T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MORFOLOJİ
(HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ)
DOKTORA PROGRAMI

Tez Yöneticisi
Prof. Dr. Turan KARACA

TNBS İLE DENEYSEL KOLİT OLUŞTURULMUŞ SIÇANLARDA T LENFOSİTLERİN VE BAZI SİTOKİNLERİN İMMÜNOHİSTOKİMYASAL VE WESTERN BLOT YÖNTEMLERİYLE İNCELENMESİ

(Doktora Tezi)

İhsan KARABOĞA

EDİRNE – 2015

T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MORFOLOJİ
(HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ)
DOKTORA PROGRAMI

Tez Yöneticisi
Prof. Dr. Turan KARACA

TNBS İLE DENEYSEL KOLİT OLUŞTURULMUŞ SIÇANLARDA T LENFOSİTLERİN VE BAZI SİTOKİNLERİN İMMÜNOHİSTOKİMYASAL VE WESTERN BLOT YÖNTEMLERİYLE İNCELENMESİ

(Doktora Tezi)

İhsan KARABOĞA

Destekleyen Kurum: TÜBAP Proje No: 2014/20

Tez No :

EDİRNE – 2015

T.C

TRAKYA ÜNİVERSİTESİ

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü

ONAY

Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji (Morfoloji) Anabilim Dalı doktora programı çerçevesinde ve Prof. Dr. Turan KARACA danışmanlığında doktora öğrencisi İhsan KARABOĞA tarafından tez başlığı **"TNBS İle Deneysel Kolit Oluşturulmuş Sıçanlarda T Lenfositlerin ve Bazı Sitokinlerin İmmünohistokimyasal ve Western Blot Yöntemleriyle İncelenmesi"** olarak teslim edilen bu tezin tez savunma sınavı 18/09/2015 tarihinde yapılarak aşağıdaki jüri üyeleri tarafından **"Doktora Tezi"** olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Turan KARACA

JÜRİ BAŞKANI

Prof. Dr. Tunç KUTOĞLU

ÜYE

Prof. Dr. Ahmet NACAR

ÜYE

Prof. Dr. Nureddin CENGİZ

ÜYE

Doç. Dr. Yeşim Hülya UZ

ÜYE

Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

Doç. Dr. Tammam SİPAHİ

Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim boyunca bilgi, birikim ve desteklerini esirgemeyen, Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı başkanımız, danışmanım sayın Prof. Dr. Turan KARACA'ya, Anabilim Dalı hocalarım; Doç. Dr. Gülnur KIZILAY ÖZFİDAN, Doç. Dr. Yeşim Hülya UZ, Doç. Dr. Yeter TOPÇU TARLADAÇALIŞIR ve Yrd. Doç. Dr. Melike SAPMAZ METİN ile Arş. Gör. Selim DEMİRTAŞ'a, çalışma arkadaşlarıma, araştırmaya maddi destek veren TÜBAP birimine, doktora eğitimim süresince maddi manevi desteklerini hep hissettiğim eşim Münteha Nur'a ve aileme en içten teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

GİRİŞ VE AMAÇ **1**

GENEL BİLGİLER **3**

SİNDİRİM KANALI GELİŞİMİ **3**

SİNDİRİM KANALI HİSTOLOJİSİ **4**

İNFLAMATUVAR BAĞIRSAK HASTALIKLARI **6**

DENEYSEL KOLİT MODELLERİ **16**

GEREÇ VE YÖNTEMLER **18**

BULGULAR **25**

TARTIŞMA **54**

SONUÇLAR **62**

ÖZET **64**

SUMMARY **66**

KAYNAKLAR **68**

ŞEKİLLER LİSTESİ **81**

ÖZGEÇMİŞ **84**

EKLER

SİMGE VE KISALTMALAR

CD: Cluster of Differentation

CH: Crohn Hastalığı

DSS: Dekstran Sülfat Sodyum

GALT: Gut Associated Lymphoid Tissue

GWAS: Genome-Wide Association Study

HLA: Human Leukocyte Antigen

IFN-γ: İnterferon-γ

IL: İnterlökin

İBH: İnflamatuvar Bağırsak Hastalıkları

İK: İndetermine Kolit

MUC2: Müsin

NOD2: Nucleotide-Binding Oligomerization Domain-Containing Protein 2

NSAID: Nonsteroid Antiinflamatuvar İlaçlar

STAT-3: Signal Transducer and Activator of Transcription-3

TGF-β: Transforming Growth Factor-β

Th: T helper

TNBS: Trinitrobenzen Sülfonik Asit

TNF-α: Tümör Nekrozis Faktör-α

ÜK: Ülseratif Kolit

GİRİŞ VE AMAÇ

İnflamatuvar bağırsak hastalıkları (İBH); immünolojik, çevresel ve genetik faktörlerin sorumlu tutulduğu, sindirim kanalının farklı bölgelerini etkileyen hastalık grubudur. Endoskopik, klinik ve histolojik bulguları farklılık gösteren ülseratif kolit (ÜK), Crohn hastalığı (CH) ve indetermine kolit (İK) bu grupta yer alır. Sindirim kanalında kronik inflamasyonla karakterize olan bu hastalıklar doku hasarına yol açmaktadırlar (1-3).

İnflamatuvar bağırsak hastalıklarının patogenezi henüz tam olarak aydınlatılamamıştır. Hastalığın patogenezinde genetik yatkınlık, mukozal bariyerin zarar görmesi, bağırsak florası ve immün yanıtta meydana gelen bozulmalar ile bunlar arasındaki etkileşimlerin önemli rol oynadığı bilinmektedir (3,4). İBH, sindirim kanalını tutmasının yanı sıra birçok organı etkileyen klinik tablolara da sebep olabilir (5).

Sindirim kanalında kolonda sınırlı ÜK'de, mukozada erozyon ve ülserasyon, kolon bez yapısında bozulmalar, mukoza ve submukozada ödem ve inflamatuvar hücre infiltrasyonu gözlenmektedir. Meydana gelen doku hasarından T lenfositler ve makrofajlar sorumlu tutulmaktadır. Oluşan immün yanıt; lenfosit proliferasyonu, nötrofil birikimi ve sitokinlerin salınımının artmasına neden olur (6,7).

Sitokinler; inflamasyonun başlaması, düzenlenmesi ve immün yanıt oluşturulmasında önemli moleküllerdir. Normal kolon homeostazisi için kolonik mukozada antiinflamatuvar ve proinflamatuvar sitokinlerin dengede olması gerekmektedir. ÜK'de meydana gelen immün hiperaktivasyonla bu denge bozulur. İnterlökin-1 (IL-1), IL-2, IL-6, IL-8, Tümör Nekrozis

Faktör-α (TNF-α) gibi proinflamatuvar sitokinlerde artma görülürken, IL-4 ve IL-10 gibi antiinflamatuvar sitokinlerde azalma görülür (8,9).

İnflamasyonda önemli rolleri olan lenfositler ve diğer immün sistem hücrelerinin plazma membranlarında; hücre etkileşimi, iyon kanalı, sinyal iletimi, immün reseptör ve adezyon molekülü gibi birçok fonksiyona sahip "Cluster of Differentation (CD)" molekülleri yer alır. ÜK'de meydana gelen inflamasyonda oluşan immün uyarım ile bu moleküllerin ifadesinde değişiklikler meydana gelir (10).

Sindirim kanalında immün yanıt oluşmasını başlatan birçok bileşik tanımlanmış ve bu maddelerle oluşturulan deneysel modeller hastalığın patogenezinin anlaşılması ve ilaç tedavilerinin geliştirilmesinde kullanılmıştır. 2, 4, 6 trinitrobenzen sülfonik asit (TNBS) bu bileşiklerden biri olup, bu madde ile oluşturulan hastalık modeli insandaki ÜK'ye benzer etkiler ortaya çıkardığından deneysel çalışmalarda yaygın olarak kullanılmaktadır (11,12).

Bu çalışmada; TNBS ile oluşturulmuş kolit modelinde meydana gelen hücresel immün aktivitelerin belirlenmesi, inflamasyonda önemli rolleri olan T lenfositlerin bağırsak mukozasındaki dağılımları ve bu süreçte önemli olan bazı sitokinlerin immünohistokimyasal ve Western blot yöntemleriyle incelenmesi amaçlanmıştır.

GENEL BİLGİLER

SİNDİRİM KANALI GELİŞİMİ

Gelişimin 4. haftasının başında ilkel sindirim kanalı kraniyal uçta orofaringeal membran ve kaudalde kloakal membran ile kapanır. Sindirim kanalının ilkel yapısı, 4. hafta boyunca baş, kuyruk ve yan kıvrılmalarla vitellüs kesesinin embriyo içine girmesi ile oluşur. Sindirim kanalının öncü yapısının endodermi, sindirim kanalı epitelinin büyük bir kısmını ve kanala bağlı bezleri oluşturur. Kanalın kraniyal ucunun epiteli stomadeum ektoderminden, kaudal ucunun epiteli ise proktodeum ektoderminden köken alır. Sindirim kanalı boyunca uzanan kas tabakası, bağ doku ve diğer tabakalar ilkel sindirim kanalını saran splanknik mezodermden köken alır (13).

Öncü sindirim kanalı 3 kısımda incelenir; ön bağırsak (foregut), orta bağırsak (midgut) ve son bağırsak (hindgut). Sindirim kanalı boyunca meydana gelen özelleşmeler homebox genlerinin ifadesiyle gerçekleşir.

Öncü sindirim kanalının ön bağırsak kısmından şu yapılar gelişir;

- Primordiyal farinks ve türevleri,
- Alt solunum sistemi,
- Özofagus ve mide,
- Koledok kanalının proksimalindeki duodenum,
- Karaciğer, safra kanalları ve pankreas,

Orta bağırsaktan gelişen yapılar;

- Duodenumun büyük kısmı,
- İnce bağırsaklar, çekum,
- Appendiks vermiformis,
- Çıkan kolon,
- Transvers kolonunun sağ 2/3'ü orta bağırsaktan gelişir.

Bu organlar orta bağırsak arteri olan a. mesenterica superior ile beslenir. Orta bağırsak bir mezenter ile karın arka duvarına tutunur ve vitellus kesesi ile ilişkilidir.

Son bağırsaktan gelişen yapılar;

- Transvers kolonun sol 1/3 ü,
- İnen kolon,
- Sigmoid kolon,
- Rektum,
- Anal kanalın üst kısmıdır.

Son bağırsağın endodermi aynı zamanda mesane ve üretra mukozasının da kaynağıdır.

SİNDİRİM KANALI HİSTOLOJİSİ

Sindirim sistemi insanda yaklaşık 9 m uzunluğunda, oral kaviteden anüse kadar uzanan özelleşmiş bölgelere sahip tübüler bir kanaldır. Sindirim kanalı 4 katman olarak düzenlenen yapısal organizasyon gösterir. Lümenden dışa doğru bu katmanlar; mukoza, submukoza, dış musküler katman ve seroza/adventisya tabakası şeklinde yer alır.

- Mukoza: Lümeni çevreleyen en iç katmandır. Sekretuar ve absorbsiyon görevi yapan bir epitel; bezleri ve dolaşım sistemi elemanlarını içeren lamina propriya; mukozanın hareketini sağlayan, genellikle iki düz kas katmanından oluşan muskularis mukoza tabakalarından oluşur.
- Submukoza: Sıkı düzensiz bağ doku yapısında olan submukoza, mukozaya fiziksel destek sağlamanın yanı sıra; kan damarları, sinirler, lenfatik damarları ve plexus nervosus submucosus (Meissner pleksusları) taşır. Ayrıca sindirim kanalı boyunca bazı bölgelerde lümene salgı yapan bezleri içerir.

- Dış musküler katman: İçte sirküler ve dışta uzunlamasına iki kas tabakasından oluşan bu katman kanal boyunca bazı özelleşmeler göstermektedir. Bu iki kas katmanı arasında plexus nervosus myentericus (Auerbach pleksusu) yer alır. Bu kas tabakalarının görevi peristaltik kasılmalarla luminal içeriğin hareket etmesini sağlamaktır.
- Seroza/Adventisya: Sindirim kanalı intraperitoneal bölgelerde mezotel adı verilen seroza örtüsüne sahipken, vücut duvarları ve bazı retroperitoneal organ komşuluklarında adventisya tabakası ile çevrelenmiştir (14).

Kalın Bağırsak

Kalın bağırsak; çekum, appendiks vermiformis, kolon, rektum ve anal kanaldan meydana gelir. Kolon, anatomik yerleşimi esas alınarak çıkan kolon, transvers kolon, inen kolon ve sigmoid kolon olmak üzere 4 kısımda incelenir. Sindirim kanalının karakteristik 4 tabakası kolon boyunca da uzamaktadır. Ayrıca kolonu sindirim kanalının diğer kısımlarından ayıran bazı makroskobik özellikler de bulunmaktadır. Bunlar;

- Tenya koli; muskularis eksternanın dıştaki longitudinal tabakasının bantlarıdır. Anal kanal ve appendiks vermiformiste görülmezler, çekum ve kolon boyunca uzanırlar.
- Haustra koli; çekum ve kolonun dış yüzeyinde görülen tenya kolilerin arasındaki küçük kese şeklindeki yapılardır.
- Omental appendiksler; serozanın kolonun dış yüzeyinde görülen yağ uzantılarıdır.

Mukoza: Kolon mukozası düz bir yüzeye sahiptir. Mukoza boyunca çok sayıda düz tübüler bağırsak bezlerini (Lieberkühn kriptaları) içerir. Bu bezler; mukozanın, lamina propriya içerisine invajinasyonuyla oluşur ve mukozaya benzer şekilde, tek katlı prizmatik epitelden oluşmuştur. Bağırsak bezlerinde yer alan Goblet hücrelerinin salgıladıkları mukus kolon içeriğinin taşınmasını ve atılmasını kolaylaştırır. Mukozada yer alan Goblet hücre sayısı, ince bağırsağa göre önemli bir artış gösterir. Kolonda suyun emilimi ile ilerleyişi zorlaşan katı-yarı katı içerik, Goblet hücrelerinin müsin salgısıyla kolonda ilerler. Kolonun mukozal epiteli Paneth hücreleri haricinde ince bağırsak ile aynı hücre tiplerini içermektedir.

Kolonun tüm epitelyal hücreleri, tek bir kök hücre popülasyonundan köken almaktadır. Bağırsak bezlerinin alt üçte birlik kısmı intestinal kök hücre nişini oluşturmaktadır. Buradan köken alan hücreler bölünerek yaklaşık 5 günde luminal yüzeye ulaşır ve lümene dökülürler.

Lamina propriya: Bezleri, absorbe edilmiş maddeleri taşıyan damarları ve immün sistem elemanlarını içermektedir. Lamina propriyada bulunan lenfoid dokular sindirim kanalı mukozasından potansiyel olarak girebilecek patojenlere ve antijenik maddelere karşı koruyucu bir immün bariyer olarak görev görürler. Lamina propriyada yer alan lenfoid doku diffüz lenfoid doku, lenf nodülleri ve serbest hücrelerden oluşur.

Diffüz lenfoid doku; lamina propriyada yer alan çok sayıda lenfosit, plazma hücresi ve epitelin intraselüler boşluklarında geçici olarak bulunan lenfositlerden meydana gelir. Lenf hücreleri germinal merkeze sahip lenf nodülleri şeklinde de lamina propriya içerisinde organize olabilirler. Bunun yanı sıra nötrofiller, serbest makrofajlar ve mast hücresi gibi hücre grupları lamina propriyada önemli immünolojik rollere sahip olan hücrelerdendir. Diffüz lenfoid dokuya ve lenf nodüllerine GALT (gut-associated lymphoid tissue) bağırsak ilişkili lenfoid doku denmektedir.

Lamina muskularis mukoza; mukoza ile submukoza arasındaki sınırı oluşturur. Mukozanın en alt tabakasını oluşturan bu tabakada içte sirküler ve dışta uzunlamasına yerleşimli düz kas tabakaları bulunmaktadır. Bu kaslar kasılarak emilim ve salgılamayı kolaylaştırıcı mukozal hareketlerin oluşmasını sağlarlar.

Submukoza: Kolon submukozası kan damarları, sinir pleksusları ve lenf damarlarını içeren sıkı düzensiz bağ dokudan meydana gelmiştir.

Musküler tabaka: Kolonun dış musküler katmanı appendisk vermiformisten rektuma uzanan uzunlamasına kas şeritleri olan tenya kolileri oluşturur. Musküler tabaka peristaltik ve segmental kasılmalar yaparak kolon içeriğinin hareketini sağlar.

Seroza/Adventisya: İntraperitoneal bölgede yer alması ve organ komşuluklarına göre mezotel ya da adventisya kolunun en dış tabakasını oluşturur (14).

İNFLAMATUVAR BAĞIRSAK HASTALIKLARI

Kronik inflamatuvar hastalıklar ikinci dünya savaşından sonra şehirleşme ve endüstrileşmenin artmasına paralel olarak bir artış göstermiştir. Bunun en önemli göstergesi havayolu ve bağırsak mukozasını etkileyen astım ve kronik inflamatuvar bağırsak hastalıkları gibi inflamatuvar hastalıklarda meydana gelen artışlardır (15).

Toksinler, otoimmün reaksiyonlar, radyasyon ve iskemi gibi birçok etkiyle bağırsaklarda inflamasyon meydana gelebilmektedir. Kronik inflamatuvar bağırsak hastalıkları, bu etkilerin hiçbiriyle tek başına açıklanamayan ve etiyolojisi henüz tam olarak aydınlatılmamış bir hastalık grubunu ifade eder (16).

İnflamatuvar bağırsak hastalıkları genetik olarak yatkın kişilerde, çevresel faktörler ve immün sistem aracılı gastrointestinal sisteminin kronik ve tekrarlayıcı patolojileridir. Klinik olarak kanlı diyare, abdominal kramp, abdominal ağrılar ve birtakım ekstraintestinal bulgularla kendisini gösteren İBH; CH, ÜK ve ikisi arasında yer alan İK'yi temsil eder. Bu üç hastalık gösterdikleri farklı klinik, endoskopik ve histolojik bulgularla ayırt edilebilir. CH, ince bağırsağın distali ve kolon başta olmak üzere tüm gastrointestinal sistemi etkileyebilirken, ÜK; rektum, çekum ve kolonda sınırlıdır. ÜK genelde bağırsak mukozasını etkilerken, CH sindirim kanalının tüm histolojik katmanlarını etkileyerek transmural tarzda yayılım gösterir. Hastaların yaklaşık %10-15'inde CH ve ÜK kolit ayrımı yapılamaz ve bu durum İK olarak adlandırılır (16-18).

Ülseratif kolit, kolonda meydana gelen tutulumun anatomik yerleşkesine göre sınıflandırılabilir. Tutulum sadece rektumda sınırlı ise proktit; rektum ve sigmoid kolonu birlikte etkiliyorsa proktosigmoidit; rektum, sigmoid kolon ve inen kolonda diffüz etki gösteriyorsa sol tip kolit olarak isimlendirilir. Kolonun tüm anatomik kısımlarını etkiler tarzda meydana gelen tutuluma ise pankolit adı verilir (19,20).

Ülseratif kolitin klinik tanısı histolojik ve endoskopik bulgularla doğrulanır. Mevcut ve gelişmekte olan ÜK tanı yöntemlerinde klinik, biyokimyasal ve patolojik bulgular da hastalığın değerlendirilmesinde kullanılmaktadır. Klinikte hastalığın aktivitesi hafif, orta ve şiddetli olarak değerlendirilir (20).

Bağırsak dışı bulgular, İBH hastalarının % 25-40'ında görülmektedir. Bunlar genelde deri, göz, karaciğer ve eklemlerde meydana gelen inflamatuvar belirtilerdir (21). Crohn hastalığında büyüme hızı anomalileri çok yaygındır. Genç bireylerde intestinal semptomların başlangıcından çok önce hastaların yaklaşık %46'sında büyüme hızı düşmesi görülmektedir (22). ÜK ve CH ile ilgili bağırsak dışı semptomların başında arthritis, erythema nodosum, pyoderma gangrenosum, aphthous stomatitis ve iritis/uveitis gelmektedir. Tromboembolizm ve primer sklerozan kolanjit ÜK hastalarında yaygındır (23,24).

Epidemiyoloji

Yapılan epidemiyolojik çalışmalarda, coğrafik bölgelerin İBH gelişiminde önemli rolü olduğu gösterilmiştir. İBH, doğudan batıya ve güneyden kuzeye doğru artan bir coğrafik eğilim göstermektedir. En yüksek ÜK insidansı Avrupa'da yılda 24.3/100.000 iken, en yüksek CH insidansı yılda 20.2/100.000 kişi ile Kuzey Amerika'da görülmektedir (25). En yüksek ÜK ve CH prevelansı ise Avrupa'da sırasıyla 505 ve 322/100.000 kişidir. İBH dünyada yaklaşık olarak beş milyon insanı etkilemektedir (26).

Coğrafik lokasyonun yanı sıra, etnik farklılıklar da İBH yaygınlığında etkilidir. Yahudi toplumları ve Kafkas ırklarında daha sık görülürken Asya toplumlarında daha az rastlanmaktadır. Çin, Güney Kore, Afrika ve Hindistan gibi ülkelerde de endüstrileşme ve batılılaşma ile birlikte yaygınlığı artmaktadır (27). Göçmenler üzerinde yapılan çalışmalarda, İBH'nin düşük yaygınlıkla olduğu bölgelerden yüksek yaygınlıkta olduğu bölgelere göç eden insanlarda İBH riskinin yüksek olduğu gösterilmiştir. Bu veriler yaşam tarzı ve değişen çevresel faktörlerin İBH'nin etiyolojisinde önemli kofaktörler olduğu düşüncesini desteklemektedir (28).

Etiyoloji ve Patogenez

İnflamatuvar bağırsak hastalıklarının patogenezi henüz tam olarak aydınlatılamamıştır. Genetik yatkınlık, konak immün cevabı, patojenler ve çevresel faktörlerin arasındaki karmaşık etkileşimlerin İBH gelişiminde rol oynadığı düşünülmektedir. İntestinal mikroflora veya diğer antijenlere verilen anormal immün yanıt, kolonda inflamasyon kaynaklı doku hasarına sebep olmaktadır.

1. Genetik faktörler

İnflamatuvar bağırsak hastalıklarının dağılımının coğrafik eğilimi ve heterojen dağılım göstermesi, hastalığın gelişiminde genetik faktörlerin de etkili olduğunu göstermektedir. Yapılan genetik çalışmalarda pozitif aile öyküsünün önemli bir risk faktörü olduğu gösterilmiştir (29).

Monozigotik ikizlerde yapılan çalışmalarda CH riskinin % 50-70 olduğu bildirilmiştir ki bu oran, normal popülasyonda görülme riskinden 800 kat daha fazladır. ÜK'de ise bu oran % 10-20 arasındadır (19, 30). Bu bulgular genetik faktörlerin CH'de ÜK'ye oranla daha etkili olduğunu göstermektedir (31).

Son beş yılda yapılan GWAS (genom-wide associtation studies) çalışmalarında ÜK ve CH ile ilişkili 160 gen bölgesi bulunmuştur (25). Bu lokuslar patojen tanımlama, lenfosit aktivasyonu, sitokin sinyalleri, intestinal epitelyal bariyer defansı gibi çeşitli patofizyolojik mekanizmalar ve birtakım genlerin düzenlenmesini kapsar. Epidemiyolojik göstergeler İBH ilişkili genlerin, hem ÜK hem de CH ile önemli derecede bağlantılı olduğunu göstermektedir.

Özellikle IL-23 yolağında üretim fonksiyonu olan genler, NK-2 transkripsiyon faktörü ilişkili lokus 3 (NKX2-3), SMAD3 (Mothers against decapentaplegic homolog 3), STAT3, (Signal transducers and activators of transcription 3), ZMIZ1 (Zinc Finger, MIZ-Type Containing 1) ve c-REL transkripsiyon faktörleri İBH ile ilişkilidir. Hem ÜK hem de CH'de ilgili gen bölgeleri her ne kadar lökosit akışı ile ilişkili gen ürünlerini içerse de bazı kesin farklar söz konusudur. Otofajiyi düzenleyen NOD2 geni sadece CH ile ilişkili iken; kromozom 6p21 üzerinde, HLA class II genine yakın majör histokompabilite kompleks bölgesi ÜK ile ilişkilidir (27). ÜK'de etkin gen lokusları, epitelyal defans fonksiyonunu aracılı genlerden de sorumludur. İlgili genler ve İBH arasındaki bağlantılar hastalıkların mekanizması ile ilgili karşılaştırmalı fikir verebilir. Örneğin IL-23 yolağında görevli faktörleri kodlayan genler özellikle sedef hastalığı ve ankilozan spondilit gibi kronik inflamatuvar hastalıklarla ilişkilendirilmiştir (2,32).

Tablo 1. Ülseratif kolit ve Crohn hastalığı ilişkili genlerin karşılaştırılması (25)

Gen	Fonksiyon	CH ilişkisi	ÜK ilişkisi
NOD2	Doğal bağışıklık	Var	Yok
ATG16L1	Otofaji	Var	Yok
IL23R	Th-17 hücre yanıtı	Var	Var
IL-12B	Th-17 hücre yanıtı	Var	Var
NKX2-3	Lenf düğümü ve dalak gelişimi	Var	Var
STAT-3	IL-23R sinyalizasyonu	Var	Var
CCR-6	Lökosit migrasyonu ve intestinal damarlanma	Var	Yok
PTGER-4	İnflamatuvar düzenleyici PGE2 reseptörü	Var	Yok
ZNF365	Mitoz	Var	Bilinmiyor
SLC22A5	Plazma membran organik katyon taşıyıcısı	Var	Bilinmiyor
PTPN2	STAT proteinleri etkileşimi	Var	Bilinmiyor
IL-10	T hücre düzenlenmesi	Bilinmiyor	Var
IFN-G	Doğal ve adaptif bağışıklık kritik sitokini	Yok	Var
MST-1	Makrofaj kemotaktik faktörü	Var	Var

NOD2; Nucleotide-binding oligomerization domain protein, ATG16L1; Autophagy-related 16-like protein1, IRGM; Immunityrelated GTPase family, IL23R; Interleukin 23 receptor, IL-12B; Interleukin 12B, NKX2-3; NK2 transcription factor-related locus, STAT3; Signal transducer and activator of transcription; CCr-6; chemokine [c-c] motif receptor 6, PTGER4; Prostaglandin E receptor 4, ZNF365; Zinc finger protein 365, SLC22A5; solute carrier family 22 organic cation transporter, PTPN2; T cell protein tyrosine phosphatase, IL-10; interleukin 10, IFN-g; interferon gamma, MST-1; macrophage stimulating-1.

2. Çevresel Faktörler

İnflamatuvar bağırsak hastalıkları, İskandinavya ülkeleri, Birleşik Krallık ve Amerika Birleşik Devletleri gibi gelişmiş ülkelerde çok yaygındır. 20. yüzyılda sanayileşmiş ülkelerde İBH'nin insidansının sürekli olarak artması çevresel faktörlerin hastalık gelişimine katkıda bulunması teorisini güçlendirmiştir (17). Yapılan epidemiyolojik çalışmalarda Asya ülkeleri, gelişmekte olan ülkeler ve birinci dünya ülkelerine göç edenler arasında insidansın yüksek olduğu bildirilmiştir. Bu artışa "Batılılaşmış" yaşam tarzıyla beraber; diyet, sigara alışkanlığı, güneş ışığı, endüstriyel kimyasallara maruziyette meydana gelen değişikliklerin sebep olduğu öngörülmektedir (17,33,34).

Özellikle rafine şeker kullanımı, yağ asitleri ve fast food tüketiminin artmasının yanı sıra meyve, sebze ve lifli gıdalarının tüketiminin azalması şeklinde batı tarzı beslenme alışkanlıkları İBH riskini artırmaktadır (35). Omega-6 yağ asitleri, uzun zincirli yağ asitleri, hayvansal gıdalar ve karbonhidratların intestinal mikrobiyotayı değiştirme yoluyla bağırsak permeabilitesini artırarak inflamasyona sebep olabilmektedir (36,37). Lifli gıdalar, meyve ve sebze ağırlıklı beslenmenin ise İBH gelişim riskini azalttığı belirlenmiştir (38,39).

Sigara, antibiyotikler, oral kontraseptifler, nonsteroid antiinflamatuvar ilaçlar (NSAID) , appendektomi, çevresel kirlilik ve stres İBH ile ilişkili önemli çevresel faktörlerdir (35,40). Sigara kullanımı CH riskini artırırken, ÜK'ye karşı koruyucu etki göstermektedir (26,35). Appendektomi geçiren kişilerde ÜK gelişim riski azalmaktadır (41,42). Oral kontraseptifler ve NSAID ilaçların kullanımı ile ilgili çalışmalarda çelişkiler mevcuttur (40, 43).

Çocukluk çağında maruz kalınan çevresel faktörler İBH için önemli risk faktörleridir. İntestinal mikrobiyotayı etkileyecek tanımlanmamış bazı faktörler İBH gelişiminde etkili olabilir. Anne sütü tüketimi, hijyen, hava kirliliği, günlük çay tüketimi, musluk suyu tüketimi, egzersiz, stres, depresyon, bağırsak helmintleri ve evcil hayvanlarla ilişki gibi birçok faktörün hastalık riski ile ilişkisini gösteren çalışmalar mevcuttur (28,35,38-41,44-46).

İlk olarak 2005 yılında epidemiyolog Christopher P. Wild tarafından kullanılan "Ekspozom" terimi gebeliğin başlangıcından ölüme kadar bireyi etkileyen bütün çevresel faktörler olarak tanımlanmaktadır. Ekspozomal faktörler bağırsak kanalını döşeyen mukoza hücrelerini direk olarak etkileme ya da intestinal mikrobiyatanın metabolik aktivitesi ve kompozisyonunu etkileme yoluyla immün fonksiyonları indirek olarak değiştirebilir (47,48). Bu yolla inflamasyonu başlatarak hastalık gelişimine katkı sağlayabilir.

3. Bağırsak Mikroflorası

Moleküler tekniklerdeki son gelişmelerle bağırsak mikroflorası ve konak arasındaki karmaşık etkileşimlerin karakterize edilmesi, normal ve İBH'ye sahip insanlarda mikrobiyatanın rollerinin keşfedilmesine ışık tutulmuştur (49). Bağırsak mikroflorası önemli metabolik ve koruyucu fonksiyonlara sahip yaklaşık 100 trilyon bakteriden oluşan büyük bir ekosistemdir (19,50). Doğumla beraber sindirim kanalına yerleşip gelişen ve 40.000 den fazla türde bakteri, virüs ve mantarlardan oluşan bağırsak florası immün sistem gelişiminde de önemli rol oynar (49,51,52). Bağırsak mikroflorasının kompozisyonundaki değişme; obezite, çölyak hastalığı, diyabet, romatoid artrit, İBH gibi birçok hastalık ile ilişkili bulunmuştur (51, 53,54).

Sağlıklı bireyler ve İBH olgularında, sahip olunan bağırsak florası içeriği karşılaştırıldığında; biyoçeşitlilik, disbiyoz, patojen içeriği ve gram pozitifler yönünden farklı olduğu saptanmıştır. *Bacteroides, Eubacterium* ve *Lactobacillus* gibi anaerobik türler İBH'de azalmaktadır. Sağlıklı bağırsak florasında daha az bulunan gram pozitif bakteri türleri İBH olgularında artış göstermekle beraber; *Pectinatus, Sutterella, Fusobacterium, Verrucomicrobium, Clostrodia, Mycobacterium paratuberculosis, M. Paramyxovirus* gibi patojen türlerde de artış saptanmıştır (55,56).

İnflamatuvar bağırsak hastalıklarının patogenezinde, immün sistemin normal bağırsak mukozasına karşı anormal bir immün yanıt ya da spesifik bir patojene karşı normal immün yanıtın etkin rol oynadığı düşünülmektedir. Bu iki mekanizmayı kesin olarak ispatlayan deneysel çalışmalar olmasa da; yapılan araştırmalarda immün yanıtın oluşması için bakterilerin gerekli olduğu gösterilmiştir (49,57).

Bağırsak florası ile immün sistem arasında sıkı bir ilişki söz konusudur. İntestinal bakteriler GALT'ı uyararak patojenlere karşı antikor üretimini sağlar. Yapılan deneysel çalışmalarda, bağırsak florasının; IL-17 üreten hücreler (Th17; T helper 17) ve regülatör T hücrelerin (Treg) gelişimini düzenleyerek GALT'ın homeostazisinde rol oynadıkları belirlenmiştir (58-60). Gram negatif peptidoglikanlar bağırsak lenfoid dokusunun gelişimi için gereklidir (49). Bağırsak florası, intestinal mukozadaki T hücreleri ve IgA salgılayan plazma hücrelerini uyaran sinyaller üreterek T ve B lenfosit cevabının düzenlenmesinde rol alır (49,61). Bağırsak florası ile immün sistem arasındaki bu dengeli ilişki normalde simbiyotiktir. İntestinal floranın patogenezi başlatması hipotezinde, bu dengenin bozulması söz konusudur. Bakteriler inflamatuvar genlerin regülasyonunu bozarak ve Nükleer faktör

kappa B (NF-kB) yolağının aktivasyonunu bloke ederek sayısız luminal antijene karşı bir inflamatuvar cevap oluşmasına sebep olurlar (17,62).

4. Bağırsak Mukozası

Bağırsak epiteli, sindirim ile ilgili fonksiyonların yanı sıra intestinal mikrobiyota ile GALT dokusu arasında mukozal immün cevabın oluşumunda önemli role sahiptir. Bağırsak epiteli, luminal bakteriler ve antijenlerin dolaşıma geçmelerini engelleyen bir fiziksel bariyer oluşturur. Epitel hücrelerinin yan yüzleri arasındaki sıkı bağlantılar bu bariyeri güçlendirir. İBH'de paraselüler boşluğu tıkayan bu bağlantıların regülasyonu bozulur ve permeabilitede bir artış meydana gelir (63,64).

Bağırsak epitelinde yer alan Goblet ve Paneth hücreleri bakteri invazyonuna karşı koruma sağlarlar. Goblet hücreleri mukus üretimi, epitel tamiri ve inflamasyonu düzenleyen bazı faktörleri salgılar. Paneth hücreleri ise α-defensin gibi antimikrobiyal peptitleri salgılar. Bağırsak lümenini örten mukus tabakası epitel hücreleri ile luminal antijenlerin ilişkisini kısıtlar. İBH'de meydana gelen inflamatuvar cevap genellikle epitelde ülserasyonlara ve defensin üretiminin azalmasına sebep olur. Sonuçta, luminal antijenlere maruziyet artar ve inflamatuvar cevap genişler (64,65).

Sitokin aracılı intestinal permeabilite değişiklikleri İBH dahil; astım, kistik fibrozis ve kan-beyin bariyeri bozukluğu gibi birçok patolojide rol oynamaktadır. Sitokinler, immün sistem hücrelerinin aktivasyon, migrasyon, gelişimini düzenlemenin yanı sıra fizyolojik, gelişimsel ve non-inflamatuvar birçok biyolojik fonksiyona sahiptir (66-68). İnterferon gama (IFN-γ), (TNF-α), interlökinler (IL-1, IL-4, IL-6, IL-13, IL-17) ile dönüştürücü büyüme faktör-β (TGF-β; transforming growth factor- β) gibi büyüme faktörleriyle yapılan deneysel çalışmalarda; intestinal permeabiliteyi düzenleyen sıkı bağlantıları oluşturan multiprotein komplekslerinin değişimi sonucu, paraselüler bariyerde defektler ve permeabilitede değişiklikler saptanmıştır (69-76).

Mukozal bariyerin önemli bir bileşeni de mukus tabakasıdır. Bu tabaka, bağırsak mukozasını luminal içeriğin fiziksel stresinden korumasının yanı sıra bağırsak florası ile ilişkisini de kısıtlayarak koruma sağlamaktadır. Mukus regülasyonunda meydana gelebilecek bir bozulma mukoza epiteli ile luminal antijenlerin etkileşimlerine ve dolayısıyla inflamasyona yol açabilmektedir (77,78).

Mukus bariyeri müsin ve fosfolipitler gibi temel yapısal elemanlara ek olarak immünoglobulinler ve antimikrobiyal etki gösteren bazı faktörleri de içermektedir. Mukus üretimi ve salgılanması epitel hücrelerinin çevresel faktörler ve luminal antijenlerle uyarımını takiben otokrin yolla; diğer epitel hücreleri, lamina propriyada bulunan lökositler ve sinirsel uyarımla da parakrin yolla düzenlenir (77).

Mikrobiyal toksinler, luminal antijenler ve sitokinler gibi bazı faktörler; müsin üretim ve salgılanmasını uyarabilir ya da inhibe edebilir. Böylece mukus tabakasının kimyasal kompozisyonunda değişiklikler meydana gelebilir. Bu durum İBH gibi çeşitli patolojik durumlara yol açabilir.

Tablo 2. İntestinal mukus bariyerinin bileşenleri ve fonksiyonları (77)

Bileşen	**Kaynak**	**Fonksiyonlar**
Müsin (MUC2)	Goblet hücreleri, Paneth hücreleri	Hidrofilik mukusun en önemli yapısal bileşeni, antimikrobiyal peptitleri tutma, luminal kayganlık
İmmünoglobulinler (IgA, IgM, IgG)	B lenfositler, Epitel hücreleri	Antimikrobiyal etki, opsonizasyon, mikrobiyal penetrasyonu engelleme
Trefoil peptitler (ITF, TF3)	Goblet hücreleri	Müsin polimerizasyonu, yara iyileşmesi uyarımı
Antimikrobiyal peptitler (defensin, katelisidinler, lizozim)	Paneth hücreleri, Enterositler	Direkt antimikrobiyal aktivite
Fosfolipitler	Enterositler	Mukus hidrofobik elemanı, kayganlık, bariyer fonksiyon
Lektinler (RegIII- γ , kollektinler)	Paneth hücreleri, Enterositler	Direkt antimikrobiyal aktivite
Antimikrobiyal proteaz inhibitörleri (elafin, SPL1)	Epitelyal hücreler, Lökositler	Kısmi direk antimikrobiyal aktivite

Örneğin, müsin (MUC2) transkripsiyonu ve Goblet hücrelerinden müsin salgılanması inflamatuvar sitokinlere cevap, luminal antijen uyarımı ve büyüme faktörleriyle artmaktadır (77,79-81). Ayrıca mukus bileşenlerinden defensin, lektin ve diğer Paneth hücre ürünlerinin üretim ve salgılanması; inflamatuvar sitokinler ve bakteriyel toksinler tarafından kontrol edilmektedir (77,82,83).

5. İmmün sistem

İntestinal lamina propriya, intestinal lümende bulunan patojenlere cevap oluşturulması ve yabancı antijenlerin girişini önlemek amacıyla, immün sistem hücrelerinden oluşan kompleks bir hücre popülasyonu içerir. Sindirim kanalı yoluyla çok sayıda yabancı antijen vücuda girer ve fizyolojik sınırlar içeresinde bir immün yanıt oluşturulur. Oral tolerans adı verilen bu normal immün yanıt, dokuda kronik inflamasyona sebep olmaz (84,85).

Aktif İBH'nın en belirgin özelliği, lamina propriya doğal bağışıklık immün sistem hücreleri (nötrofiller, makrofajlar, dentritik hücreler ve natural killer T hücreleri) ile adaptif bağışıklık immün sistem hücrelerinin (B lenfosit ve T lenfositler) infiltrasyonunun artmasıdır. Bu hücrelerin artan aktivasyonları, intestinal mukozada lokal olarak TNF-α, interlökin-1β, interferon-γ (IFN- γ) ve IL-23/Th17 yolağı sitokinlerinin artmasına sebep olur (64).

$CD4^+$ T lenfositler, immün yanıtın başlatılmasında diğer immün sistem hücrelerinin uyarılmasını ve immün reaksiyonlar sırasında efektör fonksiyonlar kazanmasını sağlayarak önemli bir rol oynar. Naive $CD4^+$ T lenfositler antijenik uyarımla aktive olarak çoğalıp efektör fonksiyonları ve sitokin üretimi karakterleri farklı olan Th1, Th2, Th17 ve Treg alt gruplarını oluştururlar (86,87).

T helper 1 alt grubu hücreleri, özellikle intraselüler viral ve bakteriyel infeskiyonlar ile kanserli hücrelere karşı immün yanıtın oluşturulmasından sorumlu, baskın olarak IFN- γ üreten alt gruptur. Th2 hücreler IL-4, IL-5, IL-9, IL-10, IL-13, IL-25 gibi ekstraselüler patojenlerin eliminasyonunda görevli sitokinlerin üretilmesinden sorumludurlar. Th1 ve Th2 hücrelerin sitokin profillerinden farklı olarak yüksek seviyede IL-17 üretimiyle karakterize yeni alt grup Th17 hücreler olarak isimlendirilmiştir. IL-17, IL-21, IL-22 ve TNF- α üreten Th17 hücreler nötrofil infiltrasyonu ve ekstraselüler patojenik bakterilerin kontrolünde önemli rol üstlenir (88-91).

T helper alt hücre gruplarının farklılaşması için spesifik sitokin uyarımları ve transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonu gereklidir. Th1 ileri hücre farklılaşması için aktif makrofajlar ve dentritik hücrelerden yüksek düzeyde IL-12 ekspresyonu ile T-box ailesi transkripsiyon faktör T-bet aktivasyonu gereklidir (90, 92). Th2 yönünde ileri hücre farklılaşması için IL-4 uyarımı ile GATA-3' ün aktivasyonunu sağlayan STAT6 yolağı aktive olur. Th2 yönünde bu farklılaşma TGF-β'nin bulunması halinde gerçekleşmektedir (Tablo 3,90).

Yeni keşfedilen alt grup Th17'nin gelişimi üç aşamada gerçekleşir. Farklılaşma aşamasında TGF-β ve IL-6 etkilidir, naive $CD4^+$ T lenfositlerden Th17 yönünde gelişimi uyarır. Amplifikasyon aşamasında IL-21 etkindir. Son aşamada ise IL-23 çoğalan hücrelerin stabilizasyonunu sağlar. Th17 farklanması için gerekli TGF-β ve IL-6, STAT3 yolağını aktive eder. STAT3'ün aktivasyonu Th17 ileri farklanmasını tetikleyen Retinoik Asit Reseptör İlişkili Orphan Reseptör γ ve α (RORγ ve RORα)' nın ekspresyonunu yönetir (93,94).

Tablo 3. T hücre alt grupları (90)

Alt gruplar	Fonksiyonlar	Sitokinleri	Hücre aktivasyonu	Disregülasyon	İBH ilişkisi
Th1	İntraselüler bakteri ve virüslerin temizlenmesi	IFN-γ, IL-2	Makrofajlar ve $CD8^+$ T hücreler	Otoimmünite	Crohn hastalığı
Th2	Ekstraselüler parazitlerin temizlenmesi	IL-4, IL-5, IL-9, IL-10, IL-13	Bazofiller, Mast hücreler, Eozinofiller, B lenfositler, Epitel hücreler	Alerji ve Astım	Ülseratif kolit
Th17	Ekstraselüler bakteri ve mantar immün yanıtın düzenlenmesi	IL-17, IL-21, IL-22	Nötrofiller	Kronik inflamatuvar hastalıklar	Bilinmiyor
Treg	İnflamasyonun ve immün yanıtın düzenlenmesi	TGF-β, IL-10	T hücre proliferayonunun baskılanması	Treg hücre regülasyon bozukluğu hastalıkları	T hücre regülasyonu bozulması İBH ilişkili

İn vivo ve *in vitro* çalışmalarda güçlü proinflamatuvar özellik gösterdiği belirlenen IL-17 sitokin ailesinin 6 üyesi vardır. Bunlar; IL-17A, IL-17B, IL-17C, IL-17D, IL-17E (IL-25), IL-17F sitokinleridir. IL-17, proinflamatuvar sitokinler, kemokinler ve matriks metalloproteazların ekspresyonunu uyararak doku yıkımı ve infiltrasyonu düzenler. IL-17 ailesi sitokinlerinin kolonik seviyeleri ÜK ve CH'de artış göstermektedir (64,95).

İnterlökin-23, IL-12 sitokin ailesinden heterodimerik protein yapıda IL-12p40/IL-23p19 kompleksinden oluşur. IL-23'ün fonksiyonel reseptörü IL-23R, IL-12Rβ1 ve IL-23R birimlerinden oluşur (96, 97). IL-23, İBH'de önemli proinflamatuvar role sahip bir sitokindir. Yapılan birçok farklı deneysel çalışma, IL-23'ün İBH gelişimi için gerekli olduğunu göstermiştir. Aktif makrofajlar ve dentritik hücreler tarafından eksprese edilen IL-23 eksikliğinde, kolonik mukozada TNF-α, IFN-γ ve IL-6 proinflamatuvar sitokinlerin seviyesinde önemli düşüş meydana gelir. (90,98-100).

İnterlökin-22, yaygın olarak eksprese edilen IL-10R2 ve kısıtlı eksprese edilen IL-10R1 alt birimlerinden meydana gelen IL-10 ailesine ait bir sitokindir. Th17 hücrelerince eksprese edilmesinin yanı sıra keratinositler, hepatositler, intestinal ve respiratuar epitel hücreleri gibi hematopoetik kökenli olmayan hücreler tarafından da eksprese edilir. IL-22, romatoid artrit, psoriasis ve İBH gibi farklı kronik inflamasyon durumlarında yüksek seviyede eksprese edilir. İnsanlarda ÜK ve CH'da kolon mukozasında IL-22 seviyesi yükselir (101, 102).

DENEYSEL KOLİT MODELLERİ

İnflamatuvar bağırsak hastalıklarının etiyolojisinin multifaktöriyel olması, deneysel model oluşturulmasını zorlaştırmaktadır. Genetik, çevresel, mukoza harabiyeti ve immün sistem defektleri gibi etiyolojik faktörlerin çalışıldığı çeşitli deneysel modeller; hastalığın patogenezinin anlaşılması ve yeni tedavi yöntemlerinin geliştirilmesi amacıyla kullanılmaktadır. Hücre kültürü, spontan, kimyasal uyarımlı, knock-out ve defektif T hücre aracılı in vivo ve in vitro birçok model bilimsel çalışmalarda kullanılmaktadır. (103,104).

İnflamatuvar bağırsak hastalık modellerinin önemli bir kısmını uyarımlı (induce) modeller oluşturmaktadır. Bu amaçla epitel bütünlüğünü bozan kimyasallarla birlikte kolitojenik bazı maddeler kullanılır. Epitel bütünlüğünün bozulmasını takiben kolitojenik maddeler mukozayı geçer ve inflamasyon oluşumuna sebep olur. Bu amaçla trinitrobenzen

sülfonik asit (TNBS), dekstran sülfat sodyum (DSS), oksazolon gibi ajanlar deneysel modellerde sıkça kullanılmaktadır (105-108).

Trinitrobenzen sülfonik asit uyarımlı deneysel kolit modelinde TNBS, %40-50 etanol çözeltisi ile birlikte intrarektal olarak uygulanır. Etanolün epitel harabiyetini takiben TNBS mukozayı geçerek İBH'nın patogenezinde rol oynayan prostaglandin E2, lökotrien B4, çeşitli inflamatuvar mediyatörlerin ve sitokinlerin seviyesini artırır (103,109).

Trinitrobenzen sülfonik asit uyarımlı deneysel kolit hayvan modellerinde, klinik ve histolojik yönden insan ÜK' ine benzer özellikler görülmektedir. Kilo kaybı, kanlı diyare ve kolon duvar kalınlaşması gibi klinik tablolar ile yoğun transmural inflamasyon, diffüz nekroz, submukozal nötrofil infiltrasyonu gibi histolojik özellikler benzerdir (103,110). $CD4^+$ ve $CD8^+$ T lenfositler, makrofajlar, granülositlerin infiltrasyonunun artması, Goblet hücrelerinin kaybı ve bağırsak bezlerinin bozulması temel histopatolojilerdir (111).

Bunların yanı sıra TNBS uyarımlı kolitte Th1, Th2 ve Th17 hücresel immün cevabın önemli rol oynadığı ve intestinal kanalın homeostazisinde görevli antiinflamatuvar ve proinflamatuvar sitokinlerin seviyesinde önemli değişikliklerin meydana gelmesi, birçok deneysel çalışmada gösterilmiştir (111-115).

GEREÇ VE YÖNTEMLER

Deneysel çalışmamızın gerçekleştirilebilmesi için gerekli izin Trakya Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan 27.12.2013 tarih ve 2013.09.03 numaralı kararı ile onaylandı (Ek 1). Etik kurul onayını takiben projelendirilen çalışmamız Trakya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (TÜBAP)'a sunuldu ve 2014/20 no'lu proje olarak TÜBAP tarafından desteklendi (Ek 2).

Çalışmamızda Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Birimi'nde üretilmiş, ağırlıkları 210-250 g arasında değişen 16 adet Wistar albino erişkin dişi sıçan kullanıldı. Deneysel aşamalar süresince hayvanlar aynı merkezde kaldı. Deneysel süreçte hayvanlar 22±2 ^{0}C ısı ve 12/12 karanlık aydınlık siklusunda taze çeşme suyu ve standart pelet yemle *ad libitum* olarak beslendi. Hayvanlar her gün düzenli olarak takip edilerek temizlikleri ve ağırlık ölçümleri yapıldı. Deney başlangıcında 16 sıçan rastgele iki gruba ayrıldı. Kontrol grubu (n=8) ve kolit grubu (n=8) hayvanların vücut ağırlıkları ölçülerek her kafeste dört sıçan olacak şekilde yerleştirildi.

TNBS Kolit Modeli Oluşturulması

Trinitrobenzen sülfonik asit uyarımlı kolit modeli uygulanarak hastalık grubu oluşturulmuştur. TNBS 25 mg/sıçan dozda %50'lik etanol içerisinde çözülerek sıçan başına 1 ml olacak şekilde uygulanmıştır. Deney uygulaması yapılmadan hayvanlar bir gece aç bırakılmış ve sabahında deney protokolü uygulanmıştır. TNBS, vazelinle yeterince kayganlaştırılmış katater kullanılarak, ketamin anestezisi altında, rektal yoldan 8 cm ilerleyerek kolona uygun hızda verilmiştir. İşlem sırasında sıçanlar, Trendelenburg

poziyonunda rektumu yukarıda kalacak şekilde tutularak verilen çözeltinin dışarı kaçması engellenmiştir. 1 dakika bu pozisyonda beklendikten sonra kolon yine aynı yolla serum fizyolojik ile yıkanmış ve TNBS uzaklaştırılmıştır. Kontrol grubu sıçanlara ise yine aynı yolla serum fizyolojik uygulanmıştır.

Dokuların Elde Edilmesi ve Makroskobik Skorlama

Hastalık modeli oluşturulmasını takiben 15. günde ksilazin-ketamin (Rompun, Bayer, İstanbul; Ketalar, Pfizer, İstanbul) 10/90 mg/kg, intraperitoneal) anestezisi altında vücut ağırlıkları ölçülen sıçanlar uyutulmuş, intrakardiyak kan alımını takiben batın açılarak kolon dış muayenesi yapılmıştır. Perforasyon/adezyon değerlendirmesi yapılan kolonlardan 8 cm boyunda örnekler alınıp serum fizyolojik ile temizlenerek ağırlık ölçümleri yapıldıktan sonra makroskobik hasar değerlendirmesi McCafferty ve ark. (1994)'e göre yapılmıştır (Tablo 4, 116). Hasar değerlendirmesi yapılan her kolonun bir kısmı ışık mikroskobik inceleme için %10'luk tamponlu formol çözeltisine, bir kısmı da Western blot analizleri için hızla kuru buz üzerine alınarak -80^{0}C'lik soğutucuda saklanmıştır.

Işık Mikroskobik İnceleme ve Mikroskobik Skorlama

Elde edilen kolon dokuları Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı ışık mikroskobi laboratuvarına taşınarak rutin takip işlemlerine başlandı. Tespit solüsyonu olarak %10'luk tamponlu formol solüsyonu (100 ml %37'lik formaldehit solüsyonu, 900 ml distile su, 6,5 gram Na_2HPO_4, 4 gram $NaH_2PO_4H_2O$) kullanıldı. Tespit solüsyonunda 48 saat bekleyen kolon dokuları bir gece çeşme suyu altında yıkandıktan sonra sırasıyla %70, %80, %90, %96' lık alkol solüsyonlarında 2x1'er saat bekletildikten sonra mutlak alkole alınarak 90 dakika dehidratasyon işlemine tabi tutulmuştu. Saydamlaştırma aşamasına alınan dokular 2x1 saat süre ksilolde bekletildikten sonra 42-45^{0}C'deki yumuşak parafin içerisine alındı. 45 dakikalık yumuşak parafin emdirme işleminden sonra dokular eriyik haldeki sert parafine alındı. Parafin dispenser yardımı ile yapılan bloklama işleminden sonra kolon dokularından Leica RM-2245 silindirli mikrotomu kullanılarak 5µm kalınlığında kesitler alındı. Kolon dokusu genel histolojik incelemesi ve mikroskobik skorlama değerlendirmesi için kesitlere Hematoksilen-Eozin (H&E) boyaması yapıldı. H&E ile boyanmış kesitlerde ışık mikroskobik değerlendirme için Obermeier ve ark. (1999)'nın kullandığı skorlama cetveli kullanıldı (Tablo 5,117).

Tablo 4. Deneysel kolit modeli makroskobik hasar değerlendirme skorlaması (116)

Özellik	**Skor**
Ülserasyon	
Normal görünüm	**0**
Ülserasyon olmadan fokal hiperemi	**1**
Hiperemi veya kolon duvarında kalınlaşma olmadan ülserasyon	**2**
Bir alanda inflamasyon ile birlikte ülserasyon	**3**
İki ya da daha fazla alanda inflamasyon ve ülserasyon	**4**
Kolon boyunca > 1 cm alanda major hasar	**5**
Kolon boyunca > 2 cm alanda hasar olduğunda tutulumun her eklenen cm'si için skor 1 birim arttırılacak	**6-10**
Adezyon	
Adezyon yok	**0**
Hafif adezyon (diğer dokulardan kolayca ayrılabilen)	**1**
Şiddetli adezyon	**2**
Diyare	
Yok	**0**
Var	**1**
Kalınlık	
Maksimal barsak duvar kalınlığı (X) mm olarak yukarıdaki skora eklenecek	**X**
	Total Skor

Tablo 5. Mikroskobik değerlendirmede kullanılan skor cetveli (117)

Özellik	**Skor**
Epitel	
Normal morfoloji	**0**
Goblet hücrelerinde kayıp	**1**
Geniş alanlarda Goblet hücre kaybı	**2**
Kript kaybı	**3**
Geniş alanlarda kript kaybı	**4**
İnfiltrasyon	
İnfiltrasyon yok	**0**
Kriptler çevresinde infiltrasyon	**1**
Lamina muskülaris mukozaya ulaşan infiltrasyon	**2**
Lamina muskülaris mukozaya ulaşan ağır infiltrasyon ve mukozanın aşırı ödemle kalınlaşması	**3**
Submukozanın İnfiltrasyonu	**4**
	Total Skor

İmmünohistokimyasal Boyamalar

Rutin takip işlemlerinin ardından, parafinde bloklanan dokulardan immünohistokimyasal boyamalar için poly-L-lysine kaplı lamlar üzerine (Sigma-P0425-72EA) Leica RM-2245 silindirli mikrotomu kullanılarak 5µm kalınlığında kesitler alındı. Ksilol ile deparafinizasyon işlemi yapıldıktan sonra azalan alkol serisinden geçirilerek suya indirildi. Kesitler fosfat tampon solüsyonunda (PBS) 3x5 dakika yıkandı. Antijen geri kazanımı aşaması sitrat tamponu içerisine (Thermo scientific, 1 M, pH:6) alınan doku kesitlerinin mikrodalga fırında (Vestel, 1550) maksimum ısıda 5 dakika kaynatılarak gerçekleştirildi. Oda sıcaklığında soğuma işlemi tamamlandıktan sonra PBS ile 3x5 dakika yıkanarak, endojen peroksidaz aktivesini baskılamak için distile su ile hazırlanan %3'lük H_2O_2 çözeltisinde 10 dakika bekletildi. Lamlar 3x5 dakika PBS ile yıkandıktan sonra özgül olmayan bağlanmaları engellemek için pappen ile havuz oluşturulan kesitler üzerine blok solüsyonu (Invitrogen) 5 dakika süreyle uygulandı. Kurutma kâğıdı yardımıyla blok

solüsyonu yıkanmadan uzaklaştırıldı. Üretici firma önerisi ve deneme aşamalarında tecrübe edilen inkübasyon sürelerinde ve uygun dilüsyonda kesitler üzerine primer antikorlar oda ısında nemli çember içerisinde uygulandı. Primer antikor uygulaması sonrasında kesitler PBS ile yıkandı ve biotinli sekonder antikorla (Invitrogen) 10 dakika nemli çember içerisinde inkübe edilerek PBS ile yıkandı. HRP-streptavidin ile nemli chamber içerisinde 10 dakika muamele edilen kesitler PBS ile yıkandı. Tüm immünohistokimyasal işaretlemelerde kromojen olarak AEC (3-amino-9-ethylcarbazole) kullanıldı. AEC (Invitrogen) ile renklendirme aşamasının süresi mikroskop altında belirlenerek tüm kesitler aynı süre kromojenle muamele edildikten sonra kesitler suya indirilerek reaksiyon durduruldu. Mayer's Hematoksilen ile zıt boyama yapılan kesitler su bazlı kapatma medyumu ile kapatılarak ışık mikroskobu altında incelenmeye hazır hale getirildi. İmmünohistokimyasal işaretlemede kullanılan primer antikorlar, inkübasyon süreleri ve hedef hücreler Tablo. 6' da verilmiştir.

Tablo 6. İmmünohistokimyasal boyamalarda kullanılan antikorlar, dilüsyonlar ve hedef hücreler

Antikor	Marka	Dilüsyon	Hedef hücreler
Anti-CD3	Bioss bs-0765R	1:50	Olgun lenfositler
Anti-CD4	Abcam ab11815	1:50	CD4 T lenfositler
Anti-CD5	Bioss bs1113R	1:200	T ve B lenfositler
Anti-CD8	Abbiotec P0731	1:100	NK T lenfositler
Anti-CD11b	Abcam ab75476	1:100	Makrofajlar
Anti-CD45	Abbiotec P08575	1:100	Genel lökosit hücre yüzey reseptörü
Anti-TNF-α	Abcam ab199013	1:100	Th1 hücreler, Makrofajlar, NK T hücreler, Mast hücreleri
Anti-IL-17	Anti-IL17 antibody (ab79056)	1:100	Th17 hücreler
Anti-IL-22	Anti-IL22 antibody (ab106773)	1:100	Th22 hücreler
Anti-IL-23	Anti-IL23 antibody (ab115759)	1:100	IL-23 yüzey reseptörüne sahip hücreler

Western blot tekniği uygulaması

Ependorf tüpleri içerisinde - 80°C'de bekletilen doku örneklerinden homojenizasyon işlemi için eşit miktarlarda doku örnekleri tartılarak alındı. 200 mg doku örneği üzerine 400 ml protein inhibitör kokteyl içeren doku lizis tamponu eklendi. Karışım buz üzerinde 10 dakika bekletildikten sonra üzerine 1,4 mm çelik boncuklar eklenerek doku homojenizatöründe 10. seviyede 4 dk kadar parçalama işlemi yapıldı. İyi parçalanmayan doku içeren tüplere buz üzerinde bir miktar daha ekstraksiyon solüsyonu eklenerek dokuların tamamen parçalanması sağlandı.

Parçalama işlemi bittikten sonra örnekler soğutmalı santrifüjde 10.000 rpm devirde +4°C' de 10 dk. süre boyunca santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra karışım yeni bir tüpe alınarak tekrar santrifüj işlemine tabi tutuldu. Üçüncü santrifüj işleminden sonra temiz lizatlar elde edilmiş oldu.

Elde edilen lizatlardaki protein yoğunluğunun ölçülmesinde Qubit 2.0 Fluorometre cihazı ile Qubit protein assay kit kullanıldı. 1 ml'lik örneklerde protein yoğunluğu ölçümleri yapıldı. Yükleme işlemi yaparken kuyucuklara eşit miktarda protein yüklemesi yapılabilmesi için örneklerden alınması gereken hacimler hesaplandı. Her örnek için toplamda 10 µl hacimde lizat + SRA+ LSD + distile su karışımı kuyucuklara yüklendi.

Yürütme solüsyonu olarak MES SDS Running Buffer 20X (Invitrogen) kullanıldı. Yükleme jeli olarak 4-12% Bis-Tris Protein Gels (Invitrogen, Novex) kullanıldı. Örnekler Novex Bolt Mini Gel Tank kullanılarak, 80 Voltta 2 saat süreyle yürütüldü. Sürenin sonunda jeller uygun şekilde çıkarılarak blotlama cihazına yerleştirildi.

Elektroforezi tamamlanan jellerin PVDF membrana (Novex, 2 PVDF Mini Stocks) aktarımı kuru blotlama sistemi ile iBlot (Invitrogen) cihazı kullanılarak gerçekleştirildi. PVDF membran yıkama işlemlerinde WesternBreeze kit (İnvitrogen) kullanıldı.

Bloklama işlemi, membran distile sudan geçirildikten sonra çalkalayıcı üzerinde bloklama solüsyonunun (Western Brezee Chemiluminescent Immunodetection System, Novex, WB7106) 1 saat uygulanmasıyla gerçekleştirildi.

Yıkama işleminden sonra membran, primer antikor (IL-17, IL-22, B-aktin) hazırlanarak muamele edildi. primer antikor ile +4°C de gece boyu inkübasyon işlemi

gerçekleştirildi. Ertesi sabah yıkama aşamasından sonra sekonder antikor muamelesi ile işleme devam edildi. Sekonder antikorla bir saat süre boyunca inkübasyon işlemi yapıldı. Primer antikor ve sekonder antikor aşamaları çalkalayıcı üzerinde yapıldı.

Sekonder antikorla inkübasyon sonrasında yıkama işlemi yapıldı. WesternBreeze kit içinde yer alan kemilüminesans substrat ve kemilüminesans substrat enhancer solüsyonları prosedüre göre hazırlanarak karanlık ortamda membran ile 5 dk muamele edildi. Sonrasında membran, görüntüleme sistemine alınarak bant görüntüleri alındı.

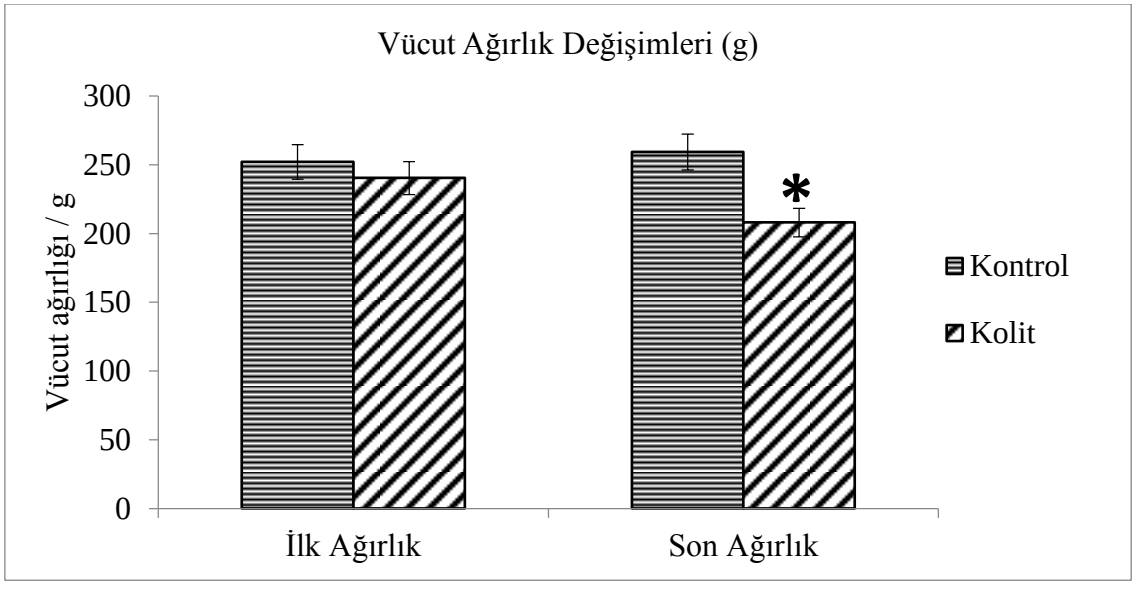
İstatistiksel Analizler

Hematoksilen-Eozin ve immünohistokimyasal boyamalar sonucu elde edilen preparatlar Zeiss (Primo star 10) ışık mikroskop altında incelenerek fotoğraflandı. Fotoğrafların alınması ve elde edilen görüntülerden analizlerin yapılmasında Kameram görüntü analiz programı (Argenit, İstanbul) kullanıldı. Hem kolit hem de kontrol grubunda, her antikor için, her bir sıçan kolon dokusunda 25 farklı alanda olmak üzere; toplamda her gruptan 200 farklı alanda pozitif boyanan hücre sayımı yapılmıştır. Elde edilen sonuçların mm^2'ye çevrilmesi ile birim alandaki hücre yoğunlukları hesaplandı. Western blot analizi sonucunda elde edilen bantların yoğunluklarının ölçülmesinde ChemiDoc MP 4.1 Görüntüleme sistemi (Bio-Rad) ve programı kullanıldı. Elde edilen veriler SPSS (SPSS 12.0 for Windows, Chicago, USA) programı ile analiz edildi. Gruplar arası farklılıklar nonparametrik Mann-Whitney U testi ile belirlendi. $p<0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

BULGULAR

Vücut ve Kolon Ağırlığı Bulguları

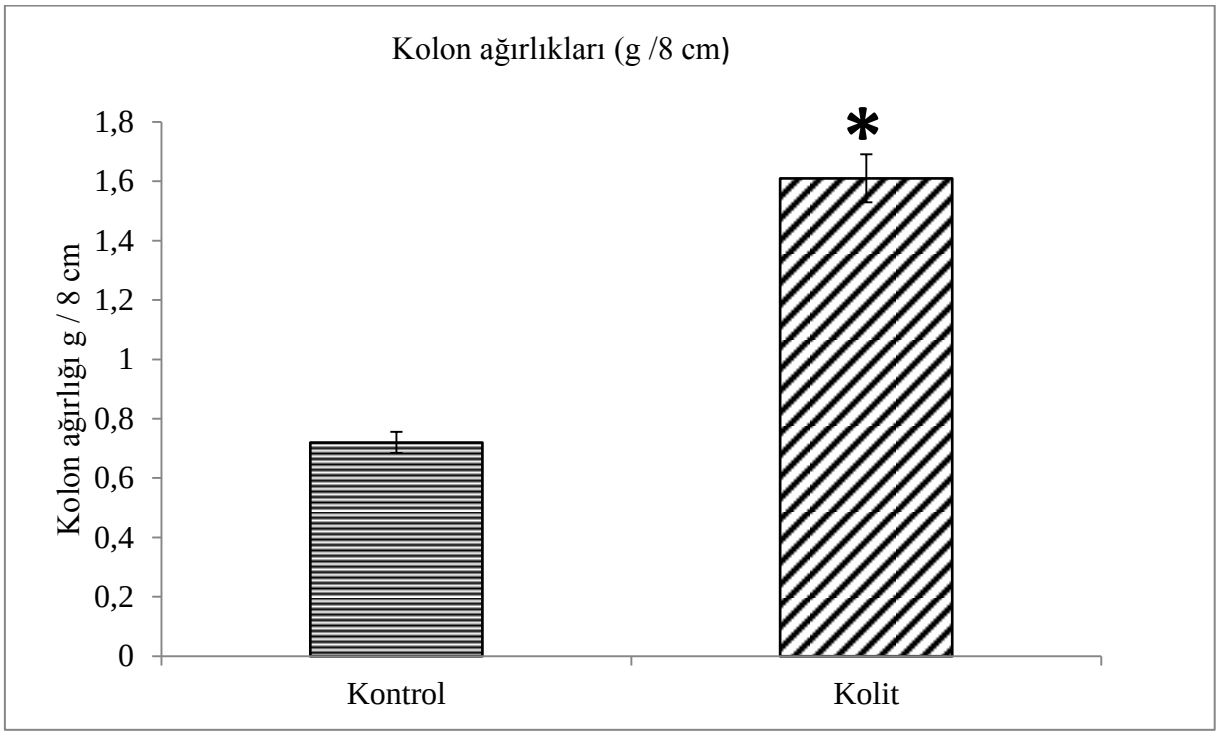
Deney başlangıcında ve deney süresinin sonunda kaydedilen vücut ağırlığı ölçümleri karşılaştırıldığında; yem tüketiminde de azalma gözlemlenen kolit grubunda, deney sonu ağırlık ortalaması deney başlangıcındaki ağırlık ortalamasıyla kıyaslandığında istatistiksel olarak da anlamlı bir azalma tespit edilmiştir ($p<0.05$). Kontrol ve deney gruplarına ait ağırlık değişimleri Şekil 1'de verilmiştir.



*p<0.05; Başlangıç vücut ağırlık değerine göre istatistiksel olarak anlamlı

Şekil 1. Kontrol ve kolit grubuna ait vücut ağırlık değişimleri

Deney süresi sonunda anestezi altında batın açıldıktan sonra kolon makroskobik bulguları değerlendirilen hayvanlardan kolon dokuları alındı. Alınan 8 cm'lik doku örnekleri hassas terazi ile tartılarak sonuçlar kaydedildi. Kolon örneklerinin ağırlıkları değerlendirildiğinde, kolit grubunda kontrol grubuna göre anlamlı bir artışın meydana geldiği gözlemlendi ($p<0.05$). Gruplara ait kolon ağırlıkları değişimleri Şekil 2'de verilmiştir.



*p<0.05; Kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı

Şekil 2. Gruplara ait deney sonu kolon doku ağrılıkları

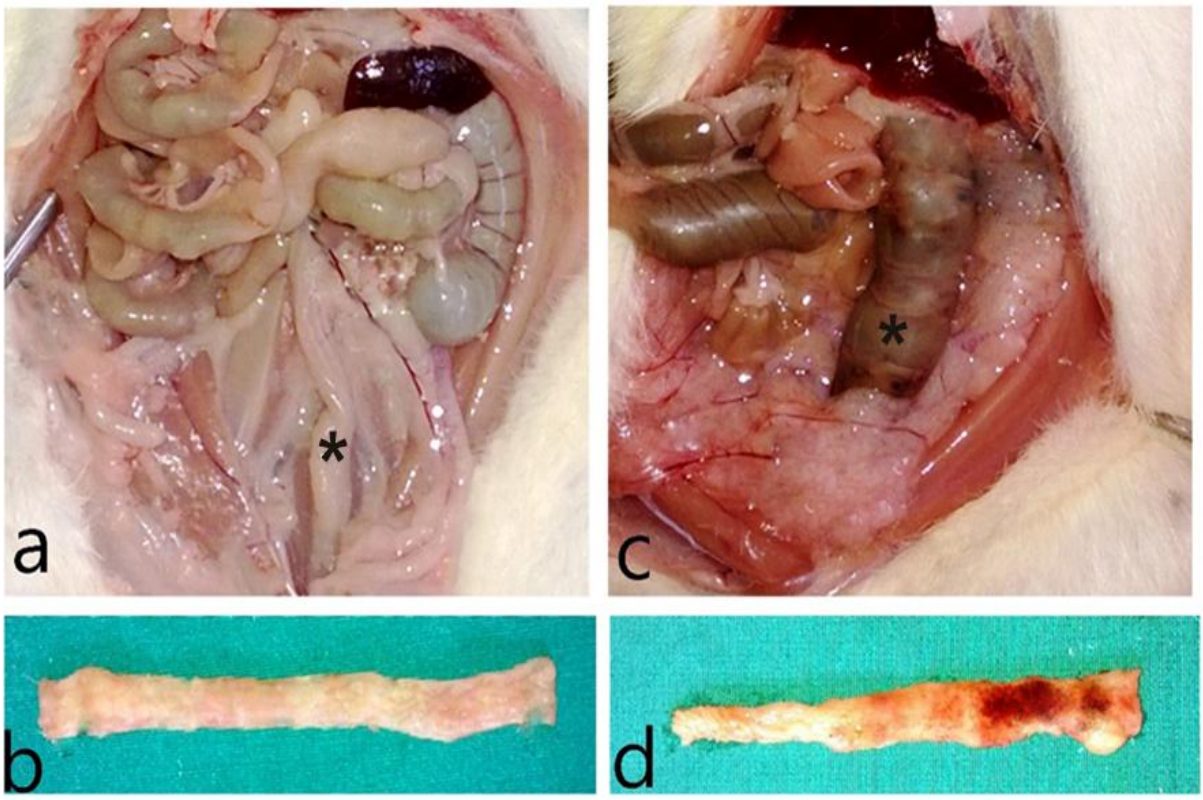
Makroskobik ve Mikroskobik Skorlama Bulguları

Makroskobik ve mikroskobik bulguların elde edilmesinde Tablo 4 ve 5'te verilen skorlama cetvelleri kullanılmıştır. Deney süresi sonunda batın açılarak yapılan intrabdominal incelemede kontrol gruplarında bir patoloji gözlemlenmezken, kolit grubunda kolon dokusunda ödem, dilatasyon ve hiperemi gözlemlenmiştir.

Kolon dokularının makroskobik incelemesinde kontrol grubunda patolojiye rastlanmazken, kolit grubu kolon dokularında hiperemi ve ülserasyon bulgularına rastlanmıştır. Kontrol ve kolon gruplarına intrabdominal ve kolon makroskobik görüntüleri Şekil 3' te verilmiştir. Kolit grubu makroskobik hasar skoru 6.8±1.5 olarak bulunmuştur. Gruplara ait makroskobik skor değerleri Şekil 4'te verilmiştir. Makroskobik bulgular

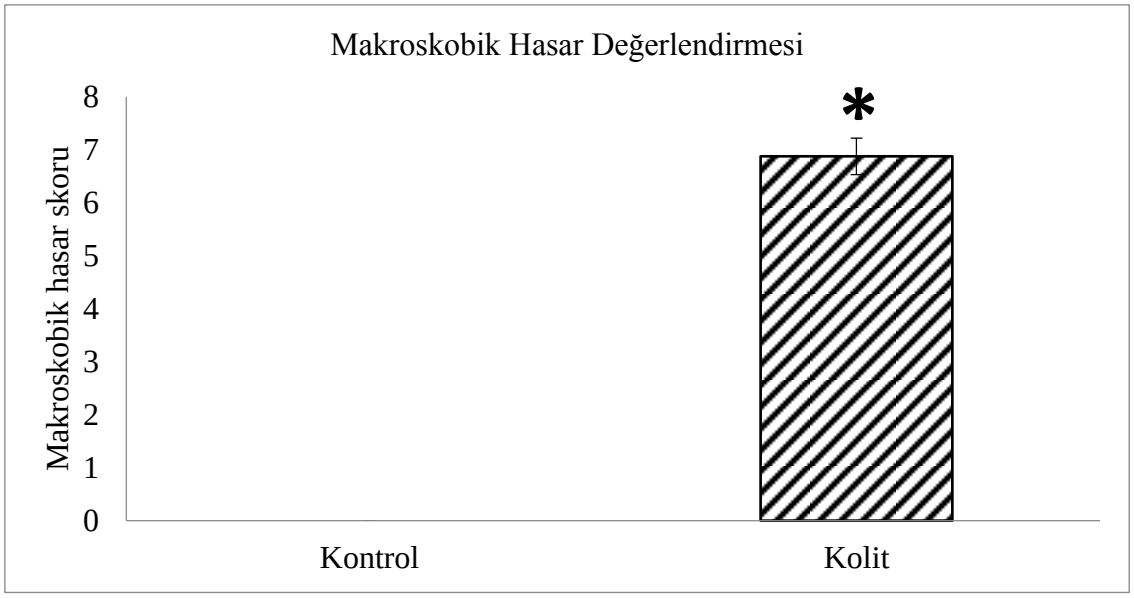
yönünden kolit grubu ile kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ($p<0.05$).

Hematoksilen-Eozin boyaması yapılan kesitlerle yapılan mikroskobik hasar değerlendirmesinde kontrol grubunda normal histolojik yapı gözlendi. Kolit grubunda ise Goblet hücre kaybı, bağırsak bezlerinin yapısındaki bozulmalar ve inflamatuvar hücre infiltrasyonu gibi histopatolojiler gözlemlendi. Kolit grubunda mikroskobik hasar skoru, kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek olarak bulundu (Kolit; 7.1±0.8, Kontrol; 0, Şekil 5, $p<0.05$).



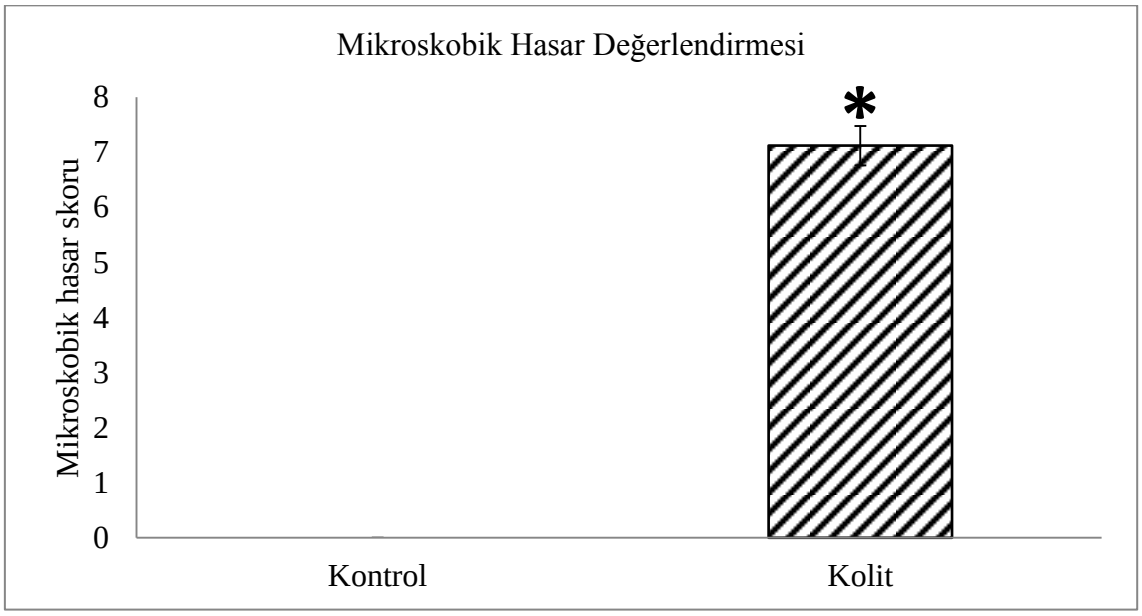
Şekil 3. Kontrol ve kolit gruplarına ait intrabdominal ve kolon makroskobik görüntüleri.

(**a;** Kontrol grubuna ait kolon ve sindirim kanalı organlarının genel görünümü, **b;** Kontrol grubu kolon dokusuna ait makroskobik görüntü**, c;** Kolit grubu batın açılması sonucu kolon ve sindirim kanalı organları görünümü, **d;** Kolit grubu kolon dokusuna ait makroskobik görüntü, * = kolon)



*p<0.05; Kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı

Şekil 4. Gruplara ait makroskobik hasar değerleri



*p<0.05; Kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı

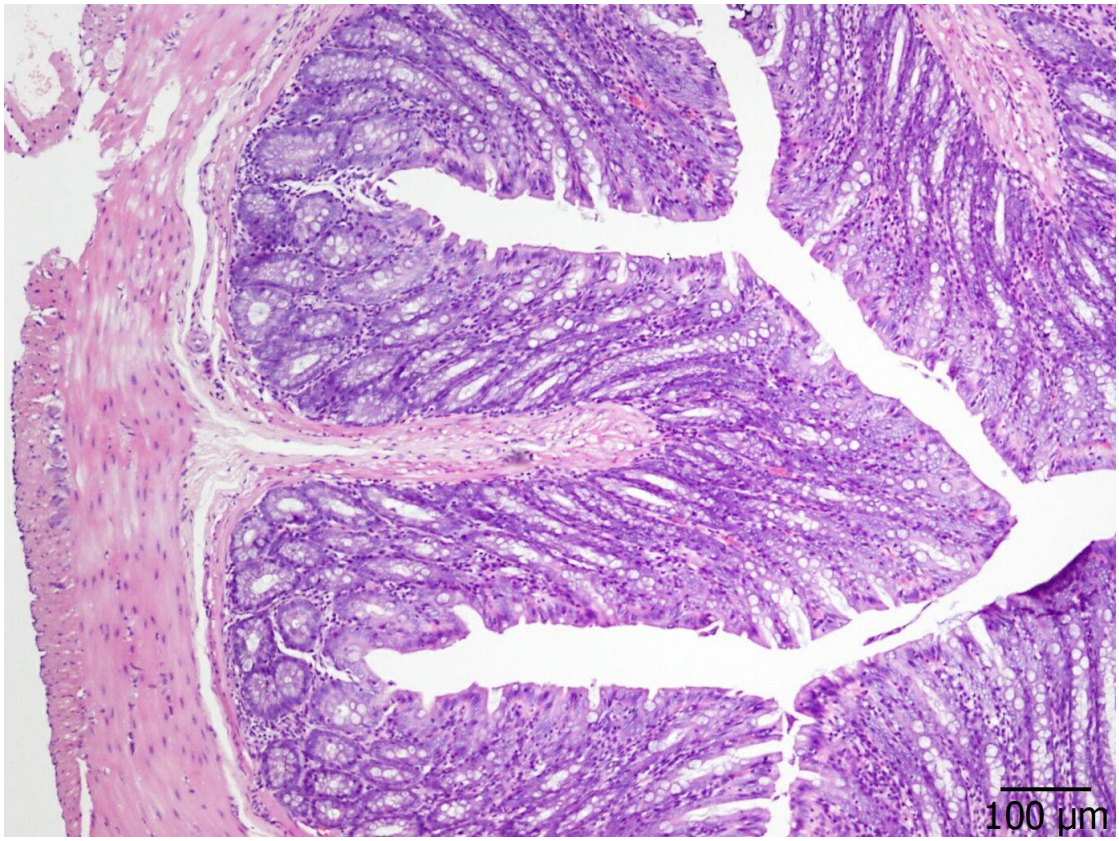
Şekil 5. Gruplara ait mikroskobik hasar değerleri

1. H&E boyama bulguları

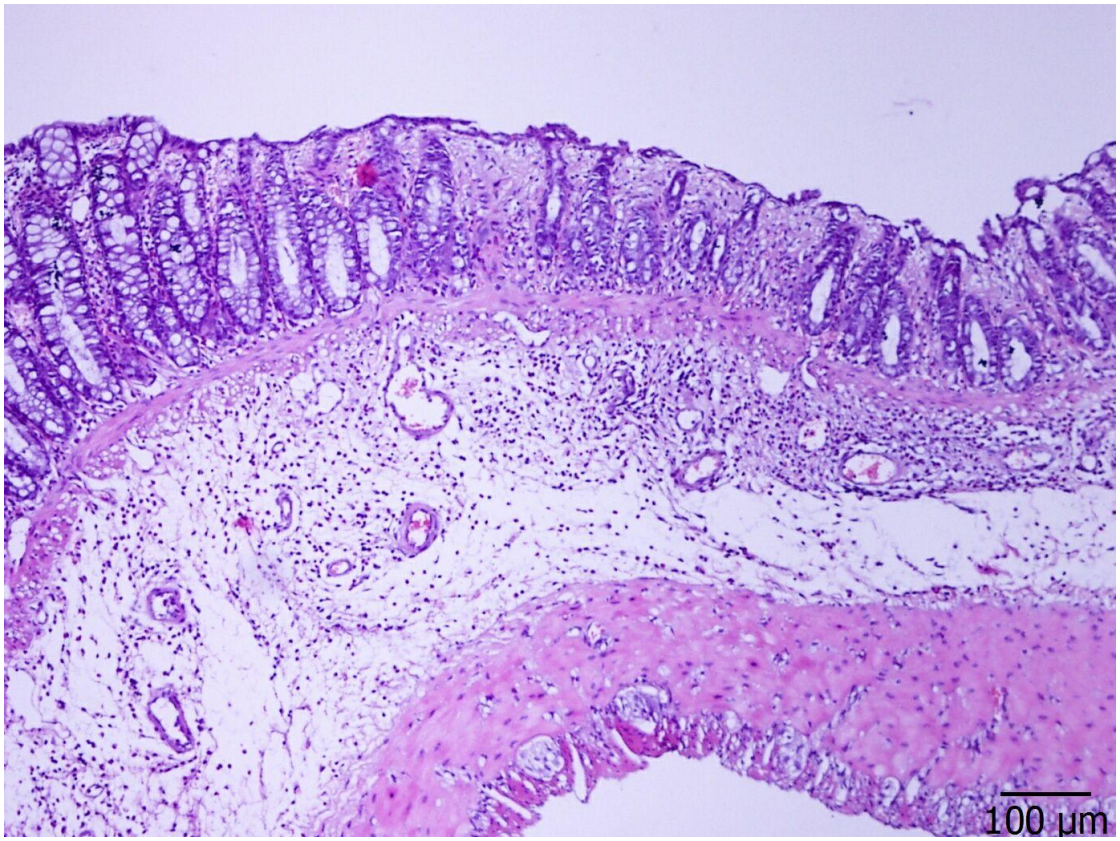
Kontrol grubuna ait H&E ile boyanmış kesitler incelendiğinde, normal histolojik yapıya sahip oldukları görüldü. Mukoza yüzeyinin çok sayıda Goblet hücresi içeren tek katlı prizmatik epitel ile örtülmüş olduğu görüldü. Lümene açılan uzun tübüler bezler olan

Lieberkühn kriptaları içeren gevşek bağ doku yapısındaki lamina propriya normal histolojik yapıya sahipti. Mukozayı submukozadan ayıran lamina muskularis mukoza, kas tabakalarından oluşan tunika muskularis tabakası ve adventisya normal doku yapısındaydı (Şekil 6).

Kolit grubuna ait, H&E ile boyanmış histolojik kesitler incelendiğinde, birçok histopatolojik bulguya rastlandı. Mukoza tabakasının incelmesine ek olarak, mukozayı örten yüzey epitelinde erozyon ve bozulmalar gözlendi. Mukozada Lieberkühn kriptalarının yer yer tamamen ortadan kalktığı görüldü. Lamina propriyada ve submukozada yoğun inflamatuvar hücre infiltrasyonu olduğu görüldü. Lamina muskularis mukozayı aşan ödem oluşumunun submukozaya taştığı ve submukoza tabakasının kalınlığının artmasına sebep olduğu gözlendi. Ayrıca bazı bölgelerde ülserasyon alanlarının varlığı gözlemlendi (Şekil 7).



Şekil 6. Kontrol grubuna ait normal kolon görüntüsü (H&E boyaması)

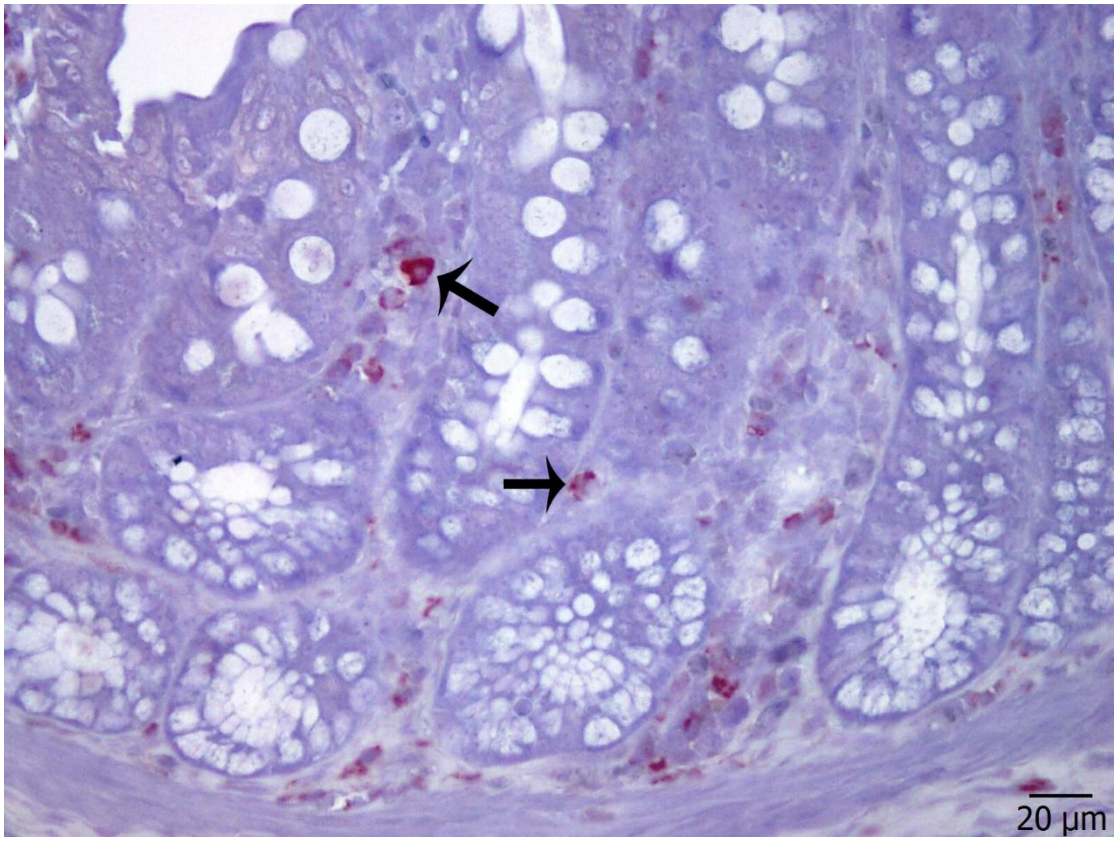


Şekil 7. Kolit grubuna ait kolon kesiti (H&E boyaması)

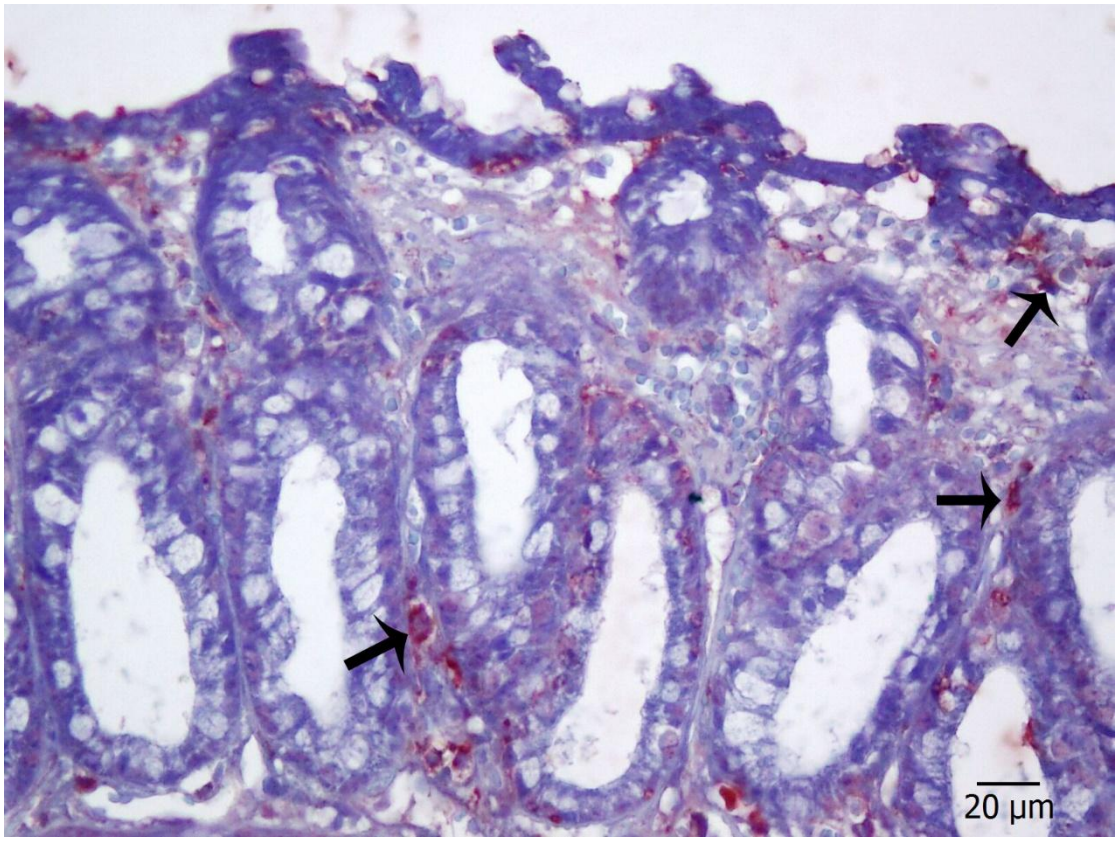
2. İmmünohistokimyasal bulgular

2.1. Anti-CD3 boyama bulguları

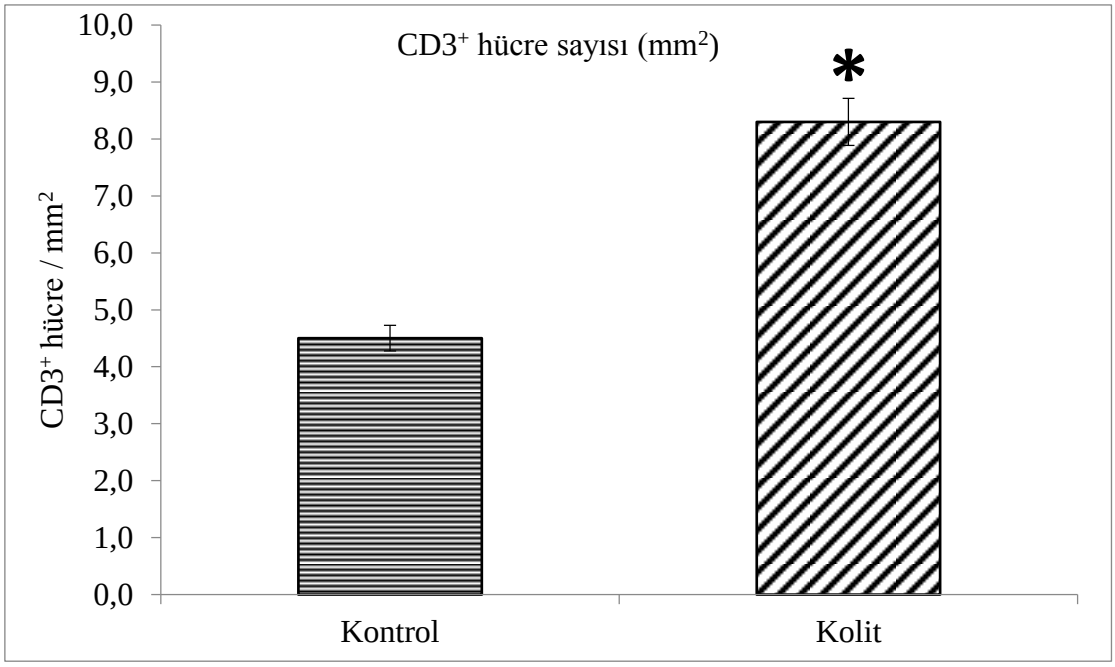
Anti-CD3 kullanılarak yapılan immünohistokimyasal işaretlemelerde; kontrol ve kolit grubunda pozitif boyanan hücrelerin yoğunluk ve dağılımları incelendi. Kontrol grubu kolon mukozasında $CD3^+$ hücre sayısı 4.5±1.50 (mm^2) olarak bulunurken, kolit grubunda 8.3±1.8 olarak belirlenmiştir. Kolit grubu mukoza $CD3^+$ hücre sayısı kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı yüksek bulunmuştur ($p<0.05$). $CD3^+$ hücrelerin dağılımları incelendiğinde, kontrol grubunda daha çok Lieberkühn kriptleri arasında bağ doku içerisinde yerleşim gösterirken; kolit grubunda buna ek olarak lamina epitelyalisin altında ve bez epitel hücreleri arasında intraepitelyal yerleşime sahip hücrelerin olduğu gözlendi. Kontrol ve kolit grubuna ait $CD3^+$ hücre işaretlemeleri Şekil 8 ve 9'da verilmiştir. Birim alandaki hücre sayıları Şekil 10'da sunulmuştur.



Şekil 8. Kontrol grubu Anti-CD3 boyanması (oklar; $CD3^{+}$ hücreler, İmmünperoksidaz, Hematoksilen zıt boyaması)



Şekil 9. Kolit grubu Anti-CD3 boyanması (oklar; subepitelyal ve kriptler çevresinde $CD3^+$ hücreler, İmmünperoksidaz, Hematoksilen zıt boyaması)

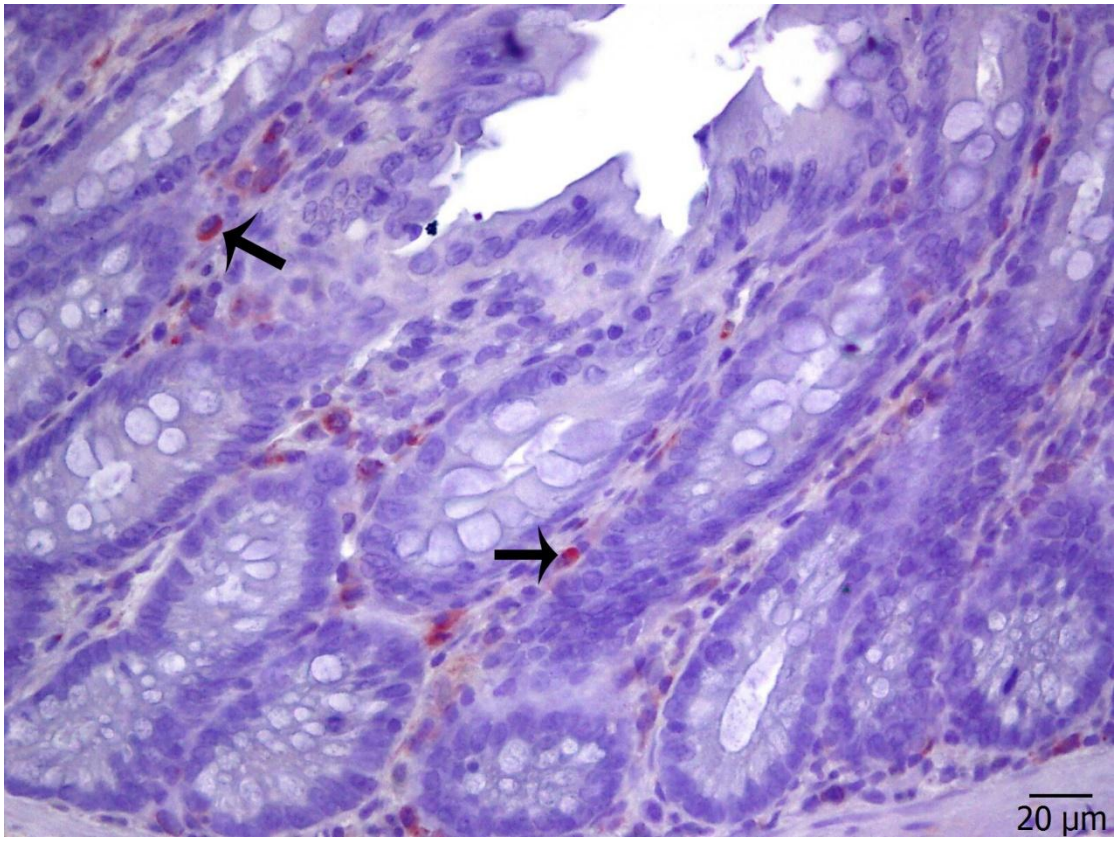


*p<0.05; Kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı

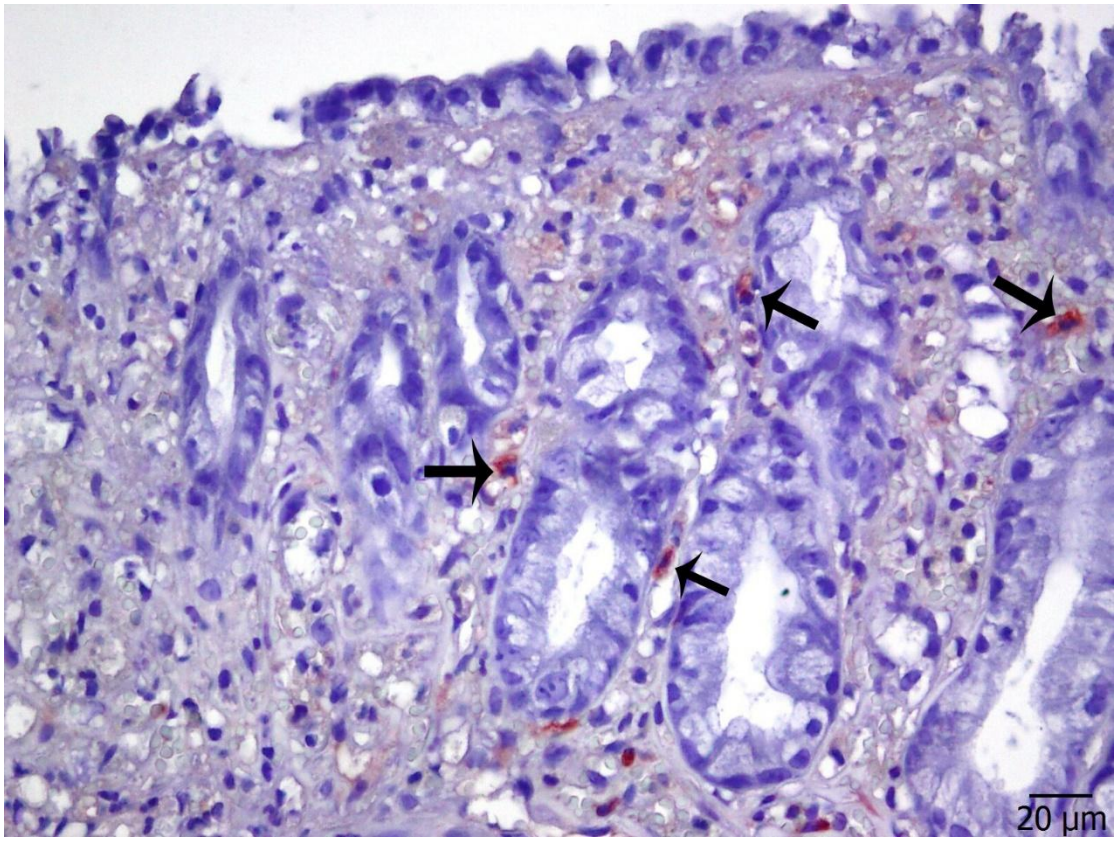
Şekil 10. Gruplara ait $CD3^+$ hücre sayımları

2.2. Anti-CD4 boyama bulguları

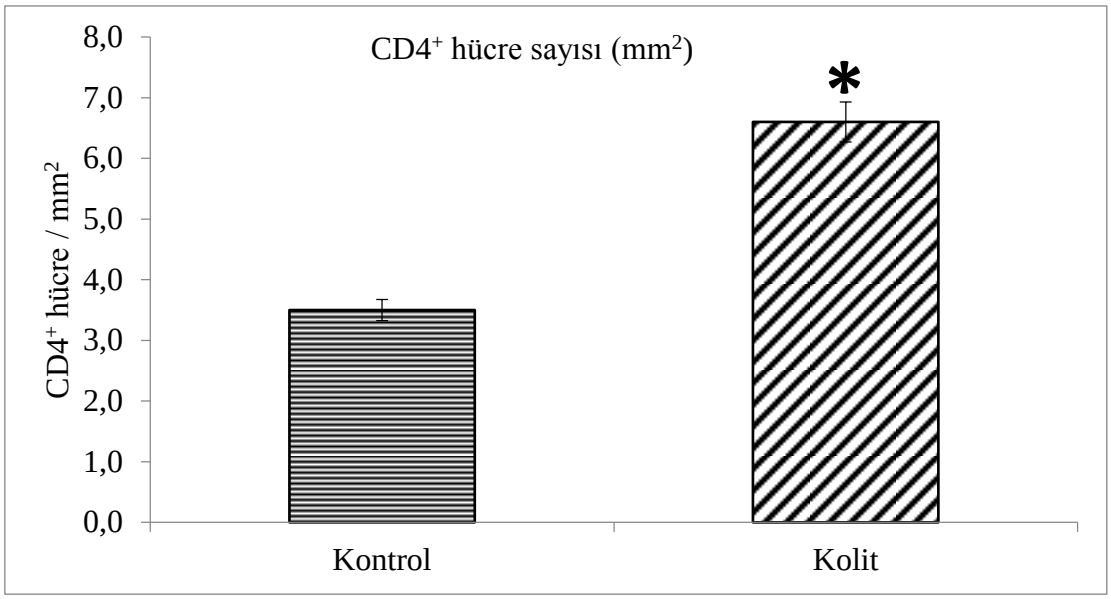
Anti-CD4 boyaması yapılan kontrol ve kolit grubu kolon mukozaları incelendiğinde; $CD4^+$ boyanan hücre sayısının, gruplar arasında farklı olduğu görüldü. $CD4^+$ hücreler, her iki grupta da lamina propriya gevşek bağ dokusu içinde, bezler arası bölgede ve bezlere yakın konumda yerleşim göstermekteydi (Şekil 11 ve 12). Birim alandaki $CD4^+$ hücre sayısı incelendiğinde kontrol grubu; 3.5±1.8 iken, kolit grubunda ise 6.6±1.6 idi. Kolit grubundaki bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulundu (Şekil 13, $p<0.05$).



Şekil 11. Kontrol grubu Anti-CD4 boyanması (oklar; $CD4^+$ hücreler, İmmünperoksidaz, Hematoksilen zıt boyaması)



Şekil 12. Kolit grubu Anti-CD4 boyanması (oklar; kriptlere yakın yerleşimli $CD4^+$ hücreler, İmmünperoksidaz, Hematoksilen zıt boyaması)

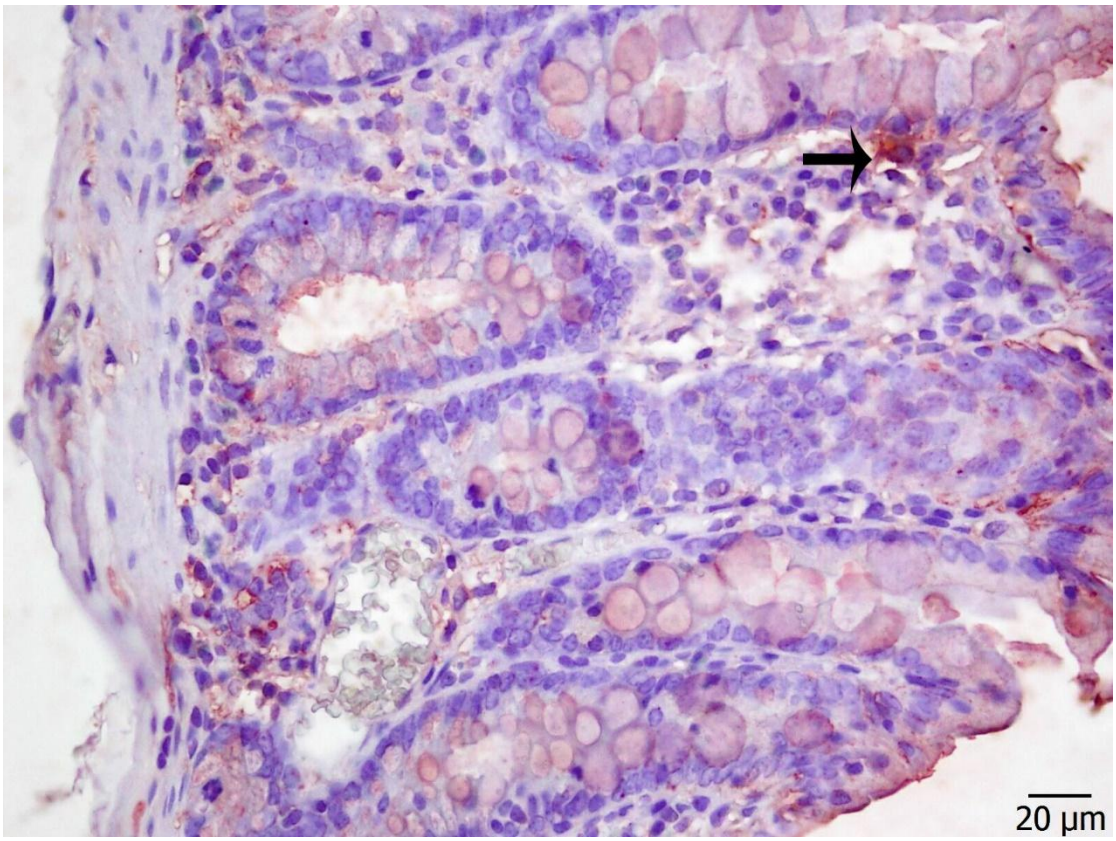


*p<0.05; Kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı

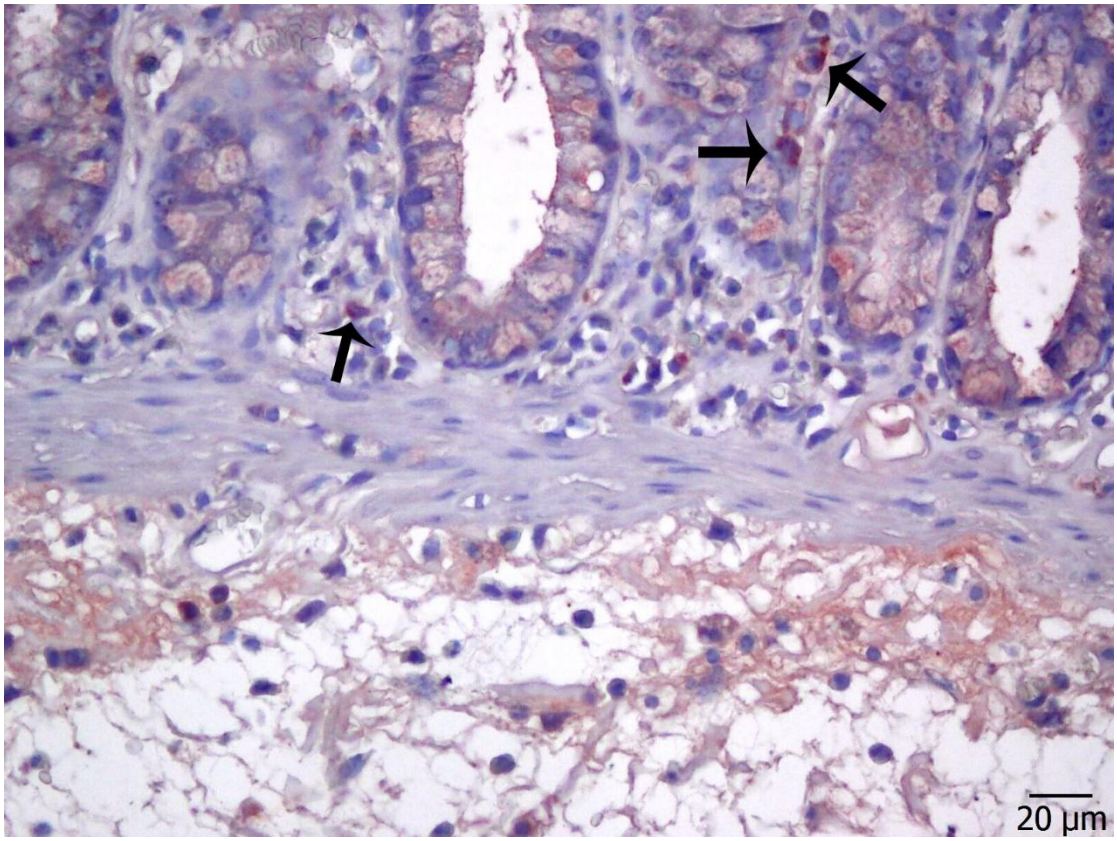
Şekil 13. Gruplara ait $CD4^+$ hücre sayımları

2.3. Anti-CD5 boyama bulguları

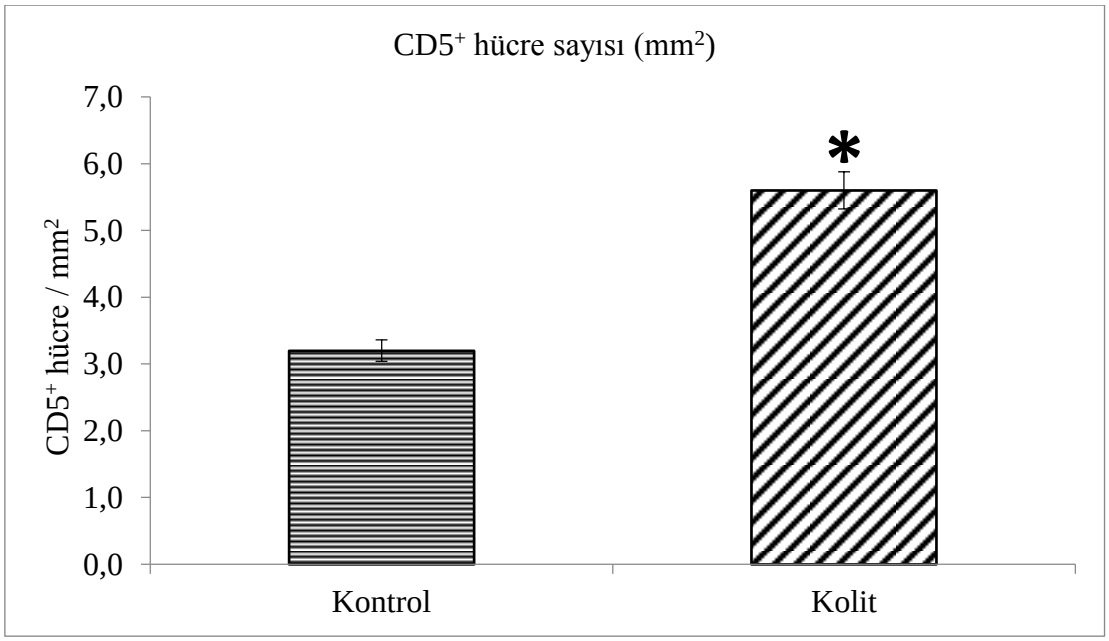
CD5 antikoru ile işaretleme yapılan kontrol ve kolit grubuna ait kesitlerin fotoğrafları Şekil 14 ve 15'de verilmiştir. Mukozadaki dağılımları incelendiğinde ise, her iki grupta da lamina propriyanın gevşek bağ dokusunda yerleşmiş oldukları gözlenmiştir. Şekil 16'da sunulduğu gibi, gruplara ait $CD5^+$ hücre sayısında; kolit grubunda kontrole kıyasla anlamlı bir artışın meydana geldiği gözlenmiştir (Kontrol; 3.2±1.3, Kolit; 5.6±1.5, $p<0.05$).



Şekil 14. Kontrol grubu Anti-CD5 boyanması (oklar; $CD5^+$ hücreler, İmmünperoksidaz, Hematoksilen zıt boyaması)



Şekil 15. Kolit grubu Anti-CD5 boyanması (oklar; $CD4^+$ hücreler, İmmünperoksidaz, Hematoksilen zıt boyaması)

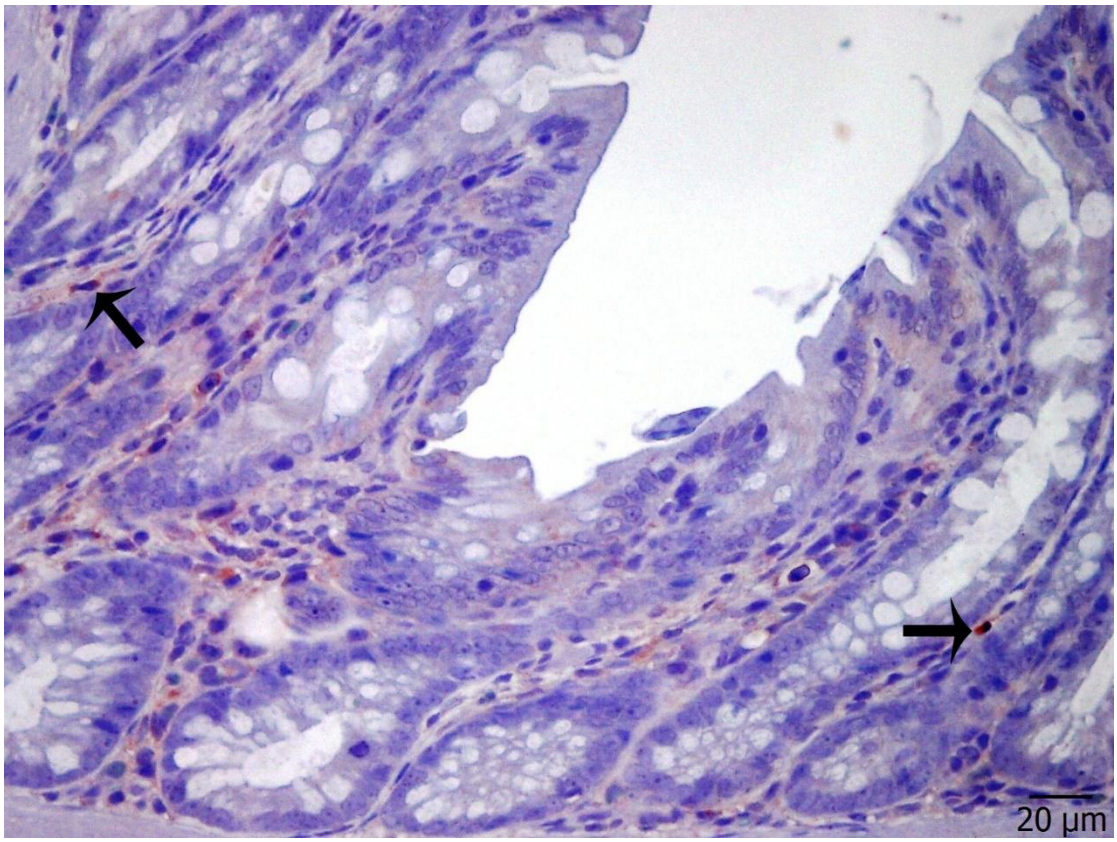


*p<0.05; Kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı

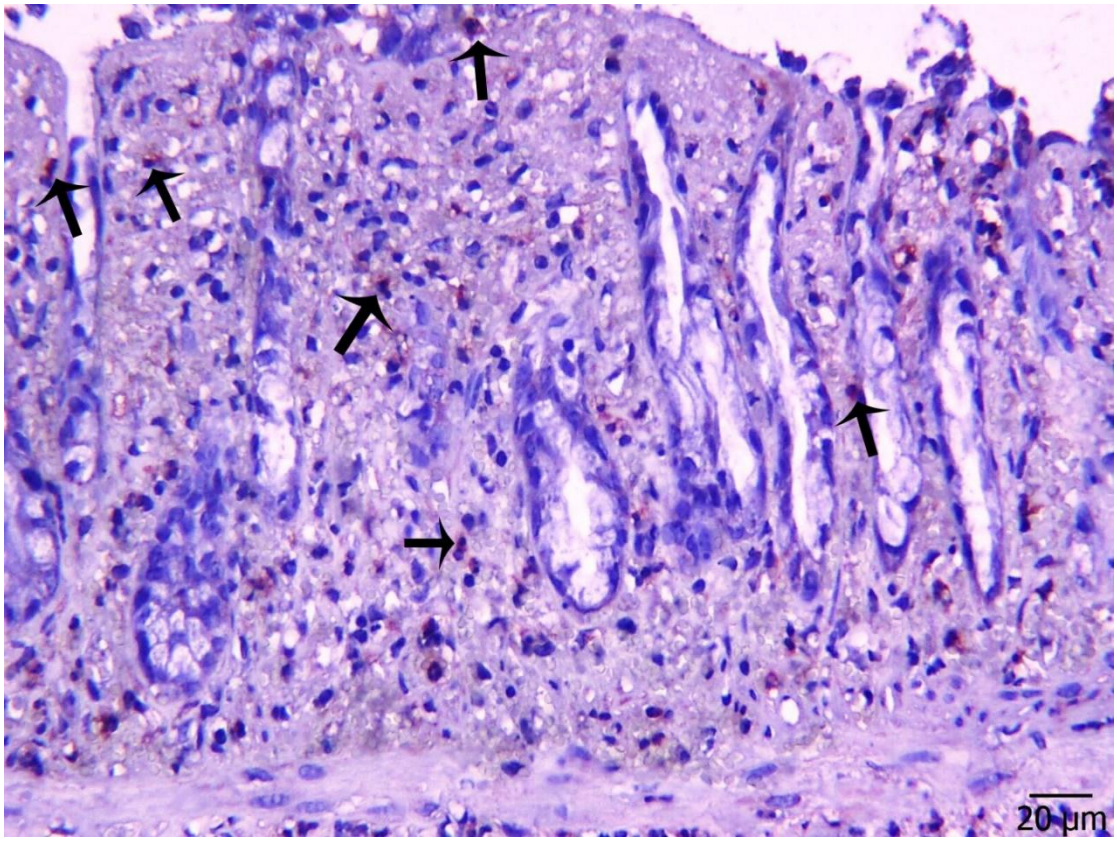
Şekil 16. Gruplara ait $CD5^+$ hücre sayımları

2.4. Anti-CD8 boyama bulguları

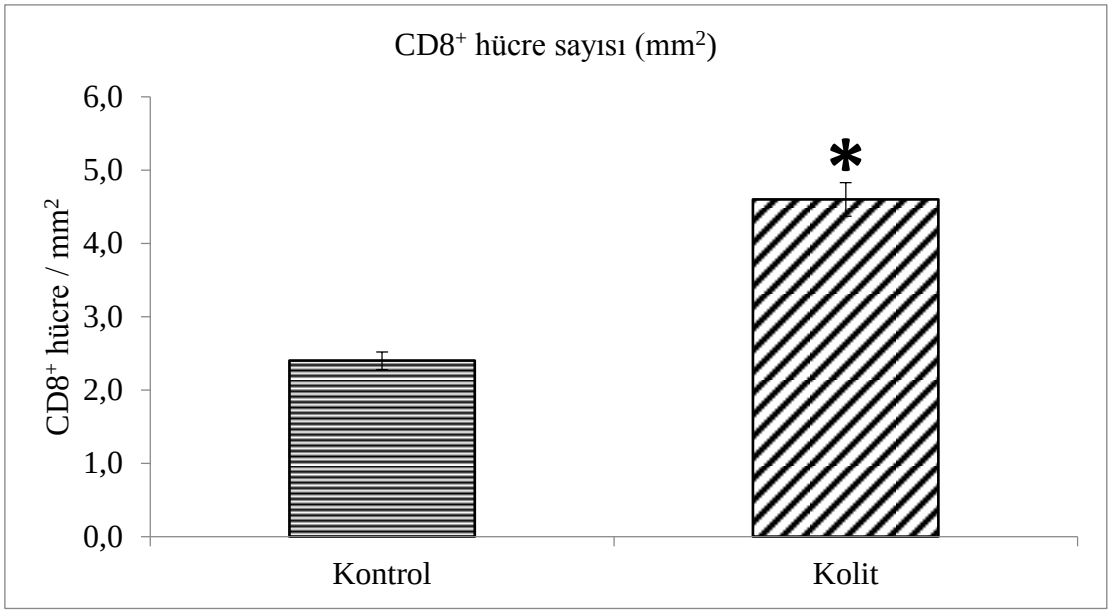
Anti-CD8 ile işaretleme yapılan kolon mukozası kesitleri incelendiğinde, birim alanda işaretlenen hücre sayısı bakımından gruplar arasında anlamlı bir farklılık gözlendi ($p<0.05$). Kontrol grubu $CD8^+$ hücre sayısı ortalaması 2.4±0.9 iken, kolit grubunda 4.6±1.3 olarak bulundu. Kontrol grubu kolon mukozasında, $CD8^+$ hücreler genellikle lamina propriya gevşek bağ dokusunda bulunurken, kolit grubunda inflamatuvar alanlarda, lamina epitelyalisin döküldüğü bölgelerde ve ülserasyon alanlarında yoğun olarak bulunduğu belirlendi. $CD8^+$ hücrelerin işaretlendiği kontrol ve kolit mukozasına ait kesitlerin fotoğrafları Şekil 17 ve 18'de verilmiştir. Gruplara ait $CD8^+$ hücre sayım sonuçları Şekil 19'da sunulmuştur.



Şekil 17. Kontrol grubuna ait Anti-CD8 boyanması (oklar; lamina propriyada $CD8^+$ hücreler, İmmünperoksidaz, Hematoksilen zıt boyaması)



Şekil 18. Kolit grubuna ait Anti-CD8 boyanması (oklar; ülserasyon alanları ve bağ doku içerisinde $CD8^+$ hücreler, İmmünperoksidaz, Hematoksilen zıt boyaması)

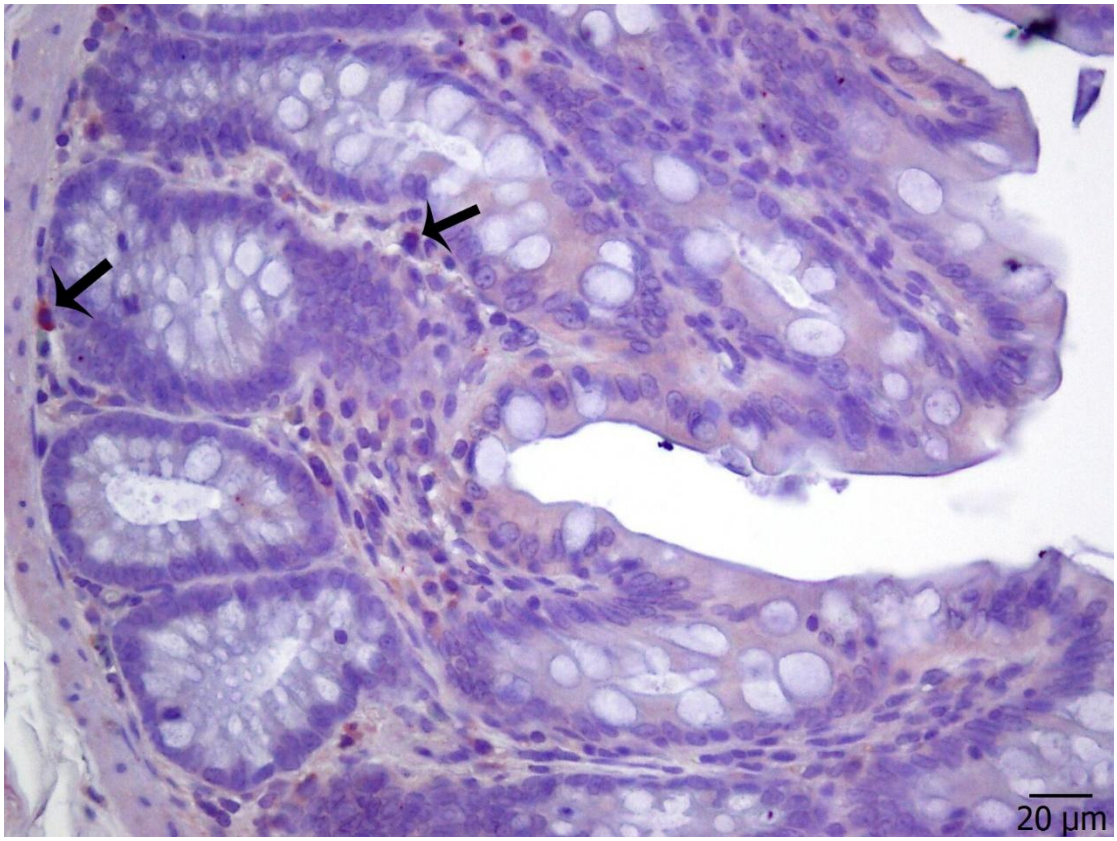


*p<0.05; Kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı

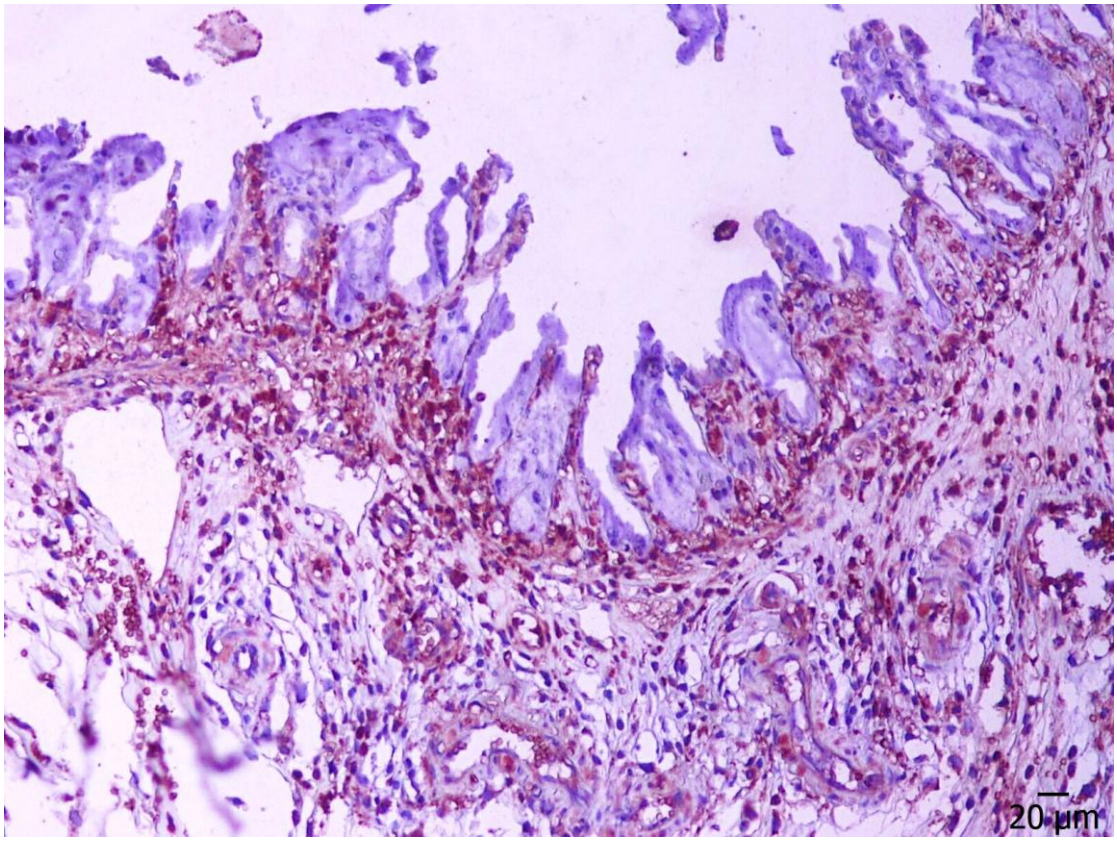
Şekil 19. Gruplara ait $CD8^+$ hücre sayımları

2.5. Anti-CD11b (CD18) boyama bulguları

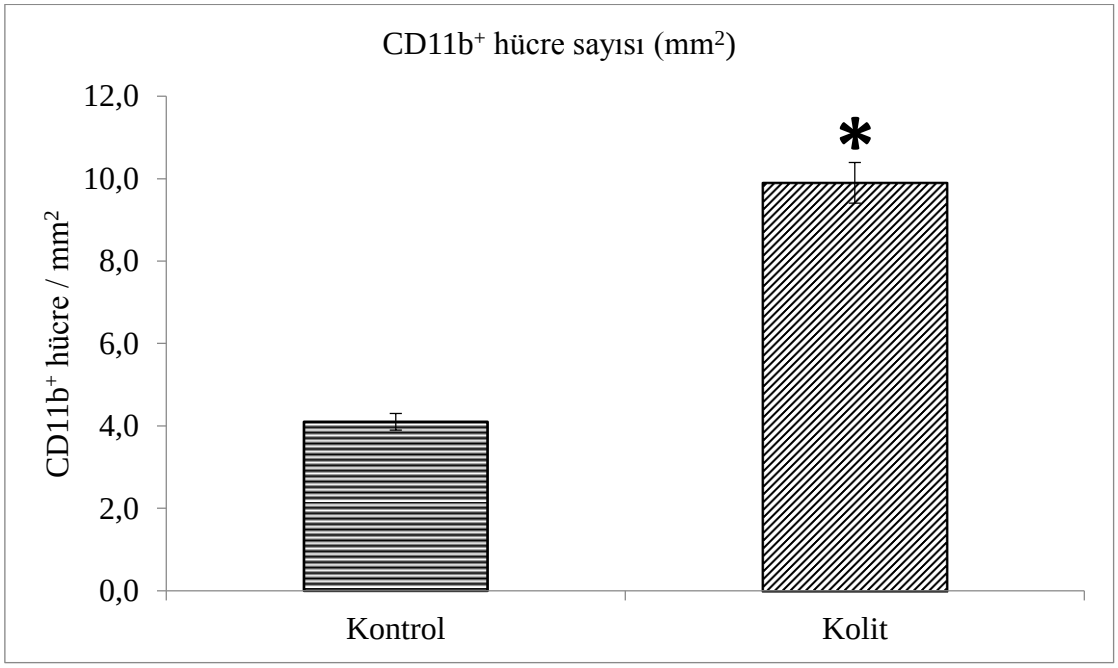
$CD11b^+$ hücrelerin immünohistokimyasal olarak işaretlendiği kontrol ve kolit grubu kolon kesitlerine ait sonuçlar Şekil 20 ve 21'de verilmiştir. Gruplara ait $CD11b^+$ hücre boyanması yoğunluğu incelendiğinde, kolit grubunda kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir artış olduğu gözlenmiştir ($p<0.05$). Pozitif boyanan hücrelerin dağılımı incelendiğinde kolit grubunda; inflamasyon alanları, ülserasyon alanları ve lamina epitelyalisin hasarlı olduğu bölgelere yakın yerlerde submukozaya taşar tarzda yoğun boyanma gözlemlenmiştir. Kontrol grubunda ise, lamina propriyanın gevşek bağ dokusunda seyrek olarak yerleştiği görülmüştür. Birim alandaki $CD11b^+$ hücrelerin sayısı, kontrol; 4.1±1.2, kolit; 9.9±1.9 olarak hesaplanmıştır (Şekil 22).



Şekil 20. Kontrol grubu Anti-CD11b boyanması (oklar; lamina propriyada $CD11b^{+}$ boyanan hücreler, İmmünperoksidaz, Hematoksilen zıt boyaması)



Şekil 21. Kolit grubu Anti-CD11b boyanması (İmmünperoksidaz, Hematoksilen zıt boyaması)

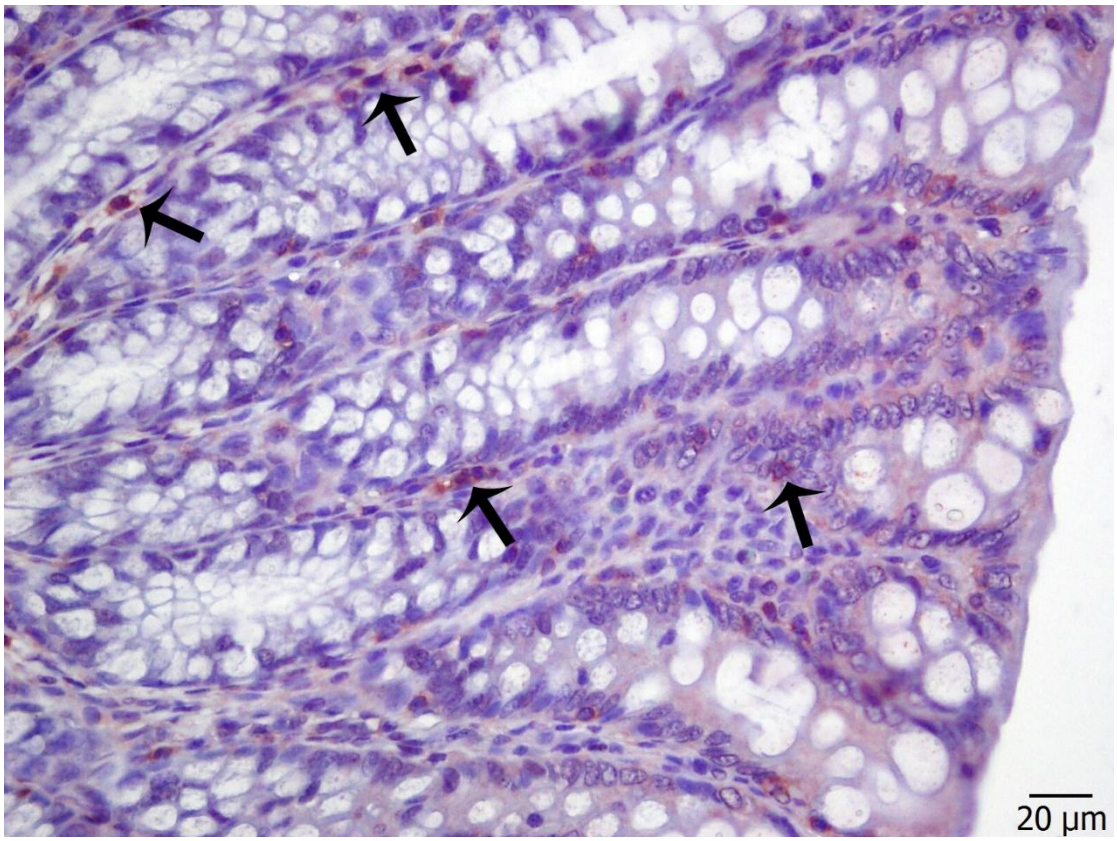


*p<0.05; Kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı

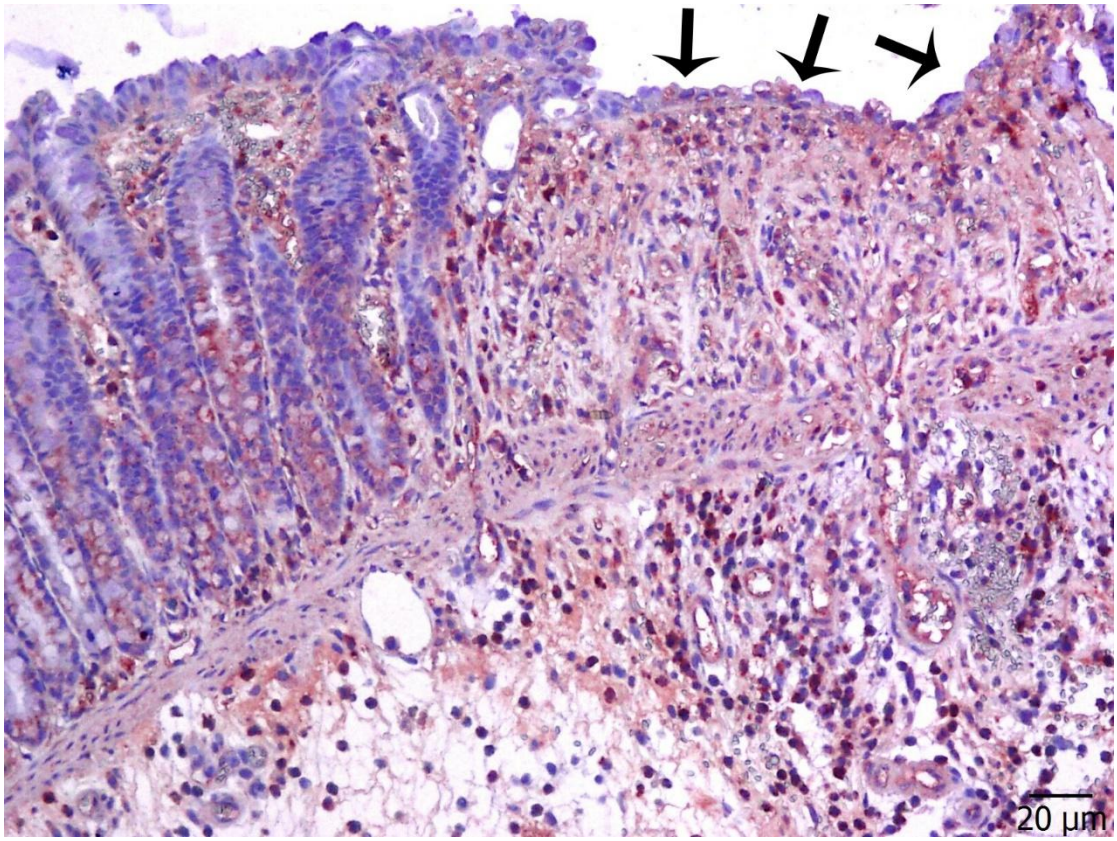
Şekil 22. Gruplara ait $CD11b^+$ hücre sayımları

2.6.Anti-CD45 boyama bulguları

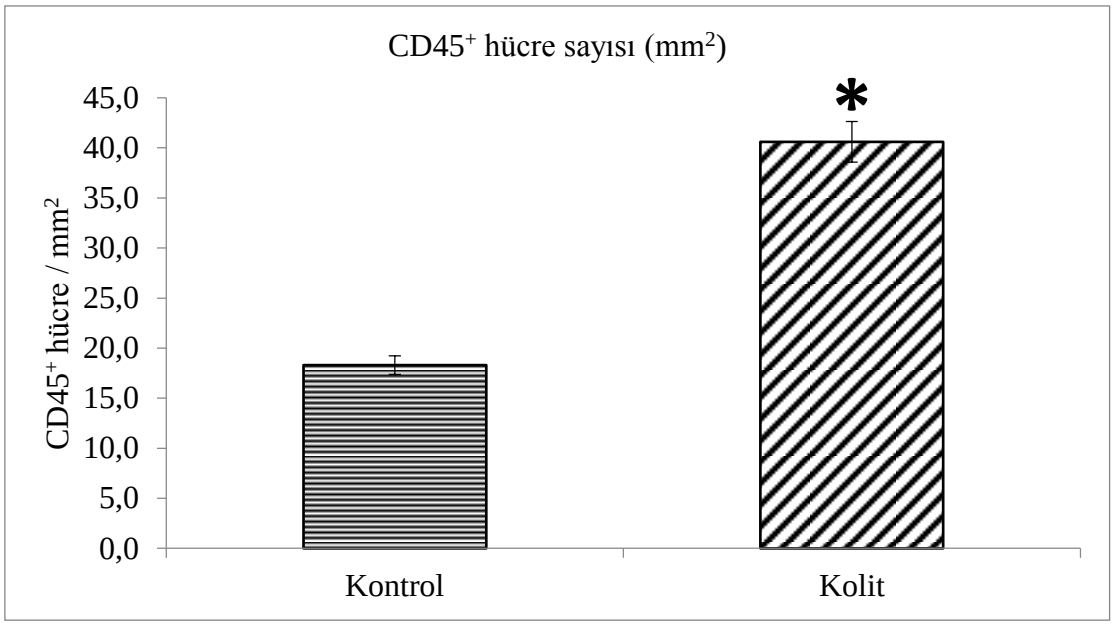
Genel lökosit antijeni olan CD45 (Protein Tirozin Fosfat, Reseptör Tip C, PTPRC)'in işaretlendiği kontrol ve kolon grubuna ait sonuçlar Şekil 23 ve 24'de verilmiştir. Kontrol grubuna kıyasla kolit grubunda hem mukoza hem de submukozada $CD45^+$ hücrelerin sayıca artmış olduğu gözlenmiştir. Kolit grubu mukozasında 1 mm^2'lik alanda $CD45^+$ hücre sayısı ortalama 18.3±3.9 bulunurken, kolit grubunda 40.6±5.3 olarak bulunmuştur (Şekil 25). Bu artış istatistiksel olarak da anlamlı bulundu ($p<0.05$). Kontrol grubunda mukozada, lamina propriyanın gevşek bağ dokusunda yerleşirken, kolit grubunda inflamasyon alanları, kanama bölgeleri ve yüzey epitelinin hasarlı olduğu bölgelerde tutulumlarının yüksek olduğu görülmüştür. Ayrıca kolit gurubu kolon submukozasında da $CD45^+$ hücrelerin artmış olduğu görüldü.



Şekil 23. Kontrol grubu Anti-CD45 boyanması (oklar; lamina propriyada ve intraepitelyal konumda yerleşim gösteren $CD45^+$ hücreler, İmmünperoksidaz, Hematoksilen zıt boyaması)



Şekil 24. Kolit grubu Anti-CD45 boyanması; mukoza ve submukozada bol miktarda $CD45^+$ hücreler izlenmekte (oklar; ülserasyon ve erozyon alanları, İmmünperoksidaz, Hematoksilen zıt boyaması)

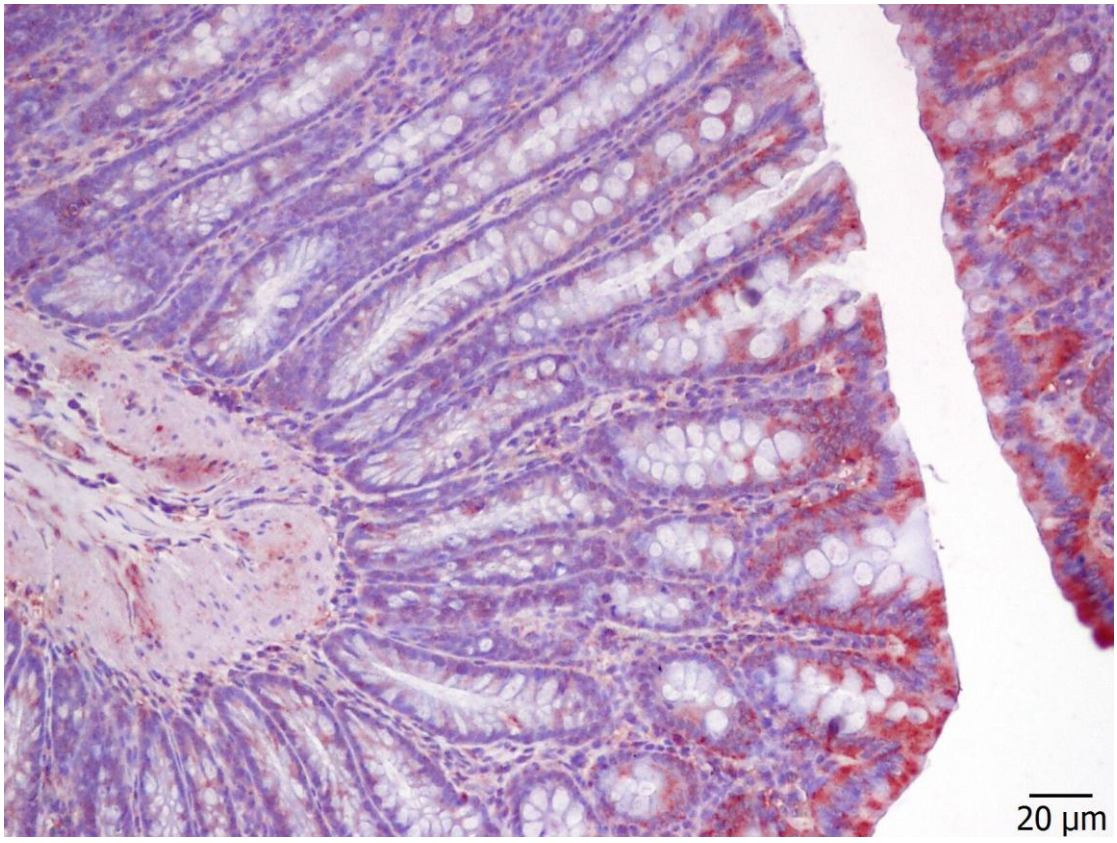


*p<0.05; Kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı

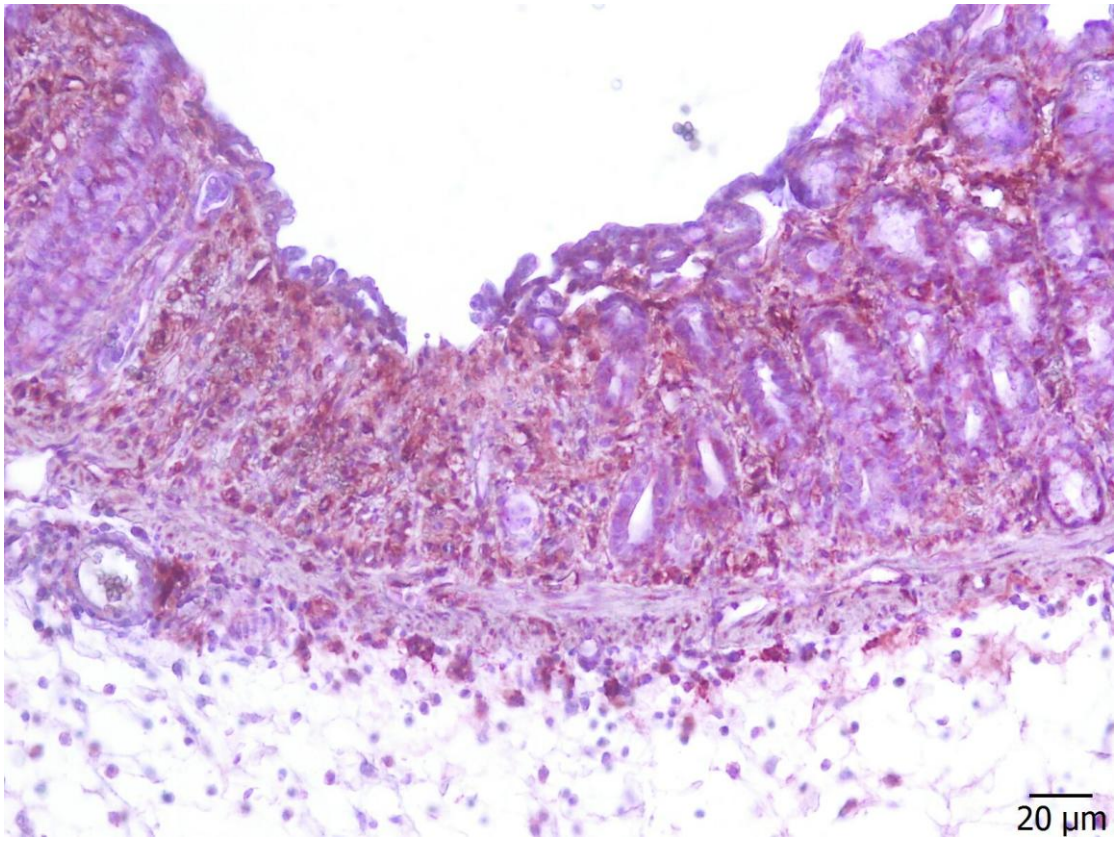
Şekil 25. Gruplara ait $CD45^+$ hücre sayımları

2.7. Anti-TNF-α boyama bulguları

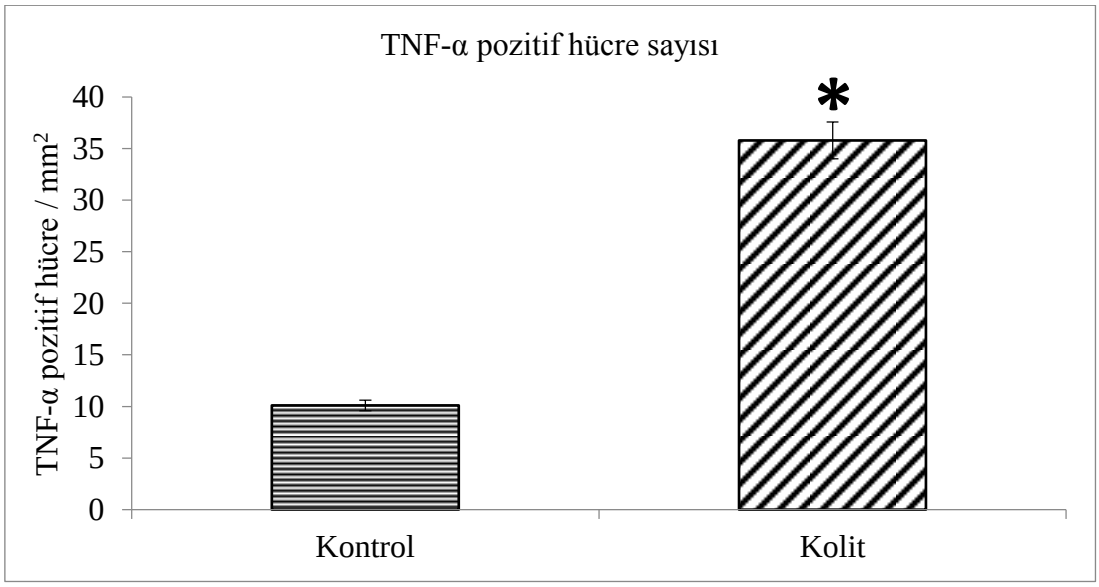
Anti-TNF-α antikoru kullanılarak yapılan immünohistokimyasal işaretleme sonucunda elde edilen fotoğraflar incelendiğinde, kontrol grubunda TNF-α immünreaktivitesinin daha çok mukozada ve yüzey epiteline yakın kısımlarda yoğunlaşmış olduğu görüldü (Şekil 26). Kolit grubunda ise özellikle mukozada inflamasyon alanlarında boyanma yoğunluğunun yüksek olduğu izlenmiştir (Şekil 27). Yapılan analizlerde kontrol grubu TNF- α pozitif hücre yoğunluğu 10.1±3.5 (mm^2) olarak bulunurken, kolit grubunda bu değer 35.8±8.6 olarak bulunmuştur (Şekil 28). Kolit grubu boyanma yoğunluğundaki bu artış istatistiksel olarak da anlamlı bulunmuştur ($p<0.05$).



Şekil 26. Kontrol grubu Anti-TNF-α boyanması; yüzey epiteline yakın alanlarda immünreaktivite izlenmekte (İmmünperoksidaz, Hematoksilen zıt boyaması)



Şekil 27. Kolit grubu mukoza ve submukozasında yoğun olarak izlenen Anti-TNF-α boyanması (İmmünperoksidaz, Hematoksilen zıt boyaması)

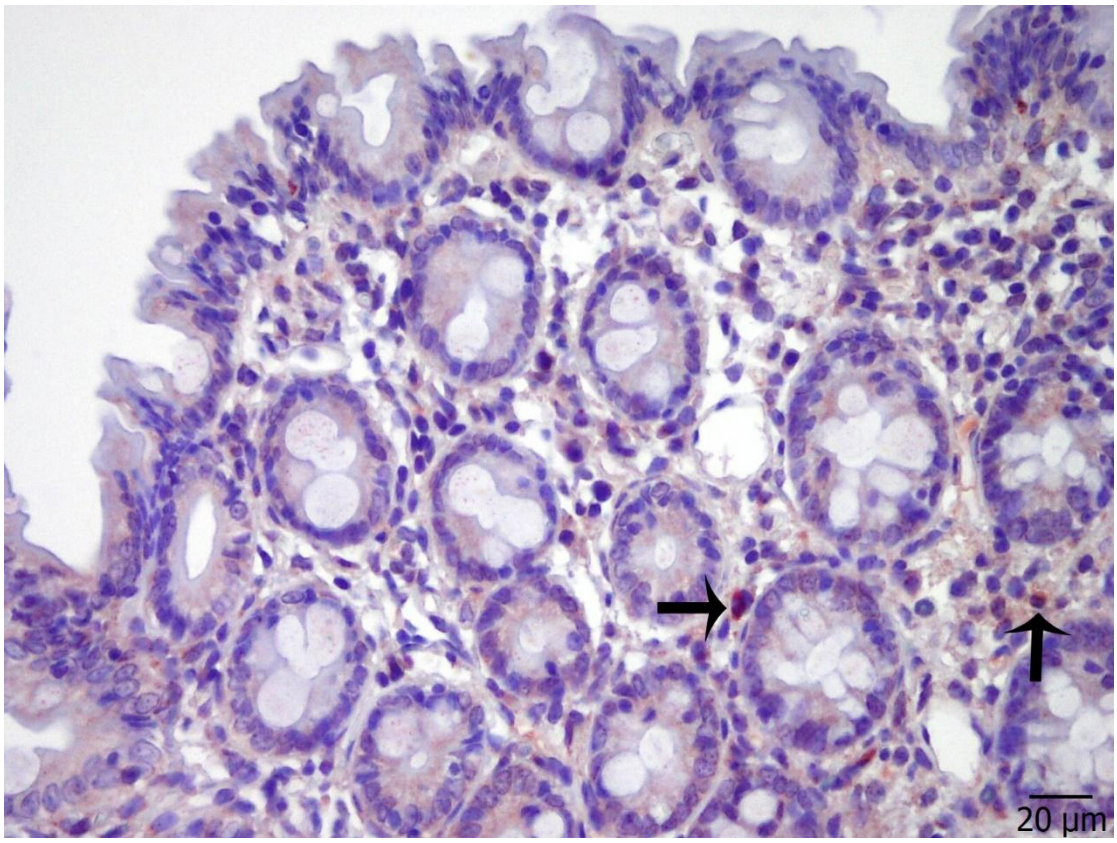


*p<0.05; Kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı

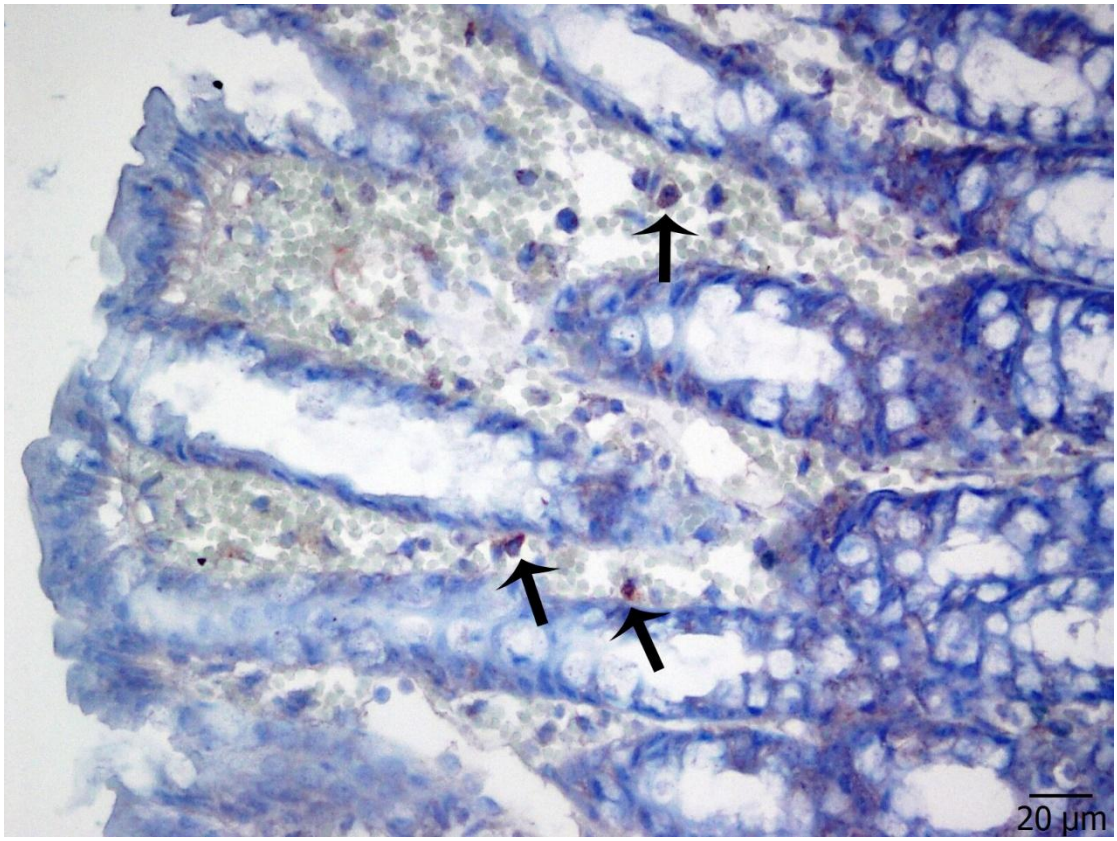
Şekil 28. Gruplara ait TNF-α pozitif hücre sayımları

2.8. Anti IL-17 boyama bulguları

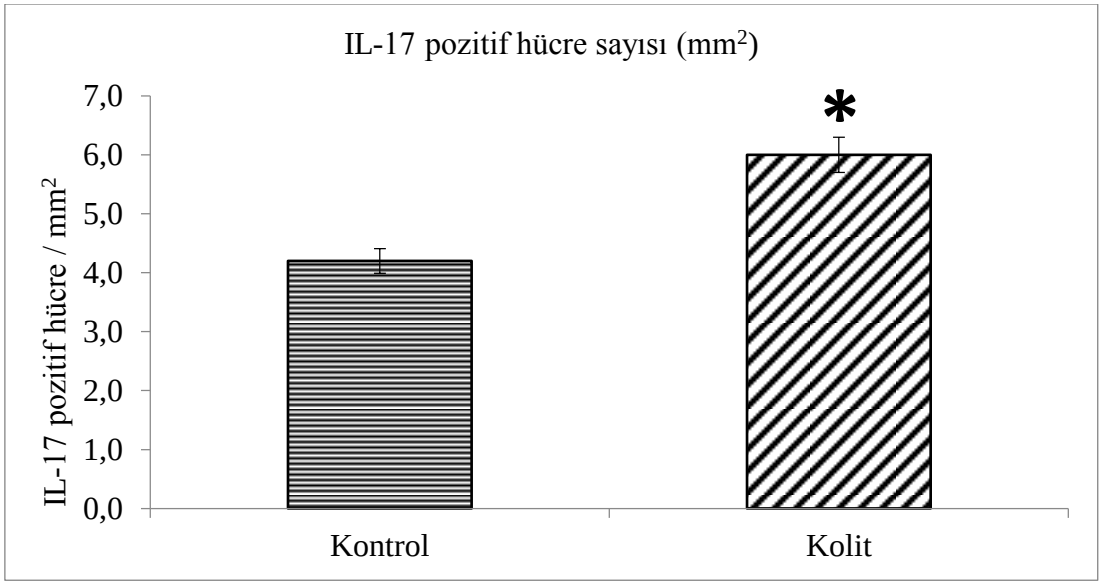
Kontrol ve kolit grubu kolon mukozasında IL-17 ifade eden Th17 hücrelerinin immünohistokimyasal olarak işaretlendiği sonuçlar Şekil 29 ve 30'da verilmiştir. Her iki grubun kolon mukozasında da Th17 hücreler daha çok Lieberkühn kriptleri arasını dolduran gevşek bağ dokusu içerisinde gözlenmiştir. Kontrol grubunda kolon mukozasındaki IL-17 pozitif hücre sayısı mm^2'de ortalama 4.2±1.5 olarak bulunurken, kolit grubunda 6.0±1.8 olarak bulunmuştur (Şekil 31). Kolit grubunda meydana gelen bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0.05$).



Şekil 29. Kontrol grubu Anti-IL-17 boyanması (oklar; lamina propriyada yerleşim gösteren IL-17 pozitif hücreler, İmmünperoksidaz, Hematoksilen zıt boyaması)



Şekil 30. Kolit grubu Anti-IL-17 boyanması (oklar; inflamasyon alanlarında yoğunluğu artan IL-17 pozitif hücreler, İmmünperoksidaz, Hematoksilen zıt boyaması)

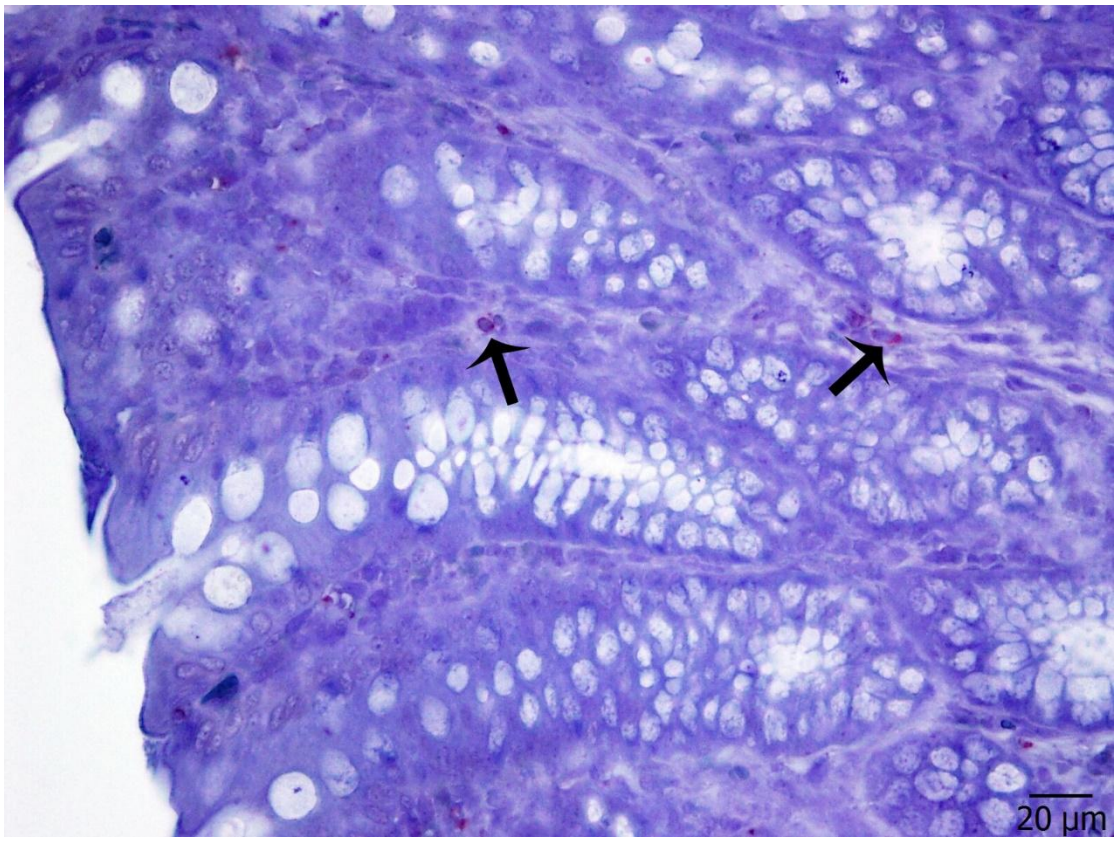


*p<0.05; Kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı

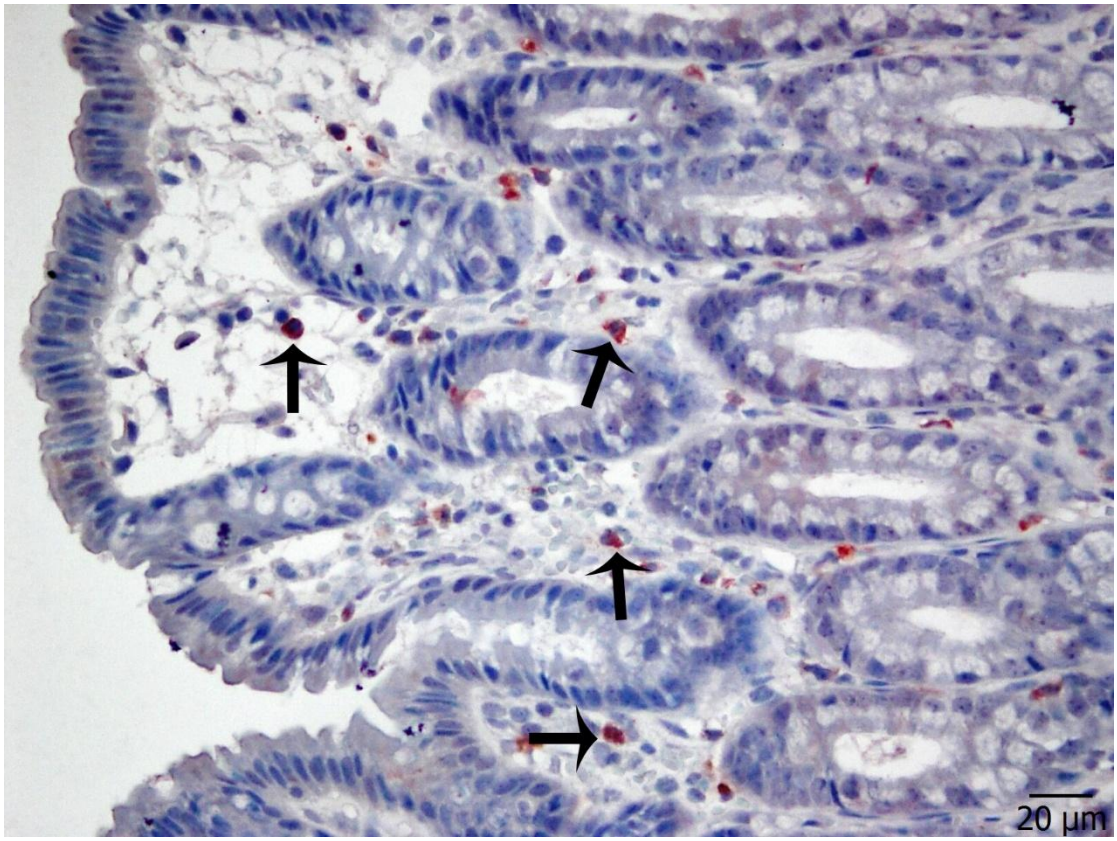
Şekil 31. Gruplara ait IL-17 pozitif hücre sayımları

2.9. Anti-IL-22 boyama bulguları

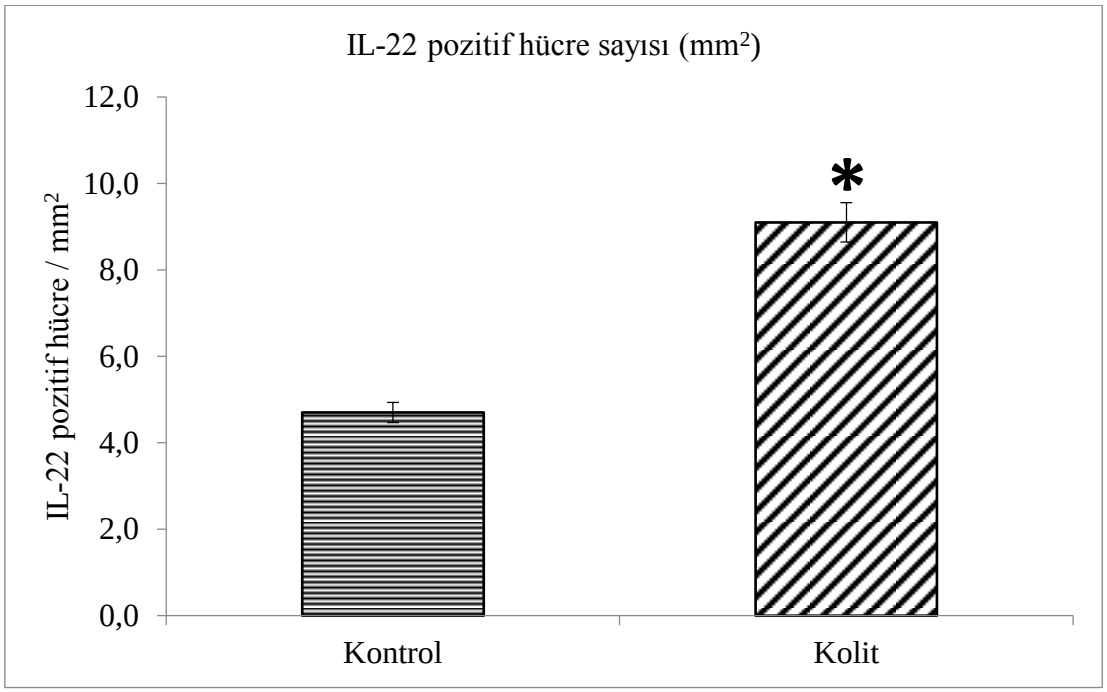
IL-22 ifade eden ve Th22 hücreler olarak isimlendirilen T hücre alt grubunun kolon dokusunda işaretlendiği sonuçlar Şekil 32 ve 33'de verilmiştir. İmmünohistokimyasal olarak gösterilen Th22 hücrelerin kolon mukozasındaki dağılımları incelendiğinde, kontrol ve kolit grubunda benzer olarak lamina propriya gevşek bağ dokusu içerisinde bulundukları gözlenmiştir. Kontrol grubu kolon mukozasında 1 mm^2 alandaki Th22 hücre sayısı ortalama 4.7±1.5 olarak hesaplanırken, kolit grubunda 9.1±2.0 olarak bulunmuştur (Şekil 34). Kolit grubundaki bu artış kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0.05$).



Şekil 32. Kontrol grubu Anti-IL-22 boyanması (oklar; lamina propriyada bağ dokusu içerisinde yerleşim gösteren IL-22 pozitif hücreler, İmmünperoksidaz, Hematoksilen zıt boyaması)



Şekil 33. Kolit grubunda artan Anti-IL-22 boyanması (oklar; IL-22 pozitif hücreler, İmmünperoksidaz, Hematoksilen zıt boyaması)

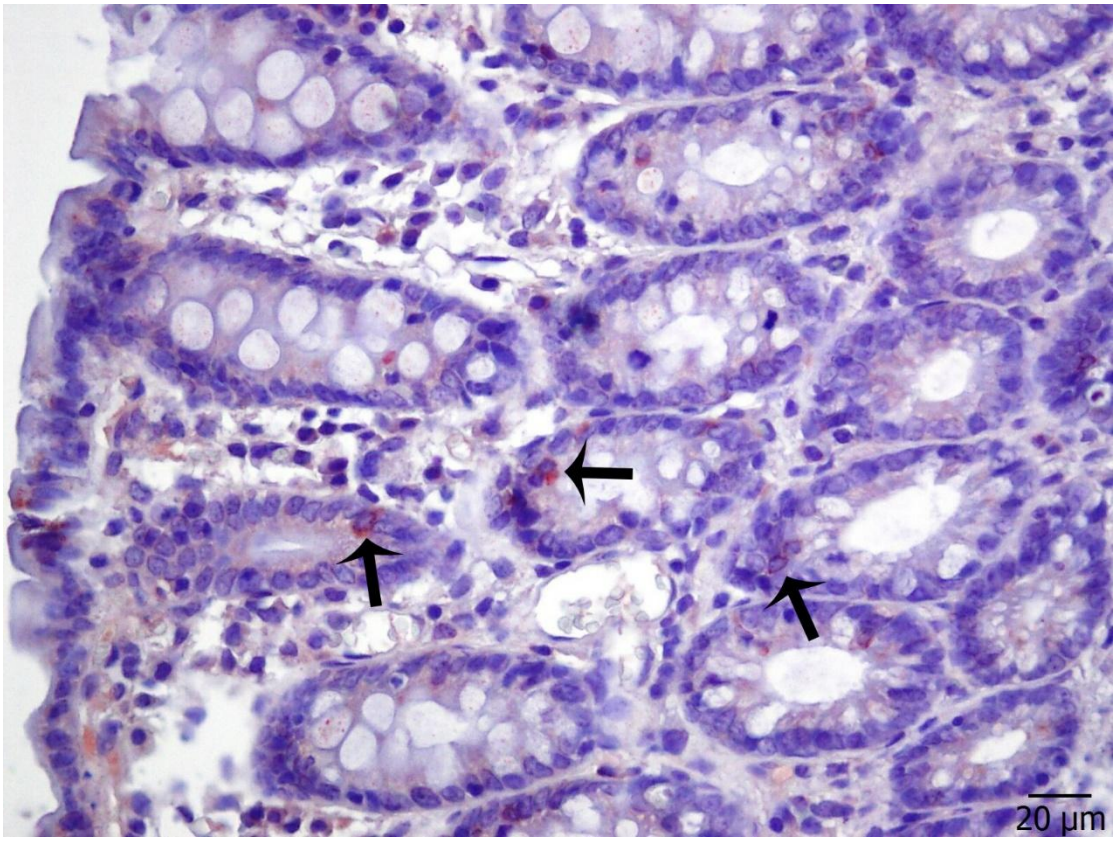


*p<0.05; Kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı

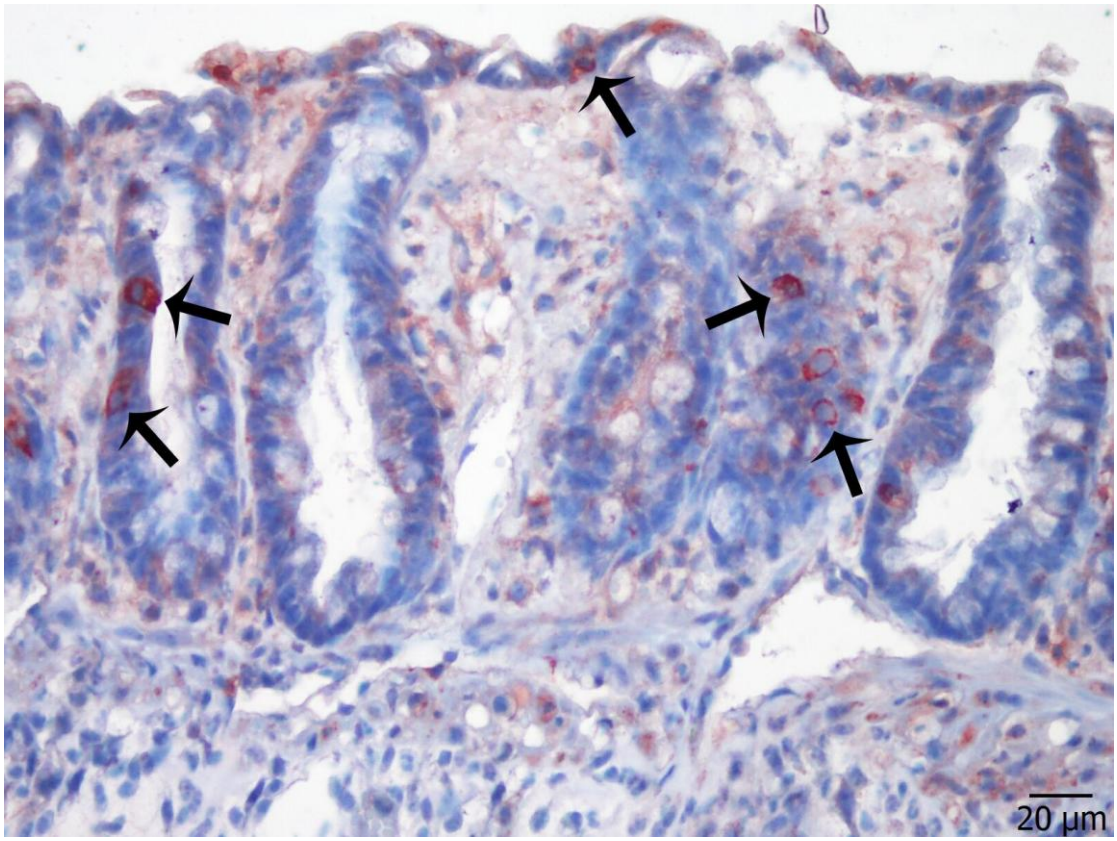
Şekil 34. Gruplara ait IL-22 pozitif hücre sayımları

2.10. Anti-IL-23 boyama bulguları

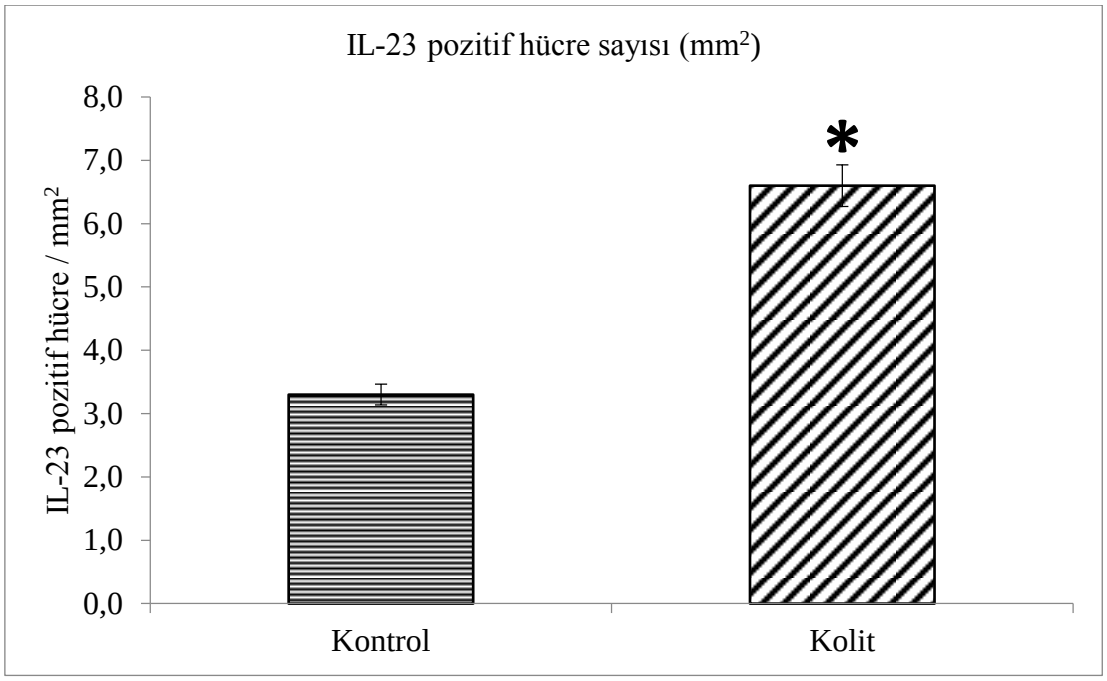
Kontrol ve kolit grubu kolon mukozası kesitlerinde IL-23 ifade eden hücrelerin gösterildiği sonuçlar Şekil 35 ve 36'da verilmiştir. Pozitif boyanan hücrelerin hem kontrol hem de kolit grubu kolon mukozasındaki yerleşimleri incelendiğinde, özellikle bez epiteli ile ilişkili olarak intraepitelyal dağılım gösterdiği gözlemlendi. Mukozada pozitif boyanan hücrelerin sayıları incelendiğinde kontrol grubunda ortalama 3.3±1.2 değerine karşılık kolit grubu kolon dokusu mukozasında mm^2 alanda 6.6±1.5 pozitif hücre sayısı değerine ulaşıldı (Şekil 37). Kolit grubunda meydana gelen bu artış istatistiksel olarak da anlamlı bulundu ($p<0.05$).



Şekil 35. Kontrol grubu Anti-IL-23 boyanması (oklar; intraepitelyal konumlu IL-23 pozitif hücreler, İmmünperoksidaz, Hematoksilen zıt boyaması)



Şekil 36. Kolit grubu Anti-IL-23 boyanması (oklar; yüzey epiteli ve bez epiteli ile ilişkili IL-23 pozitif hücreler, İmmünperoksidaz, Hematoksilen zıt boyaması)



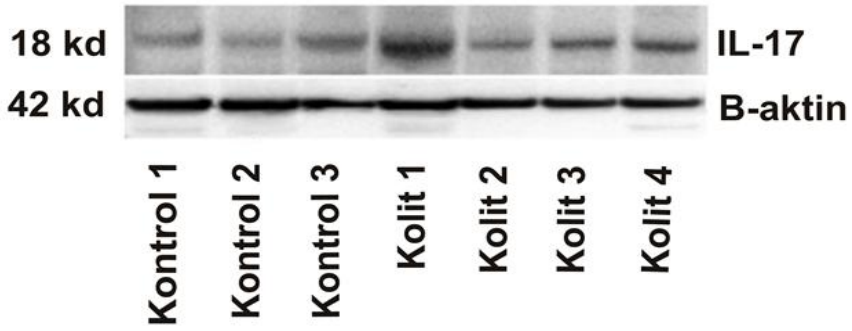
*p<0.05; Kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı

Şekil 37. Gruplara ait IL-23 pozitif hücre boyanma yoğunlukları

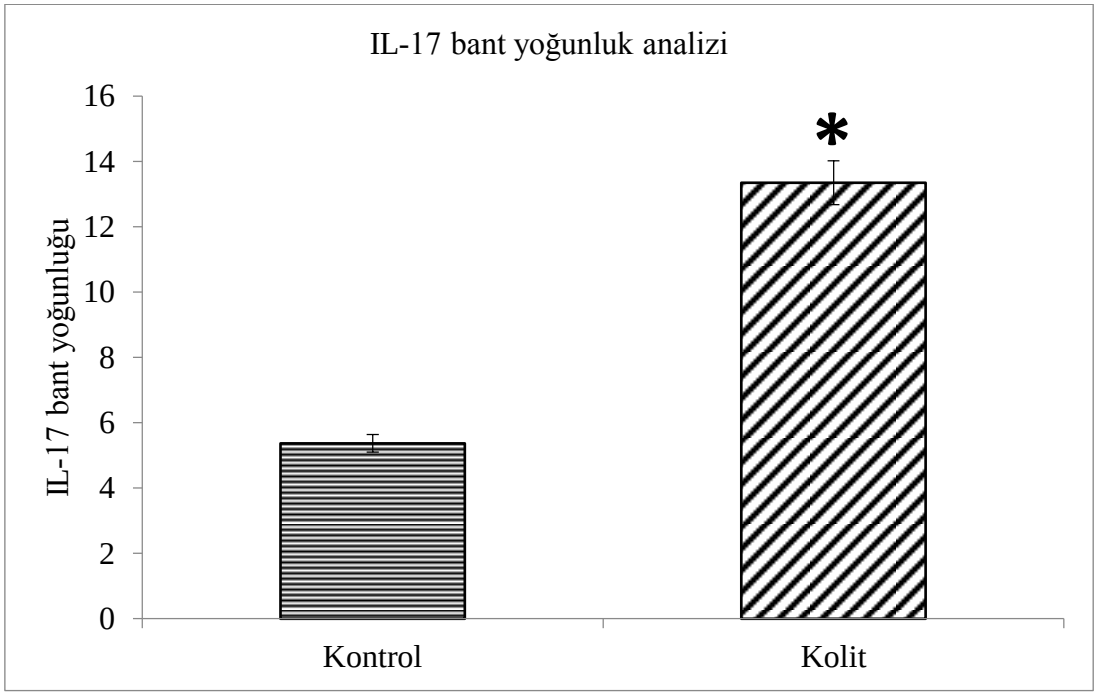
3. Western Blot bulguları

3.1. Anti IL-17 bulguları

Kolon dokusunda IL-17 antikoru ile yapılan Western blot analizinden elde edilen bant görüntüleri Şekil 38'de verilmiştir. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında IL-17'nin kolit grubunda ekspresyonunun arttığı gözlemlendi. Yapılan bant yoğunluğu analizi değerlendirmesinde kolit grubundaki IL-17 ekspresyonundaki artışın kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı yüksek olduğu belirlendi (Şekil 39, $p<0.05$).



Şekil 38. Gruplara ait Western blot analizi IL-17 bantları

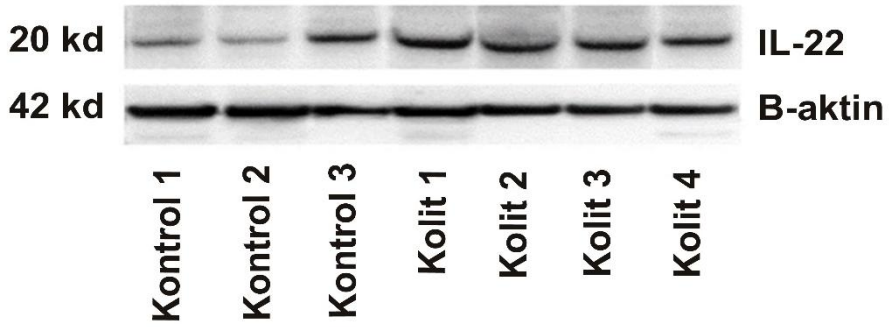


*p<0.05; Kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı

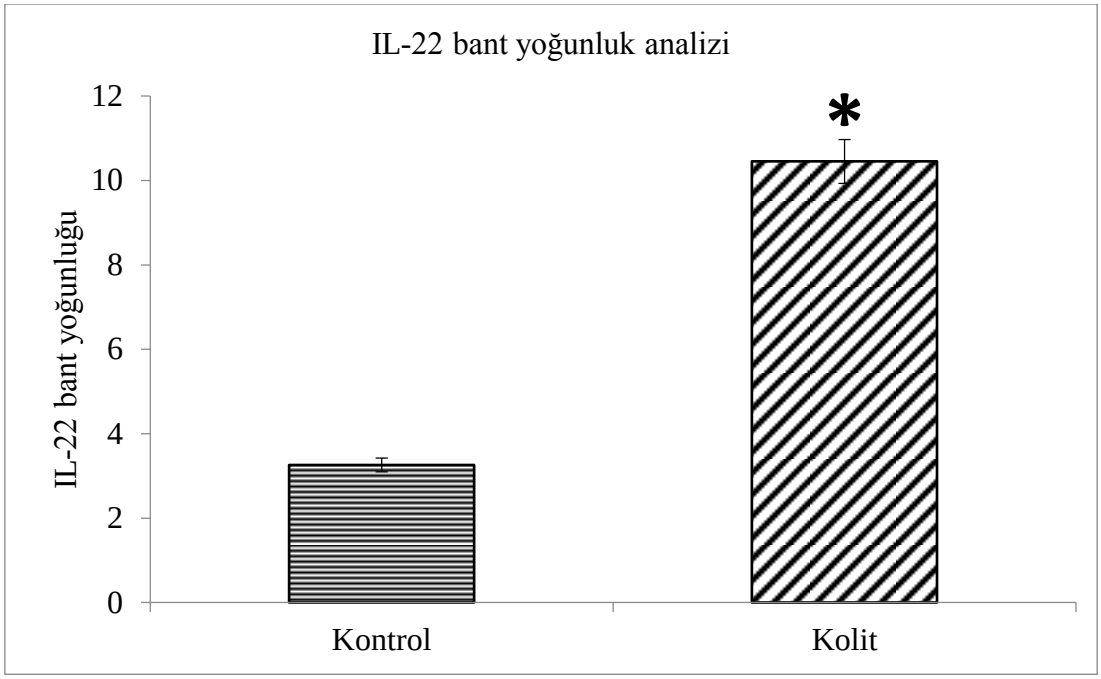
Şekil 39. Gruplara ait IL-17 bant yoğunlukları

3.2. Anti IL-22 bulguları

IL-22' nin kolon dokusunda ekspresyonun incelendiği Western blot analizinden elde edilen bantların görüntüleri Şekil 40'da verilmiş olup, kolit grubunda IL-22'nin ekspresyonunun artmış olduğu gözlenmiştir. Şekil 41'de verilen bant yoğunluk analizi sonuçları incelendiğinde; kolit grubunda, kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir artışın olduğu görülmüştür ($p<0.05$).



Şekil 40. Gruplara ait Western blot analizi IL-22 bantları



*p<0.05; Kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı

Şekil 41. Gruplara ait IL-22 bant yoğunlukları

TARTIŞMA

Kronik inflamatuvar bağırsak hastalıkları olarak bilinen ÜK ve CH, immün sistemin aracılık ettiği ve etiyopatogenezi henüz tam olarak bilinmeyen bağırsak hastalıklarıdır. Moleküler biyolojik tekniklerdeki gelişmelere bağlı olarak doku hasarına sebebiyet verebilen immünolojik aktivasyonların tanımlanması ve karakterize edilmesiyle bu hastalıklara yeni bakış açıları ve biyolojik tedaviler geliştirilmektedir (118).

İnflamatuvar bağırsak hastalıklarının patofizyolojisinde doğal ve adaptif bağışıklık sisteminin regülasyonunun bozulması, inflamasyon aracısı moleküller, bağırsak florası, oksidatif stres gibi birçok faktör rol oynamaktadır. Bu farklı etiyolojik faktörleri incelemek amacıyla, bilimsel araştırmalarda kullanılabilen birçok deneysel model geliştirilmiştir. Kimyasal uyarımlı modeller ve transgenik hayvan modelleri bu amaçla sıkça kullanılmaktadır. Bu deneysel modeller, insan ÜK ve CH'nin biyolojisi ve bu hastalıkların patogenezi hakkında önemli bilgiler sunmaktadır (103,104).

Trinitrobenzen sülfonik asit uyarımlı kolit modeli, hem akut hem de kronik faz insan ÜK'sine benzer özellikler ortaya çıkaran bir modeldir. Bu modelde TNBS, genellikle bağırsak mukoza bariyerini aşmak amaçlı %40-50'lik etanolle birlikte uygulanmaktadır. Otolog proteinlerle etkileşime giren TNBS, antijene spesifik T hücrelerin uyarılmasına yol açmaktadır (109,110,119). Bu çalışmada da, ÜK modeli indükleyicisi olarak TNBS; 25 mg/sıçan dozda, % 50'lik etanolle kombine olarak kullanılmıştır.

Trinitrobenzen sülfonik asit uyarımlı kolit modelinde, insan ÜK'sine benzer olarak vücut ağırlığında değişimler ve kilo kayıpları meydana getirdiği bilinmektedir. Çalışmamızda da önceki çalışmaların sonuçlarına paralel olarak, kolit grubunda kontrol grubuna kıyasla vücut ağırlık ortalamasında anlamlı bir azalmanın olduğu gözlenmiştir ($p<0.05$) (119,120).

Çalışmamızda makroskobik bulgular, McCafferty ve ark. (1994)'nın değerlendirme cetveli kullanılarak incelenmiştir (116). Kolgazi ve ark. (2013) sonuçlarına benzer olarak, kolit grubu makroskobik bulgu değeri çalışmamızda da yüksek bulunmuştur (121). Kontrol grubunda makroskobik hasar gözlenmemesine rağmen, kolit grubunda değerlendirme cetveline göre makroskobik bulgu değeri 6.8±1.5 olarak tespit edilmiş olup bu değer, istatistiksel olarak da kontrole göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur.

Mikroskobik bulguların değerlendirilmesinde H&E ile boyanmış kolon kesitleri kullanılmıştır. Kontrol grubu kolon dokuları incelendiğinde normal histolojik yapıda oldukları gözlenirken, kolit grubunda epitel hücre erozyonu, Goblet hücre kaybı, ülserasyon ve inflamasyon gibi birçok patolojik bulguya rastlanmıştır. İncelemelerde görülen histopatolojik değişiklikler Obermeier ve ark. (1999)'nın skorlama cetveline göre değerlendirilmiştir (117). Çalışmamızda elde edilen mikroskobik bulgu sonuçları, farklı araştırmacılar tarafından yapılan çalışmalarda elde edilen mikroskobik bulgularla ile benzerlik göstermektedir (122, 123). Bizim çalışmamızda, kolit grubunda mikroskobik skor değeri 7.1±0.8 olarak, kontrol grubuna kıyasla anlamlı yüksek bulunmuştur.

Çalışmamızda, T lenfositler ve alt gruplarının immünohistokimyasal işaretlenmesinin yanı sıra, farklı lökosit yüzey molekülleriyle bazı sitokinlerin ekspresyonları da incelenmiştir. İndirekt immünohistokimya tekniği ile işaretlenen kesitlerde pozitif hücrelerin sayımı yapılarak mm^2'de ki hücre sayıları hesaplanmıştır.

T hücre reseptörü (T Cell Receptor; TCR) olarak da bilinen CD3 yüzey molekülü, T lenfositlerin aktivasyonunu sağlar. Olgun T hücreler TCR eksprese ederler (124). Literatürde, artan CD3 ekspresyonunun parenteral Anti-CD3 uygulanmasıyla baskılanması, otoimmün hastalıklar ve deneysel alerjik ensefalomyelit gibi hastalıklara karşı tedavi yaklaşımı olarak yer almaktadır (125). Forster ve ark. (2012) oral Anti-CD3 uygulamasının T hücre uyarımlı kolitte sitokin cevabını değiştirdiği ve ÜK tedavisi için geliştirilebileceğini belirtmiştir (126).

Mukoza bulunan $CD3^+$ hücrelerin yoğunluğu incelendiğinde, kolit grubu bağırsak mukozasında, lamina propriya içerisinde ciddi bir artış meydana geldiği görülmüştür. Kolit

grubunda mukozaya ek olarak, submukoza tabakasında da $CD3^+$ hücrelere sıkça rastlanmıştır. Reinecke ve ark. (2012) TNBS uyarımlı kolit modelinde immünfloresan yöntemle $CD3^+$ hücrelerini işaretledikleri çalışmada; kolit grubu distal kolon dokusunun tüm tabakalarında pozitif hücre infiltrasyonunun kontrole göre yüksek olduğunu belirtmişlerdir (127). Benzer olarak Karaca ve ark. (2015) TNBS uyarımlı kolit modelinde, kolonik $CD3^+$ hücrelerin kontrole kıyasla arttığını göstermişlerdir (119). Çalışmamızda da, kontrol grubuna kıyasla kolit grubunda mukozal $CD3^+$ hücre sayısında istatistiksel olarak anlamlı bir artış kaydedilmiştir ($p<0.05$).

CD5, T hücrelerde ve IgM sentezi yapan B lenfosit alt grubu olan B1 lenfositlerde eksprese edilen bir membran glikoproteinidir (128, 129). Önceki çalışmalarda, CD5'in ekspresyonunun deneysel ÜK modellerinde arttığı gösterilmiştir (119, 130). Çalışmamızda elde edilen Anti-CD5 boyanması bulguları incelendiğinde, önceki çalışmalara benzer olarak artmış CD5 ekspresyonu gözlenmiştir. Bu anlamda terapötik CD5 antagonistleri kullanımı İBH'nın şiddetini azaltmak için yararlı olabilir (128).

Ülseratif kolitte inflamatuvar süreç; nötrofil granülositlerin kolonik lamina propriyaya ekstravasyonunu, lamina propriyada kolonik yüzey epiteline doğru göçünü, kriptlerin histolojik lezyonlarını ve ülserasyonları içerir. Dolaşımdaki lökositlerin inflamasyon alanlarına girişleri lökositler ve endotelyal hücreler arasında karşılıklı birçok adezyon moleküllerinin ekspresyonu ve bir dizi ardışık adezyon süreçler ile sağlanır. Endotel yüzünde eksprese edilen I-CAM ve V-CAM adezyon molekülleri lökositlerde eksprese edilen LFA-1 ve Mac-1 (CD11b) tarafından ligand olarak kullanılır (131). Çalışmamızdan elde ettiğimiz sonuçlara göre CD11b ekspresyonu kolit grubunda kontrole kıyasla önemli derecede artmıştı. Ben ve ark. (2000) ÜK'li hastalardan alınan kolonik biyopsi örneklerinde yaptıkları immünohistokimyasal incelemede, $CD11b^+$ hücrelerin kontrol ve ÜK'li hastalarda mukozada bağırsak kriptlerinin çevresine yakın yerleşimli bulunduklarını göstermişlerdir (132). Bunun aksine Wang ve ark. (2014), DSS ile indükte fare kolit modelinde, lamina propriyada $CD11b^+$ hücrelerin yüzdece azaldığını göstermişleridir (133). Adı geçen çalışmada mezenterik lenf nodları, lamina propriya, intraepitelyal lenfositler ve Payer plaklarındaki $CD11b^+$ hücreler ayrı ayrı sayılarak değerlendirilmiştir. Lamina propriya hariç diğer doku ve alanlarda CD11b ekspresyonunun artmış olduğu bildirilmiştir (133).

$CD8^+$ T hücre alt popülasyonu, intraselüler patojenler ve tümör immünitesinde önemli rol oynar (134,135). Patojenik veya koruyucu olabilen $CD8^+$ T hücrelerinin ortak özelliği,

sitotoksik fonksiyona ek olarak IFN-γ ve TNF-α üretmeleridir. İBH'de ise patojenik oldukları gösterilmiştir (136,137). Sunulan bu çalışmada elde edilen verilere göre; kolit grubu kolon mukozasında, kontrol grubuna kıyasla $CD8^+$ T lenfosit sayısında bir artış gözlenmiştir. Ghavidel ve ark. (2013) sağlıklı ve İBH'ye sahip hastaların kolon biyopsi örneklerinde, $CD8^+$ T lenfositlerin dağılımını inceledikleri çalışmalarında; İBH'ye sahip bireylerde kolonik $CD8^+$ T lenfositlerin sağlıklı bireylere kıyasla anlamlı derecede azaldığını göstermişlerdir (138). Funderburg ve ark. (2013) İBH'ye sahip ve sağlıklı bireylerde serum inflamasyon belirteçleri ile $CD4^+$ ve $CD8^+$ T lenfosit seviyelerini incelemişlerdir. Bu çalışmanın sonuçları incelendiğinde ÜK hastalığına sahip bireylerde periferik kan $CD8^+$ T lenfosit seviyesinin sağlıklı gruba kıyasla yüksek olduğu görülmüştür (139). Liu ve ark. (2008) yaptıkları çalışmada, sulfasalazin ile deneysel kolit modeli oluşturdukları ratlarda, kolonik $CD3^+$, $CD4^+$ ve $CD8^+$ hücreleri incelemişlerdir. Kolonik mukozada $CD8^+$ T lenfositlerin tutulumu kontrole kıyasla yüksek bulunmuştur (140). Sunulan bu çalışmada, kolit grubu kolonik mukoza $CD8^+$ T lenfositlerin kontrol grubuna kıyasla yüksek olması önceki bazı araştırma sonuçları ile uyuşmaz iken (138) diğer bazı araştırmaların sonuçları ile benzer olduğu görülmüştür (119, 140).

CD45 (Protein Tyrosine Phosphatase, Receptor type C; PTCRC) lökosit ortak antijeni olarak bilinen bir transmembran glikoproteindir. Hücre adezyonu, migrasyon, sitokin üretimi ve sinyal iletimi gibi birçok fonksiyonun düzenlenmesinde görev yapar (141). Çalışmamızın immünohistokimyasal CD45 ekspresyon sonuçları incelendiğinde, kolit oluşturulan grubun kolon mukozasında kontrole göre yüksek oranda ifade edildiği görülmüştür. Literatür incelendiğinde, kolit modellerinde CD45 ekspresyonun sonuçlarının aynı yönde olduğu görülmektedir. Tobisawa ve ark. (2010) kolon mukus üretimini inceledikleri kolit modelinde, $CD45^+$ hücrelerin infiltrasyonunun mukozada önemli derece arttığını göstermişlerdir. Bu sonuçlara benzer olarak, Karaca ve ark. (2015) TNBS ile indüklenen kolit modelinde rat kolon mukozasında $CD45^+$ hücrelerin infiltrasyonunun kontrol grubuna göre yüksek düzeyde olduğunu göstermişlerdir (119).

Sitokinler, İBH'de önemli rol oynayan intestinal immün sistemin anahtar sinyal moleküleridir. *İn vivo* ve *in vitro* çalışmalar TNF-α, IL-1β, IL-6, IL-18 gibi proinflamatuvar sitokinlerin seviyesinin İBH'de yükseldiğini ve inflamasyon şiddeti ile bu sitokinlerin seviyelerinin doğru orantılı olduğunu göstermektedir. TNF-α, intestinal epitelyal bariyere direk olarak etki eden proinflamatuvar sitokinlerden biridir (120,142).

Sindirim kanalı, her gün sayısız antijene maruz kalmasına rağmen GALT dokusu bu antijenleri tanımlayarak, normal fizyolojik sınırlar içerisinde ve organizmaya zarar vermeyen düzeyde bir inflamasyon meydana gelmesini sağlar (143,144). Konağın viral, bakteriyel ve parazitik enfeksiyonlara normal cevabında TNF-α önemlidir, fakat yetersiz veya aşırı üretimi konak için zararlı olmaktadır (145).

Yapılan bu çalışmada, kolon TNF-α ekspresyonu incelendiğinde; kolit grubu kolon mukozasında TNF-α immünreaktivitesinin kontrol grubu kolon mukozasına kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir artış olduğu belirlenmiştir ($p<0.05$). Aşırı TNF-α ekspresyonu epitelyal bariyere zarar vermekte, epitel hücrelerinde apoptozisi indüklemekte ve kolonik epitelyal hücrelerden kemokinlerin salgılanmasına sebep olmaktadır (120). Bu literatür bilgisi ile uyumlu olarak çalışmamızda; kolit grubu kolon mukozasında inflamasyon ve ülserasyon alanlarında TNF-α ekspresyonunun daha yoğun olduğu gözlemlendi. Zhou ve ark. (2006) TNBS uyarımlı kolit modelinde kolonik TNF-α ekspresyonunun arttığını göstermişlerdir (146). Sunulan bu çalışmada elde edilen TNF-α bulguları, Zhou ve ark. (2006)'nın elde ettiği sonuçlarla uyumlu olarak; TNF-α ekspresyonunun mukoza katmanında, özellikle lamina propriyada arttığını göstermektedir. Carvalho ve ark. (2007) ile Silva ve ark. (2010) yaptıkları çalışmalarda, TNBS uyarımlı kolit modeli kolonik mukoza dokusunda meydana gelen TNF-α artışını ELISA yöntemi ile de göstermişlerdir (147,148).

İnflamatuvar bağırsak hastalıklarında artmış kolonik TNF- α ekspresyonun azaltılması, hastalığın tedavisinde önemli bir biyolojik yöntem olarak karşımıza çıkmaktadır. Infliximab, Adalimumab, Etanercept, Golimumab gibi TNF-α inhibitörleri, İBH'nin tedavisinde etkin olarak kullanılmaktadır (149). İBH'nın tedavisinde daha efektif ve daha az yan etkileri olan TNF-α inhibitörü ajanlar deneysel modellerde geliştirilmeye devam etmektedir (119,120, 150,151).

Sitokin aracılı sinyalizasyon ve T hücre reseptörü (TCR)'nün aktivasyonu ile naive $CD4^+$ T lenfositler, çeşitli mikroorganizmalara karşı immün cevabın düzenlenmesinde önemli rollere sahip; Th1, Th2, Th17 ve T-regülatör (Treg) hücreler olmak üzere en az 4 farklı majör T-helper (Th) hücre tipine farklılaşır (86). Ürettikleri sitokin profiline göre sınıflandırılan bu T hücrelerden Th1 alt grubu yüksek seviyede IFN-γ üretirken, Th2; IL-4, IL-5 ve IL-13 gibi sitokinleri üretir. Th17 alt grubu ise yüksek seviyede IL-17 ekspresyonunun yanı sıra IL-21, IL-22 ve TNF-α üretir (86,90).

Sunulan bu çalışmada, kontrol ve kolon mukozasında $CD4^+$ T lenfositler anti-CD4 antikoru kullanılarak işaretlenmiştir. Kontrol grubuna kıyasla, kolit grubu kolon mukozasında $CD4^+$ T lenfositlerin sayısı daha yüksek bulunmuştur. Carvalho ve ark. (2007), 20 mg/sıçan dozda TNBS kullanarak oluşturdukları rat kolit modelinde, kolon dokusunda $CD4^+$ hücreleri immünohistokimyasal olarak göstermişlerdir. Bu çalışmada, kolit grubu kolon mukozasında $CD4^+$ hücre sayısı, kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı olmayan bir artış gösterirken (148), bizim çalışmamızda kolit grubu kolon mukozasında $CD4^+$ hücreler kontrol grubuna kıyasla yüksek bulunmuştur. Bahsedilen çalışmadan farklı olarak, kolit grubu kolon mukozasında artan $CD4^+$ hücre sayısı istatistiksel olarak anlamlı bir artış göstermiştir ($p<0.05$). Funderburg ve ark. (2013), İBH'ye sahip hastalarda kontrol grubuna kıyasla periferik kanda yüksek miktarda $CD4^+$ T lenfosit bulunduğunu göstermişlerdir (139).

T helper 17 hücreler, yeni keşfedilen bir T hücre alt grubudur. Bu alt grup, yüksek oranda IL-17 eksprese ettiği için Th17 olarak isimlendirilmiştir. IL-17'nin yanı sıra IL-21 ve IL-22'yi de eksprese ederler. Gelişim ve çoğalma aşamalarında spesifik sitokinler ve transkripsiyon faktörlerinin görev yaptığı bu T lenfosit alt grubunun stabilizasyonu, IL-23 ile sağlanır (87,90). IL-17, proinflamatuvar sitokinler (TNF-α, IL-6), kemokinler ve matriks metalloproteazların ekspresyonlarını indükleyerek doku hasarına sebep olabilmektedir (152).

İnterlökin-17 knock-out farelerde yapılan bir çalışmada, hayvanların akciğer bakteriyel enfeksiyonlarına karşı, akciğerde azalan nötrofil akümülasyonundan dolayı çok hassas hale geldikleri gösterilmiştir. IL-17 aşırı ekspresyonu ise kemokinlerin eksprese olmasını uyararak, akciğerde yüksek miktarda lökosit infiltrasyonu sağlayarak inflamasyona sebep olmaktadır (153).

Fujino ve ark. (2003) İBH'ye sahip kişilerin kolon mukozasında, IL-17 üreten Th17 hücrelerin sağlıklı kişilere göre artmış olduğunu göstermiştir (154). Jiang ve ark. (2014) ÜK'li hastaların kolon biyopsi örneklerinde IL-17 ile IL-17 ilişkili IL-21 ve IL-22 ekspresyonlarının kontrol grubuna göre artmış olduğunu bildirmişlerdir (155). Zhang ve ark. (2014) yaptıkları TNBS uyarımlı kolit modelinde, IL-17 ekspresyonunun arttığını immünohistokimyasal olarak göstermişlerdir (156). Sunulan çalışmada da, kolit grubu kolon mukozasında artmış miktarda IL-17 pozitif boyanan hücreler aynı yöntemle gösterilmiştir. IL-17R (IL-17 reseptör) knock-out farelerde yapılan deneysel kolit modellerinde, inflamasyon gelişmemesi de IL-17R'nin ÜK'de meydana gelen inflamasyondaki önemini ortaya çıkarmaktadır. Farklı immünmodülatör ajanlar kullanılarak yapılan deneysel hayvan modellerinde, artmış IL-17

ekspresyonunun baskılanmaya çalışıldığı araştırmalar literatürde yer almaktadır. Yun ve ark. (2015) DSS ile oluşturdukları deneysel fare kolit modelinde, resveratrolün mukozal IL-10, IL-6 ve IL-17 sitokinlerin üretimini baskılayarak ÜK'yi tedavi edici etkisini göstermişlerdir (157).

Çalışmamızda, kolon dokusunda IL-17 ekspresyonu, immünohistokimyasal metoda ek olarak Western blot yöntemi ile de incelenmiştir. Kolit grubu kolon dokusundaki IL-17 ekspresyonunun kontrol grubuna kıyasla daha yüksek olduğu gösterilmiştir. Benzer olarak He ve ark. (2012), TNBS uyarımlı deneysel kolit modelinde, kolonda IL-17 ekspresyonunun arttığını göstermişlerdir (158). ÜK hastalığına sahip kişilerde yapılan genetik çalışmalarda, IL-17 ve ilişkili genlerde bulunan polimorfizmler, Th17 yolağının ÜK gelişimindeki rolünü desteklemektedir (159).

T helper 17 hücrelere ek olarak, doğal bağışıklık hücrelerinde de eksprese edilen IL-22; IL-10 sitokin ailesine ait bir sitokindir (102). Leung ve ark. (2014) ÜK'li hastaların kolon biyopsilerinde yaptıkları incelemede, mukozal Th22 hücrelerin sayısının kontrole göre azaldığını göstermişlerdir (160). ÜK hastalarında mukozal IL-22 ve ilişkili proteinleri inceleyen Lian-Zhen ve ark. (2013), kronik hastalarda mukozal IL-22 ekspresyonunun kontrole kıyasla yüksek olduğunu immünohistokimyasal olarak göstermişlerdir (161). Çalışmamızda elde ettiğimiz verilere göre kolit grubu kolon mukozasında IL-22 artış göstermiştir. Artan IL-22 ekspresyonu çalışmamızda hem immünohistokimyasal hem de Western blot yöntemleriyle gösterilmiştir.

İnterlökin-22'nin İBH'deki rollerine bakıldığında, subepitelyal dokuda proinflamatuvar sitokinlerin ve matriks yıkım proteinlerinin ekspresyonunu artırarak proinflamatuvar rol; Goblet hücrelerinden mukus üretimi ve epitel hücrelerden antimikrobiyal RegIII ile MUC1 proteinlerinin ekspresyonunu artırarak koruyucu rol oynamaktadır (162, 163). Bu çift taraflı fonksiyonları yüzünden, literatürde IL-22 için "iki başlı sitokin" ve "kurt kılığında koyun" gibi ifadeler kullanılmıştır (164,165).

İnterlökin-23 heterodimerik proteini IL-12p40 ve IL-23 spesifik p19 alt birimlerinden meydana gelir (166). IL-23 aktifleşmiş makrofajlar ve dendritik hücrelerde eksprese edilmektedir (167). Yapılan bu çalışmada elde edilen IL-23 immünohistokimyasal bulguları incelendiğinde, IL-23 pozitif hücrelerin hem kontrol hem de kolit grubu kolon mukozasında çoğunlukla intraepitelyal yerleşimli hücreler oldukları gözlenmiştir. IL-23 pozitif boyanan

hücrelerin yerleşimleri dikkate alındığında, literatürle uyumlu olarak çoğunlukla dendritik hücreler oldukları söylenebilir. McKenzie ve ark. (2006) Th17 hücrelerin çoğalması ve stabilizasyonu için IL-23 gerekli olduğunu bildirmişlerdir (168).

İnterlökin-23, İBH'de majör proinflamatuvar role sahiptir (90). Yen ve ark. (2006) ile Hue ve ark. (2006), IL-23'ün İBH gelişimi için gerekli olduğunu deneysel modellerde göstermişlerdir (100, 169). ÜK hastalarında artmış IL-23 ekspresyonu Lian-Zhen ve ark. (2013) tarafından gösterilmiştir (161). Zhang ve ark. (2009) oksazolon uyarımlı deneysel kolit modelinde, serum IL-23 seviyesinin arttığını belirtmişlerdir (170). Literatürde yer alan sonuçlara paralel olarak, çalışmamızda da, kolit grubunda kolonik IL-23 ekspresyonu seviyesi kontrol grubuna kıyasla yüksek bulunmuştur. Sunulan bu çalışmada elde edilen bulgular, Lian-Zhen ve ark. (2013)'nın bulgularına benzer olarak, hem IL-17 hem de IL-23 ekspresyonun kolit grubu kolon mukozasında yüksek olduğunu göstermektedir.

Hue ve ark. (2006), IL-23 eksikliğinde TNF-α, IFN-γ ve IL-6 kolonik proinflamatuvar sitokinlerin seviyesinin azaldığını bildirmişlerdir (169). Bu sonuca uygun olarak oluşturduğumuz deneysel modelde, artan IL-23 ekspresyonu ile beraber kolonik mukoza TNF-α ekspresyonunda da artış meydana gelmiştir.

Bu çalışmada, mevcut çalışmalardan farklı olarak yeni T hücre alt grupları Th17 ve Th22'nin TNBS uyarımlı deneysel kolit modelindeki aktivasyonları hem doğal bağışıklık hücreleri hem de adaptif bağışıklık hücrelerinin aktivsyonları ile kıyaslanarak incelenmesi bakımından ilk olma özelliği taşımaktadır. Bu ilişkinin aydınlatılabilmesi için farklı araştırma metotları kullanılarak yapılacak ileri çalışmalara ihtiyaç bulunmaktadır.

SONUÇLAR

Dünya çapında milyonlarca insanı etkileyen İBH, intestinal mukozanın kontrolsüz ve kronik inflamasyonu ile karakterizedir. Etiyolojisi ve patofizyolojisi henüz tam olarak açıklanamayan ÜK'de, immün sistem disfonksiyonu önemli rol oynar. Bu çalışmada, deneysel ÜK modeli kolon mukozasında meydana gelen immünaktivasyonlar ve bazı inflamasyon mediyatörlerinin incelenmesi amaçlanmıştır.

İntrarektal yoldan 25 mg/sıçan dozda uygulanan TNBS uyarımlı sıçan kolit modelinde, 15. günde sakrifiye edilen deneklerin kolon dokularında makroskobik ve mikroskobik değerlendirmeler yapıldı. Kolon dokusunda farklı antikorlar kullanılarak immün sistem hücrelerinin dağılımları immünohistokimyasal olarak incelendi. IL-17 ve IL-22 sitokinlerinin kolon dokusundaki ekspresyonları Western blot yöntemiyle de incelendi. Buna göre;

1. Kolit grubu deneklerin canlı vücut ağırlıklarında deney başlangıcına kıyasla deney sonunda anlamlı bir azalmanın olduğu belirlendi (İlk ağırlık 240±13, Son ağırlık; 208±35, $p<0.05$).
2. Kolit grubunda kolon dokusu ağırlığının (g/8 cm) deney başlangıcına kıyasla anlamlı derecede artmış olduğu belirlendi (Kontrol; 0.72±0.03, Kolit; 1.61±0.12, $p<0.05$)
3. Makroskobik hasar bulguları skorunun, kolit grubunda kontrol grubuna göre yüksek olduğu belirlendi (Kontrol; 0, Kolit; 6.8±1.5, $p<0.05$).
4. Yapılan mikroskobik değerlendirmelerden elde edilen hasar bulguları skoru kolit grubunda, kontrol grubuna göre yüksek bulunmuştur (Kontrol; 0, Kolit; 7.1±0.8, $p<0.05$).

5. $CD3^+$ T lenfosit hücre yoğunluğunun, kolit grubu kolon mukozasında kontrol grubuna göre daha yüksek olduğu immünohistokimyasal olarak belirlenmiştir (Kontrol; 4.5±1.5, Kolit; 8.3±1.8, $p<0.05$)
6. Anti-CD4 immün boyanması incelendiğinde, $CD4^+$ T lenfositlerin kolit grubu kolon mukozasında, kontrol grubuna göre daha yoğun oldukları belirlenmiştir (Kontrol; 3.5±1.8, Kolit; 6.6±1.6, $p<0.05$).
7. $CD5^+$ hücrelerin kolonik mukoza yoğunluğunun kolit grubunda kontrol grubuna göre daha yüksek olduğu immünohistokimyasal olarak gösterilmiştir (Kontrol; 3.2±1.3, Kolit; 5.6±1.5, $p<0.05$).
8. $CD8^+$ hücrelerin kolit grubu kolon mukozasında, kontrol grubuna kıyasla daha yüksek oranda bulundukları immünohistokimyasal olarak belirlenmiştir (Kontrol; 2.4±0.9, Kolit; 4.6±1.3, $p<0.05$).
9. CD11b immünreaktivitesinin kolit grubunda kontrole kıyasla daha yüksek olduğu belirlenmiştir (Kontrol; 4.1±1.2, Kolit; 9.9±1.9, $p<0.05$).
10. Kolit grubu kolon kesitlerinde CD45 immünreaktivitesinin, kontrol grubuna kıyasla yüksek olduğu belirlendi (Kontrol; 18.3±3.9, Kolit; 40.6±5.3, $p<0.05$).
11. TNF-α immünreaktivitesinin kolit grubunda, kontrol grubuna kıyasla yüksek olduğu bulunmuştur (Kontrol; 10.1±3.5, Kolit; 35.8±8.6, $p<0.05$).
12. Kolit grubu IL-17 ekspresyonunun kolit grubu kolon mukozasında kontrol grubuna göre yüksek olduğu immünohistokimyasal (Kontrol; 4.2±1.5, Kolit; 6.0±1.8, $p<0.05$) ve Western blot yöntemleriyle (Kontrol; 5.3±3.8, Kolit; 13.3±10.6, $p<0.05$) belirlendi.
13. IL-22 ekspresyonunun, kolit grubunda kontrole kıyasla yüksek olduğu immünohistokimyasal (Kontrol; 4.7±1.5, Kolit; 9.1±2.0, $p<0.05$) ve Western blot yöntemleriyle (Kontrol; 3.2±4.0, Kolit; 10.4±1.9, $p<0.05$) belirlendi.
14. IL-23 immün boyanması incelendiğinde, kolit grubunda kontrole kıyasla anlamlı bir artış olduğu belirlendi (Kontrol; 3.3±1.2, Kolit; 6.6±1.5, $p<0.05$).

Deneysel kolit modelinde, kolit gruplarında yükselmiş olduğu gösterilen immünreaktivite unsurlarına karşı inhibisyon faktörlerinin kullanılması önerilmekte olup; mekanizmalarının tam olarak açıklanabilmesi için farklı parametrelerle desteklenen ileri çalışmalara gereksinim vardır.

ÖZET

Bu çalışmada, TNBS ile indüklenen kolit modelinde kolon mukozasında meydana gelen immün aktivasyonların immünohistokimyasal ve Western blot yöntemleriyle incelenmesi amaçlanmıştır.

Çalışmada 16 adet Wistar albino dişi sıçan kullanılmıştır. Denekler rastgele iki gruba ayrılmıştır; Kontrol (n=8) ve Kolit (n=8). Deneysel kolit modeli intrakolonik 2,4,6 Trinitrobenzen Sülfonik Asit (TNBS) uygulamasıyla indüklenmiştir. 25 mg/sıçan TNBS (toplam 1 ml hacimde, %50'lik etanol içerisinde) 60 saniye süre boyunca anestezi altında uygulanmıştır (ketamin; 50 mg/kg, ksilazin; 10 mg/kg, im). Kontrol grubu hayvanlarına ise aynı süre boyunca rektal serum fizyolojik uygulanmıştır. Deney süresi boyunca vücut ağırlıkları ve feçes durumları takip edilerek kaydedilmiştir. Hayvanlar TNBS uygulamasından sonra 15. günde sakrifiye edilmiştir. Kolon dokusu alınarak morfolojik incelemesi yapılmıştır. Elde edilen kolon dokusu hematoksilen-eozin ile boyanarak meydana gelen mikroskobik değişiklikler incelenmiştir. Kolon kesitleri farklı antikorlar kullanılarak (anti-CD3, anti-CD4, anti-CD5, anti-CD8, anti-CD11b, anti-CD45, anti-TNF-α, anti-IL-17, anti-IL-22, anti-IL-23) indirekt immünohistokimyasal yöntem kullanılarak işaretlenmiştir. Kolon dokusunda IL-17 ve IL-22 ekspresyonları Western blot yöntemi ile de incelenmiştir.

Deney sonunda kolit grubunda deney başlangıcına göre önemli derecede kilo kaybı ve kolon ağırlıklarında artış tespit edilmiştir. Mikroskobik inceleme sonucunda kolit grubu kolon dokusunda ülserasyon, inflamasyon, kript kaybı, Goblet hücre azalması gibi histopatolojiler gözlenmiştir. İmmünohistokimyasal olarak işaretlenen kesitlerde birim alandaki (mm^2) pozitif

boyanan hücre sayıları analiz edildiğinde; kolit grubunda, tüm immün parametreler bakımından kontrol grubuna göre istatiksel olarak anlamlı bir artış olduğu tespit edilmiştir. Kolit grubu kolon mukozasında artan IL-17 ve IL-22 ekspresyonları Western blot yöntemi ile de gösterilmiştir.

Sonuç olarak TNBS uyarımlı kolit modelinde T lenfositler ve alt gruplarının kolon mukozasındaki immünreaktivitelerinde önemli değişimlerin meydana geldiği immünohistokimyasal olarak gösterilmiştir. Yeni keşfedilen Th17/IL-23 yolağı ve IL-22'nin ülseratif kolit patogenezi ve tedavisindeki rolü, konu ile ilgili yapılacak ileri çalışmalarla daha iyi anlaşılabilecektir.

Anahtar Kelimeler; Ülseratif Kolit, TNBS, İmmünohistokimya, Western blot, Sıçan

EXAMINATION OF T LYMPHOCYTES AND SOME CYTOKINES BY IMMUNOHISTOCHEMICAL AND WESTERN BLOT TECHNIQUES ON TNBS-INDUCED RAT COLITIS

SUMMARY

This study was aimed to investigate immun activations of TNBS-induced colitis model occured in colonic mucosa by immunohistochemical and Western blot methods.

For this purpose, sixteen female Wistar albino rats were used. Rats divided two groups ramdomly; Control (n=8) and Colitis (n=8). Experimental colitis model was induced by intracolonic administration of 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS). 25 mg/rat of TNBS (diluted %50 v/v ethanol, totally 1 ml) under anaesthesia with ketamine (50 mg/kg, im) and xylazine (10 mg/kg, im) for sixty seconds was applied. Control animals received only rectal saline for same time. During the study, the weights and feces status of animals were recorded. The animals were sacrified fifteenth day after TNBS administration under anaesthesia. Colon tissue were removed and examined morphologically. Microscopic alterations were examined in stained with Hematoxylin-eosin slides from removed colon tissues. Colon slides were marking by indirect immunohistochemical method used with different antibodies (Anti-CD3, Anti-CD4, Anti-cd5, Anti-CD8, Anti-CD11b, Anti-CD45, Anti-TNF-α, Anti-IL-17, Anti-IL-22, Anti-IL-23). Also, the colonic tissue IL-17 and IL-22 expressions were examined by Western blot method.

In the experimental results, it was determined significant decrease in body weight and increase in colon weight in colitis group when comparing initial experiments. Some histopathological changes such as ulcerations, inflammation, cyrpt loss and Goblet cell loss

were observed in colitis group in microscopic examinations. When analyzed positive stained cell number in per unit area (mm^2) as immunohistochemical, a significant increase as statisticically in colitis group compared with control group. Also, increased IL-17 and IL-23 expressions in colitis colon mucosa were shown by Western blot method.

Consequently, important immunactivations occuring in T lymphoctes and subgroups in TNBS-induced colitis model was detected by immunohistochemical method. The role of newly investigated Th17/IL-23 pathway and IL-22 in the pathogenesis and treatment of ulcerative colitis will be clear up by further studies.

Key Words; Ulcerative Colitis, TNBS, Immunohistochemistry, Western blot, Rat

KAYNAKLAR

1. Xavier RJ, Podolsky DK. Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease. Nature 2007;448(7152):427-34.

2. Cho JH, Brant SR. Recent insights into the genetics of inflammatory bowel disease. Gastroenterology 2011;140(6):1704-12.

3. Mazzon E, Muià C, Di Paola R, Genovese T, De Sarro A, Cuzzocrea S. Thalidomide treatment reduces colon injury induced by experimental colitis. Shock 2005;23(6):556–64.

4. Dabritz J, Menheniott TR. Linking immunity, epigenetics, and cancer in inflammatory bowel disease. Inflamm Bowel Dis 2014;20(9):1638-54.

5. Liu Y, Wang XY, Yang X, Jing S, Zhu L, Gao SH. Lung and intestine: a specific link in an ulcerative colitis rat model. Gastroenterol Res Pract 2013:124530.

6. Sartor RB. Mechanisms of disease: pathogenesis of Crohn's disease and ulcerative colitis. Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol 2006;3(7):390-407.

7. Mazzon E, Muià C, Paola RD, Genovese T, Menegazzi M, De Sarro A. Green tea polyphenol extract attenuates colon injury induced by experimental colitis. Free Radic Res 2005;39(9):1017-25.

8. Papadakis KA, Targan SR. Role of cytokınes in the pathogenesıs of inflammatory Bowel Disease. Annu Rev Med 2000;51:289-98.

9. Sanchez-Muñoz F, Dominguez-Lopez A, Yamamoto-Furusho JK. Role of cytokines in inflammatory bowel disease. World J Gastroenterol 2008;14(27):4280.

10. Zola H, Swart B, Nicholson I, Aasted, B, Bensussan A, Boumsell L et al. CD molecules 2005: human cell differentiation molecules. Blood 2005;106(9):3123-6.

11. Low D, Nguyen DD, Mizoguchi E. Animal models of ulcerative colitis and their application in drug research. Drug Des Devel Ther 2013;7:1341-57.

12. Blumberg RS, Saubermann LJ, Strober W. Animal models of mucosal inflammation and their relation to human inflammatory bowel disease. Curr Opin Immunol 1999;11:648–56.

13. Sadler TW. Lagman's Medical Embryology. 12. Edition ed. Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins, 2012;224-47.

14. Michael H. Ross WP. Histology A Text and Atlas with Correlated Cell and Molecular Biology; 6th ed. Philadelphia: Wolters Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins Health, 2011;568-624.

15. Renz H, Brandtzaeg P, Hornef M. The impact of perinatal immune development on mucosal homeostasis and chronic inflammation. Nat Rev Immunol 2012;12(1):9-23.

16. Bing XIA, Crusius JBA, Meuwissen S, Peña A. Inflammatory bowel disease: definition, epidemiology, etiologic aspects, and immunogenetic studies. World J Gastroenterol 1998;4(5):446-458.

17. Hanauer SB. Inflammatory bowel disease: epidemiology, pathogenesis, and therapeutic opportunities. Inflamm Bowel Dis 2006;12(1):3-6.

18. Telakis E, Tsironi E. Indeterminate colitis - definition, diagnosis, characteristics and management. Ann Gastroenterol 2008;21(3):173-9.

19. Kaser A, Zeissig S, Blumberg RS. Inflammatory bowel disease. Annu Rev Immunol 2010;28:573-621.

20. Baumgart DC, Sandborn WJ. Inflammatory bowel disease: clinical aspects and established and evolving therapies. Lancet 2007;369:1641–57.

21. Danese S, Semeraro S, Papa A, Roberto I, Scaldaferri F, Fedeli G et al. Extraintestinal manifestations in inflammatory bowel disease. World J Gastroenterol 2005;11(46):7227.

22. Kaistha A, Levine J. Inflammatory bowel disease: the classic gastrointestinal autoimmune disease. Curr Probl Pediatr Adolesc Health Care 2014;44(11):328-34.

23. Zippi M, Corrado C, Pica R, Avallone EV, Cassieri C, De Nitto D et al. Extraintestinal manifestations in a large series of Italian inflammatory bowel disease patients. World J Gastroenterol 2014;20(46):17463.

24. Singh B, Kedia S, Konijeti G, Mouli VP, Dhingra R, Kurrey L et al. Extraintestinal manifestations of inflammatory bowel disease and intestinal tuberculosis: frequency and relation with disease phenotype. Indian J Gastroenterol 2015:1-8.

25. Ponder A, Long MD. A clinical review of recent findings in the epidemiology of inflammatory bowel disease. Clin Epidemiol 2013;5:237-47.

26. Fumery M, Dauchet L, Vignal C, Gower-Rousseau C. Epidemiology, risk factors and factors associated with disabling course in inflammatory bowel disease. Revue du Praticien 2014;64(9):1210-15.

27. Ek WE, D'Amato M, Halfvarson J. The history of genetics in infl ammatory bowel disease. Ann Gastroenterol 2014;27(4):294-303.

28. Logan I, Bowlus CL. The geoepidemiology of autoimmune intestinal diseases. Autoimmun Rev 2010;9(5):A372-8.

29. Tysk C, Lindberg E, Järnerot G, Floderus-Myrhed B. Ulcerative colitis and crohn's disease in an unselected population of monozygotic and dizygotic twins. A study of heritability and the influence of smoking. Gut 1988;29(7):990-6.

30. Halme L, Paavola-Sakki P, Turunen U, Lappalainen M, Farkkila M, Kontula K. Family and twin studies in infl ammatory bowel disease. World J Gastroenterol 2006;12(23):3668-72.

31. Halfvarson J, Bodin L, Tysk C, Lindberg E, Järnerot G. Inflammatory bowel disease in a swedish twin cohort: a long-term follow-up of concordance and clinical characteristics. Gastroenterology 2003;124(7):1767-73.

32. Khor B, Gardet A, Xavier RJ. Genetics and pathogenesis of inflammatory bowel disease. Nature 2011;474(7351):307-17.

33. Danese S, Sans M, Fiocchi C. Inflammatory bowel disease: the role of environmental factors. Autoimmun Rev 2004;3(5):394-400.

34. Krishnan A, Korzenik JR. Inflammatory bowel disease and environmental influences. Gastroenterol Clin North Am 2002;31(1):21-39.

35. Ng SC. Emerging leadership lecture: inflammatory bowel disease in asia: emergence of a "western disease". J Gastroenterol Hepatol 2015;30(3):440-5.

36. Lee D, Albenberg L, Compher C, Baldassano R, Piccoli D, Lewis JD et al. Diet in the pathogenesis and treatment of inflammatory bowel diseases. Gastroenterology 2015;148(6):1087-106.

37. Dixon LJ, Kabi A, Nickerson KP, McDonald C. Combinatorial effects of diet and genetics on inflammatory bowel disease pathogenesis. Inflamm Bowel Dis 2015;21(4):912-22.

38. Sakamoto N, Kono S, Wakai K, Fukuda Y, Satomi M, Shimoyama T et al. Dietary risk factors for inflammatory bowel disease a multicenter case-control study in Japan. Inflamm Bowel Dis 2005;11:154-63.

39. Hou JK, Abraham B, El-Serag H. Dietary intake and risk of developing inflammatory bowel disease: a systematic review of the literature. Am J Gastroenterol 2011;106(4):563-73.

40. Martin TD, Chan SS, Hart AR. Environmental factors in the relapse and recurrence of inflammatory bowel disease: a review of the literature. Dig Dis Sci 2015;60(5):1396-405.

41. Ahuja V, Tandon RK. Inflammatory bowel disease in the asia-pacific area: a comparison with developed countries and regional differences. J Dig Dis 2010;11(3):134-47.

42. Firouzi F, Bahari A, Aghazadeh R, Zali MR. Appendectomy, tonsillectomy, and risk of inflammatory bowel disease: a case control study in Iran. Int J Colorectal Dis 2006;21(2):155-9.

43. Cornish JA, Tan E, Simillis C, Clark SK, Teare J, Tekkis PP. The risk of oral contraceptives in the etiology of inflammatory bowel disease: a meta-analysis. Am J Gastroenterol 2008;103(9):2394-400.

44. Ananthakrishnan AN. Environmental risk factors for IBD. Gastroenterol Hepatol 2013;9(6):367-74.

45. Beamish LA, Osornio-Vargas AR, Wine E. Air pollution: an environmental factor contributing to intestinal disease. J Crohns Colitis 2011;5(4):279-86.

46. Ng SC, Tang W, Leong RW, Chen M, Ko Y, Studd C et al. Environmental risk factors in inflammatory bowel disease: a population-based case-control study in Asia-Pacific. Gut 2015;64(7):1063-71.

47. Wild CP. The exposome: from concept to utility. Int J Epidemiol 2012;41(1):24-32.

48. Rogler G, Vavricka S. Exposome in IBD: recent insights in environmental factors that influence the onset and course of IBD. Inflamm Bowel Dis 2015;21(2):400-8.

49. De Cruz P, Prideaux L, Wagner J, Ng SC, McSweeney C, Kirkwood C et al. Characterization of the gastrointestinal microbiota in health and inflammatory bowel disease. Inflamm Bowel Dis 2012;18(2):372-90.

50. Hisamatsu T, Kanai T, Mikami Y, Yoneno K, Matsuoka K, Hibi T. Immune aspects of the pathogenesis of inflammatory bowel disease. Pharmacol Ther 2013;137(3):283-97.

51. Sathyabama S, Khan N, Agrewala JN. Friendly pathogens: prevent or provoke autoimmunity. Crit Rev Microbiol 2014;40(3):273-80.

52. Matsuoka K, Kanai T. The gut microbiota and inflammatory bowel disease. Semin Immunopathol 2015;37(1):47-55.

53. Nina Stachowicz AK. The role of gut microbiota in the pathogenesis of obesity and diabetes. Postepy Hig Med Dosw 2013;67:288-303.

54. Fernandez LMB, Lasa JS, Man F. Intestinal microbiota its role digestive diaseas. J Clin Gastroenterol 2014;48:657-66.

55. Seksik P, Sokol H, Lepage P, Vasquez N, Manichanh C, Mangin I et al. Review article: the role of bacteria in onset and perpetuation of inflammatory bowel disease. Aliment Pharmacol Ther 2006;24(3):11-8.

56. Shih DQ, Targan SR. Immunopathogenesis of inflammatory bowel disease. World J Gastroenterol 2008;14(3):390.

57. Cahill RJ, Foltz CJ, Fox JG, Dangler CA, Powrie F, Schauer D. Inflammatory bowel disease: an immunity-mediated condition triggered by bacterial infection with helicobacter hepaticus. Infect Immun 1997;65(8):3126–31.

58. Weaver CT, Harrington LE, Mangan PR, Gavrieli M, Murphy KM. Th17: an effector CD4 T cell lineage with regulatory T cell ties. Immunity 2006;24(6):677-88.

59. Stockinger B, Veldhoen M. Differentiation and function of Th17 T cells. Curr Opin Immunol 2007;19(3):281-6.

60. Purchiaroni F, Tortora A, Gabrielli M, Bertucci F, Gigante G, Ianiro G. The role of intestinal microbiota and the immune system. Eur Rev Med Pharmacol Sci 2013;17(3):323-33.

61. Hooper LV, Macpherson AJ. Immune adaptations that maintain homeostasis with the intestinal microbiota. Nat Rev Immunol 2010;10(3):159-69.

62. Hooper LV, Littman DR, Macpherson AJ. Interactions between the microbiota and the immune system. Science 2012;336(6086):1268-73.

63. Turner JR. Molecular basis of epithelial barrier regulation: from basic mechanisms to clinical application. Am J Pathol 2006;169(6):1901-09.

64. Abraham C, Cho JH. Inflammatory bowel disease. N Engl J Med 2009;361(21):2066-78.

65. Simms LA, Doecke JD, Walsh MD, Huang N, Fowler EV, Radford-Smith GL. Reduced α-defensin expression is associated with inflammation and not NOD2 mutation status in ileal crohn's disease. Gut 2008;57(7):903-10.

66. Francescone R, Hou V, Grivennikov SI. Cytokines, IBD, and colitis-associated cancer. Inflamm Bowel Dis 2015;21(2):409-18.

67. Lui W-Y, Cheng CY. Regulation of cell junction dynamics by cytokines in the testis—a molecular and biochemical perspective. Cytokine Growth Factor Rev 2007;18(3):299-311.

68. Capaldo CT, Nusrat A. Cytokine regulation of tight junctions. Biochim Biophys Acta 2009;1788(4):864-71.

69. Hering NA, Andres S, Fromm A, Van Tol EA, Amasheh M, Mankertz J. Transforming growth factor-β, a whey protein component, strengthens the intestinal barrier by upregulating claudin-4 in HT-29/B6 cells. J Nutr 2011;141(5):783-9.

70. Prasad S, Mingrino R, Kaukinen K, Hayes KL, Powell RM, MacDonald T. Inflammatory processes have differential effects on claudins 2, 3 and 4 in colonic epithelial cells. Lab Invest 2005;85(9):1139-62.

71. Mazzon E, Puzzolo D, Caputi AP, Cuzzocrea S. Role of IL-10 in hepatocyte tight junction alteration in mouse model of experimental colitis. Mol Med 2002;8(7):353.

72. Yang R, Han X, Uchiyama T, Watkins SK, Yaguchi A, Delude RL. IL-6 is essential for development of gut barrier dysfunction after hemorrhagic shock and resuscitation in mice. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 2003;285(3):G621-9.

73. Wisner DM, Harris LR, Green CL, Poritz LS. Opposing regulation of the tight junction protein claudin-2 by interferon-γ and interleukin-4. J Surg Res 2008;144(1):1-7.

74. Al-Sadi R, Ye D, Said HM, Ma TY. IL-1β-induced increase in intestinal epithelial tight junction permeability is mediated by MEKK-1 activation of canonical NF-κB pathway. Am J Pathol 2010;177(5):2310-22.

75. Mankertz J, Tavalali S, Schmitz H, Mankertz A, Riecken EO, Fromm M. Expression from the human occludin promoter is affected by tumor necrosis factor alpha and interferon gamma. J Cell Sci 2000;113(11):2085-90.

76. Kinugasa T, Sakaguchi T, Gu X, Reinecker HC. Claudins regulate the intestinal barrier in response to immune mediators. Gastroenterology 2000;118(6):1001-11.

77. McGuckin MA, Eri R, Simms LA, Florin TH, Radford-Smith G. Intestinal barrier dysfunction in inflammatory bowel diseases. Inflamm Bowel Dis 2009;15(1):100-13.

78. Johansson ME. Mucus layers in inflammatory bowel disease. Inflamm Bowel Dis 2014;20(11):2124-31.

79. Limvuttegrijerat T, Poachanukoon O, Koontongkaew S, Na Ayudhya TD. Crude ethanolic extracts of zingiber cassumunar ROXB inhibit PMA-induced MUC2 and

MUC5AC expression via ERK inhibition in human airway epithelial cells. Asian Pac J Allergy Immunol 2014;32(4):328-36.

80. Iwashita J, Sato Y, Sugaya H, Takahashi N, Sasaki H, Abe T. mRNA of MUC2 is stimulated by IL-4, IL-13 or TNF-α through a mitogen-activated protein kinase pathway in human colon cancer cells. Immunol Cell Biol 2003;81(4):275-82.

81. Levine SJ, Larivee P, Logun C, Angus CW, Ognibene FP, Shelhamer JH. Tumor necrosis factor-alpha induces mucin hypersecretion and MUC-2 gene expression by human airway epithelial cells. Am J Respir Cell Mol Biol 1995;12(2):196-204.

82. Kobayashi KS, Chamaillard M, Ogura Y, Henegariu O, Inohara N, Nuñez G et al. Nod2-dependent regulation of innate and adaptive immunity in the intestinal tract. Science 2005;307(5710):731-4.

83. Ayabe T, Satchell DP, Wilson CL, Parks WC, Selsted ME, Ouellette AJ. Secretion of microbicidal α-defensins by intestinal paneth cells in response to bacteria. Nat Immunol 2000;1(2):113-8.

84. Castro-Sánchez P, Martín-Villa JM. Gut immune system and oral tolerance. Br J Nutr 2013;109(S2):S3-11.

85. Faria A, Weiner HL. Oral tolerance. Immunol Rev 2005;206(1):232-59.

86. Zhu J, Paul WE. Peripheral CD4+ T-cell differentiation regulated by networks of cytokines and transcription factors. Immunol Rev 2010;238(1):247-62.

87. Liu Z-J, Yadav PK, Su J-L, Wang JS, Fei K. Potential role of Th17 cells in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. World J Gastroenterol 2009;15(46):5784.

88. Kolls JK, Lindén A. Interleukin-17 family members and inflammation. Immunity 2004;21(4):467-76.

89. Nurieva R, Yang XO, Martinez G, Zhang Y, Panopoulos AD, Ma L. Essential autocrine regulation by IL-21 in the generation of inflammatory T cells. Nature 2007;448(7152):480-3.

90. Zenewicz LA, Antov A, Flavell RA. CD4 T-cell differentiation and inflammatory bowel disease. Trends Mol Med 2009;15(5):199-207.

91. Harrington LE, Hatton RD, Mangan PR Turner H, Murphy TL, Murphy KM. Interleukin 17–producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. Nat Immunol 2005;6(11):1123-32.

92. Grusby MJ. Impaired IL-12 responses and enhanced development of Th2 cells in Stat4-deficient mice. Nature 1996;382:11.

93. Yang XO, Pappu BP, Nurieva R, Akimzhanov A, Kang HS, Chung Y. T helper 17 lineage differentiation is programmed by orphan nuclear receptors RORα and RORγ. Immunity 2008;28(1):29-39.

94. Manel N, Unutmaz D, Littman DR. The differentiation of human TH-17 cells requires transforming growth factor-β and induction of the nuclear receptor RORγt. Nat Immunol 2008;9(6):641-9.

95. Annunziato F, Cosmi L, Santarlasci V, Maggi L, Liotta F, Mazzinghi B. Phenotypic and functional features of human Th17 cells. J Exp Med 2007;204(8):1849-61.

96. Abraham C, Cho J. Interleukin-23/Th17 pathways and inflammatory bowel disease. Inflamm Bowel Dis 2009;15(7):1090-100.

97. Ahern PP, Schiering C, Buonocore S McGeachy MJ, Cua DJ, Maloy KJ. Interleukin-23 drives intestinal inflammation through direct activity on T cells. Immunity 2010;33(2):279-88.

98. Kullberg MC, Jankovic D, Feng CG, Hue S, Gorelick PL, McKenzie BS. IL-23 plays a key role in helicobacter hepaticus–induced T cell–dependent colitis. J Exp Med 2006;203(11):2485-94.

99. Uhlig HH, McKenzie BS, Hue S, Thompson C, Joyce-Shaikh B. Differential activity of IL-12 and IL-23 in mucosal and systemic innate immune pathology. Immunity 2006;25(2):309-18.

100. Yen D, Cheung J, Scheerens H Poulet F, McClanahan T, McKenzie B. IL-23 is essential for T cell–mediated colitis and promotes inflammation via IL-17 and IL-6. J Clin Invest 2006;116(5):1310.

101. Zenewicz LA, Flavell RA. Recent advances in IL-22 biology. Int Immunol 2011;23(3):159-163.

102. Rutz S, Eidenschenk C, Ouyang W. IL-22, not simply a Th17 cytokine. Immunol Rev 2013;252:116-32.

103. Goyal N, Rana A, Ahlawat A, Bijjem KR, Kumar P. Animal models of inflammatory bowel disease: a review. Inflammopharmacology 2014;22(4):219-33.

104. Elson CO, Cong Y, McCracken VJ, Dimmitt RA, Lorenz RG, Weaver CT. Experimental models of inflammatory bowel disease reveal innate, adaptive, and regulatory mechanisms of host dialogue with the microbiota. Immunol Rev 2005;206:260–76.

105. Vijay-Kumar M, Wu H, Aitken J, Kolachala VL, Neish AS, Sitaraman SV et al. Activation of toll-like receptor 3 protects against DSS-induced acute colitis. Inflamm Bowel Dis 2007;13(7):856-64.

106. Daniel C, Sartory NA, Zahn N, Schmidt R, Geisslinger G, Radeke HH et al. FTY720 ameliorates oxazolone colitis in mice by directly affecting T helper type 2 functions. Mol Immunol 2007;44(13):3305-16.

107. Heller F, Fuss IJ, Nieuwenhuis EE, Blumberg RS, Strober W. Oxazolone colitis, a Th2 colitis model resembling ulcerative colitis, is mediated by IL-13-producing NK-T cells. Immunity 2002;17(5):629-38.

108. Juhás S, Cikos S, Czikková S, Veselá J, Il'ková G, Hájek T et al. Effects of borneol and thymoquinone on TNBS-induced colitis in mice. Folia Biol (Praha) 2008;54(1):1.

109. Dothel G, Vasina V, Barbara G, De Ponti F. Animal models of chemically induced intestinal inflammation: Predictivity and ethical issues. Pharmacol Ther 2013;139(1):71-86.

110. Motavallian-Naeini A, Andalib S, Rabbani M, Mahzouni P, Afsharipour M, Minaiyan M. Validation and optimization of experimental colitis induction in rats using 2, 4, 6-trinitrobenzene sulfonic acid. Res Pharm Sci 2012;7(3):159.

111. Kremer B, Mariman R, Van Erk M, Lagerweij T, Nagelkerken L. Temporal colonic gene expression profiling in the recurrent colitis model identifies early and chronic inflammatory processes. PLoS One 2012;7(11):e50388.

112. Szalai Z, Szász A, Nagy I, Puskás LG, Kupai K, Király A et al. Anti-inflammatory effect of recreational exercise in TNBS-Induced colitis in rats: role of NOS/HO/MPO system. Oxid Med Cell Longev 2014; 925981.

113. Park S-Y, Neupane GP, Lee SO, Lee JS, Kim MY, Kim SY et al. Protective effects of pogostemon cablin bentham water extract on inflammatory cytokine expression in TNBS-induced colitis in rats. Arch Pharm Res 2014;37(2):253-62.

114. Arab HH, Salama SA, Eid AH, Omar HA, Arafa el-SA, Maghrabi IA . Camel's milk ameliorates TNBS-induced colitis in rats via downregulation of inflammatory cytokines and oxidative stress. Food Chem Toxicol 2014;69:294-302.

115. Joo M, Kim HS, Kwon TH Palikhe A, Zaw TS, Jeong JH et al. Anti-inflammatory effects of flavonoids on TNBS-induced colitis of rats. Korean J Physiol Pharmacol 2015;19(1):43-50.

116. McCafferty DM, Sharkey KA, Wallace JL. Beneficial effects of local or systemic lidocaine in experimental colitis. Am J Physiol 1994;266(4):G560-7.

117. Obermeier F, Kojouharoff G, Hans W, Schölmerich J, Gross V, Falk W. Interferon-gamma (IFN-γ)-and tumour necrosis factor (TNF)-induced nitric oxide as toxic effector molecule in chronic dextran sulphate sodium (DSS)-induced colitis in mice. Clin Exp Immunol 1999;116(2):238-45.

118. Monteleone G, Caprioli F. Why are molecular mechanisms of immune activation important in IBD? Inflamm Bowel Dis 2008;14 Suppl 2:S106-7.

119. Karaca T, Uz YH, Demirtas S, Karaboga I, Can G. Protective effect of royal jelly in 2, 4, 6 trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis in rats. Iran J Basic Med Sci 2015;18(4):370-9.

120. Yang M, Lin H-B, Gong S, Chen PY, Geng LL, Zeng YM et al. Effect of astragalus polysaccharides on expression of TNF-α, IL-1β and NFATc4 in a rat model of experimental colitis. Cytokine 2014;70(2):81-6.

121. Kolgazi M, Uslu U, Yuksel M, Velioglu-Ogunc A, Ercan F, Alican I. The role of cholinergic anti-inflammatory pathway in acetic acid-induced colonic inflammation in the rat. Chem Biol Interact 2013;205(1):72-80.

122. Wakuda T, Azuma K, Saimoto H, Ifuku S, Morimoto M, Arifuku I et al. Protective effects of galacturonic acid-rich vinegar brewed from Japanese pear in a dextran sodium sulfate-induced acute colitis model. J Funct Foods 2013;5(1):516-23.

123. Watanabe T, Asano N, Murray PJ, Ozato K, Tailor P, Fuss IJ et al. Muramyl dipeptide activation of nucleotide-binding oligomerization domain 2 protects mice from experimental colitis. J Clin Invest 2008;118(2):545.

124. Frauwirth KA, Thompson CB. Activation and inhibition of lymphocytes by costimulation. J Clin Invest 2002;109(3):295-9.

125. Ishikawa H, Ochi H, Chen M-L, Frenkel D, Maron R, Weiner HL et al. Inhibition of autoimmune diabetes by oral administration of anti-CD3 monoclonal antibody. Diabetes 2007;56(8):2103-9.

126. Forster K, Goethel A, Chan CWT, Zanello G, Streutker C, Croitoru K. An oral CD3-specific antibody suppresses T-cell–induced colitis and alters cytokine responses to T-cell activation in mice. Gastroenterology 2012;143(5):1298-1307.

127. Reinecke K, Eminel S, Dierck F, Roessner W, Kersting S, Chromik AM et al. The JNK inhibitor XG-102 protects against TNBS-induced colitis. PLoS ONE 2012;7(3):e30985.

128. Dasu T, Qualls JE, Tuna H, Raman C, Cohen DA, Bondada S. CD5 plays an inhibitory role in the suppressive function of murine CD4+ CD25+ T reg cells. Immunol Lett 2008;119(1):103-13.

129. Perez-Villar JJ, Whitney GS, Bowen MA, Hewgill DH, Aruffo AA, Kanner SB. CD5 negatively regulates the T-cell antigen receptor signal transduction pathway: involvement of SH2-containing phosphotyrosine phosphatase SHP-1. Mol Cell Biol 1999;19(4):2903-12.

130. Karaca T, Şimşek N, Uslu S, Kalkan Y, Can I, Kara A et al. The effect of royal jelly on CD3+, CD5+, CD45+ T-cell and CD68+ cell distribution in the colon of rats with acetic acid-induced colitis. Allergol Immunopathol (Madr) 2012;40(6):357-61.

131. Gulubova MV, Manolova IM, Vlaykova TI, Prodanova M, Jovchev JP. Adhesion molecules in chronic ulcerative colitis. Int J Colorectal Dis 2006;22(6):581-9.

132. Vainer B, Nielsen OH, Horn T. Comparative studies of the colonic in situ expression of intercellular adhesion molecules (ICAM-1, -2, and -3), [beta]2 integrins (LFA-1, Mac-1, and p150,95), and PECAM-1 in ulcerative colitis and crohn's disease. Am J Surg Pathol 2000;24(8):1115-24.

133. Wang L, Jiang X, Liu X, Qian T, Chu Y. Local immune compartments are related to the severity of dextran sodium sulphate induced colitis. Biosci Trends 2014;8(5):242-7.

134. Klenerman P, Hill A. T cells and viral persistence: lessons from diverse infections. Nat Immunol 2005;6(9):873-9.

135. Lu Y, Hong B, Li H, Zheng Y, Zhang M, Wang S et al. Tumor-specific IL-9–producing CD8+ Tc9 cells are superior effector than type-I cytotoxic Tc1 cells for adoptive immunotherapy of cancers. Proc Natl Acad Sci 2014;111(6):2265-70.

136. Chen J, Bruce D, Cantorna MT. Vitamin D receptor expression controls proliferation of naive CD8+ T cells and development of CD8 mediated gastrointestinal inflammation. BMC Immunol 2014;15(1):6.

137. Steinhoff U, Brinkmann V, Klemm U, Aichele P, Seiler P, Brandt U et al. Autoimmune intestinal pathology induced by hsp60-specific CD8 T cells. Immunity 1999;11(3):349-58.

138. Ghavidel A, Somi MH, Ebrahimzadeh ZA, Halimi M, Tabrizi A. CD4+ and CD8+ T cell count in colonic mucosa of patients with IBD and IBS. J Am Sci 2013;9:79-83.

139. Funderburg NT, Stubblefield Park SR, Sung HC, Hardy G, Clagett B, Ignatz-Hoover J et al. Circulating CD4+ and CD8+ T cells are activated in inflammatory bowel disease and are associated with plasma markers of inflammation. Immunology 2013;140(1):87-97.

140. Liu D, Zhao H, Zhao N, Lu C, Lu AP. Effect of Bawei Xilei powder on CD3, CD4, CD8 T-lymphocytes of rats with ulcerative colitis. Zhongguo Zhong Yao Za Zhi 2008;33(11):1301-04.

141. Saunders A, Johnson P. Modulation of immune cell signalling by the leukocyte common tyrosine phosphatase, CD45. Cell Signal 2010;22(3):339-48.

142. Strober W, Fuss IJ. Proinflammatory cytokines in the pathogenesis of inflammatory bowel diseases. Gastroenterology 2011;140(6):1756-67.

143. Chistiakov DA, Bobryshev YV, Kozarov E, Sobenin IA, Orekhov AN. Intestinal mucosal tolerance and impact of gut microbiota to mucosal tolerance. Front Microbiol 2015;13(5):1-9.

144. Brandtzaeg P. Mucosal immunity: integration between mother and the breast-fed infant. Vaccine 2003;21(24):3382-8.

145. Bradley J. TNF-mediated inflammatory disease. J Pathol 2008;214(2):149-60.

146. Zhou Y-H, Yu J-P, Liu Y-F, Teng XJ, Ming M, Lv P et al. Effects of Ginkgo biloba extract on inflammatory mediators (SOD, MDA, TNF-α, NF-κ Bp65, IL-6) in TNBS-induced colitis in rats. Mediators Inflamm 2006;2006(5):92642.

147. Da Silva MS, Sánchez-Fidalgo S, Talero E, Cárdeno A, da Silva MA, Villegas W et al. Anti-inflammatory intestinal activity of Abarema cochliacarpos (Gomes) Barneby & Grimes in TNBS colitis model. J Ethnopharmacol 2010;128(2):467-75.

148. Carvalho AT, Souza H, Carneiro AJ Castelo-Branco M, Madi K, Schanaider A, et al. Therapeutic and prophylactic thalidomide in TNBS-induced colitis: synergistic effects on TNF-alpha, IL-12 and VEGF production. World J Gastroenterol 2007;13(15):2166-73.

149. Murdaca G, Colombo B, Puppo F. Adalimumab for the treatment of immune-mediated diseases: an update on old and recent indications. Drugs Today (Barc) 1998) 2011;47(4):277-88.

150. Hussein IH, Zgheib Z, Zeenny MN, Chams S, Assi TB, Chams T et al. Epigallocatechin-3-gallate reduces mast cells activity TNF-α and NFKB in colitis by interrupting an inflammatory cascade (MUC2P. 827). J Immunol 2014;192:68.11.

151. Farzaei MH, Ghasemi-Niri SF, Abdolghafari AH, Baeeri M, Khanavi M, Navaei-Nigjeh M et al. Biochemical and histopathological evidence on the beneficial effects of tragopogon graminifolius in TNBS-induced colitis. Pharm Biol 2014;53(3):429-36.

152. Pernis A. Th17 cells in rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. J Intern Med 2009;265(6):644-52.

153. Hung L-Y, Velichko S, Huang F, Thai P, Wu R. Regulation of airway innate and adaptive immune responses: the IL-17 paradigm. Crit Rev Immunol 2008;28(4):269-79.

154. Fujino S, Andoh A, Bamba S, Ogawa A, Hata K, Araki Y et al. Increased expression of interleukin 17 in inflammatory bowel disease. Gut 2003;52(1):65-70.

155. Jiang W, Su J, Zhang X, Cheng X, Zhou J, Shi R et al. Elevated levels of Th17 cells and Th17-related cytokines are associated with disease activity in patients with inflammatory bowel disease. Inflamm Res 2014;63(11):943-50.

156. Zhang M, Qiu X, Zhang H, Yang X, Hong N, Yang Y et al. Faecalibacterium prausnitzii inhibits interleukin-17 to ameliorate colorectal colitis in rats. PLoS One. 2014 Oct 2;9(10):e109146.

157. Yao J, Wei C, Wang J-Y, Zhang R, Li YX, Wang LS. Effect of resveratrol on Treg/Th17 signaling and ulcerative colitis treatment in mice. World J Gastroenterol 2015;21(21):6572.

158. He Y, Lin L-J, Zheng C-Q, Jin Y, Lin Y. Cytokine expression and the role of Thl7 cells in mice colitis. Hepatogastroenterology 2012;59(118):1809-13.

159. Thompson AI, Lees CW. Genetics of ulcerative colitis. Inflamm Bowel Dis 2011;17(3):831-48.

160. Leung JM, Davenport M, Wolff MJ, Wiens KE, Abidi WM, Poles MA et al. IL-22-producing CD4+ cells are depleted in actively inflamed colitis tissue. Mucosal Immunol 2014;7(1):124-33.

161. Yu L-Z, Wang H-Y, Yang S-P, Yuan ZP, Xu FY, Sun C et al. Expression of interleukin-22/STAT3 signaling pathway in ulcerative colitis and related carcinogenesis. World J Gastroenterol 2013;19(17):2638.

162. Zheng Y, Valdez PA, Danilenko DM, Hu Y, Sa SM, Gong Q et al. Interleukin-22 mediates early host defense against attaching and effacing bacterial pathogens. Nat Med 2008;14(3):282-9.

163. Aujla S, Kolls J. IL-22: a critical mediator in mucosal host defense. J Mol Med 2009;87(5):451-4.

164. Laurence A, O'Shea JJ, Watford WT. Interleukin-22: a sheep in wolf's clothing. Nat Med 2008;14(3):247-9.

165. Seiderer J, Brand S. Il-22: A two-headed cytokine in IBD? Inflamm Bowel Dis 2009;15(3):473-4.

166. Ahern PP, Izcue A, Maloy KJ, Powrie F. The interleukin-23 axis in intestinal inflammation. Immunol Rev 2008;226:147-59.

167. Iwakura Y, Ishigame H. The IL-23/IL-17 axis in inflammation. J Clin Invest 2006;116(5):1218.

168. McKenzie BS, Kastelein RA, Cua DJ. Understanding the IL-23–IL-17 immune pathway. Trends Immunol 2006;27(1):17-23.

169. Hue S, Ahern P, Buonocore S, Kullberg MC, Cua DJ, McKenzie BS et al. Interleukin-23 drives innate and T cell–mediated intestinal inflammation. J Exp Med 2006;203(11):2473-83.

170. Zhang H-Q, Ding TT, Zhao J-S, Yang X, Zhang HX, Zhang JJ et al. Therapeutic effects of clostridium butyricum on experimental colitis induced by oxazolone in rats. World J Gastroenterol 2009;15(15):1821.

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1. Kontrol ve kolit grubuna ait vücut ağırlık değişimleri 25
Şekil 2. Gruplara ait deney sonu kolon doku ağrılıkları 26
Şekil 3. Kontrol ve kolit gruplarına ait intrabdominal ve kolon makroskobik görüntüleri. 27
Şekil 4. Gruplara ait makroskobik hasar değerleri 28
Şekil 5. Gruplara ait mikroskobik hasar değerleri 28
Şekil 6. Kontrol grubuna ait normal kolon görüntüsü (H&E boyaması) 29
Şekil 7. Kolit grubuna ait kolon kesiti (H&E boyaması) 30
Şekil 8. Kontrol grubu Anti-CD3 boyanması (oklar; $CD3^+$ hücreler, İmmünperoksidaz, Hematoksilen zıt boyaması) 31
Şekil 9. Kolit grubu Anti-CD3 boyanması (oklar; subepitelyal ve kriptler çevresinde $CD3^+$ hücreler, İmmünperoksidaz, Hematoksilen zıt boyaması) 32
Şekil 10. Gruplara ait $CD3^+$ hücre sayımları 32
Şekil 11. Kontrol grubu Anti-CD4 boyanması (oklar; $CD4^+$ hücreler, İmmünperoksidaz, Hematoksilen zıt boyaması) 33
Şekil 12. Kolit grubu Anti-CD4 boyanması (oklar; kriptlere yakın yerleşimli $CD4^+$ hücreler, İmmünperoksidaz, Hematoksilen zıt boyaması) 34
Şekil 13. Gruplara ait $CD4^+$ hücre sayımları 34
Şekil 14. Kontrol grubu Anti-CD5 boyanması (oklar; $CD5^+$ hücreler, İmmünperoksidaz, Hematoksilen zıt boyaması) 35
Şekil 15. Kolit grubu Anti-CD5 boyanması (oklar; $CD4^+$ hücreler, İmmünperoksidaz, Hematoksilen zıt boyaması) 36

Şekil 16. Gruplara ait $CD5^+$ hücre sayımları 36
Şekil 17. Kontrol grubuna ait Anti-CD8 boyanması (oklar; lamina propriyada $CD8^+$ hücreler, İmmünperoksidaz, Hematoksilen zıt boyaması) 37
Şekil 18. Kolit grubuna ait Anti-CD8 boyanması (oklar; ülserasyon alanları ve bağ doku içerisinde $CD8^+$ hücreler, İmmünperoksidaz, Hematoksilen zıt boyaması) 38
Şekil 19. Gruplara ait $CD8^+$ hücre sayımları 39
Şekil 20. Kontrol grubu Anti-CD11b boyanması (oklar; lamina propriyada $CD11b^+$ boyanan hücreler, İmmünperoksidaz, Hematoksilen zıt boyaması) 40
Şekil 21. Kolit grubu Anti-CD11b boyanması (İmmünperoksidaz, Hematoksilen zıt boyaması) 41
Şekil 22. Gruplara ait $CD11b^+$ hücre sayımları 41
Şekil 23. Kontrol grubu Anti-CD45 boyanması (oklar; lamina propriyada ve intraepitelyal konumda yerleşim gösteren $CD45^+$ hücreler, İmmünperoksidaz, Hematoksilen zıt boyaması) 42
Şekil 24. Kolit grubu Anti-CD45 boyanması; mukoza ve submukozada bol miktarda $CD45^+$ hücreler izlenmekte (oklar; ülserasyon ve erozyon alanları, İmmünperoksidaz, Hematoksilen zıt boyaması) 43
Şekil 25. Gruplara ait $CD45^+$ hücre sayımları 43
Şekil 26. Kontrol grubu Anti-TNF-α boyanması; yüzey epiteline yakın alanlarda immünreaktivite izlenmekte (İmmünperoksidaz, Hematoksilen zıt boyaması) 44
Şekil 27. Kolit grubu mukoza ve submukozasında yoğun olarak izlenen Anti-TNF-α boyanması (İmmünperoksidaz, Hematoksilen zıt boyaması) 45
Şekil 28. Gruplara ait TNF-α pozitif hücre sayımları 45
Şekil 29. Kontrol grubu Anti-IL-17 boyanması (oklar; lamina propriyada yerleşim gösteren IL-17 pozitif hücreler, İmmünperoksidaz, Hematoksilen zıt boyaması) 46
Şekil 30. Kolit grubu Anti-IL-17 boyanması (oklar; inflamasyon alanlarında yoğunluğu artan IL-17 pozitif hücreler, İmmünperoksidaz, Hematoksilen zıt boyaması) 47
Şekil 31. Gruplara ait IL-17 pozitif hücre boyanma yoğunlukları 47
Şekil 32. Kontrol grubu Anti-IL-22 boyanması (oklar; lamina propriyada bağ dokusu içerisinde yerleşim gösteren IL-22 pozitif hücreler, İmmünperoksidaz, Hematoksilen zıt boyaması) 48
Şekil 33. Kolit grubunda artan Anti-IL-22 boyanması (oklar; IL-22 pozitif hücreler, İmmünperoksidaz, Hematoksilen zıt boyaması) 49

Şekil 34. Gruplara ait IL-22 pozitif hücre boyanma yoğunlukları 49
Şekil 35. Kontrol grubu Anti-IL-23 boyanması (oklar; intraepitelyal konumlu IL-23 pozitif hücreler, İmmünperoksidaz, Hematoksilen zıt boyaması) 50
Şekil 36. Kolit grubu Anti-IL-23 boyanması (oklar; yüzey epiteli ve bez epiteli ile ilişkili IL-23 pozitif hücreler, İmmünperoksidaz, Hematoksilen zıt boyaması) 51
Şekil 37. Gruplara ait IL-23 pozitif hücre boyanma yoğunlukları 51
Şekil 38. Gruplara ait Western blot analizi IL-17 bantları 52
Şekil 39. Gruplara ait IL-17 bant yoğunlukları 52
Şekil 40. Gruplara ait Western blot analizi IL-22 bantları 53
Şekil 41. Gruplara ait IL-22 bant yoğunlukları 53

Tablolar

Tablo 1. Ülseratif kolit ve Crohn hastalığı ilişkili genlerin karşılaştırılması……9
Tablo 2. İntestinal mukus bariyerinin bileşenleri ve fonksiyonları……13
Tablo 3. T hücre alt grupları……15
Tablo 4. Deneysel kolit modeli makroskobik hasar değerlendirme skorlaması……20
Tablo 5. Mikroskobik değerlendirmede kullanılan skor cetveli……21
Tablo 6. İmmünohistokimyasal boyamalarda kullanılan antikorlar, dilüsyonlar ve hedef hücreler……22

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: İhsan KARABOĞA

Doğum Yeri ve Yılı: Söke / 18.11.1987

Eğitim;

- Lisans; Mustafa Kemal Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü (2004 - 2008)
- Yüksek Lisans; Mustafa Kemal Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıp Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı (2009 - 2011)
- Doktora; Trakya Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıp Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı (2012- halen)

Mesleki Tecrübe: Öğretim Görevlisi, Namık Kemal Üniversitesi, Sağlık Yüksekokulu (2011- halen)

Akademik Yayınlar;

1. Basaran UN, Ayvaz S, Aksu B, Karaca T, Cemek M, **Karaboga I** et al. Desferrioxamine reduces oxidative stress in the lung contusion. ScientificWorldJournal 2013;1:376959.

2. Gencer B, Karaca T, Tufan HA, Kara S, Arikan S, Toman H, **Karaboga I** et al. The protective effects of dexmedetomidine against apoptosis in retinal ischemia/reperfusion injury in rats. Cutan Ocul Toxicol 2014;33(4):283-8.

3. Kara S, Gencer B, Karaca T, Tufan HA, Arikan S, Ersan I, **Karaboga I** et al. Protective effect of hesperetin and naringenin against apoptosis in ischemia/reperfusion-induced retinal injury in rats. ScientificWorldJournal 2014 Jan 30;2014:797824.

4. Karaca T, Demirtaş S, **Karaboga I**, Ayvazz S. "Protective effects of royal jelly against testicular damage in streptozotocin-induced diabetic rats" Turk J Med Sci 2015;45(1):27-32.

5. Arikan S, Ersan I, Karaca T, Kara S, Gencer B, **Karaboga I**, et al. Quercetin protects the retina by reducing apoptosis due to ischemia-reperfusion injury in a rat model" Arq Bras Oftalmol. 2015;78(2):100-4.

6. Karaca T, Uz YH, Demirtas S, **Karaboga I**, Can G. Protective effect of royal jelly in 2,4,6 trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis in rats" Iran J Basic Med Sci. 2015;18(4):370-9.

7. Demirtaş S, Karaca T and **Karaboga I**. The Immuno-histochemical Study of the Distribution Atrial Natriuretic Peptide Receptor in Ovarian and Uterine Tissues in Different Days of Pregnancy of the Experimental Diabetes by Streptozotocin in Rats. Global Research in Medical Sciences 2014;1(1):1-7.

8. Karaca T, Bayıroğlu F, Cemek M, Comba B, Ayaz A, **Karaboğa I.** Effects of Green Tea Extract and Lactobacillus Casei Strain Shirota on Levels of Serum Minerals, Cholesterol, Triglycerides, Glucose and Lactate in Rats Fed on High-carbohydrate and High-lipid Diets, Kafkas J Med Sci 2013;3(1):1–7

9. Demirtaş S, **Karaboga I**, Karaca T. Natriüretik Peptitler. IJBCM 2014; 2(3):157-64

EKLER

EK-1 Etik Kurul İzni

T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU KARARLARI

EDİRNE

Oturum Sayısı: 09 **Karar Tarihi: 27.12.2013**

KARAR NO: 2013.09.03

Yürütücülüğünü Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi öğretim üyesi Doç. Dr. Turan KARACA'nın yaptığı, İhsan KARABOĞA'nın Doktora tezi olarak planlanan TÜHDYEK-2013/65 protokol nolu "TNBS ile deneysel kolit oluşturulmuş sıçanlarda T lenfositlerin ve bazı sitokinlerin immunohistokimyasal ve western blot yöntemleriyle incelenmesi'' başlıklı çalışma hakkında görüşüldü. Araştırmanın amaç, yaklaşım, gereç ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmesi sonucunda; Hayvan deneyleri yerel etik kurulu yönergesinde belirtilen ilke ve kurallara uygun bulunarak, çalışmanın yapılabileceğine mevcudun oy birliği ile karar verilmiştir.

Ünvanı/Adı/Soyadı	Araştırma ile İlişki	Toplantı Katılımı	İmza
Doç. Dr. Enis ULUÇAM 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 Sivil Üye	☐ var ☐ yok	☐ evet ☐ hayır	
Yrd. Doç. Dr. Beytullah ÖZKAN Fen-Edebiyat Fakültesi Öğretim Üyesi	☐ var ☒ yok	☒ evet ☐ hayır	
Doç. Dr. Y. Atakan SEZER Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi	☐ var ☒ yok	☒ evet ☐ hayır	
Doç. Dr. Tevfik AKTOZ 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	

EK-2 Proje Kabul Onayı

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

SAYI : 59803669/604-01-01/ 1496 - 3896
KONU:

EDİRNE

19 -02- 2014

Sayın Prof. Dr. Turan KARACA
Trakya Üniversitesi
Tıp Fakültesi
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı
EDİRNE

Yöneticiliğini yapmış olduğunuz ve Doktora Öğr. İhsan KARABOĞA'nın "TNBS ile Deneysel Kolit Oluşturulmuş Sıçanlarda T Lenfositlerin Ve Bazı Sitokinlerin İmmünohistokimyasal ve Western Blot Yöntemleriyle İncelenmesi" başlıklı doktora projesinin 24 (yirmi dört) ay süre ve 24.840,00 TL ile desteklenmesine Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu'nun 11.02.2014 tarih ve 2014/03 sayılı toplantısında mevcudun oy birliği ile karar verilmiştir.

Bilimsel Araştırma Projeleri Yönergesi'nin 7. maddesinin c bendi 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.

Bilgilerinizi 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
e-mail : tubap@trakya.edu.tr

Faks : 0 284 223 08 48

Ek 3. Orjinallik Raporu

T.C.
TRAKYA ÜNİVERİSTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
YÜKSEK LİSANS/DOKTORA TEZ ÇALIŞMASI
ORİJİNALLİK RAPORU

Öğrencinin Adı Soyadı: İhsan KARABOĞA
Numarası: 1118310251
Anabilim Dalı: Morfoloji (Tıp Histoloji ve Embriyoloji)
Programı: ◯ **Yüksek Lisans** **X Doktora**
Tez başlığı/Konusu: **TNBS İLE DENEYSEL KOLİT OLUŞTURULMUŞ SIÇANLARDA T LENFOSİTLERİN VE BAZI SİTOKİNLERİN İMMÜNOHİSTOKİMYASAL VE WESTERN BLOT YÖNTEMLERİYLE İNCELENMESİ**

Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne

Yukarıda açık adı bulunan tezimin "Kapak Sayfası, Giriş ve Amaç, Genel Bilgiler, Bulgular, Tartışma, Sonuçlar, Özet ve Summary" bölümlerinden oluşan toplam 63 sayfalık kısmına ilişkin 05/10/2015 Tarihinde tez danışmanım tarafından *TURNİTİN* adlı intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanmış olan orijinallik raporuna göre tezimin benzerlik oranı % 3 olarak belirlenmiştir.

Uygulanan filtrelemeler;

1-Kabul ve Onay Sayfası hariç
2-Teşekkür hariç
3-İçindekiler hariç
4-Simge ve Kısaltmalar hariç
5-Gereç ve Yöntemler Hariç
6-Kaynaklar hariç
7-Şekiller Listesi hariç
8-Özgeçmiş hariç
9-Ekler hariç

Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez çalışması Orijinallik Raporu Uygulama Esaslarını inceledim ve bu uygulama esaslarında belirtilen maksimum benzerlik oranlarına göre tez çalışmamın herhangi bir intihal içermediğini, aksinin ispat edileceği muhtemel durumda doğabilecek her türlü sorumluluğu kabul ettiğimi ve yukarıda vermiş olduğum bilgilerin doğruluğunu beyan ederim. 05/10/2015

Öğrencinin Adı Soyadı, İmza
İhsan KARABOĞA

Ek:Orijinallik Raporu (.....Sayfa)

UYGUNDUR
05/10/2015

Danışman Adı Soyadı, İmza
Prof. Dr. Turan KARACA