmesini sağlar.

Kemik ve kıkırdak yıkımını arttırırlar. Kondrositlerden matriks enzim üretimini uyarır. IL-6 ve TNF ile birlikte eklem hasarında rol oynadığı düşünülmektedir.

Nitrik oksit ve prostaglandin yapımını uyarır; aynı anda başlıca tip-2 kollajen olmak üzere diğer kollajen yapıları ve büyük proteoglikan moleküllerin de yapımını azaltırlar. Yapılan çalışmalarda RA'da IL1-β seviyesinin yüksek bulunduğu gösterilmiştir (31,56-59).

İnterlökin-2

T hücresi büyüme faktörü de denilen IL-2; T, B lenfositlerin ve natural killer hücrelerin proliferasyonunu ve sitokin oluşumunu artırır. IL-2, kendisini üreten hücrelere etki edip kendi oluşumunu sağlar, bu onun otokrin büyüme faktörü işlevini gösterir. Ayrıca parakrin büyüme faktörü olarak da etkisi mevcuttur. IL-2'nin temel etkisi lenfositler üzerinedir (57,59,60).

İnterlökin-6

İnflamasyon, konak savunması, doku hasarı ile ilgili birçok hümoral ve hücresel immün etkileri olan çok yönlü bir sitokindir**.** Mononükleer fagositler, damar endotel hücreleri, fibroblastlar ve epitel hücreler ile bazı aktive T hücreleri tarafından sentez edilir. B hücrelerinin farklılaşmasını uyarır, hipotalamusu etkileyerek ateş yapar ve karaciğer tarafından akut faz proteinlerin üretilmesini tetikler (56,57).

İnterlökin-10

Doğal immün reaksiyonların ve hücresel immünitenin kontrolünde rol oynar. IL-10'un iki önemli etkisi vardır. Birincisi; makrofajlar tarafından sitokinlerin (örn: TNF, IL-1, IL-12) üretimini engellemek, ikincisi ise makrofajların T hücresi aktivasyonundaki işlevlerini engellemektir (56,57,60).

Tümör Nekroz Faktör

Gram (-) bakterilere ve diğer infeksiyoz organizmalara karşı gelişen akut inflamatuvar yanıtın ana mediyatörüdür. TNF'nin hücresel kaynağı lipopolisakkarit olan mononükleer fagositlerdir. İki çeşit TNF vardır. Bunlar aktif makrofajlardan salınan TNFα ve TNFβ'dır (54,59,60). TNFα sağlıklı eklem kıkırdağı ile romatizmaya bağlı olarak değişime uğramış dokuların sınırında özellikle yüksek miktarda bulunmaktadır (61).

Tümör nekroz faktör alfa, RA hastalığında öncelikli olarak, iltihap sürecinden sorumlu olan anahtar bir sitokindir; hem sinoviyal dokuda hem de sinoviyal sıvıda bol miktarda bulunur. İltihabın devamlılığını sağlar, başka sitokinlerin uyarılmasını teşvik eder. Doğal ve kazanılmış bağışıklık, hücre regülasyonu ve farklılaşma süreçlerinde önemli rollere sahip olup kanserli hücrelerin yıkımını sağlar (11,54,59-61).

Tümör nekroz faktör alfa düşük yoğunlukta lökositler ve endotelde akut inflamasyonu indükler. Orta yoğunlukta bulunması ise inflamasyonun sistemik etkilerini düzenler. Endojen pirojen olarak etki ederek ateşi yükseltir. Mononükleer fagositler ve vasküler endotel hücrelere etki ederek IL-1 ve IL-6'nın dolaşıma salınmasını uyarır. Yüksek konsantrasyonunda ise septik şokun patolojik anormalliklerine neden olur (59,61).

HEDERA HELİX FOLİUM EKSTRESİ (PROSPAN®)

Hedera helix folium (Prospan®) duvar sarmaşığı yaprağının özünden elde edilmektedir (8-10). Sarmaşıkgiller (*Araliaceae*) familyasından Avrupa ve Güneybatı Asya bölgesine özgü bir sarmaşık türüdür. Duvarlar, kayalar ve ağaçlarda uygun yüzeylerin bulunması durumunda 20-30 metreye kadar boylanabilen her zaman yeşil bir bitkidir (Şekil 1). Dikey yüzeylerin bulunmadığı koşullarda yerde yetişmektedir. Ağaç kabukları ve kayalara vantuz biçimindeki kısa yapışkan kökçükler yardımı ile tutunabilmektedir (62-65).

Hedera helix folium (Prospan®) kimyasal bileşimine baktığımızda önem sırasına göre şu maddeleri içerir:

1) Triterpen saponinler: Duvar sarmaşığının %4-5'ini oluştururlar. İçerik olarak %80 oranında hedera saponin C ve az miktarda hedera saponin B ve Monodesmosidler (α-hederin ve hederagenin-3-O-β-D-glikozit) içerir. Hedera saponin C'nin hidroksitlenmesi ile (suda parçalanması) α-hederin'e dönüşür. Hedera saponin B'nin hidroksitlenmesi (suda parçalanması) ile hederin β-hederine dönüşür. α-hederin ve β-hederin parçalanarak hederagenin-3-O-β-D-glikozite dönüşür.
2) Flavonitler
3) Eter yağı türevleri (Uçucu yağlar); metiletilketon, metilizobutilketon, furfurol
4) Vitaminler çok az miktarda olup E ve C vitamini ile β-Karotin
5) Minerallerden; iyot, çinko, bakır, mangan, arsenik, lityum, alüminyum
6) Sterol türevleri; sitosterol, stigmasterol, α-spinasterol içerir (65).



Şekil 1. Hedera helix bitkisi

Tarihçesi

Hedera helix (duvar sarmaşığı), antik çağlardan bu yana öksürük tedavisinde kullanılmaktadır. Duvar sarmaşığının kullanımı, özellikle Avrupa'da çok eski tarihlere dayanır. Antik çağların başında kötü ruhları kovmasının yanında "dostluk" simgesi olarak kullanılmıştır (8,9).

Antik zamanlarda Hipokrat, sarmaşığın yaygın biçimde tıbbi bitki olarak kullanılmasını sağlamıştır. İyileştirdiği hastalıklar arasında dizanteri, kulak ağrısı, gut ve ateş sayılabilir (9).

16. yüzyıldan itibaren, duvar sarmaşığının solunum yolu hastalıklarına çare olabilecek bir bitki olduğu gözlendi. 19. yüzyılda ise halk ilacı olmaktan çıkıp bilimsel dayanaklı tıp uygulamasına girerek önemini artırmıştır (9).

Duvar sarmaşığının solunum hastalıklarının tedavisindeki önemi 1949 yılında şans eseri Doktor Karl Engelhard tarafından keşfedilmiştir. Doktor Karl Engelhard Güney Fransa'da yaşayan çocukların başka yerlerdeki akranlarına kıyasla daha az öksürük problemi yaşadıklarını gördü. Nedenini araştırdığında o bölgede çocukların sütlerini sarmaşıktan yapılmış tahta kaplar içinde içtiklerini saptadı. Böylelikle sarmaşığın sütün içine geçen birtakım maddeler içerdiği ve bu yolla öksürüğe karşı etkili ve yararlı olduğu sonucuna vardı. 1950 yılında ise Prospan® ilk kez Almanya'da kullanıma sunuldu (9).

Klinik Özellikleri

Bitkinin sedatif, antispazmodik, hipnotik, diüretik, sekretolitik ve ekspektoran etkileri vardır. Cilt ve mukozanın sarmaşık yaprağına hassas olduğu bildirilmiştir. Yaprakta bulunan saponozitler (Hederakozit C ve beta hederin), akut ve kronik solunum yolu inflamasyonunda semptomatik rahatlama sağlamaktadır (66-68).

Bitki ekstratlarının antiinflamatuvar, antioksidan, antispazmodik, antialerjik, antitümör, vazokonstriktör, hemolitik, antibakteriyel, analjezik, yumuşatıcı ve antipirutik etkilere sahip olduğu yönünde yayınlar bulunmaktadır. Preparatları dahilen öksürük ve bronşit tedavisinde, haricen ise bazı deri hastalıklarının tedavisinde yardımcı ilaç olarak kullanılır. Kozmetolojide krem, losyon, şampuan ile selülite karşı zayıflatıcı preparatların bileşimine girer (63,64,66,68).

Antispazmodik etki: Sarmaşık yaprak içinde bulunan triterpen saponinlerden Hederakozit C ve α-hederin antispazmodik aktivite gösterirler. Bronşlardaki β adrenerjik reseptörlerinin inhibisyonu sonucu ligand kompleksleri ile α-hederin, yüzeyde aktif madde salgılanmasını artırır ve sekretolitik etki gösterir (63,65-67).

Antiinflamatuvar etki: Hederakozit-C ve α-hederin, akut ve kronik inflamasyon durumlarında inflamasyonu etkisiz hale getirirler (66).

Antimikrobiyal etki: Hedera helix folium sarmaşığı kumarin glikozitleri olarak falkarinon ve falkarinol içerir. Sarmaşığın antifungal ve antibakteriyel etkisinden bu maddeler sorumludur (58).

GEREÇ VE YÖNTEM

Yaptığımız çalışma için Trakya Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul onayı (TÜHDYEK-2012/61) alınmıştır (Ek-1) ve çalışmamız Trakya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (TÜBAP-2012/198) tarafından desteklenmiştir.

DENEKLER

Çalışmamızda Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Birimi'nde üretilmiş olan, ortalama 250-300 gram ağırlığında 48 adet Sprague Dawley erkek sıçan kullanılmıştır. Tüm denekler standart laboratuvar koşullarında (22±1 °C, %55 nem ve 12 saat aydınlık/karanlık siklusunda) barındırılmıştır. Beslenmeleri için standart sıçan yemi ve musluk suyu kullanılmıştır.

İLAÇLAR

Freund's Complete Adjuvant (FCA), (Sigma-Aldrich, USA)

Hedera helix folium ekstresi (Prospan®, Biomeks, Almanya)

İbuprofen (Dolven, Eczacıbaşı, Türkiye)

Rompun (Xylazin, Bayer, USA)

Ketamin (Ketalar, Pfizer, USA)

DENEY DÜZENİ

Çalışmamızda adjuvan artrit önceden RA değerlendirilmesi için tarif edilen metodlara göre, ısıda öldürülmüş ve kurutulmuş *Mycobacterium tuberculosis* içeren sıvı parafin emülsiyonunun (FCA, 10 mg/ml) hayvanların sağ arka ayak pençelerine,

22 numaralı iğne ile 0,1 ml'lik tek doz intradermal olarak injeksiyonu ile oluşturuldu (Şekil 2).



Şekil 2. İntradermal *Freund's Complete Adjuvant* uygulanması

Çalışmamızda 6 grup oluşturuldu ve her grupta 8 hayvan kullanıldı. Birinci grup kontrol grubu olarak ayrıldı ve pençe takibi sonrası 27. gün kalpten kan alındı. Diğer gruplara ise, 0. gün intradermal olarak 0,1 ml FCA injeksiyonu yapıldı ve 17-27 günler arası ikinci gruba serum fizyolojik, üçüncü gruba Hedera helix folium ekstresi (Prospan®) (10 mg/kg), dördüncü gruba Hedera helix folium ekstresi (Prospan®) (30 mg/kg), beşinci gruba Hedera helix folium ekstresi (Prospan®) (50 mg/kg) ve altıncı gruba da pozitif kontrol için ibuprofen (100 mg/kg) uygulandı. Hedera helix folium ekstresi (Prospan®) ve diğer ilaçlar sıçanlara gastrik gavaj yoluyla verildi (Tablo 1) (Şekil 3).

Tablo 1. Gruplar ve ilaç isimleri

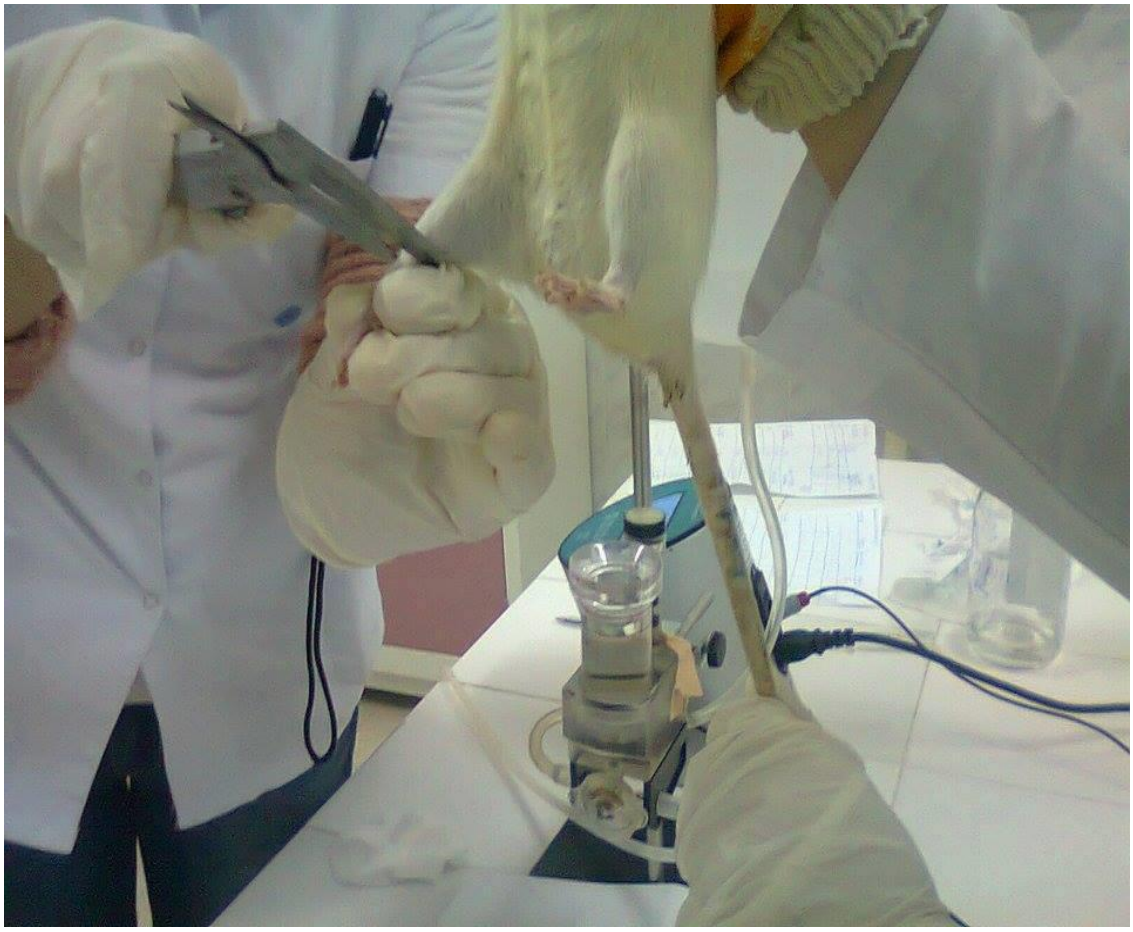
Gruplar	İlaç ismi	Günler
1. grup	-	-
2. grup	2 ml Serum Fizyolojik	17-27.gün
3. grup	10 mg/kg Prospan	17-27.gün
4. grup	30 mg/kg Prospan	17-27.gün
5. grup	50 mg/kg Prospan	17-27.gün
6. grup	100 mg/kg İbuprofen	17-27.gün



Şekil 3. Gastrik gavaj uygulaması

İnflamatuvar reaksiyon, inokülasyon günü 0. gün kabul edilerek; 0, 17, 20, 23 ve 27. günlerde pençelerde oluşan ödemin ve pençe çapının ölçülmesiyle değerlendirildi. Pençe çapını ölçmek için kumpas cihazı kullanıldı (Şekil 4). Ayrıca sıçanların ekleminde oluşan mekanik ağrı ve hipersensitivite, mekanik uyarılmayla

bacak çekme reaksiyonunu değerlendiren ve yeni piyasaya çıkan PAM cihazıyla değerlendirildi. 27. günde son ölçümleri yapılan hayvanlara ksilazin/ketamin (10/50 mg/kg, i.p.) anestezisi altındayken kalpten ponksiyon ile kan alınarak ötenazi uygulandı. Kuru biyokimya tüpüne alınan kanlar santrifüj edilerek serumları ayrıldı ve -80 ºC'da çeşitli sitokinler ve MDA düzeyleri ölçülene kadar saklandılar (2,32,35). Lipid peroksidasyonu son ürünü olan MDA Fakültemizin Fizyoloji Anabilim Dalı'nda bulunan spektrofotometre cihazıyla ve inflamatuvar yanıtın göstergeleri olan sitokinler (TNFα, IL-1β, IL-2, IL-6, IL-10) Bezmiâlem Vakıf Üniversitesi'nin Biyokimya Anabilim Dalı'nda bulunan *Enzyme-linked İmmunosorbent Assay* (ELISA) cihazıyla ölçüldü. Sıçanların sağ ayak eklemleri çıkarılarak formaldehite konuldu ve Fakültemiz Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı'na histopatolojik olarak değerlendirilmek üzere gönderildi. Araştırmanın sonunda elde edilen tüm verilerin istatistiksel olarak değerlendirilmesi Fakültemiz Biyoistatistik ve Tıbbi Bilişim Anabilim Dalı'nda yapıldı.



Şekil 4. Kumpas uygulaması

KULLANILAN CİHAZLAR

Spektrofotometre	:	(Spectronic Biotek Elx 800, ABD)
Elektronik Tartı	:	(Denver Instrument APX-200, ABD)
Soğutmalı santrifüj	:	(MPW 350R, Polonya)
Soğutmalı santrifüj	:	(Hettich Micro 220r, Almanya)
Su banyosu	:	(Nickel Clifton Elektro LTD, İngiltere)
Vorteks	:	(Nüve NM110, Türkiye)
Derin dondurucu	:	(Thermo Elektron Corporation, USA)
Ph Metre	:	(Inolab, Level I, Almanya)
Manyetik karıştırıcı	:	(Heidolph MR 3001, Almanya)
Distile su cihazı	:	(Millipore, Fransa)
PAM	:	(Ugo Basile, İtalya)

BASINÇ UYGULAMA ÖLÇÜMÜ

Basınç uygulama ölçümü (*Pressure application measurement*-PAM) cihazı artrit çalışmalarında mekanik ağrı eşiğinin ölçülmesi amacıyla özellikle kemirgenlerin diz, ayak bileği ve eklemlerinde basınca karşı hipersensitiviteyi değerlendirmek için kullanılmaktadır. PAM cihazı eklemin doğrudan uyarılması için otomatik olarak ölçülebilir bir kuvvet uygular. Uygulayıcı sadece başparmağına özel bir kuvvet sensörü giyer ve pik amplifikatörü hayvanın bacağını geri çekmesiyle ortaya çıkar. Oluşan değer cihaz tarafından kaydedilir. Cihaz sıçan ve farelerde kullanılmak üzere 2 adet kuvvet sensörü içerir. Şekil 5'de PAM cihazı ve uygulama şekli gösterilmiştir.



Şekil 5. *Pressure application measurement* cihazı ve uygulaması

İNTERLÖKİN-1β ÖLÇÜMÜ

İnterlökin-1β düzeyleri ölçümünde Platinum ELISA IL-1β ölçüm kiti kullanıldı.

Prensip

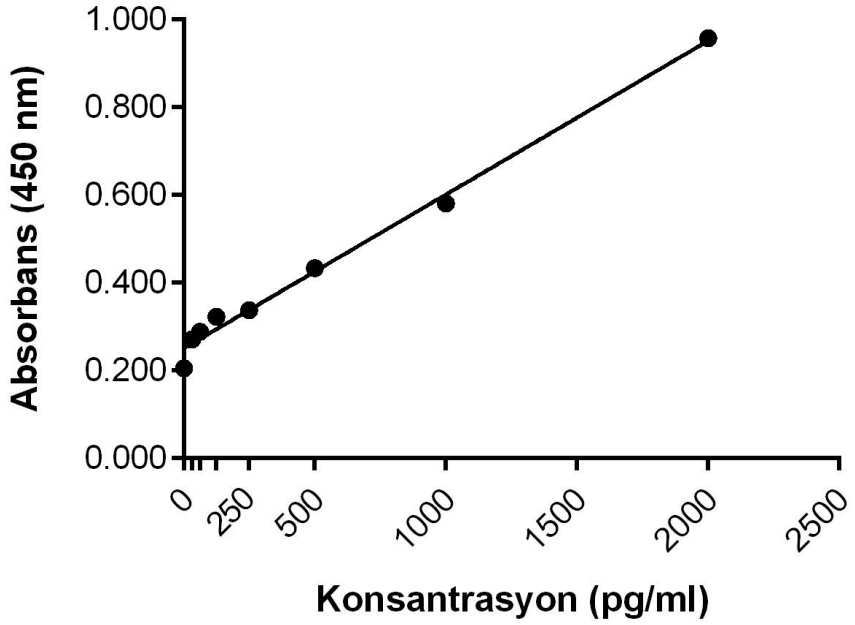
Anti-sıçan IL-1β kaplanmış ELISA kuyucuklarına örnek veya standart koyulur. Örnek veya standart içindeki IL-1β kuyucukları kaplayan anti-sıçan IL-1β antikoru tarafından bağlanarak yakalanır. İlk antikorlar tarafından yakalanan IL-1β'ya biyotin ile bağlı ikinci *(sekonder)* antikor (anti-sıçan IL-1β-biotin-bağlı) bağlanır. Bağlanmayan biyotin bağlı anti-sıçan IL-1β yıkanarak uzaklaştırılır. Sonrasında streptaviridin-HRP eklenerek biyotin bağlı anti-sıçan IL-1β antikoruna bağlanması sağlanır. Takiben bağlanmayan streptavidin-HRP yıkanarak uzaklaştırılır. HRP ile reaksiyon sonucunda renk değiştiren substrat solüsyonu tetrametil-benzidin (TMB) kuyucuklara eklenir. Belirli bir inkübasyon süresi sonrası reaksiyon asit (stop solüsyonu) eklenerek durdurulur ve meydana gelen renk değişikliği 450 nm'de spektrofotometrik olarak ölçülür.

Deney

ELISA IL-1β kitinde bulunan tabakada, standartların ve örneklerin koyulacağı kuyucukların şeması belirlendi. Deneye başlamadan kuyucukların tümü 400 µl *ıkama* (%1 Tween 20 ve %10 sığır serum albümini içeren fosfat tamponu) ile 2 kez yıkandı. Standart kuyucuklarına eksternal dilüsyonu yapılan ve konsantrasyonları sırasıyla 2000-1000-500-250-125-62,5-31,3 pg/ml olan standartlardan 100 µl konuldu. Kör kuyucuklarına 100 µl sulandırma solüsyonu koyuldu. Örnek kuyucuklarına ise 50 µl sulandırma solüsyonu ve 50 µl örnek konuldu. Ardından tüm kuyucuklara reaksiyonu başlatmak için 50 µl biotin bağlı sekonder antikor (anti-sıçan IL-1β-biotin-bağlı) eklenerek tabakanın üzeri şeffaf bir filmle kapatıldı. Oda sıcaklığında çalkalayıcıya yerleştirilerek 200 rpm de 2 saat boyunca inkübe edildi. 2 saatin ardından kuyucukların hepsi boşaltıldı ve 3 kez 400 µl yıkama solüsyonu ile yıkandı. Tüm kuyucuklara 100 µl streptavidin HRP konularak tabakanın üzeri tekrar filmle kapatılıp 1 saat çalkalayıcıda inkübe edildi. Ardından tekrar tüm kuyucuklar boşaltıldı ve 400 µl yıkama solüsyonu ile 3 kez yıkandı. Yıkama işleminin ardından bütün kuyucuklara HRP ile reaksiyon sonucunda renk değiştiren substrat olan TMB solüsyonundan 100 µl konuldu ve 10 dakika oda sıcaklığında, ışıksız karanlık bir ortamda bekletildi. Pozitif kontrol çukurlarındaki renk koyu mavi olduğunda her bir kuyucuğa 100 µl stop

solüsyonu (asit) eklenerek reaksiyon durduruldu. Daha sonra kuyucuklarda oluşan renk değişikliğinin adsorbansı 450 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçüldü (Şekil 6).

Hesaplama



Şekil 6. İnterlökin-1ß kalibrasyon eğrisi

Linear (log y = A(log x) + B)

Y = 0,0003506*X + 0,2509 A=0,0003506 B=0,2509

İNTERLÖKİN-2 ÖLÇÜMÜ

İnterlökin-2 düzeyleri ölçümünde Platinum ELISA IL-2 ölçüm kiti kullanıldı.

Prensip

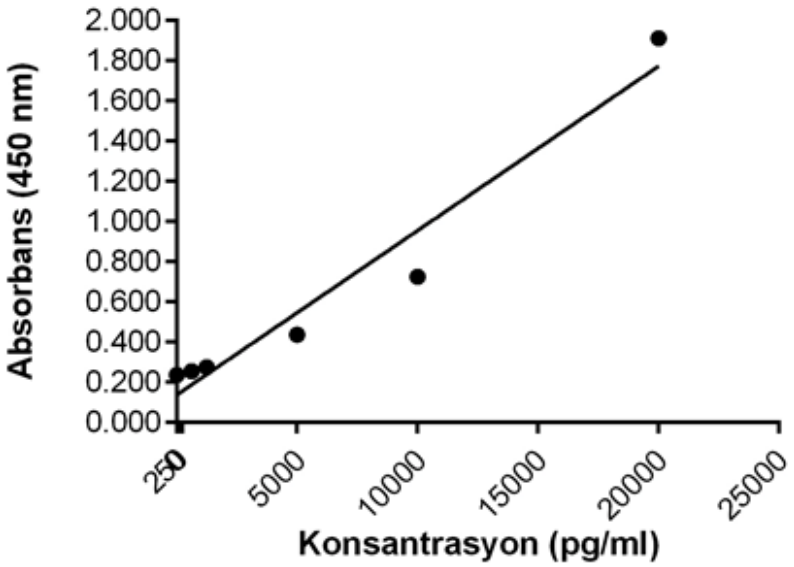
Anti-sıçan IL-2 kaplanmış ELISA kuyucuklarına örnek veya standart koyulur. Örnek veya standart içindeki IL-2 kuyucukları kaplayan anti-sıçan IL-2 antikoru tarafından bağlanarak yakalanır. İlk antikorlar tarafından yakalanan IL-2'ya biyotin ile bağlı ikinci *(sekonder)* antikor (anti-sıçan IL-2-biotin-bağlı) bağlanır. Bağlanmayan biyotin bağlı anti-sıçan IL-2 yıkanarak uzaklaştırılır. Sonrasında streptaviridin-HRP eklenerek biyotin bağlı anti-sıçan IL-2 antikoruna bağlanması sağlanır. Takiben bağlanmayan streptavidin-HRP yıkanarak uzaklaştırılır. HRP ile reaksiyon sonucunda renk değiştiren substrat solüsyonu kuyucuklara eklenir. Belirli bir inkübasyon süresi

sonrası reaksiyon asit ilavesi (stop solüsyonu) durdurulur ve meydana gelen renk değişikliği 450 nm'de spektrofotometrik olarak ölçülür.

Deney

ELISA IL-2 kitinde bulunan tabakada, standartların ve örneklerin koyulacağı kuyucukların şeması belirlendi. Deneye başlamadan kuyucukların tümü 400 µl yıkama solüsyonu (%1 Tween 20 ve %10 sığır serum albümini içeren fosfat tamponu) ile 2 kez yıkandı. Standart kuyucuklarına eksternal dilüsyonu yapılan ve konsantrasyonları sırasıyla 2000-1000-500-250-125-62,5 pg/ml olan standartlardan 100 µl konuldu. Kör kuyucuklarına 100 µl sulandırma solüsyonu koyuldu. Örnek kuyucuklarına ise 50 µl sulandırma solüsyonu ve 50 µl örnek konuldu. Ardından tüm kuyucuklara reaksiyonu başlatmak için 50 µl biotin bağlı sekonder antikor (anti-sıçan IL-2-biotin-bağlı) eklenerek tabakanın üzeri şeffaf bir filmle kapatıldı. Oda sıcaklığında çalkalayıcıya yerleştirilerek 200 rpm de 3 saat boyunca inkübe edildi. 3 saatin ardından kuyucukların hepsi boşaltıldı ve 4 kez 400 µl yıkama solüsyonu ile yıkandı. Tüm kuyucuklara 100 µl streptavidin HRP konularak tabakanın üzeri tekrar filmle kapatılıp 1 saat çalkalayıcıda inkübe edildi. Ardından tekrar tüm kuyucuklar boşaltıldı ve 400 µl yıkama solüsyonu ile 4 kez yıkandı. Yıkama işleminin ardından bütün kuyucuklara HRP ile reaksiyon sonucunda renk değiştiren substrat olan TMB solüsyonundan 100 µl konuldu ve 10 dakika oda sıcaklığında, ışıksız karanlık bir ortamda bekletildi. Pozitif kontrol çukurlarındaki renk koyu mavi olduğunda her bir kuyucuğa 100 µl stop solüsyonu (asit) eklenerek reaksiyon durduruldu. Daha sonra kuyucuklarda oluşan renk değişikliğinin adsorbansı 450 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçüldü (Şekil 7).

Hesaplama



Şekil 7. İnterlökin-2 kalibrasyon eğrisi

Linear (log y = A(log x) + B)

Y = 8,179e-005*X + 0,1382 A=22,232827075 - 005 B=0,1382

İNTERLÖKİN-10 DÜZEYİ ÖLÇÜMÜ

İnterlökin-10 düzeyleri ölçümünde Platinum ELISA IL-10 ölçüm kiti kullanıldı.

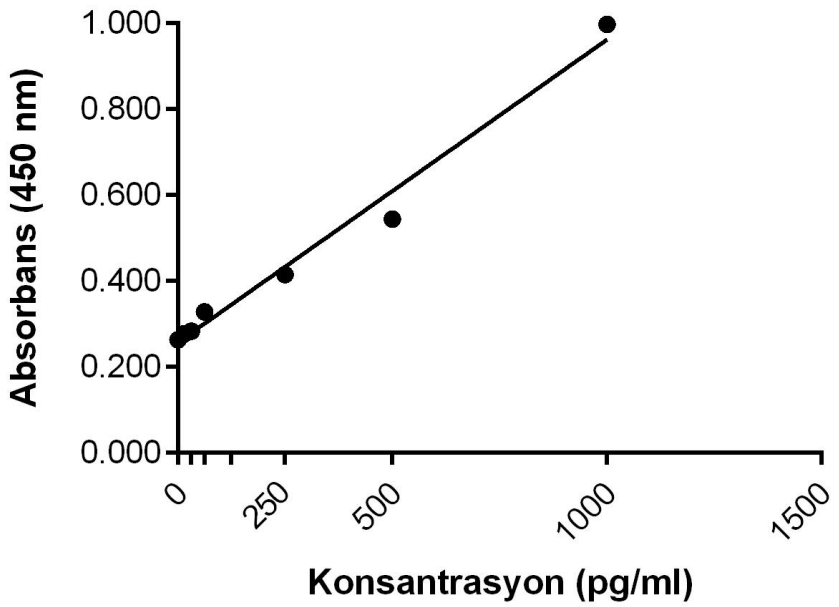
Prensip

Anti-sıçan IL-10 kaplanmış ELISA kuyucuklarına örnek veya standart koyulur. Örnek veya standart içindeki IL-10 kuyucukları kaplayan anti-sıçan IL-10 antikoru tarafından bağlanarak yakalanır. İlk antikorlar tarafından yakalanan IL-10'ya biyotin ile bağlı ikinci *(sekonder)* antikor (anti-sıçan IL-10-biotin-bağlı) bağlanır. Bağlanmayan biyotin bağlı anti-sıçan IL-10 yıkanarak uzaklaştırılır. Sonrasında streptaviridin-HRP eklenerek biyotin bağlı anti-sıçan IL-10 antikoruna bağlanması sağlanır. Takiben bağlanmayan streptavidin-HRP yıkanarak uzaklaştırılır. HRP ile reaksiyon sonucunda renk değiştiren substrat solüsyonu kuyucuklara eklenir. Belirli bir inkübasyon süresi sonrası reaksiyon asit ilavesi (stop solüsyonu) durdurulur ve meydana gelen renk değişikliği 450 nm'de spektrofotometrik olarak ölçülür.

Deney

ELISA IL-10 kitinde bulunan tabakada, standartların ve örneklerin koyulacağı kuyucukların şeması belirlendi. Deneye başlamadan kuyucukların tümü 400 µl yıkama solüsyonu (%1 Tween 20 ve %10 sığır serum albümini içeren fosfat tamponu) ile 2 kez yıkandı. Standart kuyucuklarına eksternal dilüsyonu yapılan ve konsantrasyonları sırasıyla 1000-500-250-125-62,5-31,3-15,6 pg/ml olan standartlardan 100 µl konuldu. Kör kuyucuklarına 100 µl sulandırma solüsyonu koyuldu. Örnek kuyucuklarına ise 50 µl sulandırma solüsyonu ve 50 µl örnek konuldu. Ardından tüm kuyucuklara reaksiyonu başlatmak için 50 µl biotin bağlı sekonder antikor (anti-sıçan IL-10-biotin-bağlı) eklenerek tabakanın üzeri şeffaf bir filmle kapatıldı. Oda sıcaklığında çalkalayıcıya yerleştirilerek 200 rpm de 2 saat boyunca inkübe edildi. 2 saatin ardından kuyucukların hepsi boşaltıldı ve 3 kez 400 µl yıkama solüsyonu ile yıkandı. Tüm kuyucuklara 100 µl streptavidin HRP konularak tabakanın üzeri tekrar filmle kapatılıp 1 saat çalkalayıcıda inkübe edildi. Ardından tekrar tüm kuyucuklar boşaltıldı ve 400 µl yıkama solüsyonu ile 3 kez yıkandı. Yıkama işleminin ardından bütün kuyucuklara HRP ile reaksiyon sonucunda renk değiştiren substrat olan TMB solüsyonundan 100 µl konuldu ve 10 dakika oda sıcaklığında, ışıksız karanlık bir ortamda bekletildi. Pozitif kontrol çukurlarındaki renk koyu mavi olduğunda her bir kuyucuğa 100 µl stop solüsyonu (asit) eklenerek reaksiyon durduruldu. Daha sonra kuyucuklarda oluşan renk değişikliğinin adsorbansı 450 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçüldü (Şekil 8).

Hesaplama



Şekil 8. İnterlökin-10 kalibrasyon eğrisi

Linear (log y = A(log x) + B)

Y = 0,0007055*X + 0,2572 A=0,0007055 B=+ 0,2572

TÜMÖR NEKROZ FAKTÖR DÜZEYİ ÖLÇÜMÜ

TNFα düzeyleri ölçümünde Platinum ELISA TNFα ölçüm kiti kullanıldı.

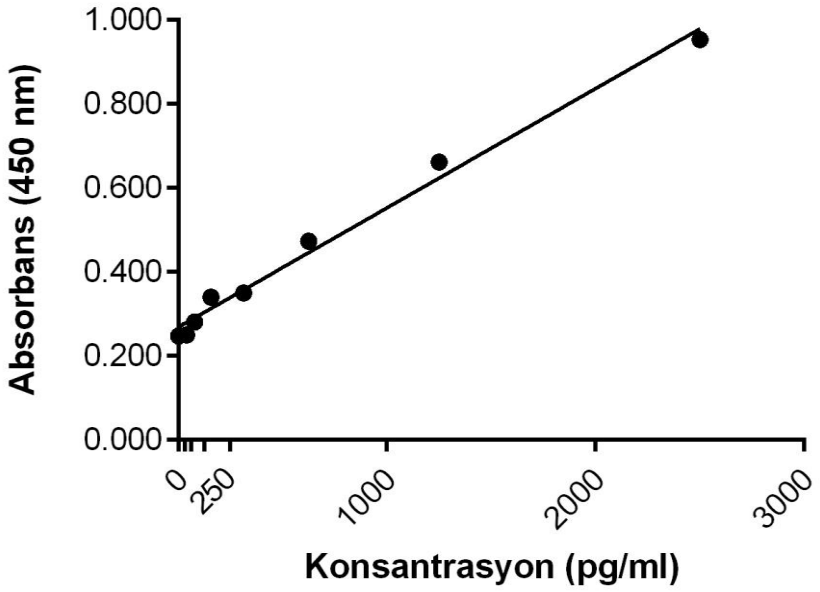
Prensip

Anti-sıçan TNFα kaplanmış ELISA kuyucuklarına örnek veya standart koyulur. Örnek veya standart içindeki TNFα kuyucukları kaplayan anti-sıçan TNFα antikoru tarafından bağlanarak yakalanır. İlk antikorlar tarafından yakalanan TNFα'ya biyotin ile bağlı ikinci *(sekonder)* antikor (anti-sıçan TNFα-biotin-bağlı) bağlanır. Bağlanmayan biyotin bağlı anti-sıçan TNFα yıkanarak uzaklaştırılır. Sonrasında streptaviridin-HRP eklenerek biyotin bağlı anti-sıçan TNFα antikoruna bağlanması sağlanır. Takiben bağlanmayan streptavidin-HRP yıkanarak uzaklaştırılır. HRP ile reaksiyon sonucunda renk değiştiren substrat solüsyonu kuyucuklara eklenir. Belirli bir inkübasyon süresi sonrası reaksiyon asit ilavesi (stop solüsyonu) durdurulur ve meydana gelen renk değişikliği 450 nm'de spektrofotometrik olarak ölçülür.

Deney

ELISA TNFα kitinde bulunan tabakada, standartların ve örneklerin koyulacağı kuyucukların şeması belirlendi. Deneye başlamadan kuyucukların tümü 400 µl yıkama solüsyonu (%1 Tween 20 ve %10 sığır serum albümini içeren fosfat tamponu) ile 2 kez yıkandı. Standart kuyucuklarına eksternal dilüsyonu yapılan ve konsantrasyonları sırasıyla 2500-1250-625-312,5-156,3-78,1-39,1 pg/ml olan standartlardan 100 µl konuldu. Kör kuyucuklarına 100 µl sulandırma solüsyonu koyuldu. Örnek kuyucuklarına ise 50 µl sulandırma solüsyonu ve 50 µl örnek konuldu. Ardından tüm kuyucuklara reaksiyonu başlatmak için 50 µl biotin bağlı sekonder antikor (anti-sıçan TNFα-biotin-bağlı) eklenerek tabakanın üzeri şeffaf bir filmle kapatıldı. Oda sıcaklığında çalkalayıcıya yerleştirilerek 200 rpm de 2 saat boyunca inkübe edildi. 2 saatin ardından kuyucukların hepsi boşaltıldı ve 4 kez 400 µl yıkama solüsyonu ile yıkandı. Tüm kuyucuklara 100 µl streptavidin HRP konularak tabakanın üzeri tekrar filmle kapatılıp 1 saat çalkalayıcıda inkübe edildi. Ardından tekrar tüm kuyucuklar boşaltıldı ve 400 µl yıkama solüsyonu ile 4 kez yıkandı. Yıkama işleminin ardından bütün kuyucuklara HRP ile reaksiyon sonucunda renk değiştiren substrat olan TMB solüsyonundan 100 µl konuldu ve 10 dakika oda sıcaklığında, ışıksız karanlık bir ortamda bekletildi. Pozitif kontrol çukurlarındaki renk koyu mavi olduğunda her bir kuyucuğa 100 µl stop solüsyonu (asit) eklenerek reaksiyon durduruldu. Daha sonra kuyucuklarda oluşan renk değişikliğinin adsorbansı 450 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçüldü (Şekil 9).

Hesaplama



Şekil 9. Tümör nekroz faktör-αlfa kalibrasyon eğrisi

Linear (log y = A(log x) + B)

Y = 0,0002842*X + 0,2687 A=0,0002842 B=0,2687

MALONDİALDEHİT DÜZEYİ ÖLÇÜMÜ

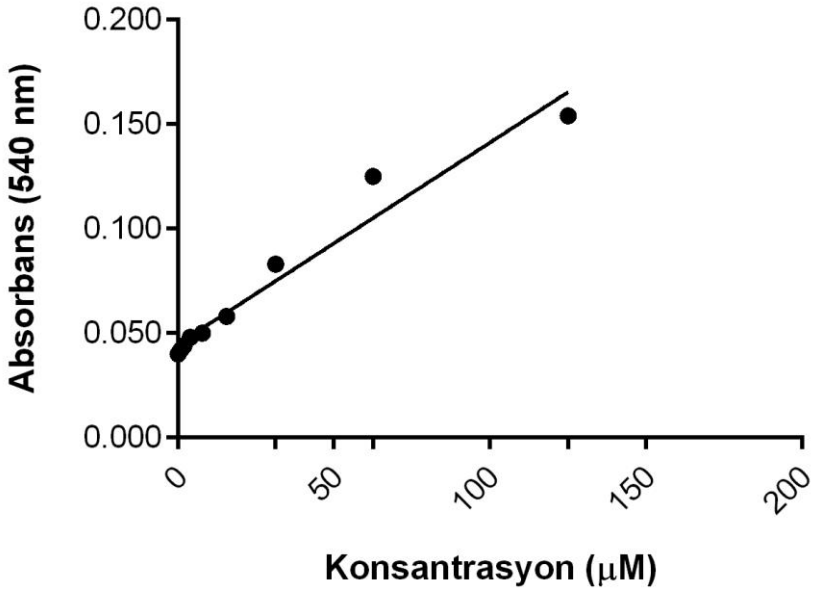
Prensip

Lipit peroksidasyonun son ürünü olan MDA'nın TBA ile sıcak ve asit ortamda reaksiyona girmesi ile oluşan renk spektrofotometrik olarak 540 nm dalga boyunda ölçülür.

Deney

0.2 ml 10 kat dilüe edilmiş doku homojenatı; 0.2 ml %8.1'lik sodyum dodesil sülfat, 1.5 ml %20'lik asetik asit,1.5 ml %0.8'lik TBA ve 0.6 ml distile su ile karıştırıldı. Karışım 95°C'deki sıcak su banyosunda 1 saat tutuldu. Musluk suyu ile soğutulduktan sonra üzerine 1 ml distile su ve 5 ml butonal/piridin (15:1) eklenerek vorteksle 1 dakika karıştırıldı. Organik faz 4000xg'de 10 dakika santrifüj edilerek ayrıldı. Absorbanslar homojenat içermeyen ayıraç körüne karşı 540 nm dalga boyunda spektrofotometrede okundu (Şekil 10).

Hesaplama



Şekil 10. MDA kalibrasyon eğrisi

Linear (log y = A(log x) + B)

Y = 0,0009646*X + 0,04487 A=0,0009646 B=0,04487

HİSTOPATOLOJİK İNCELEME

Tüm sıçanlara ait ayaklar %10 tamponlu formaldehitte bir gece tespit edildikten sonra metatarsofalenjial eklemleri içerecek şekilde örneklenerek %10 formik asit içeren dekalsifikasyon solüsyonunda bir gece bekletildi. Dekalsifiye olan dokular akan suda yarım saat yıkandıktan sonra gece boyu süren alkol takibine tabi tutuldu. Parafine gömülen dokulardan elde edilen 5 mikron kalınlığındaki kesitlere deparafinizasyon işleminin ardından rutin boyalar olan hematoksilen ve eozin boyaları (HE) uygulandı. Lamel ile kapatılan kesitler Olympus BX51 mikroskobunda gruplara ait bilgi olmadan kör değerlendirmeye alındı, bulgular tablo halinde kaydedildi. İnflamasyon, vasküler proliferasyon ve ödem semikantitatif olarak 0-3 arasında değerlendirildi. Sinoviyal proliferasyon varlığı veya yokluğu not edildi: 0-lezyon yok, 1-hafif şiddetli lezyon, 2-orta şiddetli lezyon, 3-şiddetli lezyon olarak kabul edildi. Vasküler proliferasyonun tespiti için 5 büyük büyütme alanındaki (BBA=x40) damarlar sayıldı ve ortalamaları alınarak büyük büyütme alanı başına düşen damar sayısı hesaplandı.

İSTATİSTİKSEL ANALİZ

İstatistiksel değerlendirme, 10240642 seri numaralı SPSS 22 istatistik programı kullanılarak yapıldı. Ölçülebilen verilerin normal dağılıma uygunlukları tek örnek Kolmogorov Smirnov testi ile bakıldıktan sonra normal dağılım gösterenler için gruplar arası kıyaslamalarda tek yönlü varyans analizi ve posthoc Bonferroni testi ve normal dağılım göstermeyenler için ise Kruskal Wallis varyans analizi ve sonrasında Mann Whitney U testi kullanıldı. Normal dağılıma uyan verilerin grup içi kıyaslamalarında bağımlı gruplarda t testi ve normal dağılıma uymayan verilerin değerlendirilmesinde ise Wilcoxon eşleştirilmiş iki örnek testi kullanıldı. Niteliksel verilerde Pearson x^2 testi ve Kolmogorov Smirnov iki örnek testi kullanıldı. Tanımlayıcı istatistikler olarak ortalama değerleri ve standart sapma verildi. Tüm istatistikler için anlamlılık sınırı $p<0,05$ olarak seçildi. Grafikler ise Graphpad Prism for Windows Version 6.05 programı kullanılarak çizilmiştir.

BULGULAR

Çalışmamızın ilk gününde (0. gün) tüm sıçanların ağırlıkları tartıldı. Sağ arka ayak pençe çapları kumpas ile ölçüldü ve pençe ödemleri makroskopik skorlama yöntemiyle derecelendirildi. PAM cihazı ile bazal ağrı eşiği belirlendi. 1. grup hiçbir işlem yapılmadan kontrol grubu olarak ayrıldı. Diğer gruplardaki (2, 3, 4, 5, 6) sıçanların sağ arka ayak pençelerine adjuvan artrit oluşturmak için 0,1 ml FCA intradermal injeksiyonla uygulandı. Sıçanların ağırlık takipleri, kumpas ve PAM ölçümleri ile makroskopik skorlama derecelendirilmesi 17, 20, 23 ve 27. günlerde tekrarlandı. İlaçların adjuvan artrite etkisini incelemek amacıyla 17-27. günler arasında 10 gün boyunca 2. gruba ilaçların çözücüsü olarak kullandığımız serum fizyolojik 2 ml (gastrik gavaj ile), 3. gruba Hedera helix folium ekstresi (Prospan®) (10 mg/kg, gastrik gavaj ile), 4. gruba Hedera helix folium ekstresi (Prospan®) (30 mg/kg, gastrik gavaj ile), 5. gruba Hedera helix folium ekstresi (Prospan®) (50 mg/kg, gastrik gavaj ile) ve 6. gruba da pozitif kontrol için ibuprofen (100 mg/kg, gastrik gavaj ile) uygulandı. Deney sonunda sıçanların kalplerinden kan alındı ve sağ ayak eklemleri histopatolojik olarak değerlendirildi. İlaç tedavisinin etkinliğini ölçmek için tüm veriler 17, 20, 23, 27. günlerde kendi içinde ve gruplar arasında istatistiksel olarak karşılaştırıldı.

Yapılan ölçümlerde sıçanların ağırlık takibinde 27. günde gruplar arası yapılan karşılaştırmalarda grup 1 (kontrol grubu)'e göre 2, 3, 4, 5 ve 6. gruplarda istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık ($p<0,05$) bulunmuştur (Tablo 2). Artrit oluşturulan sıçanların FCA uygulanmayan sıçanlara göre kilo kaybettikleri ve zayıfladıkları bulunmuştur.

Tablo 2. Tüm gruplarda ağırlık ortalamaları (g) (Ort +SD)

	0. gün	17. gün	20. gün	23. gün	27. gün
Grup 1	275.8± 16.6	302.1± 20.7	287.7± 19.7	293.2± 19.1	297.9± 19.7
Grup 2	292.6± 35.8	305.1± 36.2	273.0± 39.6	258.1± 42.5	249.3± 52.6*
Grup 3	290.9± 21.9	304.9± 48.4	277.9± 36.8	263.4± 26.7	251.6± 22.4*
Grup 4	296.7± 21.4	295.5± 23.8	269.7± 22.9	258.7± 27.4	251.7± 40.5*
Grup 5	271.6± 32.1	267.8± 35.6	259.6± 43.4	247.0± 34.6	233.0± 31.3*
Grup 6	288.6± 30.5	285.4± 28.7	269.6± 28.3	252.0±24.5	223.8± 34.5*

Ort: Ortalama; **SD**: Standart sapma.

*p<0,05, 27. günde grup 1 (kontrol grubu)'e göre gruplar arası karşılaştırma.

Freund's Complete Adjuvant uygulanan grupların kumpas cihazı ile ölçülen pençe ölçüm değerleri, 17. güne gelindiğinde 0. gündeki değerler ile karşılaştırıldığında hiçbir işlem uygulanmayan 1. grup hariç diğer gruplarda (2, 3, 4, 5, 6) grup içi karşılaştırmalarda tüm sıçanlarda adjuvan artritin oluştuğu, sağ arka pençede inflamatuvar reaksiyon ve ödemin belirgin olduğu ve bunların istatistiksel olarak anlamlı ($p<0,05$) olduğu saptandı (Tablo 3). Bu da FCA uygulanan tüm sıçanlarda artrit oluştuğunu göstermektedir.

Ayrıca 17. günde kumpas cihazı ile ölçülen pençe ölçüm değerleri FCA uygulanmayan 1. grup (kontrol grubu) değerleri ile karşılaştırıldığında, FCA uygulanan 2, 3, 4, 5 ve 6. gruplarda aynı şekilde adjuvan artritin oluştuğu, sağ arka pençede inflamatuvar reaksiyon ve ödemin belirgin olduğu ve bunların istatistiksel olarak anlamlı ($p<0,05$) olduğu saptandı (Tablo 3).

Freund's Complete Adjuvant uygulanıp artrit oluşturulan tüm gruplara 17. günde ilaç tedavileri başlanmıştır. 20, 23 ve 27. günlerde pençe çapı ölçümleri tekrarlanmıştır. 17 ile 20. günler arasında kumpas aleti ile yapılan ölçümlerde grup 3 (Prospan 10)'ün sağ pençe çapında anlamlı düzeyde azalma oluşturduğu ($p<0,05$) saptanmıştır. 23. gündeki pençe ölçüm değerleri 17. gündeki ile karşılaştırıldığında grup 3 ve 6'daki sıçanların pençe ölçüm değerlerinde azalma olmasına rağmen istatistiksel olarak herhangi bir anlamlılık saptanamamıştır. 17. gün ile 27. günler arasında grupları karşılaştırdığımızda ise sadece ibuprofen (grup 6) grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir farklılığın ortaya çıktığı ($p<0,05$) görülmüştür (Tablo 3).

27. günde grup 2 (serum fizyolojik) ile gruplar arası karşılaştırmada grup 4, 5, 6 pençe çaplarında azalma olmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunamamıştır ($p>0,05$).

Tablo 3. Tüm gruplarda sağ pençe takibi (kumpas) ortalamaları (mm) (Ort +SD)

	0. gün	17. gün	20. gün	23. gün	27. gün
Grup 1	6.5±0.6	6.7±0.9	6.9±0.6	6.6±1.3	6.7±0.5
Grup 2	6.7±0.7	9.1±2.0*$	9.1±2.2	8.7±2.3	9.8±1.5
Grup 3	6.5±0.3	9.6±1.8*$	8.0±2.2†	8.8±2.1	9.1±1.4
Grup 4	6.6±0.1	8.9±0.9*$	8.5±2.0	9.0±2.1	8.9±1.8
Grup 5	6.3±0.7	9.0±1.0*$	8.9±1.3	8.8±2.4	7.9±1.7
Grup 6	6.5± 0.9	10.0± 0.7*$	9.2± 1.6	8.9± 2.2	8.3± 1.5‡

Ort: Ortalama; **SD**: Standart sapma,

*p<0,05, 0-17. gün grup içi karşılaştırma, †p <0,05, 17-20. gün grup içi karşılaştırma, ‡p<0,05, 17-27. gün grup içi karşılaştırma.

$p<0,05, 17. günde grup 1 (kontrol grubu)'e göre gruplar arası karşılaştırma

0. günde, FCA injeksiyonu yapılmadan önce tüm gruplarda PAM cihazıyla eklemlere uygulanan basınca karşı sıçanın bacağını çekme eşiği ve gösterdiği hipersensivite ölçüldü. FCA uygulanan grupların PAM ölçüm değerleri, 17. güne gelindiğinde 0. gündeki değerler ile karşılaştırıldığında hiçbir işlem uygulanmayan 1. grup hariç diğer gruplarda (2, 3, 4, 5, 6) grup içi karşılaştırmalarda basınca karşı duyarlılığın arttığı ve reaksiyon gösterme sürelerinin kısaldığı ve bunlarında istatistiksel olarak anlamlı ($p<0,05$) olduğu saptandı (Tablo 4). Bu da FCA uygulanan tüm sıçanlarda artrit oluştuğunu ve ağrılı uyarana karşı pençelerin hassaslaştığını göstermektedir.

İlaçların etkisini değerlendirmek amacıyla 17. gün ile 20, 23 ve 27. günlerde grup içi karşılaştırma yapıldığında sadece grup 6 (ibuprofen grubu)'da PAM değerlerinde anlamlı düzeyde artma görülmüştür ($p<0,05$). Aynı şekilde 27. günde grup 2 (serum fizyolojik grubu) ile diğer gruplar karşılaştırıldığında yine sadece grup 6 (ibuprofen grubu)'da istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmuştur ($p<0,05$). Bu da uygulanan tüm dozlarda Hedera helix ekstresinin analzejik etkisinin bulunmadığını fakat grup 6 (ibuprofen grubu)'nın analzejik etkisinin olduğunu göstermiştir.

Tablo 4. Tüm gruplarda sağ pençe PAM ortalamaları (gf) (Ort +SD)

	0. gün	17. gün	20. gün	23. gün	27. gün
Grup 1	1293.3± 221.1	1578.9±241.2	1198.6± 319.2	1141.7± 389.6	1281.6± 311.1
Grup 2	1112.5± 264.1	809.1± 594.7*†	570.7±378.4	673.9± 420.6	386.4±277.9
Grup 3	1411.7± 416.8	906.6± 489.0*†	365.6± 486.9	654.3±492.4	252.7± 107.0
Grup 4	1578.2± 168.6	962.7± 408.4*†	605.2± 427.7	451.9± 238.8	317.2± 261.5
Grup 5	1266.3± 290.8	838.3± 422.3*†	780.0± 220.2	481.9± 208.5	582.2± 400.2
Grup 6	1100.7± 229.3	617.8± 271.0*†	542.7± 259.1	543.6± 349.6	867.1± 246.1‡

Ort: Ortalama; **SD**: Standart sapma**,**

*p<0,05, 0-17. gün grup içi karşılaştırma, ‡p<0,05, 27. günde grup 2'ye göre gruplar arası karşilaştırma

†p<0,05, 17. günde grup 1 (kontrol grubu)'e göre gruplar arası karşılaştırma

0. günde FCA injeksiyonu yapılmadan önce tüm gruplarda sağ arka ayak pençelerini makroskopik skorlama yöntemiyle 0-4 arasında derecelendirdik. 17. güne gelindiğinde 0. gün değerleri ile karşılaştırıldığında FCA uygulanan tüm sıçanlarda makroskopik skorlama değerlerinin yüksek olduğu, adjuvan artritin oluştuğu, sağ arka pençede inflamatuvar ödemin belirgin olduğu ve bunların istatistiksel olarak anlamlı ($p<0,05$) olduğu saptandı (Tablo 5). Bu da FCA uygulanan tüm sıçanlarda artrit oluştuğunu göstermektedir.

27. günde grup 2 (serum fizyolojik) ile diğer gruplar karşılaştırıldığında grup 4, 5, 6'nın makroskopik skor ortalamalarında düşüş olmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı düzeyde değildi (Tablo 5).

Tablo 5. Tüm gruplarda sağ pençelerde makroskopik skor ortalamaları (Ort ± SD)

	0. gün	17. gün	20. gün	23. gün	27. gün
Grup 1	0	0	0	0	0
Grup 2	0	3.8± 0.5*†	3.5± 0.5	3.3± 0.9	3.50± 0.8
Grup 3	0	3.7± 0.5*†	3.7± 0.5	3.3± 0.8	3.86± 0.4
Grup 4	0	3.8± 0.4*†	3.3± 0.8	3.3± 1.0	3.00± 1.6
Grup 5	0	3.4± 0.6*†	3.6± 0.6	2.6± 1.1	2.20±1.3
Grup 6	0	4.0± 0.0*†	3.4± 0.9	3.0± 0.7	2.80± 0.8

Ort: Ortalama; **SD**: Standart sapma,

*p<0,05, 0-17. gün grup içi karşılaştırma

†p<0,05, 17. günde grup 1 (kontrol grubu)'e göre gruplar arası karşılaştırma

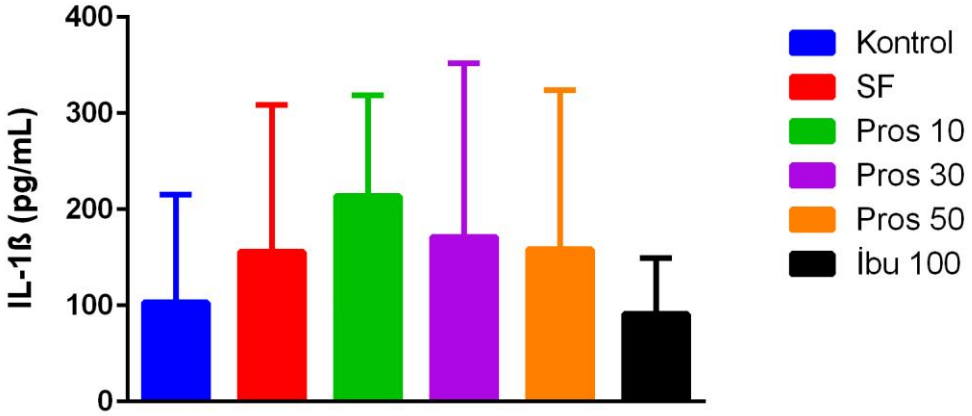
İNTERLÖKİN 1-BETA DÜZEYİ

Serum interlökin 1-β düzeyi Platinum ELISA kiti kullanılarak spektrofotometrik yöntemle mililitre başına pikogram (pg/mL) olarak ölçüldü. Ortalamaları ve standart sapmaları hesaplandı. Hesaplanan verilerin normalitesi incelendi. Nonparametrik Kruskal Wallis varyans analizi ve Mann Whitney U testi uygulandı. 27. günde gruplar arası kıyaslamalarda istatistiksel olarak anlamlılık bulunamamıştır (Tablo 6) (Şekil 11).

Tablo 6. Plazma interlökin-1 beta düzeyi ortalama ve standart sapmaları

GRUPLAR	1	2	3	4	5	6
Ort ± SD	103.1±112.5	155.7±153.3	213.7±105.2	171.4±180.8	158.3±165.6	91.2±58.1

Ort: Ortalama; **SD**: Standart sapma



Şekil 11. Gruplara göre interlökin-1 β düzeylerinin dağılımı

SERUM İNTERLÖKİN-2 DÜZEYİ

Serum interlökin-2 düzeyi Platinum ELISA kiti kullanılarak spektrofotometrik yöntemle mililitre başına pikogram (pg/mL) olarak ölçüldü. Ortalamaları ve standart sapmaları hesaplandı. Hesaplanan verilerin normalitesi incelendi. Nonparametrik Kruskal Wallis varyans analizi ve Mann Whitney U testi uygulandı. 27. günde gruplar

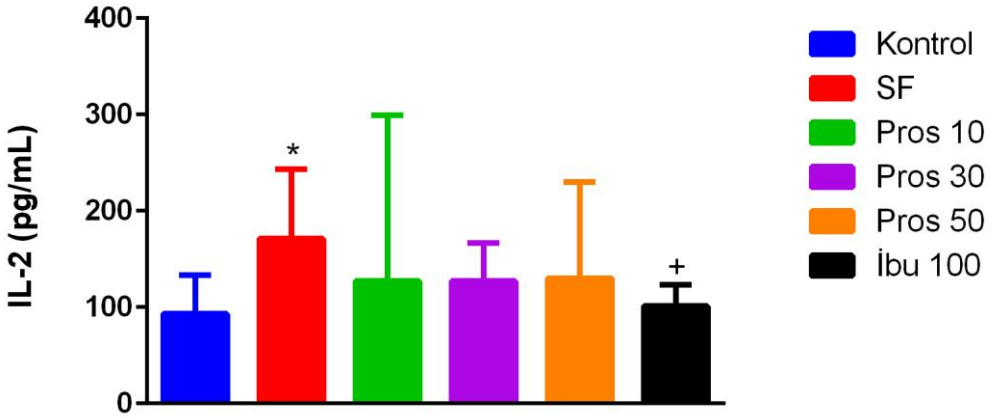
arası kıyaslamalarda grup 1 (kontrol grubu) ile grup 2 (serum fizyolojik grubu) arasında istatistiksel olarak anlamlılık ($p<0,05$) bulunmuştur. Tedavi etkinliğini ölçmek için yapılan karşılaştırmalarda ise sadece grup 2 (serum fizyolojik grubu) ile grup 6 (İbuprofen grubu) arasında istatistiksel olarak anlamlılık bulunmuştur (Tablo 7) (Şekil 12).

Tablo 7. Plazma interlökin-2 düzeyi ortalama ve standart sapmaları

GRUPLAR	1	2	3	4	5	6
Ort ± SD	93.2±39.9	171.3±72.1*	127.0±172.1	127.0±39.9	104.3±104.4	101.2±22.0†

Ort: Ortalama; **SD**: Standart sapma

***p<0,05, 27. günde grup 1(kontrol grubu) ile karşılaştırma, †p<0,05, 27. günde grup 2 (serum fizyolojik grubu) ile karşılaştırma.



Şekil 12. Gruplara göre interlökin-2 düzeylerinin dağılımı

SERUM İNTERLÖKİN-10 DÜZEYİ

Serum interlökin-10 düzeyi Platinum ELISA kiti kullanılarak spektrofotometrik yöntemle mililitre başına pikogram (pg/mL) olarak ölçüldü. Ortalamaları ve standart sapmaları hesaplandı. Hesaplanan verilerin normalitesi incelendi. Nonparametrik Kruskal Wallis varyans analizi ve Mann Whitney U testi uygulandı. 27. günde gruplar

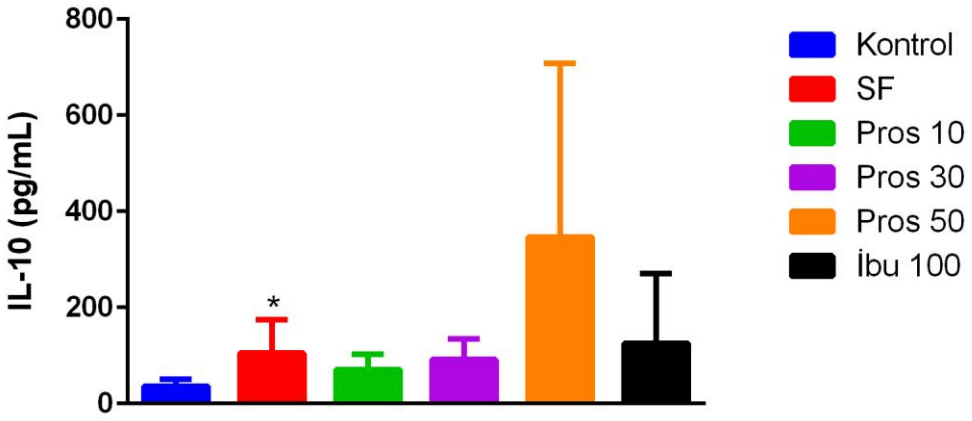
arası kıyaslamalarda grup 1 (kontrol grubu) ile grup 2 (serum fizyolojik grubu) arasında istatistiksel olarak anlamlılık bulunmuştur (p<0,05). Grup 2 ile 3, 4, 5 ve 6. gruplar arasında anlamlılık bulunamamıştır (Tablo 8) (Şekil 13).

Tablo 8. Plazma interlökin-10 düzeyi ortalama ve standart sapmaları

GRUPLAR	1	2	3	4	5	6
Ort ± SD	36.5±13.9	105.2±69.3*	70.8±31.7	91.8±42.5	347.0±360.4	144.8±170.8

Ort: Ortalama; **SD**: Standart sapma

*p<0,05, 27. gün grup 1 (kontrol grubu) ile karşılaştırma.



Şekil 13. Gruplara göre interlökin-10 düzeylerinin dağılımı

SERUM MALONDİALDEHİT DÜZEYLERİ

Serum MDA düzeyi Platinum ELISA kiti kullanılarak spektrofotometrik yöntemle mililitre başına pikogram (pg/mL) olarak ölçüldü. Ortalamaları ve standart sapmaları hesaplandı. Hesaplanan verilerin normalitesi incelendi. Nonparametrik Kruskal Wallis varyans analizi ve Mann Whitney U testi uygulandı. 27. günde grup 1 (kontrol grubu) ile grup 2 (serum fizyolojik grubu) arasında istatistiksel olarak anlamlılık bulunmamasına rağmen, grup 2 (serum fizyolojik grubu) ile grup 6 (ibuprofen)

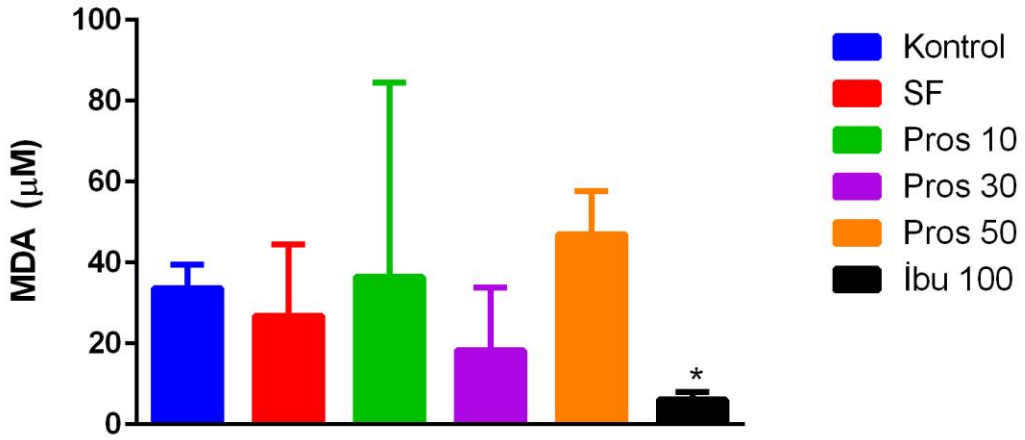
arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık (p<0,005) saptanmıştır (Tablo 9) (Şekil 14).

Tablo 9. Plazma malondialdehit düzeyi ortalama ve standart sapmaları

GRUPLAR	1	2	3	4	5	6
Ort ± SD	33.7±5.8	26.9±17.6	36.4±48.1	18.3±15.6	47.0±10.6	6.2±1.9*

Ort: Ortalama; **SD**: Standart sapma

*p<0,05, 27. gün grup 2 (serum fizyolojik grubu)'ye göre karşılaştırma.



Şekil 14. Gruplara göre MDA düzeylerinin dağılımı

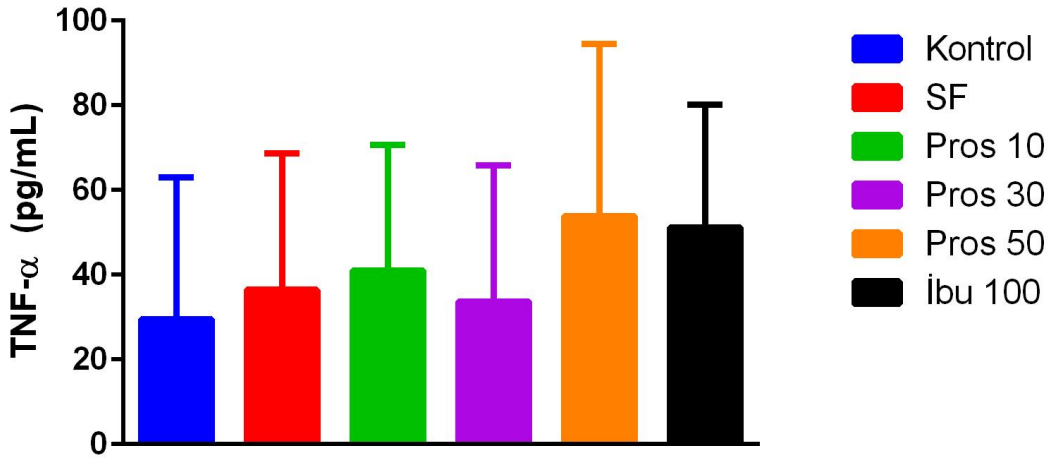
SERUM TÜMOR NEKROZ FAKTÖR ALFA DÜZEYLERİ

Serum TNFα düzeyi Platinum ELISA kiti kullanılarak spektrofotometrik yöntemle mililitre başına pikogram (pg/mL) olarak ölçüldü. Ortalamaları ve standart sapmaları hesaplandı. Hesaplanan verilerin normalitesi incelendi. Nonparametrik Kruskal Wallis varyans analizi ve Mann Whitney U testi uygulandı. 27. günde gruplar arası karşılaştırmalarda istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunamamıştır (Tablo 10) (Şekil 15).

Tablo 10. Plazma tümör nekroz faktör düzeyi ortalama ve standart sapmaları

GRUPLAR	1	2	3	4	5	6
Ort ± SD	29.5±33.5	36.5±32.2	41.0±29.7	31.4±29.2	53.9±40.5	53.1±35.2

Ort: Ortalama; **SD**: Standart sapma

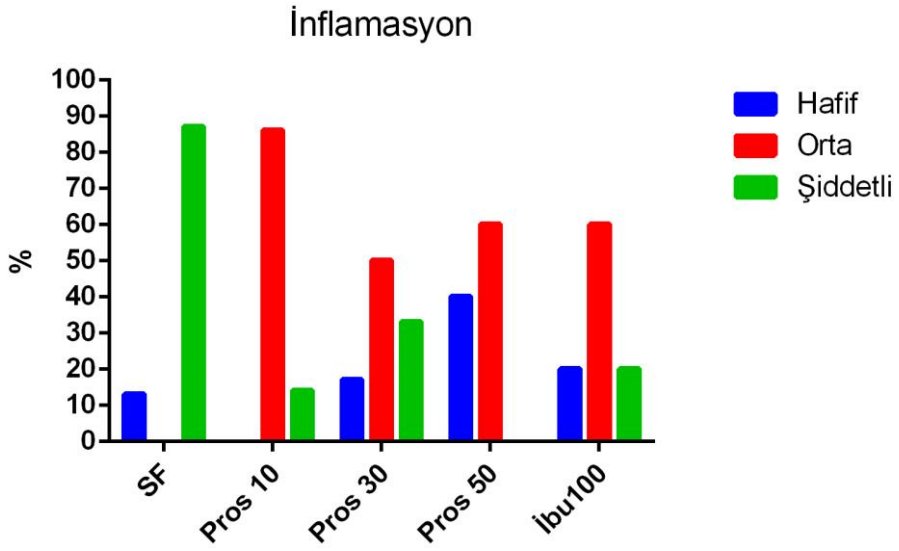


Şekil 15. Gruplara göre TNFα düzeylerinin dağılımı

HİSTOPATOLOJİK İNCELEMELER

İnflamasyon

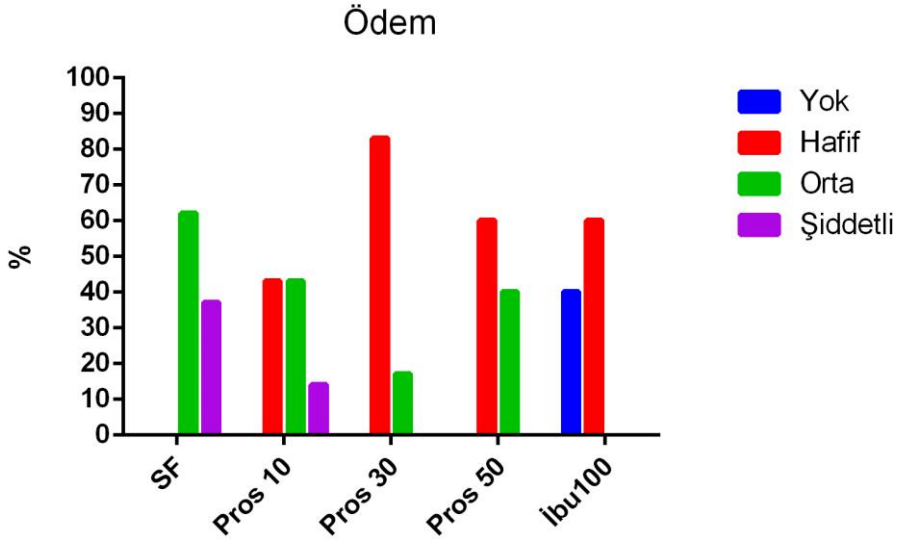
Yirmi yedinci günde sıçanların sağ arka ayak pençelerinin histopatolojik incelemelerinde grup 1'deki (kontrol grubu) sıçanlarda inflamasyona rastlanmadı. Grup 2 (serum fizyolojik grubu)'nin % 87,5'unda şiddetli, %12,5'unda hafif inflamasyon görülürken; grup 3'ün %85,7'sinde orta, %14,3'ünde şiddetli; grup 4'ün %16,7'sinde hafif, %50,0 orta, %33,3 şiddetli; grup 5'in %40'ında hafif, %60,0'ında orta; grup 6'nın %20'sinde hafif, %60,0'ında orta, %20,0'sinde şiddetli inflamasyon görüldü (Şekil 16).



Şekil 16. Gruplara göre inflamasyonun hafif-orta-şiddetli olarak % değerleri

Ödem

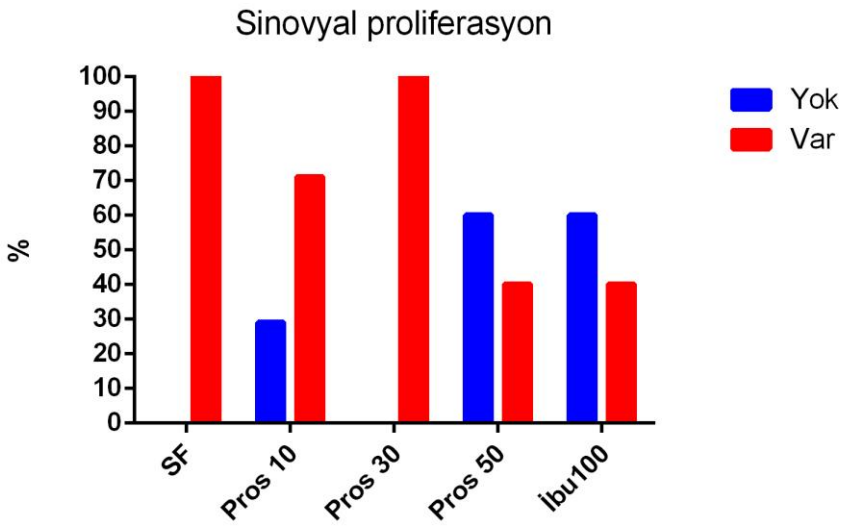
Yirmi yedinci günde sıçanların sağ arka ayak pençelerinin histopatolojik incelemelerinde grup 1 (kontrol grubu) sıçanlarında ödem görülmedi. Grup 2 (serum fizyolojik grubu)'nin %62,5'unda orta, %37,5'unda şiddetli; grup 3'ün 42,9'unda hafif, 42,9'unda orta, %14,3'ünde şiddetli; grup 4'ün %83,3'ünde hafif, 16,7'sinde orta; grup 5'in %60,0'ında hafif, %40,0'ında orta; grup 6'nın %40,0'ında ödeme rastlanmazken %60,0'ında hafif ödeme rastlandı (Şekil 17).



Şekil 17. Gruplara göre ödem % değerleri

Sinovyal Proliferasyon

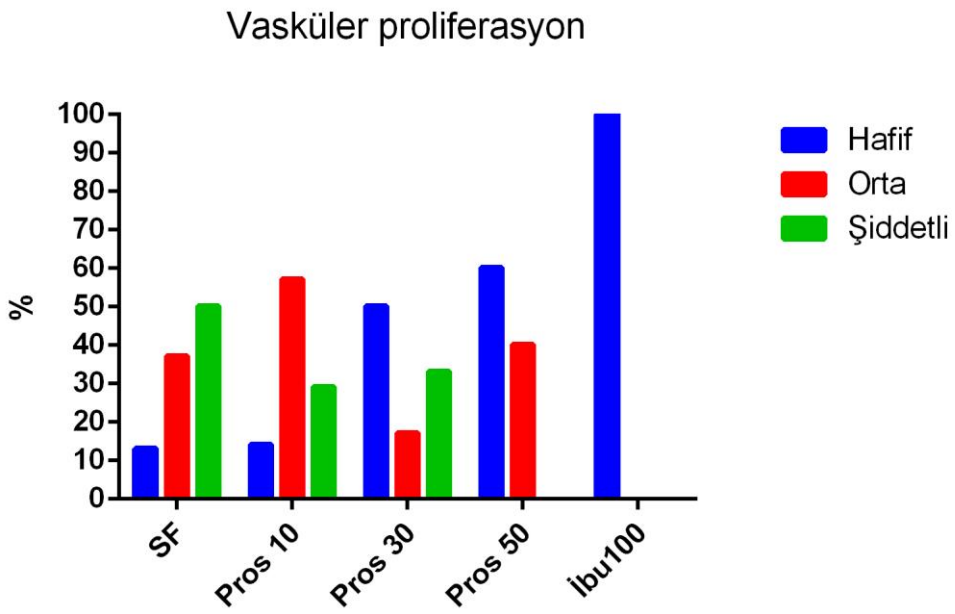
Yirmi yedinci günde sıçanların sağ arka ayak pençelerinin histopatolojik incelemelerinde grup 1'deki (kontrol grubu) hayvanlarda sinovyal proliferasyona rastlanmadı. Grup 2 (serum fizyolojik grubu)'nin %100 sinovyal proliferasyon görülürken; grup 3'ün %71,4'ünde; grup 4'ün %100'ünde; grup 5 ve 6'nın %40,0'ında sinovyal proliferasyon görüldü (Şekil 18).



Şekil 18. Gruplara göre sinovyal proliferasyon % değerleri

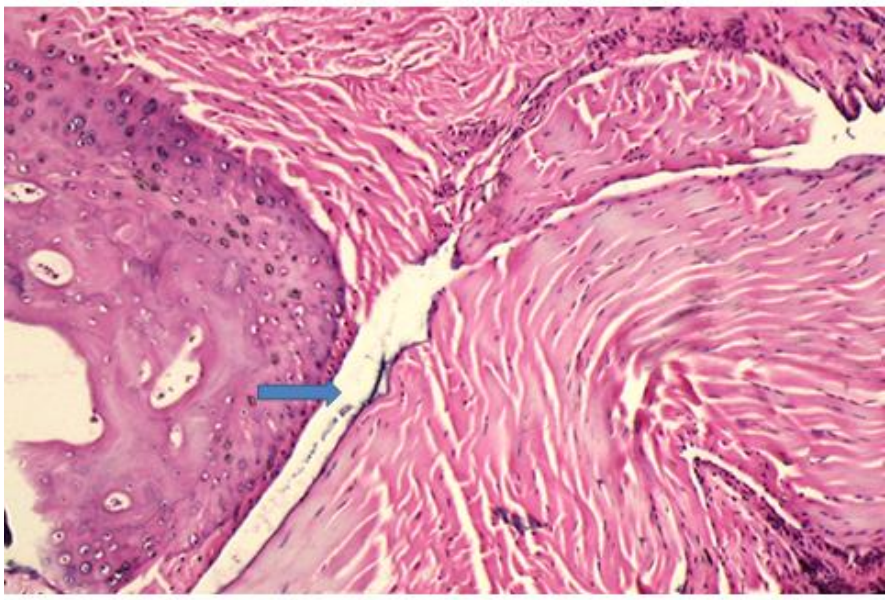
Vasküler Proliferasyon

Yirmi yedinci günde sıçanların sağ arka ayak pençelerinin histopatolojik incelemelerinde 40'lık büyütmede 5 alan incelendi. Vasküler yapılar sayıldı ve ortalamaları alındı. 27. günde grup 1'deki (kontrol grubu) hayvanlarda vasküler proliferasyona rastlanmadı. Grup 6'da %100 hafif vasküler proliferasyon görülürken grup 2 (serum fizyolojik grubu)'nin % 12,5'unda hafif, %37,5' unda orta, %50'sinde şiddetli; grup 3'ün %14,3'ünde hafif, % 57,1'sinde orta, %28,6'sında şiddetli; grup 4'ün %50'sinde hafif, %16,7'sinde orta, %33,3'ünde şiddetli; grup 5'in %60'ında hafif, %40'ında orta derecede vasküler proliferasyon görüldü (Şekil 19).

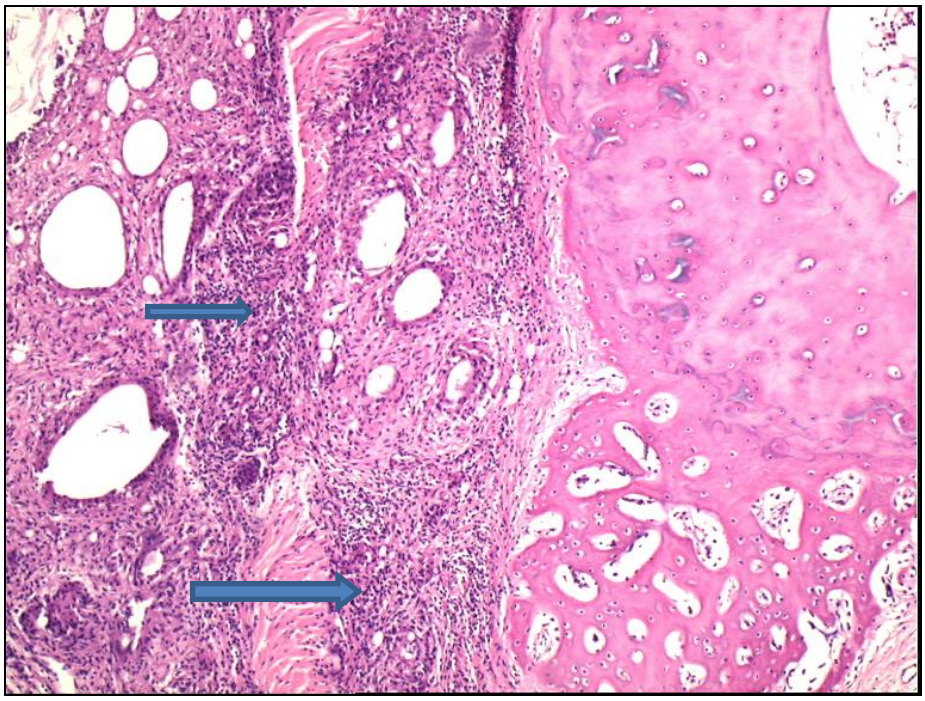


Şekil-19. Gruplara göre vasküler proliferasyon % değerleri

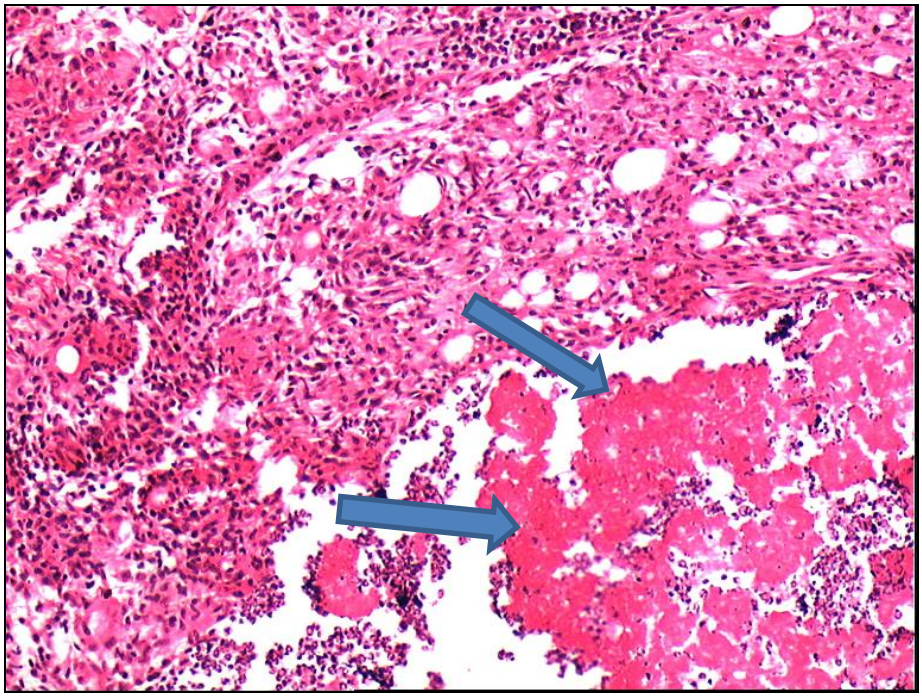
Histopatolojik olarak sıçanların sağ arka ayak pençeleri incelendiğinde grup 1 (kontrol grubu) normal sıçan pençesi ve hafif-orta-şiddetli ödem, inflamasyon, vasküler proliferasyon, sinovyal proliferasyon örneklerini gösteren şekiller (Şekil 20-27) aşağıda verilmiştir.



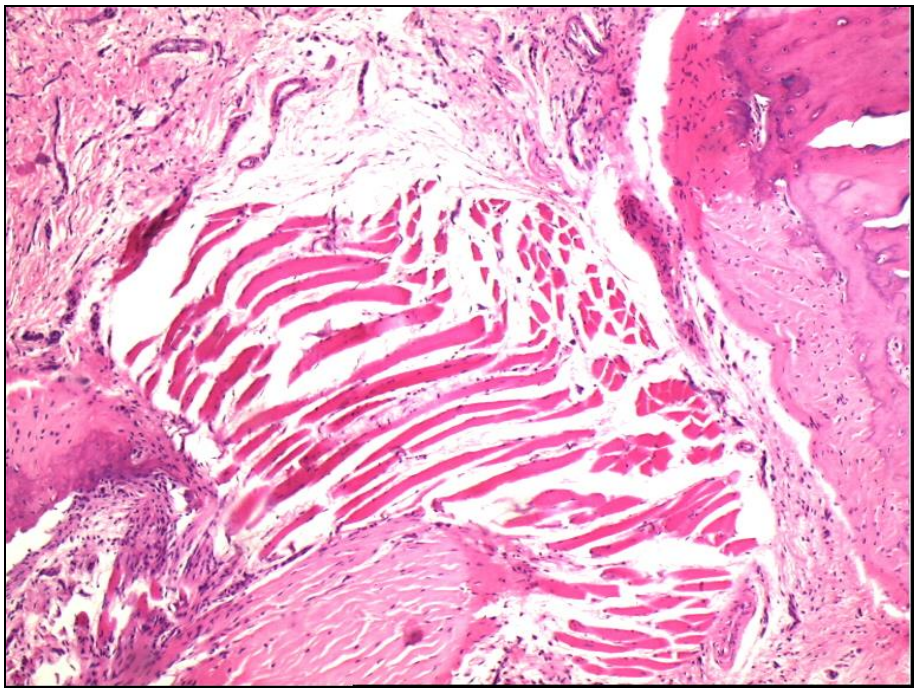
Şekil 20. Normal morfolojide kemik ve tendon dokusu ve normal eklem mesafesi (ok) (HEx100)



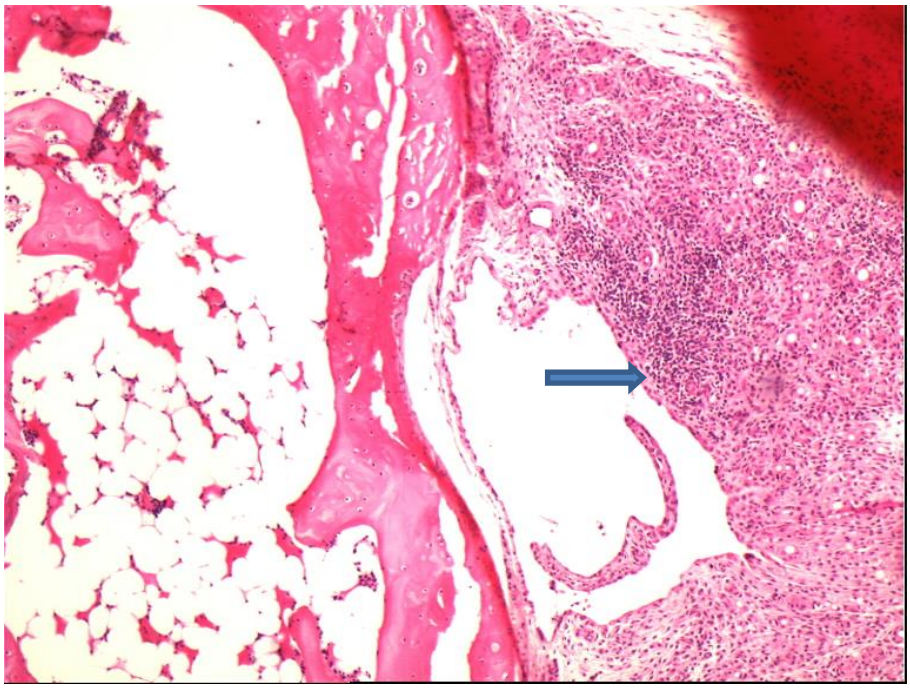
Şekil 21. Kemiğe komşu yumuşak dokuda periartiküler mesafede daralmanın eşlik ettiği yoğun mononükleer inflamasyon alanları (oklar) (HEx50)



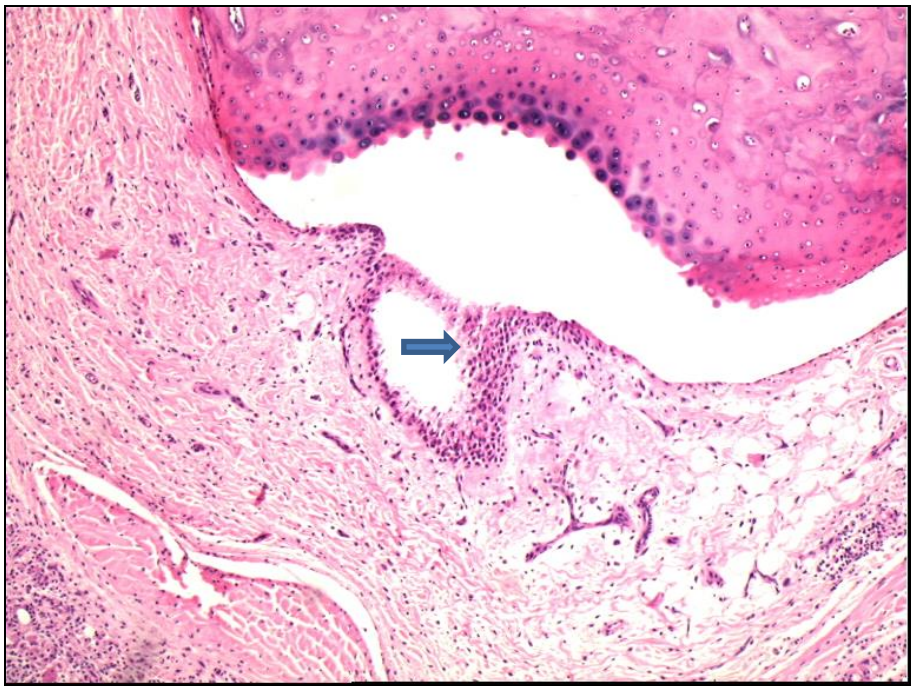
Şekil 22. Damar harabiyetini düşündüren fibrin birikimi (ok) ile birlikte yumuşak dokuda yoğun mononükleer inflamasyon ve artmış vaskülarizasyon (HEx100)



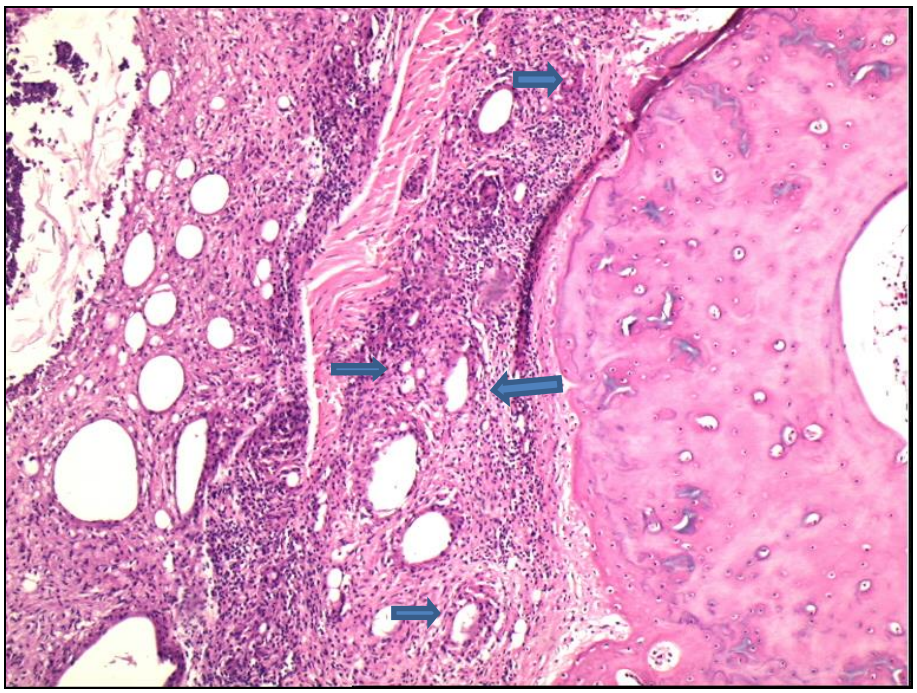
Şekil 23. Çizgili kas lifleri ve bağ dokusu liflerini birbirinden ayıran şiddetli ödem (HEx50)



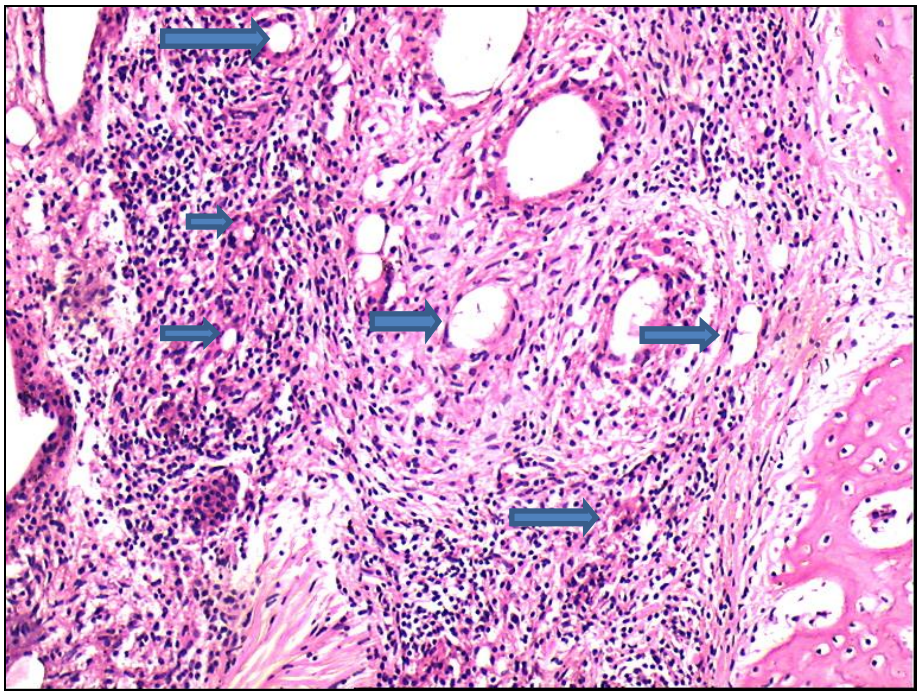
Şekil 24. Yoğun mononükleer inflamasyonla birliktelik gösteren prolifere sinoyyal doku (ok) (HEx50)



Şekil 25. Minimal inflamasyon, fokal sinovyal proliferasyon (ok) (HEx50)



Şekil 26. Kemiğe komşu şiddetli inflamasyon içeren yumuşak doku alanlarında ayıca artmış damar yapıları (oklar) (HEx50)



Şekil 27. Yoğun inflamasyon içeren ödemli yumuşak doku içerisinde sayıca artmış damar yapıları (oklar) (HEx100)

TARTIŞMA

Romatoid artrit; birçok eklemi tutan, etyolojisi belli olmayan, kronik ve inflamatuvar multisistemik hastalıklardan birisidir. Tüm toplumlarda görülme prevelansı %0,5-1 arasındadır (1-5). Hastalık sadece kas ve iskelet sistemini etkilemekle kalmayıp; kalp-damar, akciğer gibi tüm hayati sistemleri etkileyerek erken mortalite ve morbiliteye neden olur (11-16).

Romatoid artrit tedavisini araştirmak için birçok deneysel artrit modeli geliştirilmiştir. Bu modellerden biri de adjuvan artrit olup; FCA'nın sıçan pençesine intradermal injeksiyonu ile oluşturulur. RA'da çok sık kullanılmaktadır (2,33,50).

Hedera helix folium ekstresi (Prospan®) ile yapılan birçok çalışmada; Hedera helix ekstresinin antispazmodik, sekretolitik, antiinflamatuvar, antimikrobiyal, hemolitik, vazokonstriktör, analjezik ve antipirutik etkileri sayesinde öksürük, bronşit, kanser, romatoid artrit ve haricen deri hastalıklarında tedavi olarak kullanıldığı görülmüştür (63,64,66,68-70).

Nonsteroid antiinflamatuvar ajanlar, RA'da kullanılmakla birlikte prostaglandin sentez inhibisyonu ile etkilerini gösterirler. Bu ilaçların, adjuvan artritli sıçanların pençelerinde ağrı ve ödem gibi inflamatuvar göstergeleri azalttığı yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (71,72).

Çalışmamız sıçanlarda oluşturulan artrit modelinde Hedera helix folium ekstresi (Prospan®) tedavisinin koruyucu etkisini araştırmak amacıyla yapılmıştır. İbuprofen, artrit tedavisinde en çok kullanılan nonsteroid bir antiinflamatuvardır. İbuprofen, Hedera helix folium ekstresi (Prospan®)'nin adjuvan artritte inflamasyon ve ağrı üzerindeki etkisini incelemek amacıyla pozitif kontrol amacıyla kullanılmıştır.

Çalışmamızda adjuvan artrit modelini oluşturmak için 0. günde, kontrol grubu hariç diğer tüm sıçan gruplarının sağ arka ayak pençelerine tek doz 0,1 ml FCA intradermal olarak uygulandı. Bunu takiben 17. günde sıçanların sağ pençe çapları kumpas aleti ile ölçüldü ve pençe ödemleri makroskopik skorlama yöntemiyle derecelendirildi. Kontrol grubuna göre, diğer grupların sağ pençe hacim ve çaplarında istatistiksel olarak anlamlı bir artışın olduğu görüldü ($p<0,05$). Bu bulgumuz bizim artriti başarıyla oluşturduğumuzun göstergesidir.

Sıçanların ağırlık takibinde, 27. günde gruplar arası yapılan karşılaştırmalarda grup 1 (kontrol grubu)'e göre 2, 3, 4, 5 ve 6. gruplarda istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık ($p<0,05$) bulunmuştur. FCA uygulaması nedeniyle artrit oluşan gruplar ile grup 1 (kontrol grubu) karşılaştırıldığında sıçanların kilo kaybettikleri bulunmuştur.

Çalışmamızda oluşturduğumuz adjuvan artrit modelimize uyguladığımız Hedera helix (Prospan®) tedavisi, 17. gün ile 27. gün arasında 10 gün sürdü. Grupların 17. günde kumpas cihazı ile ölçülen pençe ölçüm değerleri 20. günde grup 3 (Prospan 10)'de; 27. günde ise grup 6 (ibuprofen grubu)'da anlamlı düzeyde azalmış olduğu görülmüştür. Bu bulgularla biz RA'da Hedera helix ekstresi (Prospan®) ve ibuprofen tedavisinin inflamasyonda etkili olabileceğini söyleyebiliriz.

Hedera helix ekstresinin antiinflamatuvar etkisi olduğuna dair birçok çalışma yapılmıştır. Rai ve ark. 2013 yılında Hedera helix ekstresinin antiinflamatuvar ve antiartritik özelliklerini incelemek için yaptıkları çalışmada 5 gruba ayırdıkları farelerin pençe çapı kalınlıklarını ölçmüşler ve kuyruklarından aldıkları kanlarda eritrosit sedimantasyon hızına bakmışlardır. Bu verilerden yola çıkarak yaptıkları karşılaştırmalarda Hedera helix ekstraktının antiinflamatuvar ve antiartiritik özelliklerini bulmuşlardır (64).

Cwientzek ve ark.'nın 2011 yılında yaptıkları çalışmada akut bronşit tanısı konulan 590 çocuk hasta üzerinde Hedera helix ekstresinin antiinflamatuvar etkinliğini göstermişlerdir (73).

Gepdiremen ve ark.'nın 2005 yılında yaptıkları çalışmasında ise akut ayak ödemi geliştirdikleri sıçanlarda Hedera helix ekstrelerinin içerdiği triterpen saponinlerin antiinflamatuvar özelliklerini göstermişlerdir (74).

Süleyman ve ark.'nın 2003'deki çalışmasında sıçanlarda geliştirilen pamuk ve toprak kaynaklı akut ve kronik inflamasyon modellerinde Hedera helix ekstresinin antiinflamatuvar özelliklerini bulmuşlardır (75).

2006 yılında Fazio ve ark.'nın yapmış olduğu çalışmasında da 5181'i çocuk olan 9657 bronşitli hastaya Hedera helix ekstresinden ihtiva edilmiş bir şurup 7 gün boyunca günde 3 kez içirilmiştir. 7 günün sonunda bronşit hastaların semptomlarında % 95 oranında iyileşme gözükmüştür (76).

Biz de yaptığımız çalışmamızda Hedera helix ekstresinin (Prospan®) antiinflamatuvar ve antiartritik etkilerini bulduk.

Çalışmamızda ağrı düzeyleri PAM cihazı ile FCA uygulaması yapılmadan önce 0. gün tüm gruplarda ölçüldü. FCA uygulanan grupların PAM ölçüm değerleri, 17. güne gelindiğinde 0. gündeki değerler ile karşılaştırıldığında hiçbir işlem uygulanmayan 1. grup hariç diğer gruplarda (2, 3, 4, 5, 6) grup içi karşılaştırmalarda basınca karşı duyarlılığın arttığı ve reaksiyon gösterme sürelerinin kısaldığı ve bunlarında istatistiksel olarak anlamlı ($p<0,05$) olduğu saptandı. 17. gün ile 20, 23 ve 27. günlerde grup içi karşılaştırıldığında sadece grup 6 (ibuprofen grubu)'da PAM değerlerinde anlamlı düzeyde artma görülmüştür ($p<0,05$). Aynı şekilde 27. günde grup 2 (serum fizyolojik grubu) ile diğer gruplar karşılaştırıldığında yine sadece grup 6 (ibuprofen grubu)'da istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmuştur ($p<0,05$). Bu da uygulanan tüm dozlarda Hedera helix ekstresinin analzejik etkisinin bulunmadığını fakat grup 6 (ibuprofen grubu)'nın analzejik etkisinin olduğunu göstermiştir. Literatürde Rai'nin yapmış olduğu çalışma da Hedera helix ekstresi (Prospan®) analjezik etkisine dair bir bulgu gözlemlenememiştir (64).

Çalışmamızın sonunda RA bulgularını değerlendirmek amacıyla sıçanların pençelerini histopatolojik olarak inceledik. 27. günde grup 2'nin % 12,5'unda hafif, grup 3'ün %14,3'ünde hafif, grup 4'ün %50'sinde hafif, grup 5' in %60'ında hafif, grup 6'da %100 hafif vasküler proliferasyon görüldü. Vasküler proliferasyon yüzde olarak en çok grup 2'de ve en az grup 4, grup 5 ve grup 6'da görülmüştür.

Sıçanların sağ arka ayak pençelerinin 27. günde histopatolojik incelemelerinde; grup 2 (serum fizyolojik grubu)'nin %100'ünde, grup 3'ün %71,4'ünde; grup 4'ün %100'ünde; grup 5 ve 6'nın %40,0'ında sinovyal proliferasyon görüldü. Sinovyal proliferasyon yüzde olarak en çok grup 2'de ve en az grup 5 ve grup 6'da görülmüştür.

İnflamasyon oluşumu açısından 27. günde yapılan histopatolojik incelemelerde; grup 2 (serum fizyolojik grubu)'nin %12,5'unda hafif, grup 3'ün %85,7'sinde orta; grup 4'ün %16,7'sinde hafif; grup 5'in %40'ında hafif; grup 6'nın %20'sinde hafif,

inflamasyon görülmüştür. Bu bulgulardan yüzde olarak en çok grup 2'de ve en az inflamasyon grup 4, grup 5 ve grup 6'da görüldü.

Sıçanların sağ arka ayak pençelerinin histopatolojik incelemelerinde 27. günde, grup 2 (serum fizyolojik grubu)'nin %62,5'unda orta; grup 3'ün 42,9'unda hafif; grup 4'ün %83,3'ünde hafif; grup 5'in %60,0'ında hafif, grup 6'nın %60,0'ında hafif ödeme rastlanmıştr. Bu bulgulardan yüzde olarak en az ödem grup 4, grup 5 ve grup 6'da görüldü. Rai'nin yapmış olduğu çalışmasında Hedera helix ekstresi (Prospan®) tedavisinin artrit uygulanmış sıçanların pençelerinde ödem ve inflamasyonu önlediğine dair bulgular gözlemlemiştir (64).

Serbest radikaller, vücatta oksidatif stres sonucu oluşan, bir veya daha fazla ortaklanmamış elektron içeren endojen bir bileşiklerdir. Enfeksiyon, inflamasyon, radyasyon, oksijen toksisitesi, diyabet ve kanserin RA patogenezinde rol oynadığı yönünde bulgular elde edilmiştir (46-48).

Serbest radikaller vücutta aşırı miktarda üretildiğinde veya antioksidan sistemleri yetersiz kaldığında doku hasarına neden olmaktadır. Doku hasarının en belirgin özelliklerinden biri de hücre zarının yapısında bulunan lipit peroksidasyonu ve bu reaksiyonun son ürünü olan MDA'dır. Yapılan çoğu çalışmada MDA düzeyi RA'lı hastalarda sağlıklı bireylere göre yüksek bulunmuştur (55,72). Taştekin ve ark. (2) yaptığı çalışmada adjuvant artritli sıçanlarda plazma MDA düzeylerinin sağlıklı kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde ($p<,05$) arttığını görmüşlerdir. Bizim çalışmamızda ise MDA değerleri 27. günde; grupların ikili karşılaştırmalarında grup 2 (serum fizyolojik grubu)'ye göre sadece grup 6 (ibuprofen grubu)'da istatistiksel olarak anlamlı bir azalma ($p<0,005$) olduğu görüldü. Bu bulgular grup 6 (ibuprofen grubu)'nın antioksidan etki gösterdiğini düşündürmektedir. Gülçin ve ark. (77) da yaptığı çalışmada Hedera helix ekstresi (Prospan®)'nin alfa-hederin ve hedera saponin C'nin antioksidan aktivitesini gözlemlemişlerdir.

Tümör nekroz faktör alfa, RA'lı hastalarda iltihabın devamlılığını sağlayan bir sitokindir. Hem sinoviyal dokuda hem de sinoviyal sıvıda bol miktarda bulunur. Başka sitokinlerin uyarılmasını teşvik eder (29,31,61). Çalışmamızın 27. gününde TNF-α ölçümlerinde, grup içi ve gruplar arası karşılaştırmalarda istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunamamıştır.

Sitokinler, immün cevapta rol alan hücrelerin intrasellüler iletişimine yardım eden çözünebilir proteinler olup hücre bölünmesini, farklılaşmasını etkiler ve birçok

inflamatuvar olayda rol oynar. Etkileri lokal veya sistemik olabilir. Sitokinler sinovyal hücre proliferasyonu meydana getirerek membran hiperplazisi ve pannus oluşumundan sorumludurlar. Romatoid artritte de sinovyoda sitokinlerin düzeyi artar. RA patogenezinde başlıca önemli sitokinler TNFα, IL-1, IL-2, IL-6 ve IL-10'dur (54).

İnterlökin-1, iki farklı proteinden meydana gelmekte olup bunlar IL1-α ve IL1-β'dır. Fibroblast ve sinovial hücrelerin proliferasyonunu arttırıcı etki göstermekle birlikte santral sinir sistemi üzerine etkisiyle ateş ortaya çıkar. Kondrositlerden matriks enzim üretimini uyararak kemik ve kıkırdak yıkımını artırırlar (59,60,78). Çalışmamızın 27. gününde gruplar arası kıyaslamalarda istatistiksel olarak anlamlılık bulunamamıştır.

İnterlökin-2, T helper hücreleri tarafından üretilen en önemli immünoregülatör bir sitokindir. Yapımı antijen uyarısına karşı geçici yanıt olarak oluşur. T lenfositlerinin otokrin ve parakrin büyüme faktörüdür (57,57,60,78). Çalışmamızın 27. gününde yapılan IL-2 ölçümlerinde grup 1 (kontrol grubu) ile grup 2 (serum fizyolojik grubu) arasında istatistiksel olarak anlamlılık ($p<0,05$) bulunmuştur. 27.günde gruplar arası yapılan karşılaştırmada grup 2 (serum fizyolojik grubu)'ye göre grup 6 (İbuprofen grubu)'da istatistiksel olarak anlamlı bir azalma saptandı ($p<0,05$).

İnterlökin-6, T helper hücreleri ve monositler tarafından üretilir. İnflamasyon, konak savunması, doku hasarı ile ilgili birçok hümoral ve hücresel immün etkileri olan çok yönlü bir sitokindir. B lenfositlerden IgG üretiminden sorumludur. RA'lı hastaların plazma ve yıkılan kemik dokusunda IL-6 yüksek oranda bulunmuştur (56,57,78,79). Bizim çalışmamızda ise deneysel ölçüm hatalarından kaynaklı olarak IL-6 bulunamamıştır.

İnterlökin-10, hücresel immünitenin kontrolünde rol oynar. Makrofajlar tarafından sitokinlerin (örn: TNF, IL-1, IL-12) üretimini engellemekle birlikte makrofajların T hücresi aktivasyonundaki işlevlerini engeller. İlk kez sitokin sentez kısıtlayıcı faktör olarak tarif edilmiştir (56,57,60,78). Khalifeh ve ark. (80)'nın yaptığı çalışmada sağlıklı grupta IL-10 düzeyleri kontrol grubuna göre daha düşük bulunmuştur. Bizim çalışmamızda ise 27. günde gruplar arası kıyaslamalarda grup 1 (kontrol grubu) ile grup 2 (serum fizyolojik grubu) arasında istatistiksel olarak anlamlı ($p<0,05$) bulunmasına ($p<0,05$) rağmen, diğer gruplar arasında istatistiksel anlamlılık ($p>0,05$) bulunamamıştır.

Sonuç olarak; FCA'nın sıçanların sağ arka ayak pençelerine injeksiyonu sonucu oluşturulan adjuvan artrit modelinde Hedera helix ekstresi (Prospan®) tedavisinin, deneysel çalışmalarla kanıtlanmış antiinflamatuvar etkileri bizim çalışmamızda da 20. günde bulunmuştur. Fakat antioksidan ve analjezik etkilerinin değerlendirilmesi amacıyla daha kapsamlı çalışmaların yapılarak RA tedavisindeki etkisinin incelenmesinin gerektiğine inanmaktayız.

SONUÇLAR

Çalışmamızda sıçanların sağ arka ayak pençelerine 0,1 ml FCA'nın intradermal olarak uygulanmasıyla olşturulan adjuvan artritte Hedera helix folium ekstresi (Prospan®) tedavisinin etkilerini inceledik. İncelemeler sonucunda elde edilen veriler aşağıdaki gibidir;

1. Sıçanların ağırlık takibinde 27. günde gruplar arası yapılan karşılaştırmalarda grup 1 (kontrol grubu)'e göre 2, 3, 4, 5 ve 6. gruplarda istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık ($p<0,05$) bulunmuştur. FCA ile artrit oluşturulan sıçanlar kilo kaybetmişlerdir.

2. *Freund's Complete Adjuvant* uygulanan grupların kumpas cihazı ile ölçülen pençe ölçüm değerleri, 17. güne gelindiğinde 0. gündeki değerler ile karşılaştırıldığında hiçbir işlem uygulanmayan 1. grup hariç diğer gruplarda (2, 3, 4, 5, 6) grup içi karşılaştırmalarda tüm sıçanlarda adjuvan artritin oluştuğu, sağ arka pençede inflamatuvar reaksiyon ve ödemin belirgin olduğu ve bunların istatistiksel olarak anlamlı ($p<0,05$) olduğu saptandı. Bu bulgumuz bizim adjuvan artrit modelini başarı ile gerçekleştirdiğimizin göstergesidir. 17. günde uygulanan ilaç tedavilerinin etkinliğini incelemek amacıyla 20. günde kumpas cihazı ile yapılan ölçüm değerleri karşılaştırıldığında grup 3 (Prospan 10)'ün sağ pençe çapında anlamlı düzeyde azalma oluşturduğu ($p<0,05$) saptanmıştır. 17. gün ile 27. günler arasında kumpas ile yapılan pençe ölçüm değerleri grup içi karşılaştırmalarda ise sadece grup 6 (ibuprofen grubu)'da istatistiksel olarak anlamlı bir farklılığın ortaya çıktığı ($p<0,05$) görülmüştür.

3. *Pressure application measurement* cihazı ile yapılan ağrı eşiği ölçümleri, 17. güne gelindiğinde 0. gündeki değerler ile karşılaştırıldığında hiçbir işlem

uygulanmayan 1. grup hariç diğer gruplarda (2, 3, 4, 5, 6) grup içi karşılaştırmalarda basınca karşı duyarlılığın arttığı ve reaksiyon gösterme sürelerinin kısaldığı ve bunların da istatistiksel olarak anlamlı ($p<0,05$) olduğu saptandı. 27. günde grup 2 (serum fizyolojik grubu) ile diğer gruplar karşılaştırıldığında sadece grup 6 (İbuprofen grubu)'da istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmuştur ($p<0,05$).

4. Adjuvan artritin histopatolojik olarak incelemelerinde en çok FCA uygulaması sonrası serum fizyolojik uygulanan grupta vasküler proliferasyon, sinoviyal proliferasyon, inflamasyon ve ödemin görüldüğü ve grup 5 (Prospan 50) ve grup 6 (İbuprofen grubu)'da ise bu bulguların daha belirgin olarak gerilediği görülmüştür.

5. 27. günde MDA düzeyleri ölçümünde grup 2 (serum fizyolojik grubu) ile grup 6 (İbuprofen grubu) arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık olduğu bu bulgularımızda bulunmuştur ($p<0,005$).

6. 27. günde inflamasyon göstergesi olan TNF-α, IL-1β sitokinlerinin değerlerinde gruplar arasında anlamlı bir farklılık bulunamadı.

7. 27. günde IL-2 sitokinin değerleri ölçümünde gruplar arası kıyaslamalarda grup 1 (kontrol grubu) ile grup 2 (serum fizyolojik grubu) arasında istatistiksel olarak anlamlılık ($p<0,05$) bulunmuştur. Tedavi etkinliğini ölçmek için yapılan karşılaştırmalarda ise sadece grup 2 (serum fizyolojik grubu) ile grup 6 (İbuprofen grubu) arasında istatistiksel olarak anlamlılık bulundu ($p<0,05$).

8. 27. günde IL-10'nun ölçümünde gruplar arası kıyaslamalarda grup 1 (kontrol grubu) ile grup 2 (serum fizyolojik grubu) arasında istatistiksel olarak anlamlılık bulundu ($p<0,05$).

Sonuçlar, deneysel adjuvan artrit modelinde Hedera helix folium ekstresinin (Prospan®) pençe çapı ve hacim ölçümleri ile histopatolojik veriler doğrultusunda antiinflamatuvar etkisinin olduğu fakat ağrı ölçümleri sonucunda da analjezik etkisinin olmadığı görüldü. MDA ölçümleri doğrultusu sonucunda sadece grup 6 (İbuprofen)'nın antioksidan etkisi saptandı. Sitokinler üzerinde etkinliği ile ilgili ise tam olarak anlamlı sonuçlar bulunamamıştır. Bu konuda daha kapsamlı ve ayrınlı araştırmalar yapılması gerektiğini düşünmekteyiz.

ÖZET

Çalışmamızda Hedera helix folium ekstresi (Prospan®) tedavisinin sıçanlarda deneysel olarak oluşturulan adjuvan artrit modelindeki etkisini inceledik. Toplam 6 grup oluşturuldu. Birinci grup kontrol grubu olarak ayrıldı ve diğer grupların sağ arka ayak pençelerine 0. gün intradermal yolla 0,1 ml *Freund's Complete Adjuvant* injeksiyonu yapılarak artrit oluşturuldu. 17-27 günler arası; ikinci gruba serum fizyolojik, üçüncü gruba Hedera helix folium ekstresi (Prospan®) (10 mg/kg), dördüncü gruba Hedera helix folium ekstresi (Prospan®) (30 mg/kg), beşinci gruba Hedera helix folium ekstresi (Prospan®) (50 mg/kg) ve altıncı gruba da pozitif kontrol için ibuprofen (100 mg/kg) uygulandı. Tüm ilaçlar sıçanlara gastrik gavaj yoluyla verildi. 0, 17, 20, 23 ve 27. günlerde pençe çapları kumpasla, ağrı düzeyleri ise basıç uygulama cihazıyla ölçüldü. 27. günde kalpten ponksiyonla kanlar alındı ve patolojik inceleme için sağ arka ayak eklemleri çıkarıldı. Serumda malondialdehit, interlökin-1beta, interlökin-2, interlökin-6, interlökin-10 ve tümör nekroz faktör-alfa düzeyleri ölçüldü ve eklemler histopatolojik olarak incelendi.

Hedera helix folium ekstresi (Prospan® 30 mg/kg) tedavisinin deneysel adjuvant artrit modelinde antiinflamatuvar etki göstererek pençe ölçüm değerlerini azalttığı, histopatolojik bulgulardan inflamasyon, vasküler proliferasyon, sinoviyal proliferasyon ve ödemde etkili olduğu görülmüştür. Ağrı parametre ölçümlerinde analzejik etkisi bulunamamıştır. Sitokin ölçümlerinde ise anlamlı sonuçlar elde edilememiştir.

Anahtar sözcükler: Adjuvant artrit, ibuprofen, Hedera helix ektresi, Prospan®, sitokin.

THE EFFECT OF HEDERA HELIX FOLIUM EXTRACT (PROSPAN®) TREATMENT IN THE EXPERIMENTAL ARTHRITIS MODEL

SUMMARY

In our study, we examined the effect of the Hedera helix folium extract (Prospan®) on the experimentally-induced adjuvant arthritis model in rats. In total, 6 groups have been formed. The first group served as the control group. In the other groups, 0.1 ml of *Freund's Complete Adjuvant* was injected intradermally to the right back paws on day 0 to induce arthritis. Between days 17 and 27, saline has been administered to the 2nd group, Hedera helix extract (Prospan®) (10, 30 and 50 mg/kg) to the 3rd - 5th groups, respectively, and ibuprofen (100 mg/kg) was given as positive control to the 6th group. All of the drugs were administered through gastric gavage. On days 0, 17, 20, 23 and 27, paw diameters were measured with a caliper and pain was evaluated using a paw pressure apparatus. On day 27, bloods were taken from the heart by puncture and right hind leg joints were removed for pathological examination. Serum malondialdehyde, interleukin-1beta, interleukin-2, interleukin-6, interleukin-10 and tumor necrosis factor-alpha levels were measured and joints were examined histopathologically.

Hedera helix folium extract (Prospan®) treatment exerted an antiinflammatory effect and reduced paw diameters in the experimental adjuvant arthritis model; histopathological findings indicate that it has been effective on inflammation, vascular proliferation, synovial proliferation and edema. No analgesic activity was observed in

pain parameters. In cytokine measurements, no significant results were obtained.

Keywords: Adjuvant arthritis, ibuprofen, Hedera helix extract, Prospan®, cytokine.

KAYNAKLAR

1. Kiper S, Sunal N. Romatoid Artritli Hastalarda Uyku Kalitesinin Değerlendirilmesi. Kocatepe Tıp Dergisi Ocak-Mayıs-Eylül 2009;10:33-39.

2. Tastekin N, Aydogdu N, Dokmeci D, Usta U, Birtane M, Erbas H, Ture M. Protective effects of L-carnitine and alpha-lipoic acid in rats with adjuvant arthritis. Pharmacol Res. 2007;56(4):303-10.

3. Jaswal S, Mehta HC, Sood AK, Kaur J. Antioxidant status in rheumatoid arthritis and role of antioxidant therapy. Clin Chim Acta. 2003;338(1-2):123-9.

4. Sürer S, Dokmeci D. Deneysel artrit modelinde irbesartan, karvedilol ve kombine tedavinin etkisi (tez). Edirne: Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmakoloji Anabilim Dalı;2014.

5. Dağdelen Öğe F, Dokmeci D. Deneysel artrit modelinde erdostein, kafeik asit fenetil ester ve kombine tedavinin etkisi (tez). Edirne: Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmakoloji Anabilim Dalı;2014.

6. Rooney S, Ryan MF. Effects of alpha-hederin and thymoquinone, constituents of Nigella sativa, on human cancer cell lines. Anticancer Res. 2005;25:2199-204.

7. Mendel M, Chłopecka M, Dziekan N, Wiechetek M. The effect of the whole extract of common ivy (Hedera helix) leaves and selected active substances on the motoric activity of rat isolated stomach strips. J Ethnopharmacol 2011;134(3):796-802.

8. tr.wikipedia.org/wiki/Duvar_sarmaşığı. Erişim tarihi: 17.02.2014.

9. www.ansiklopediatri.com/Prospan. Erişim tarihi: 25.02.2014.

10. Süzgeç S, Eyisan S. Türkiye'deki eczanelerde bulunan bitkisel ilaçlar. Marmara Pharmaceutical Journal 16:164-180,2012.

11. Bozkurt M. Romatoid artrit ve ankilozan spondilitte nörosensorial işitme kaybı (uzmanlık tezi).Diyarbakır: Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizik Tedavi Ve Rehabilitasyon Anabilim Dalı;2009

12. Sarıöz Ö. Türk romatoid artrit hastalarında IL-6 (interlökin-6) gen polimorfizmlerinin moleküler düzeyde incelenmesi (tez). İstanbul: Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü;2009.

13. Eren M. Romatoid artrit hastalarında hastalık aktivitesinin ve tedaviye yanıtın değerlendirilmesinde anti-ccp otoantikorunun yeri (tez).Erzurum: Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı;2008.

14. Gülcü E. Romatoid artrit hastalarında antioksidan enzim düzeyleri ile hastalık aktivitesi arasındaki ilişki (uzmanlık tezi). Van: Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tıp Fakültesi Fiziksel Tıp Ve Rehabilitasyon Anabilim Dalı;2010.

15. Dirik G. Posttraumatıc growth and psychologıcal dıstress among rheumatoid arthritis patients: an evaluation with. İn the conservation of resources theory (tez). Ankara: Mıddle East Technıcal Unıversıty of The Graduate School of Social Scıences;2006.

16. Özer H, Varol İhsan Ö. Romatoid artrit, skleroderma ve ankilozan spondilitli hastalarda d vitamin düzeyinin hastalık aktivasyonu ile ilişkisi (tez). Adana: Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı;2013

17. Kalyoncu U. Romatoid artrit sinoviyumda çoklu ilaç direnç proteinlerinin ekspresyonu: Breast cancer resistance protein (tez). Ankara: Hacettepe Üniversitesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı Romatoloji Ünitesi;2009.

18. Yaşar Bilge N. Romatoid artrit hastalarında serum adinopektin düzeylerinin insülin direnci ve inflamatuvar göstergelerle ilişkisi (tez). Eskişehir: Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı/ Romatoloji Bilim Dalı; 2012.

19. Hamuryudan V. Türkiye'de sık karşılaşılan hastalıklar 1. İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri Sempozyum Dizisi No: 55 2007; s. 69-86.

20. Yener M, Hekim Baloğlu H. Romatoid artrit hastalarında sağlık ile ilgili yaşam kalitesini etkileyen faktörlerin belirlenmesi (tez). Isparta: Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi;2010

21. Işık A, Polat YK. Romatoid artrit ve sistemik lupus eritematoz hastalarında apelin ve omentin'nin insülin direnci üzerine etkileri (tez). Elazığ: Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı;2010.

22. Umut Yazgan S. Yerleşmiş romatoid artrit hastalarında kardiyovasküler risk ile fonksiyonel yetersizlik ve hastalık aktivitesi arasındaki ilişki (tez). İstanbul: Bezmialem Vakıf Üniversitesi Tıp Fakültesi Fiziksel Tıp Ve Rehabilitasyon Anabilim Dalı;2011.

23. Tıkız C, Aslanalp Zahide. Romatoid artrit hastalık aktivitesinin değerlendirilmesinde dinamik mrg, serum anjiogenik faktör düzeyleri ve VEGF gen ekspresyonunun araştırılması (tez). Manisa: Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Fiziksel Tıp ve Rehabilitasyon Anabilim Dalı;2011.

24. Çalgüneri M, Karadağ Ö. Romatoid artritte karpal tünel sendromunun yüksek frekanslı ultrasonografi ile değerlendirilmesi ve hastalık aktivitesi ile ilişkisinin araştırılması (tez). Ankara: Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı Romatoloji Ünitesi;2008.

25. Tekeoğlu İ, Özkan Y. Periodontal hastalık ve romatoid artrit (tez). Van: Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tıp Fakültesi Fiziksel Tıp Ve Rehabilitasyon Anabilim Dalı; 2011.

26. Güdücüoğlu H, Çalışır U. Romatoid artrit tanılı hastalarda anti nükleer antikorların dağılımı (tez). Van: Yüzüncü Yıl Üniversitesi Sağlık bilimleri Fakültesi;2011.

27. Altay Z, Koca T. Romatoid artrit ve ankilozan spondilit hastalıkları ile b ve c viral hepatiti ilişkisi (tez). Malatya: İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi;2011.

28. Kamanlı A, Taş Pıhtılı N. Romatoid artrit ve ankilozan spondilitli hastalarda servikal tutulum özelliklerinin hastalık parametreleri ve yaşam kalitesi ile ilişkileri (tez). Elazığ: Fırat Üniversitesi Fiziksel Tıp Ve Rehabilitasyon Anabilim Dalı; 2010.

29. Sayarlıoğlu M, Uçar MA. Anti-TNFα tedavisinin ankilozan spondilit ve romatoid artrit hastalarında üriner enfeksiyon gelişimine olan etkisi (tez). Kahramanmaraş: Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı;2010.

30. Duruöz MT, Dal N. Romatoid artrit, ve ankilozan spondilitte servikal tutulum ve bunun üst ekstremite tutulumları ile ilişkisi (tez). Manisa: Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Fiziksel Tıp Ve Rehabilitasyon Anabilim Dalı;2010.

31. Çetinkaya B. Romatoid artrit ve kronik periodontitis hastalarında proinflamatuvar(TNFα, IL-1β) ve antiinflamatuvar (IL-10, IL-4) sitokin düzeylerinin incelenmesi (tez). Ankara: Başkent Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Periodontoloji Anabilim Dalı;2009.

32. Aytekin O, Tekin M. Romatoid artritli hastalarda tedavi uyumunu etkileyen faktörlerin belirlenmesi ve uyum artırma önerileri (tez). İstanbul: İstanbul Göztepe Eğitim ve Araştırma Hastanesi Aile Hekimliği;2007.

33. Sönme N. Sıçanlarda oluşturulan adjuvan artrit modelinde resveratrolün etkisinin incelenmesi (tez). İstanbul: Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü;2007.

34. Tekeoğlu İ, Yazmalar L. Romatoid artrit, ankilozan spondilitli, osteoartrit hastalarında ve kontrollerde mevsimsel serum 25 hidroksivitamin d [25(oh)d] düzeyleri ile hastalık aktivitesi arasındaki ilişki (tez). Van: Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tıp Fakültesi Fiziksel Tıp Ve Rehabilitasyon Anabilim Dalı/ Romatoloji Anabilim Dalı;2010.

35. Çetin E, Us T. Parvovirüs b19, epstein-barr virüs, herpes simplex virüs ve chlamydia trachomatis'in romatoid artrit etyolojisindeki yeri (tez). Eskişehir: Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı;2009.

36. Öztürk O. Klasik tedaviye dirençli romatoid artrit ve ankilozan spondilit hastalarında tümör nekroz faktör alfa blokeri kullanımının böbrek fonksiyonlarına etkisi (tez). Bursa: Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı Nefroloji Blim Dalı;2007.

37. Korkmaz C, Cansu G. Romatoid artrit hastalarında adiponektin düzeyi ile hastalık etkinliği ve akut faz yanıtın ilişkisi(tez). Eskişehir: Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı;2007.

38. Koca N, Karadeniz F. Serbest Radikal oluşum mekanizmaları ve vücüttaki antioksidan savunma mekanizmaları. Gıda Mühendisliği Dergisi 2003;16:32-37.

39. Serin S. Romatoid artritli ve ankilozan spondilitli hastalarda adalimumab ve infiliksimabın etkinliğinin, klinik parametreler yanında akut faz reaktanları, inflamatuvar sitokinler, kollajen yıkım ürünü mmp-3 aracılığı ile karşılaştırılması (tez). Bursa: Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı Romatoloji Blim Dalı;2009.

40. Altınkesen E. Erken ve geç dönem romatoid artritli hastalarda semptomlar, fonksiyonel durum ve yaşam kalitesi arasındaki ilişkinin incelenmesi (tez). İzmir: Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü;2006.

41. Keşkek Ö. Romatoid artritli hastalarda kombine tedavinin mono terapiye üstünlüğü (uzmanlık tezi). İstanbul: Dr. Lütfi Kırdar Kartal Eğitim Ve Araştırma Hastanesi İç Hastalıkları Kliniği;2004.

42. Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA, McShane DJ, Fries JF, Cooper NS, et al. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum 1988;31:315-24.

43. Altınışık M. Serbest oksijen radikalleri ve antioksidanlar (sunum). Aydın: Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim dalı;2000.

44. Akpoyraz M, Durak İ. Serbest radikallerin biyolojik etkileri. Ankara Tıp Dergisi 1995;48:253-62.

45. Ramprasath VR, Shanthi P, Sachdanandam P. Semecarpus anacardium Linn. nut milk extract, an indigenous drug preparation, modulates reactive oxygen/nitrogen species levels and antioxidative system in adjuvant arthritic rats. Mol Cell Biochem 2005;276(1-2):97-104.

46. Bahçeli S, Yıldız M, Çiçek E. Nükleer tıp uygulamalarının hastalardaki serbest radikaller üzerine etkileri (tez). Isparta: Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Fizik Anabilim Dalı;2005.

47. Okur İM, Bingöl İ. Vücut dismorfik bozukluğunda serbest radikaller (tez). Elazığ: Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Plastik Ve Rekonstrüktif Cerrahi Anabilim Dalı; 2006.

48. Tuzcu M. Diyabet oluşturulmuş sıçanlarda serbest radikal reaksiyonlarının lensdeki rolü ve antioksidanlar (tez). Elazığ: Fırat Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı;2000.

49. Yurdakul Z. Oksijen Radikalleri nedir? www.biyokimya.8m.net/oksijen/html. Erişim tarihi: 11.04.2014.

50. Gündüz S. Adjuvan artritli sıçanlarda pelargonium sidoidesin etkisi (tez). Edirne: Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü;2011.

51. Fang YZ, Yang S, Wu G, Free radicals, antioxidants and nutrition. Nutrition 2002;18:872.

52. Arık A. Romatoid artrit hastalarında anti-ccp, mcp-1 ve anti-mcv düzeylerinin ankilozan spondilit ve normal populasyonla karşılaştırılması (uzmanlık tezi). Manisa: Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı;2010.

53. Cansu B, Cansu D, Kaşifoğlu T, Korkmaz C. Romatoid artritli hastalarda hastalığı modifiye edici ilaçlar serum adiponektin ve HDL-kolestrol düzeylerini artırmaktadır (poster no:0104). Eskişehir; Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi İç hastalıkları Anabilim Dalı.

54. www.ctf.edu.tr/farma/sitokingokhan.pdf. Erişim tarihi:11.04.2014.

55. Kocabaş H, Kocabaş V, Büyükbaş S, Sallı A, Uğurlu H. Romatoid Artrit Hastalarında Hücresel Oksidan ve Antioksidan Statü ve Hastalık Aktivitesi ile ilişkisi. Romatizma dergisi 2010;Cilt 25, Sayı 3:141-6.

56. www.turkiyeklinikleri.com/article/tr-interlokinler-2325.html. Erişim tarihi:10.02.2014

57. med.ege.edu.tr/Image/gozdoc/okuler_immunoloji_elif_demirkilinc.doc. Erişim tarihi: 10.02.2014.

58. Romatizmahastaliklari.com/konferans-notlari/romatoid-artrit.pdf. Erişim tarihi: 13.02.2014.

59. Ateş Ö. Romatoid artrit ve tüberkülozda metal iyon taşıyıcı protein (slc11a1-nramp1) gen polimorfizminin rolü (tez). İstanbul: İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü;2007.

60. www.turkiyeklinikleri.com/article/tr-sitokinler-7125.html. Erişim tarihi:01.04.2014.

61. Yazar S. Romatoid artrit hastalığının proinflamatuvar sitokini olan TNFα tabanlı nanoteranostik geliştirilmesi(tez). Eskişehir: Anadolu Üniversitesi İleri Teknolojiler Anabilim Dalı;2010.

62. Bedir E, Kirmizipekmez H, Sticher O, Calis I. Triterpene saponins from the fruits of Hedera helix Phytochemistry 2000;53(8):905-9.

63. Lutsenko Y, Bylka W, Matlawska I, Darmohray R. Hedera helix as a medicinal plant. Ukrayna: Danylo Halytsky Lviv National Medical University Department of Pharmacognosy;2010.

64. Rai A. The antinflammatory and antiarthritic properties of ethanol extract of Hedera helix. Indian J Pharm Sci 2013;75(1):99–102.

65. http://www.alternatif-tip.net/duvar-sarmasigi-efeu-Hedera-helix.htm.Erişim tarihi:22.10.2014.

66. Hocaoğlu Babayiğit A, Karaman Ö, Erge Ölmez D, Erbil G, Yılmaz O, Kivcak B, Bağrıyanık A, Uzuner N. Effect of Hedera helix on lung histopathology in chronic asthma (artıcle). Iran J Allergy Asthma Immunol;2012; 11(4):316-23.

67. files.vademecumonline.com.tr/.../Prospan_Surup Kullanim_Kilavuzu. Erişim tarihi: 22.10.2014.

68. Stauss-Grabo M, Atiye S, Warnke A, Wedemeyer RS, Donath F, Blume HH. Observational study on the tolerability and safety of film-coated tablets containing ivy extract (Prospan® Cough Tablets) in the treatment of colds accompanied by coughing. Phytomedicine 2011;18(6):433-6.

69. Rooney, S, Ryan, M.F, 2005. Effects of alpha-hederin and thymoquinone, constituents of *nigella sativa*, on human cancer cell lines. Antıcancer Research 25, 2199-2204

70. Jones JM, Beyaz IR, Beyaz JM, McFadden JP. Allergic contact dermatitis to English ivy (Hedera helix) a case series: Contact Dermatitis 2009;60(3):179-80.

71. Dökmeci D, Özdemir F, Ulugöl A, Karadağ ÇH, Kokino S, Dökmeci İ. Kronik Adjuvant artritli sıçanlarda diklofenak ve bioptron'un antiinflamatuvar etkilerinin karşılaştırılması. Turk J. Phys. Med. Rehab. 1998;2:67-70.

72. Ulugol A, Unalan H, Dokmeci I, Kokino S. Comparison of the effects of tenoxicam and mid-laser irradiation on chronic adjuvant arthritis in rats. Clin and Exp Rheumatol 1997;15:83-6.

73. Cwientzek U, Ottillinger B, Arenberger P. Acute bronchitis therapy with ivy leaves extracts in a two-arm study. A double-blind, randomised study vs. an other ivy leaves extract. Phytomedicine 2011;18(13):1105-9.

74. Gepdiremen A, Mshvildadze V, Süleyman H, Elias R. Acute anti-inflammatory activity of four saponins isolated from ivy: alpha-hederin, Hederasaponin-C, Hederacolchiside-E and Hederacolchiside-F in carrageenan-induced rat paw edema. Phytomedicine 2005;12(6-7):440-4.

75. Süleyman H, Mshvildadze V, Gepdiremen A, Elias R. Acute and chronic antiinflammatory profile of the ivy plant, Hedera helix, in rats. Phytomedicine 2003;10(5):370-4.

76. Fazio S., Pouso J., Dolinsky D., Fernandez A., Hernandez M., Clavier G., Hecker M., 2006. Tolerance, safety and efficacy of Hedera helix extract in

inflammatory bronchial diseases under clinical practice conditions: A prospective, open, multicentre postmarketing study in 9657 patients. Phytomedicine 2009;16(1):17-24.

77. Gülçin I, Mshvildadze V, Gepdiremen A, Elias R. Antioxidant activity of saponins isolated from ivy: alpha-hederin, Hederasaponin-C, Hederacolchiside-E and Hederacolchiside-F. Planta Med. 2004;70(6):561-3.

78. Kayaalp S.O, Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji. Nonsteroid. Ankara: Hacattepe-Taş kitapçılık 2002;964.

79. Fionula M. Brennan, Andrew Jackson, David Chantry, Ravinder Maini, Marc Feldmann Inhibitory effect of TNF alpha antibodies on synovial cell interleukin-1 production in rheumatoid arthritis. Lancet 2003;29(2):244-7.

80. Khalifeh MS, Al-Rukibat R, Hananeh W, Boumezrag A, Okour O. Investigation of the role of tumour necrosis factor-{alpha}, interleukin-1{beta}, interleukin-10, nitric oxide and rheumatoid factor-immunoglobulin M in a rat model of arthritis. Lab Anim. 2010;44(2):143-9.

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekiller	**Sayfa no.**
Şekil 1. Hedera helix bitkisi resmi	20
Şekil 2. İntradermal FCA uygulanması	23
Şekil 3. Gastrik gavaj uygulaması	24
Şekil 4. Kumpas uygulaması	25
Şekil 5. *Pressure application measurement* cihazı ve uygulaması	26
Şekil 6. İnterlökin-1ß kalibrasyon eğrisi	28
Şekil 7. İnterlökin-2 kalibrasyon eğrisi	30
Şekil 8. İnterlökin-10 kalibrasyon eğrisi	32
Şekil 9. Tümör nekroz faktör-αlfa kalibrasyon eğrisi	34
Şekil 10. MDA kalibrasyon eğrisi	35
Şekil 11. Gruplara göre interlökin-1 β düzeylerinin dağılımı	45
Şekil 12. Gruplara göre interlökin-2 düzeylerinin dağılımı	46
Şekil 13. Gruplara göre interlökin-10 düzeylerinin dağılımı	47
Şekil 14. Gruplara göre MDA düzeylerinin dağılımı	48
Şekil 15. Gruplara göre TNFα düzeylerinin dağılımı	49
Şekil 16. Gruplara göre inflamasyonun hafif-orta-şiddetli olarak % değerleri	50
Şekil 17. Gruplara göre ödem % değerleri	50
Şekil 18. Gruplara göre sinovyal proliferasyon % değerleri	51
Şekil 19. Gruplara göre vasküler proliferasyon % değerleri	52

Şekil 20. Normal morfolojide kemik ve tendon dokusu ve normal eklem mesafesi (ok) (HEx100) 52
Şekil 21. Kemiğe komşu yumuşak dokuda periartiküler mesafede daralmanın eşlik ettiği yoğun mononükleer inflamasyon alanları (HEx50) 53
Şekil 22. Damar harabiyetini düşündüren fibrin birikimi (ok) ile birlikte yumuşak dokuda yoğun mononükleer inflamasyon ve artmış vaskülarizasyon (HEx100D) 53
Şekil 23. Çizgili kas lifleri ve bağ dokusu liflerini birbirinden ayıran şiddetli ödem (HEx50) 54
Şekil 24. Yoğun mononükleer inflamasyonla birliktelik gösteren prolifere sinoyiyal doku (ok) (HEx50) 54
Şekil 25. Minimal inflamasyon, fokal sinovyal proliferasyon (ok) (HEx50) 55
Şekil 26. Kemiğe komşu şiddetli inflamasyon içeren yumuşak doku alanlarında ayrıca artmış damar yapıları (oklar) (HEx50) 55
Şekil 27. Yoğun inflamasyon içeren ödemli yumuşak doku içerisinde sayıca artmış damar yapıları (oklar) (HEx100) 56

Tablolar **Sayfa no.**

Tablo 1. Gruplar ve ilaç isimleri 24
Tablo 2. Tüm gruplarda ağırlık ortalamaları 38
Tablo 3. Tüm gruplarda sağ pençe takibi (kumpas) ortalamaları 40
Tablo 4. Tüm gruplarda sağ pençe PAM ortalamaları 42
Tablo 5. Tüm gruplarda sağ pençe makroskopik skor ortalamaları 44
Tablo 6. Plazma interlökin-1 beta düzeyi ortalama ve standart sapmaları 45
Tablo 7. Plazma interlökin-2 düzeyi ortalama ve standart sapmaları 46
Tablo 8. Plazma interlökin-10 düzeyi ortalama ve standart sapmaları 47
Tablo 9. Plazma malondialdehit düzeyi ortalama ve standart sapmaları 48
Tablo 10. Plazma tümör nekroz faktör düzeyi ortalama ve standart sapmaları 49

ÖZGEÇMİŞ

02.04.1988 tarihinde Samsun'da doğdum. İlk ve orta eğitimimi Samsun'da tamamladım. 2006 yılında girdiğim İstanbul Üniversitesi Bakırköy Sağlık bilimleri Fakültesi Hemşirelik Bölümü'nden 2010 yılında mezun oldum. 2011 yılında Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmakoloji Anabilimdalı'nda yüksek lisans eğitimime başladım. 2011 yılından itibaren yüksek lisans eğitimim devam etmektedir.

EKLER

Ek 1

T.C.

TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU KARARLARI

EDİRNE

Oturum Sayısı: 05 **Karar Tarihi: 03.07.2012**
KARAR NO: 2012.05.12

Yürütücülüğünü Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi öğretim üyesi Prof. Dr. Dikmen Dökmeci'nin yaptığı Yüksek Lisans Öğr. Fatma Çiçek'in tezi olarak planlanan TÜHDYEK-2012/61 protokol nolu "**Deneysel artrit modelinde Hedera helix folium ekstresi (Prospan®) ile tedavinin etkisi**" başlıklı çalışma hakkında görüşüldü; araştırmanın amaç, yaklaşım, gereç ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmesi sonucunda; Hayvan Hakları Evrensel Bildirgesi ve etik kurallara uygun olarak hazırlandığına ve çalışmanın yapılabileceğine mevcudun oy birliği ile karar verilmiştir.

Ünvani/Adı/Soyadı	Araştırma ile İlişki	Toplantı Katılımı	İmza
Yrd.Doç.Dr. Burhan AKSU Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi	☐ var ☐ yok	☐ evet ☐ hayır	
Yrd.Doç. Dr. Hayati ARDA Fen-Edebiyat Fakültesi Öğretim Üyesi	☐ var ☐ yok	☐ evet ☐ hayır	
Vet.Hek. Ziya ÇUKUR Veteriner Hekim	☐ var ☐ yok	☐ evet ☐ hayır	
Hüseyin KOÇ Sivil Toplum Örgütü Üyesi Sivi Üye	☐ var ☐ yok	☐ evet ☐ hayır	
Yrd.Doç.Dr. Beytullah ÖZKAN Fen-Edebiyat Fakültesi Öğretim Üyesi	☐ var ☐ yok	☑ evet ☐ hayır	
Yrd.Doç.Dr. Y. Atakan SEZER Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi	☐ var ☐ yok	☐ evet ☐ hayır	
Doç. Dr. Enis ULUÇAM Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi	☐ var ☑ yok	☐ evet ☐ hayır	
Yrd.Doç.Dr.Hakan GÜRKAN Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi	☐ var ☑ yok	☐ evet ☐ hayır	
Osman GÜLTEKİN Sivil Üye	☐ var ☐ yok	☐ evet ☐ hayır	

T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
İdari ve Mali İşler Daire Başkanlığı

SAYI : B.30.2.TRK.0.73.00.00/ 0067 **EDİRNE**
KONU :

03-01-2013

Sayın Prof. Dr. Dikmen DÖKMECİ
Trakya Üniversitesi
Tıp Fakültesi
Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı
EDİRNE

Yöneticiliğini yapmış olduğunuz ve yüksek lisans öğrencisi Fatma ÇİÇEK'in "Deneysel Artrit Modelinde Hedera Helix Folium Ekstresi (Prospan®) ile Tedavisinin Etkisi" başlıklı yüksek lisans projesinin 12 (on iki) ay süre ve 10.000,00 TL ile desteklenmesine, Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu'nun 18.12.2012 tarih ve 2012/09 sayılı toplantısında mevcudun oy birliği ile karar verilmiştir.

Bilimsel Araştırma Projeleri Yönergesi'nin 12. maddesi uyarınca düzenlenen ve ekte sunulan Trakya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Sözleşmesi'nin tarafınızca imzalanarak 1 (bir) hafta içinde Rektörlüğe iletilmesi hususunda bilgilerinizi ve gereğini rica ederim.

Prof. Dr. Süleyman PİŞKİN
Rektör Yardımcısı ve
Komisyon Başkanı

EK: 1 adet protokol sözleşmesi

Posta Adresi
Trakya Üniversitesi Rektörlüğü
22050 Balkan Yerleşkesi/ EDİRNE

Tel : 0 284 223 87 45 Faks : 0 284 223 08 48
e-mail: tubap@trakya.edu.tr