T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MORFOLOJİ ANABİLİM DALI
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ
YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

Tez Yöneticisi
Doç. Dr. Yeter TOPÇU TARLADAÇALIŞIR

TRİNİTROBENZEN SÜLFONİK ASİT İLE OLUŞTURULAN DENEYSEL KOLİT MODELİNDE QUERCETİN KULLANIMININ OTOFAJİK SÜRECE ETKİSİ

(Yüksek Lisans Tezi)

Zeynep MERCAN

Referans no: 10306527

EDİRNE – 2019

T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MORFOLOJİ ANABİLİM DALI
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ
YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

Tez Yöneticisi
Doç. Dr. Yeter TOPÇU TARLADAÇALIŞIR

TRİNİTROBENZEN SÜLFONİK ASİT İLE OLUŞTURULAN DENEYSEL KOLİT MODELİNDE QUERCETİN KULLANIMININ OTOFAJİK SÜRECE ETKİSİ

(Yüksek Lisans Tezi)

Zeynep MERCAN

Destekleyen Kurum: TÜBAP-2018/207

Tez No :

EDİRNE – 2019

T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürlüğü

O N A Y

Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Morfoloji (Histoloji ve Embriyoloji) Anabilim Dalı yüksek lisans programı çerçevesinde ve Doç. Dr. Yeter TOPÇU TARLADAÇALIŞIR danışmanlığında, yüksek lisans öğrencisi Zeynep MERCAN tarafından tez başlığı "Trinitrobenzen Sülfonik Asit İle Oluşturulan Deneysel Kolit Modelinde Quercetin Kullanımının Otofajik Sürece Etkisi" olarak teslim edilen bu tezin tez savunma sınavı 01/11/2019 tarihinde yapılarak aşağıdaki jüri üyeleri tarafından **"Yüksek Lisans Tezi"** olarak kabul edilmiştir.

İmza
Ünvanı Adı Soyadı
JÜRİ BAŞKANI
Prof. Dr. Gülnur KIZILAY ÖZFİDAN

İmza
Ünvanı Adı Soyadı
Doç. Dr. Gamze TANRIVERDİ

İmza
Ünvanı Adı Soyadı
Doç. Dr. Yeter TOPÇU TARLADAÇALIŞIR

Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

Prof. Dr. Tammam SİPAHİ
Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Yetişmemde çok büyük emeği olan ve benden hiçbir fedakârlığı esirgemeyen değerli aileme minnettarım. Yüksek lisans eğitimim süresince bilgi ve tecrübelerini paylaşarak, bana yardımcı olan başta danışmanım Sayın Doç. Dr. Yeter TOPÇU TARLADAÇALIŞIR olmak üzere, değerli hocalarım Sayın Prof. Dr. Gülnur KIZILAY ÖZFİDAN, Doç. Dr. Yeşim Hülya UZ, Doç. Dr. Melike SAPMAZ METİN'e ve Trakya Üniversitesi Histoloji Embriyoloji Bölümünün tüm çalışanlarına katkılarından dolayı, istatistiksel analizlerin yapılmasında Sayın Prof. Dr. Necdet SÜT'e ve projenin gerçekleştirilmesinde mali destek sağlayan TÜBAP birimine sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

SİMGE VE KISALTMALAR

AMPK : AMP-Activated Protein Kinase

Atg : Autophagy Related Genes

BCL10 : B cell lymphoma/leukemia 10

DMSO : Dimetil-Sülfoksit

DSS : Dekstran Sülfat Sodyum

ER Stresi : Endoplazmik Retikulum Stresi

H+E : Hematoksilen-Eosin

HSCORE : Histolojik Skor

IL : İnterlökin (Interleukin)

İBH : İnflamatuvar Bağırsak Hastalıkları

LC3 : Microtubule-associated proteins 1A/1B light chain 3B

mTOR : Mammalian Target Of Rapamycin

NF-kB : Nükleer Faktör-KappaB

PAS : Periyodik asit Shiff

PI3K : Phosphatidylinositol 3-Kinase

SQSTM-1/P62 : Sequestosome 1/P62

TCR : T Cell Receptor

TNBS : Trinitrobenzen Sülfonik Asit

TNF-α : Tümör Nekroz Faktör Alfa

İÇİNDEKİLER

GİRİŞ VE AMAÇ 1

GENEL BİLGİLER 3

İNFLAMATUVAR BAĞIRSAK HASTALIKLARI 3

DENEYSEL KOLİT MODELLERİ 7

OTOFAJİ 9

QUERCETİN 17

GEREÇ VE YÖNTEMLER 20

BULGULAR 25

TARTIŞMA 49

SONUÇLAR 59

ÖZET 62

SUMMARY 64

KAYNAKLAR 66

ŞEKİLLER LİSTESİ 75

ÖZGEÇMİŞ 77

EKLER

GİRİŞ VE AMAÇ

Ülseratif kolit ve Crohn hastalığını kapsayan inflamatuvar bağırsak hastalıkları (İBH); son yıllarda dünya çapında insidansı gittikçe artan, hastaların yaşam kalitesini önemli ölçüde etkileyen, kronik ve tekrarlayan inflamatuvar bir bozukluktur. Etiyolojisi tam olarak bilinmemekle birlikte, hastalığın gelişiminde kronik proinflamatuvar sitokinlerin üretimine neden olan mukozal immün sistemin aktivasyonu önemli rol oynamaktadır (1,2).

Deneysel ve klinik çalışmalardan elde edilen veriler; oksidatif stresin, farklı seviyelerde İBH'nın gelişimine katkıda bulunduğunu göstermektedir. Oksidatif stresin; sindirim kanalı mukozasına zarar vermek suretiyle, mukozal bariyeri bozduğu ve böylece ortaya çıkan bakteriyel invazyonun immün yanıtı uyararak hastalığı tetiklediği bilinmektedir (1-3). Ayrıca, birbiriyle bağlantılı iki hücresel kontrol mekanizması olan otofaji ve apoptozun, İBH'nda önemli rollere sahip olduğu gösterilmiştir (4,5). Otofaji; proteinlerin ve organellerin geri dönüşümünü düzenleyen ve hücresel hemeostazisde önemli rol oynayan hücre içi bir bozulma yoludur (6). Normal hücrelerde hayatta kalma mekanizması olan otofaji, hücreler de DNA hasarını, reaktif oksijen türlerini (ROS) ve anormal mitokondriyonları azaltmak ve hasarlı organeller ile birikmiş proteinleri ortadan kaldırmak suretiyle, onları malign değişimlere karşı korumaktadır (7). Açlık, hipoksi gibi hücresel stres durumlarında hasarlı sitozolik bileşenler birikir. Bu bileşenlerin hücrenin tolere edemeyeceği seviyeye gelmesi sonucu otofaji mekanizması devreye girer. Sonuç olarak otofaji; bu stres elemanları ölüme sebep olmadan, hücre ölümüne karşı bir önlem mekanizması olarak işlev görmektedir (6). Baskılanmış veya yetersiz otofajinin kolit gelişimindeki rolü gösterilmiştir (8-11). Otofaji-ilişkili genlerdeki değişikliklerin, bağırsaklarda doğuştan ve edinilmiş immünitenin yanı sıra, inflamatuvar

yanıtları etkilediği bilinmektedir. Mekanizması bozulan otofajinin; bakteriyel, fungal ve viral klerans, hücre içi bakteri ölümü, Paneth hücreleri tarafından anti-mikrobiyal peptit sekresyonu, makrofajlar tarafından proinflamatuar sitokin üretimi, dendritik hücreler tarafından antijen sunumu, Goblet hücrelerinin fonksiyonu ve enterositlerde endoplazmik retikulum stres (ER stresi) yanıtı gibi süreçleri değiştirerek, İBH'nın patogenezinde rol oynadığı tespit edilmiştir (12,13). Bağırsak epitel hücrelerinde yetersiz otofajinin, inflamatuvar koşullarda, apoptozu indükleyerek, intestinel bariyer bütünlüğünü potansiyel olarak zayıflattığı gösterilmiştir (14). İBH'nda otofajinin rolü ortaya konulduktan sonra, immün ve inflamatuvar yanıtların önemli bir düzenleyicisi olarak görülen otofajik süreci düzenleme potansiyeline sahip ajanların, terapötik amaçlı kullanımı üzerine odaklanmış çalışmalar gün geçtikçe artmıştır (9-11,15,16).

İnflamatuvar bağırsak hastalıkları tedavisinde; aminosalisilik asit ilaçları, hormonlar veya immünsüpresif ajanlar sıklıkla batı tıbbında kullanılmaktadır, bu uygulamalar kısa vadede semptomları kontrol edip azaltabilmekte, ancak uzun vadede olumsuz etkilere yol açmaktadır (17). Bu nedenle, kolit tedavisinde istenmeyen etkileri en aza indirecek farklı yollar aranmaktadır. Doğal bileşiklerden elde edilen geleneksel kimyasal ilaçlar veya besinler, İBH için umut kaynağı olmuştur. Son yıllarda, özel beslenme tedavilerinin, mukozal iyileşmeyi artırmak, intestinal immün fonksiyonu ve bağırsak mikrobiyata dengesini düzenlemek suretiyle, Crohn hastalığının hafifletilmesinde oldukça etkili olabileceği gösterilmiştir (18,19). Flavonoidler, antioksidan ve antiinflamatuvar özellikleri göz önünde bulundurulduğunda, son yılların popüler besinsel antioksidanları olarak görülmektedir. Ayrıca flavonoid bileşiklerinin, enzim inhibisyonu (lipoksijenaz, siklooksijenaz, nitrik oksid sentaz) ile immün hücre düzenlenmesi gibi birçok biyolojik etkisi bulunmaktadır (20). Bunun yanısıra, polifenolik bileşiklerin otofaji üzerinde düzenleyici etkileri de gösterilmiştir (21-26). Daha önceki çalışmalar; çeşitli sebze ve meyvelerde bulunan, bir polifenol olan quercetinin, oksidatif hasarı ve inflamasyonu inhibe etmek suretiyle kolit gelişiminde koruyucu rolünü göstermiştir (21,27,28). Bununla birlikte kolit gelişiminde önemli bir etken olan otofajik süreç üzerindeki etkisinin değerlendirildiği bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu nedenle, bu çalışmada; 2,4,6 trinitrobenzen sülfonik asit (TNBS) ile kolit oluşturulmuş şıçanların kolon dokusunda, quercetin kullanımının otofajik süreç (Sequestosome 1/62 ve Beclin-1 immünoreaktivitesi) üzerindeki etkisi ile kolon dokusunda meydana gelen histopatolojik hasarları önleyici/azaltıcı rolü araştırılmıştır. Çalışmamızdan elde edeceğimiz sonuçların, İBH'nın önlenmesi ve/veya tedavisinde yeni yaklaşımların geliştirilmesine katkı sağlayacağı kanaatindeyiz.

GENEL BİLGİLER

İNFLAMATUVAR BAĞIRSAK HASTALIKLARI

İnflamatuvar bağırsak hastalıkları (İBH), gastrointestinal kanalın kronik, idiyopatik inflamasyonu ile karakterize hastalıklar olup, Crohn hastalığı ve ülseratif kolit olmak üzere iki major klinik formdan oluşur (2). Bu hastalıklara rastlanma sıklığı; birey, mekan, zaman, sosyo-ekonomik faktör gibi değişkenlere bağlı olarak farklılık gösterir. İBH; hastaların %20'sinde, çocukluk ve adolesan dönemde başlamakla birlikte, hastalığın ciddiyeti, tedaviye verdiği yanıt ve seyri değişkenlik göstermektedir (29). Tutulum yeri ile inflamasyonun şiddeti arasında kısmen bir korelasyon gözlenmektedir. Ülseratif kolit, kolonu rektumdan proksimale doğru tamamen kaplayan, remisyon ve alevlenmelerle seyreden ve bağırsak mukozasını etkileyen inflamatuvar bir hastalıktır. Crohn hastalığı ise ağızdan anüse kadar sindirim kanalını segmentler halinde, arada sağlam bölgeler bırakarak tutan, bağırsağın tüm histolojik katmanlarını etkileyerek transmural yayılım gösteren, kronik, inflamatuvar bir hastalıktır (29,30). İBH, klinik olarak bağırsak dışı bulgulara ilave kanlı diyare, abdominal kramp ve ağrılar ile karakterize olup, klinik ve diagnostik özellikleri Tablo 1'de gösterilmektedir (31).

İnflamatuvar bağırsak hastalıkları, büyük ölçüde sanayileşmiş ülkelerin, özellikle Amerika ve Avrupa'nın hastalığıdır, kentsel alanlarda ve kuzey iklimlerinde daha yaygındır (32). Ülkemizde İBH insidansı; ülseratif kolit için 2,6/100000 ve Crohn hastalığı için 1,4/100 olarak bildirilmiştir (33). Crohn hastalığı ve ülseratif kolit; geç adolesan ve genç erişkin dönemin hastalığıdır, 10 yaş altındaki çocuklarda ülseratif kolit, Crohn hastalığı'ndan daha sık görülmektedir. Bununla birlikte, Crohn hastalığı insidansı; kadınlarda erkeklerden daha fazla

iken, ülseratif kolit için belli bir farklılığa rastlanmamıştır. İBH'nın etiyopatogenezi, yapılan yoğun çalışmalara rağmen tam olarak anlaşılamamıştır. Hastalığa duyarlılıkta ve gelişiminde, neden-sonuç ilişkisi şeklinde tek bir faktörden çok, daha kompleks nedenler rol oynamaktadır. Büyük ihtimalle predispozan genetik faktörler, konak immün yanıtı, endojen ve ekzojen tetikleyiciler ve çevresel faktörlerin etkileşmesi sonucu hastalık ortaya çıkmaktadır. Bağırsak mikroflorası ve diğer antijenlere karşı oluşturulan anormal immün yanıt, inflamasyon kaynaklı kolon hasarına yol açmaktadır (2,29).

Tablo 1. Crohn hastalığı ve ülseratif kolitin klinik ve diagnostik özellikleri (31)

	Crohn Hastalığı	**Ülseratif Kolit**
Semptom ve bulgular		
Karın ağrısı	+++	+
Diyare	+++	+++
Rektal kanama	+	+++
Urgensi ve tenesmus	+	+++
Kilo kaybı	+++	+
Ateş	+++	+
Malnütrisyon	++	+
Abdominal kitle	+++	+
Komplikasyonlar		
Sitrüktür	+++	+
Fistül	++++	0
Toksik megakolon	+	++
Perforasyon	++	+
Kanser	+	++
Tutulum paterni	**S**ıçrayıcı lezyonlar	Devamlı
Tutulan bölgeler	Gastrointestinal traktusun Herhangi bir parçası tutulabilir. Oral ve perianal hastalık olabilir. Sıklıkla ileum ve kolon tutulumu.	Sadece rektum ve kolon Nadiren çekal yama vardır *Backwash ileitis*
Endoskopik bulgular	Segmental inflamasyon Aftöz ve lineer ülserler Kaldırım taşı manzarası Psödopolipler	Yaygın inflamasyon Eritem Frajilite ve granülarite varlığı Vasküler belirginliğin kaybolması Psödopolipler sıktır
Histolojik bulgular	Transmural inflamasyon Granülom	Mukozal inflamasyon Kript abseleri
Radyolojik bulgular	İp işareti Bağırsak duvarı kalınlaşması Yağ birikimi Obstrüksiyon	Haustrasyon kaybı Toksik megakolon

Crohn Hastalığı

Hastalığa, 1932'de meslektaşları Ginzburg ve Oppenheimer ile birlikte, hastalığın özelliklerini açıklayan makaleyi yayınlayan, Dr. Burrill B. Crohn'un adı verilmiştir. Crohn hastalığı, kronik, tekrarlayan, transmural yayılım gösteren, ağızdan anüse kadar sindirim kanalının herhangi bir bölümünü etkileyebilen fakat en çok terminal ileum ve/veya kolonda görülen, etiyolojisi belirsiz bir hastalık çeşididir. Crohn hastalığında bağırsak iltihaplanması ve ülserasyon asimetriktir ve sağlıklı doku alanlarına serpiştirilmiş "noktalar" şeklinde oluşur ve granülomatöz lezyonlar halinde bağırsak duvarına derinlemesine uzanır. Crohn hastalığının, 15-35 yaş arasındaki genç yetişkinlerde, kadınları ve erkekleri eşit derecede etkilediği bildirilmiştir. Bununla birlikte, hastalığın, herhangi bir yaşta ortaya çıkabildiği ve vakaların yaklaşık %10'unun 18 yaşın altında olduğu tespit edilmiştir (32).

Crohn hastalığı gelişiminde, genetik faktörlerin oldukça etkili olduğu bildirilmiştir. Crohn hastalığı ile ilgili önemli gen bölgeleri tanımlanmış olup, bunlardan en belirgin olanları kromozom 16'da yer alan CARD15/NOD2 (34), kromozom 5 üzerinde bulunan OCTN1 geni (35) ve kromozom 10 üzerinde bulunan DLG5 genidir (36). CARD15/NOD2'nin bağırsak immün yanıtındaki rolü belirsizliğini korumaktadır, ancak genin mutasyonları ve fonksiyonunda meydana gelen değişikliklerin, bağırsak mukozal bariyerini ve bağırsak florasına karşı bağışıklık tepkisini bozabildiği gösterilmiştir (34). DLG5 geninin, Crohn hastalığının gelişmesinde daha az fakat önemli bir etkisi vardır. Sorumlu tam mekanizma belirlenmemiş olsa da DLG5, çeşitli organlarda epitel bütünlüğünü korumada fonksiyonel olan önemli bir iskelet proteinini kodlamaktadır (36). Bir iyon kanalını kodlayan, gen OCTN1, Crohn hastalığı riski üzerinde NOD2/CARD15'ten daha az etkilidir. Bu gendeki mutasyonlar, Crohn hastalığında bağırsak epitelindeki katyon taşıyıcıların işlevini ve hücreden hücreye sinyal geçişini bozabilir (35).

Yapılan araştırmalar, stresin Crohn hastalığına katkıda bulunan bir faktör olabileceğini göstermiştir. İlgili mekanizmalar, çalışılan hayvan modeline bağlı olarak geniş ölçüde değişiklik gösterir, ancak stres ve diğer çevresel faktörlerin bağırsaklarda hem sistemik hem de lokal bağışıklık durumunu etkilediği sonucuna varılmıştır. Stres sinyalleri, merkezi sinir sistemi tarafından algılanarak, sinyalin bağırsaklara nöroendokrin mediyatörleri aracılığıyla iletilmesini tetikler. Hipotalamik-hipofiz-adrenal eksen ve sempatik-adrenal-medüller eksen, bağırsaktaki salgı, emilim ve bariyer fonksiyonlarını düzenleyebilir (37). Crohn hastalığı, artan bağırsak geçirgenliği ile karakterizedir ve yapılan kapsamlı hayvan araştırmaları, stresin

kortikropropin salgılama, otonom sinir sistemi ve enterik sinir sistemi aracılığı ile bağırsak geçirgenliğini önemli ölçüde etkilediğini göstermiştir (38).

Crohn hastalığı gelişiminde bakteriyel etiyoloji için birkaç olası mekanizma öne sürülmektedir; 1. Bağırsak enfeksiyonuna yol açan spesifik bir patojene karşı immün yanıt, 2. Bağırsak sisteminin normal bakteri içeriğindeki değişiklikler, 3. Hasarlı bir mukozal bariyer ve yerleşik bakterilerin antijenlerine ve endotoksinlerine aşırı derecede maruz kalma ve 4. Bağırsak immün yanıtında değişiklikler (32,39). İBH olgularında mukozanın bakteriyel invazyonu saptanmış olup, ülseratif kolit hasta kolon örneklerinin %83.3'ünde, Crohn hastalarının ileumlarının %55.6'sında ve kolon örneklerinin %25'inde mukoza yüzeylerinde kontrollerdekinden daha fazla bakteri tespit edilmiştir (40).

Crohn hastalığı için çevresel risk faktörler arasında; sigara içme, erişkin apendektomi ve oral kontraseptiflerin kullanımı, steroid olmayan antiinflamatuvar ilaçlar ve antibiyotik kullanımı sayılabilmektedir (32). Coğrafik, ekonomik, eğitimsel ve mesleki durumlar risk faktörlerini etkileyebilmektedir. Crohn hastalığı gelişmiş ülkelerde daha sık görülür ve ofis çalışanları/memur ve kapalı alanlardaki bireyler ile çok fazla hareket gerektirmeyen mesleklere sahip kişilerde daha yaygındır. Hareketsizliğin bağırsak geçiş süresini geciktirdiği ve bu durumun, gıda antijenleri ile bağırsak mukozası arasındaki temasın artmasıyla sonuçlandığı düşünülmektedir (32,41).

İnflamatuvar Bağırsak Hastalıklarında Oksidatif Stresin Rolü

Oksidatif stresin, Crohn hastalığı da dahil olmak üzere İBH'nın patogenezinde önemli rol oynadığı düşünülmektedir (42). Reaktif oksijen türlerinin (ROS), bağırsak epitelinin yüzeyinde yer alan musini yıkarak, mukus bariyerini ortadan kaldırdığı ve bunun sonucu olarak nötrofil, monosit ve lenfosit gibi fagositik lökositlerin infiltrasyonunu ve bakteriyel toksinlerin lamina propriyaya difüzyonunu kolaylaştırdığı bilinmektedir (1-3). Serbest oksijen radikallerinin temel kaynağı olan lökositlerin (bilhassa nötrofillerin) infiltrasyonu aracılı ROS üretimindeki artışın yol açtığı oksidatif stres, kolon hasarının önemli bir tetikleyicisidir (42). Süperoksit dismutaz, glutatyon ve katalaz gibi endojen antioksidanların, normalde bağırsak mukozasındaki oksidatif stresi önleyebilmesine karşın, inflamasyon, bu önemli antioksidanlara olan talebi arttırmakta ve bunun sonrasında prooksidanlar ve antioksidanlar arasında ortaya çıkan dengesizlik mukozal hasara neden olmaktadır (1,43). Yapılan çalışmalarda; ROS'nin aşırı üretiminin ve antioksidan defans sistemindeki bozukluğun, inflamatuvar bağırsak hasarının gelişiminde önemli bir etken olduğu gösterilmiştir (42,44). Oksidatif stres ile immün

düzenleyici inflamatuvar faktörler arasındaki bağlantıyı inceleyen çalışmalar; ROS'nin, bazı inflamatuvar sitokinlerin salınımını düzenleyen nükleer faktör-kappaB'nin (NF-kB) aktivasyonunda rol oynadığını bildirmektedir (43). Ayrıca iltihaplı mukozada artmış protein karbonillerinin varlığı, serbest radikallerin, İBH'nda mukozal proteinlere zarar verebileceği teorisini desteklemektedir (32).

DENEYSEL KOLİT MODELLERİ

Deneysel hayvan modelleri; 20 yıldan fazla bir süredir, İBH'nda özellikle bağırsak homeostazisi ya da bağırsak homeostazisinin korunmasına ilişkin mukozal immünoloji hakkında ayrıntılı bilgi sağlamak amacıyla kulanılmaktadır. Tek bir modelin, insan İBH'nın karmaşıklığını tümüyle yansıtamadığı, ancak her bir modelin, hastalığın bir veya birden fazla ana belirtisine ilişkin önemli veriler sağlayarak, genel olarak insan İBH patogenezi ilkelerinin oluşturulmasına olanak sağladığı bilinmektedir. Çeşitli sebeplerle indüklenmiş ya da genetik tabanlı inflamasyonun, ortak immünopatageneze sebep olduğu, normal yerleşik bağırsak mikrobiyotasının bağırsak inflamasyonunu tetiklediği, epitel bariyerinin bozulduğu ve T hücre yanıtının yanısıra doğuştan gelen immün yanıtta meydana gelen defektlerin bağırsak inflamasyonuna katkıda bulunduğu gösterilmiştir (45).

Genel anlamda, deneysel kolit modelleri 5 kategoriye ayrılmaktadır (45). Bunlar;

1. Gen Knockout Modelleri; Bu kategori, indüksiyon yöntemlerine ve araçlarına bağlı olarak beş farklı alt kategori içermektedir,

- İnterlökin-2 KO/İnterlökin-2 reseptör (IL-2 KO/IL-2R) gen knockout fare,
- IL-10 gen knockout fare,
- T hücre reseptör (TCR) gen knockout fare,
- TNF-3' untranslated region (UTR) gen knockout fare,
- Trefoil faktörü eksikliği gen knockout fare

2. Transgenik Fare ve Sıçan Modelleri;

- IL-7 transgenik fare
- Sinyal dönüştürücü ve aktive edici transkripsiyon (STAT)-4 transgenik fare
- İnsan lökosit antijeni B27 (HLA B27) transgenik sıçan

3. Spontan Kolit Modelleri;

- C3H/HejBir fare

- SAMP1/Yit fare

4. Adoptive Transfer Modeller;

- Isı şok proteini (hsp) 60'a özgü CD8 T hücrelerinin transferiyle indüklenen kolit
- CD45RB transferiyle indüklenen kolit

5. İndüklenebilir Kolit Modelleri; çeşitli ajanların kullanımına bağlı olarak hastalık gelişimini sağlayan modellerdir;

- Asetik asitle oluşturulan kolit
- İodoasetamid ile oluşturulan kolit
- İndometasin ile oluşturulan kolit
- Trinitrobenzen sülfonik asit (TNBS) ile oluşturulan kolit
- Oksazolon koliti
- Dekstran sulfat sodyum (DSS) Koliti
- Peptidoglikan-Polisakkarit koliti

Trinitrobenzen Sülfonik Asit (TNBS) Aracılı Kolit Modeli

2,4,6-trinitrobenzen sülfonik asit (TNBS), hem histolojik hem de immünolojik seviyede insan İBH'na özellikle de Crohn hastalığına benzer olarak IL-12 aracılı T helper 1 (Th1) transmural inflamasyonu ile karakterize koliti indükler (46). Haptenleştirici ajan olarak TNBS'in intrarektal uygulanması; ajanın trinitrofenil grupları ile kolonik proteinleri haptenleştirerek, bu proteinleri bağışıklık sistemi için immünojenik hale getirmek suretiyle, duyarlı hayvan suşlarında kolite yol açan mukozal bağışıklık yanıtını başlatır (3,45,46). Bu modelde, bariyer kırıcı bir ajan olan etanolde çözünmüş TNBS hapteni kullanılır. TNBS etanolle birlikte kullanıldığında etanolün, bağırsak bariyerini etkili bir şekilde yok etmesinin ardından, TNBS kolon dokusu proteinleri ile etkileşime geçer. TNBS ile haptenleştirilen yüksek moleküler ağırlıklı proteinler, konakçı immün sisteminde immünojenik hale gelerek, hastalığa yol açan bağırsak mukozal immün yanıtı tetikler (3,46). Kolit indüksiyonundan sonra, hayvanlarda kanlı diyare şeklinde gözlenen anormal dışkılama gibi akut kolitin bazı belirtileri ortaya çıkar. TNBS/etanolün sıçanlara intrakolonik olarak uygulanması, kanlı diyare ile birlikte ilk hafta boyunca vücut ağırlığında belirgin bir azalmaya neden olur. Vücut ağırlığı kaybına; sıvı emilimini azaltmak gibi TNBS'in bağırsak üzerindeki direkt etkisinin yanı sıra, sistemik inflamatuvar cevabın da bu olayda rol oynadığı düşünülmektedir (3). TNBS'in SJL/J veya C57BL/10 farelere intrarektal olarak uygulanması, ciddi ishal, kilo kaybı ve rektal prolapsus

gelişiminin yanısıra, esas olarak Th1 aracılı bağışıklık tepkisi ile uyarılan ve $CD4^+$ T lenfositler, nötrofiller ve makrofajların lamina propriaya sızması ile başlayan ve ardından transmural tutulum gösteren inflamasyonla karakterize koliti indükler (3,46).

OTOFAJİ

Otofaji (kelime anlamı "kendi kendini yemek"); ökaryotik hücreler tarafından hücre için bir enerji kaynağı olan sitozolik bileşenlerin geri dönüşümü olarak tanımlanan, lizozom aracılı katabolik bir süreçtir. Otofaji; hücrelerin hasarlı organellerinin ortadan kaldırıldığı, protein agregatlarının temizlendiği, hücrenin besin açlığı süreleri boyunca hayatta kaldığı ve hücre içi patojen kleransı ve sitokin sekresyonunun düzenlendiği fizyolojik süreçlerde kilit rol oynayan, hücresel strese karşı bir yanıt mekanizmasıdır. Sonuç olarak otofaji; hem doğal hem de edinilmiş bağışıklıktaki rolünün yanı sıra, metabolik ve inflamatuvar yanıtların düzenlenmesinde de oldukça önemlidir (48,49).

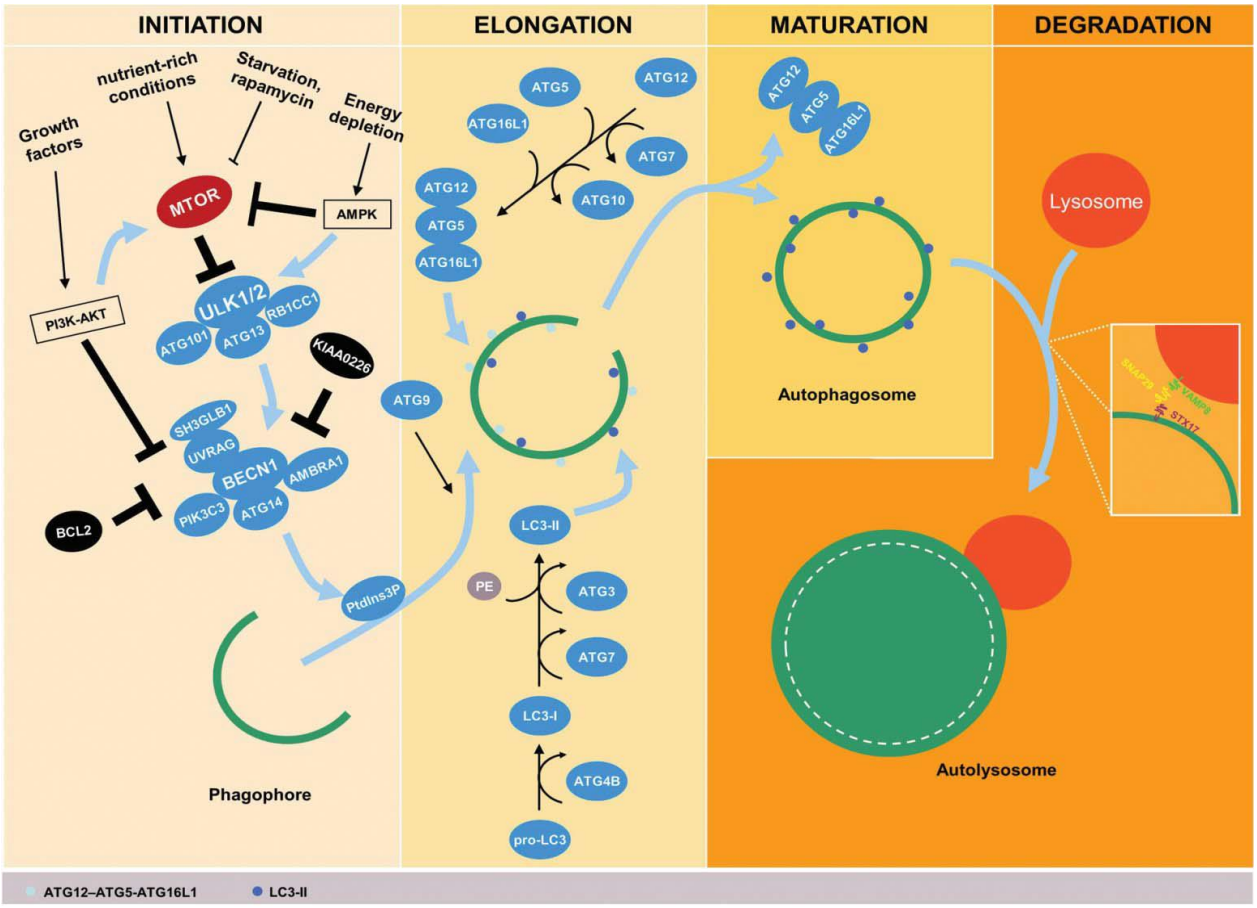
Otofajinin klasik rolü; hücre içi materyalleri veya patojenleri saptamak, kapsüllemek ve yıkmak olsa da otofajinin, sitokinlerin, antimikrobiyal peptitlerin ve müsinlerin salınımı, antijen sunumu ve apoptoz gibi hücresel yanıtları içeren ilave rollere sahip olduğu bilinmektedir (12). Otofaji stres oluşturucunun tespiti, çok katlı membran yapısının başlatılması, kargo seçimi, otofagozomal membranın uzaması ve son olarak otofagozomun parçalanması için lizozom ile birleşmesini kapsayan aşamalı bir süreçtir (Şekil 1) (48,50). Bu aşamaların sorunsuz bir şekilde gerçekleştirilebilmesi için çeşitli proteinlere ihtiyaç duyulmaktadır (50,51);

1. Otofagozom oluşumunun ilk aşamalarında yer alan; ULK1 kompleksi (unc-51-like kinase 1 (ULK1)), Sınıf III fosfatidilinositol 3-kinaz (phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)) kompleksi, beclin-1 ve Sınıf III PI3K Vps34 (Class III PI3K Vacuolar protein sorting 34),

2. Otofagozomun uzaması ve kapanmasında rol oynayan; otofaji ilişkili genler (ATG) 5, 7, 12 (ATG5, ATG7, ATG12)) ve ATG16 benzeri 1 (ATG16L1),

3. Otofagozomlar oluşturarak kargo alımından sorumlu olan çeşitli otofajik düzenleyiciler; Mikrotübül ilişkili proteinler 1A/1B hafif zincir 3 beta (LC3), gama-amino butirik asit reseptör ilişkili protein (GABARAP) ve gama-amino butirik asit reseptör ilişkili protein benzeri 2 (GABARAPL2),

4. Otofagozomların lizozom ile füzyonu için gerekli olan otofaji ilişkili gen 14 (ATG14).



Şekil 1. Otofajik yolağın şematik aşamaları (50).

Hipoksi, besin azlığı, ROS ve protein agregatlarının artışı gibi hücresel stres uyaranlarının, otofajiyi tetiklediği bilinmektedir. Bu uyaranlar, otofajinin iki önemli düzenleyicisi olan, rapamisinin memeli hedefi (mammalian target of rapamycin (mTOR)) ve 5' adenozin monofostatın aktive ettiği protein kinaz (AMP-activated protein kinase (AMPK)) üzerinden etki gösterir (Şekil 1). Hücre büyümesi, çoğalması ve metabolizmasının düzenlenmesinde ve hayatta kalma sürecinde rol oynayan mTOR, esas olarak bir serin/trionin protein kinazdır. Hücre içi metabolik yanıtları düzenleyici temel yolağı yöneten rapamisin memeli hedefi kompleks 1 (mammalian target of rapamycin complex 1 (mTORC1)) yani mTORC1 protein öbeği, mTOR ve bunun düzenleyicilerinden oluşmaktadır. Yeterli hücre içi besin varlığında bu yolak, ULK1 kompleksi ve ATG13 proteinlerini fosforilleyerek otofajik yıkımın başlamasını engeller. Fizyolojik koşullar altında; AMPK aktivitesi ise hücre içinde yüksek adenozin trifosfat (ATP) seviyeleri tarafından inhibe edilir. Besin yoksunluğu gibi hücre içi AMP üretimini arttıran hücresel stres durumunda, AMPK aktive olur ve mTOR baskılanır. ULK1, besin yoksunluğunu takiben hücrenin hayatta kalması için gereklidir ve bu

ULK1 deki AMPK bölgesinin fosforilasyonunu gerektirir. Ayrıca, ULK1 üzerinde doğrudan mTOR fosforilasyon bölgesinin bulunduğu gösterilmiştir. Çalışmalar, AMPK'nin ULK1'i doğrudan aktive eden veya mTORC1 kompleksi 1'in ULK1 üzerindeki baskılayıcı etkisini önleyen çift yönlü bir mekanizmayla otofajiyi tetikleyebileceğini göstermektedir. Sonuç olarak, mTOR aktivitesinin kaybı otofajik cevabı aktive etmek için önemli bir işarettir (52). Besin bakımından zengin koşullar altında, mTOR, otofajiyi bastırıcı görevi gören Foxk proteinlerinin transkripsiyonel aktivitesini arttırır. Bu mekanizma sayesinde, mTOR, temel otofaji genlerini baskılayarak, bazal otofajiyi sınırlandırır (53). Çalışmalar; mTOR yolağının, otofajinin aktivasyonuyla ilişkili olduğunu ve mTOR yolağının downregülasyonunun otofajiyi aktive edebileceğini göstermektedir (9,11,15,54).

Bir stres oluşturucu tespit edildikten sonra iki kinaz kompleksi, otofagozom nükleasyon proteinlerini almak ve çok lamelli otogafozomal membranın uzamasını uyarmak için aktive edilir. Doğrudan bir mTOR hedefi olan ULK1 kompleksi, PI3K kompleksi için uyarıcı bir sinyal yayar. PI3K kompleksi; kargo seçimi ve membran uzaması için gerekli olan otofaji-ilişkili proteinlere bağlanma bölgeleri oluşturmak için lipit membranın oluşumu ve düzenlenmesinde gereklidir (48). Otofagozomal membranın nükleasyonu ve uzamasını içeren otofagozom oluşumu, Beclin-1 kompleksi, Atg12 ve LC3 gibi proteinlerin aktivitesine bağlıdır (6). İki farklı ubikitin benzeri konjugasyon sistemi, otofagozomal membranın uzamasına ve kapanmasına neden olur. Atg7/10 sisteminin fonksiyonu, Atg12'yi Atg5'e kovalent olarak bağlayarak otofagozom mambranı ile birleşmek üzere daha büyük bir Atg 16L1 kompleksi için bir çekirdek oluşturmaktır. Diğer konjugasyon sistemi Atg 4/7/13; LC3'ü hedef alır ve LC3-I olarak adlandırılır. LC3-I, Atg4 proteazı tarafından parçalanır ve sonra LC3-II'yi oluşturmak üzere Atg3 ve Atg7 ligazları tarafından fosfotidiletanolamine konjuge edilir. Bu aşamanın ardından; LC3-II, p62 gibi kargo seçim adaptör proteinleri için kenetlenme bölgeleri sağlamak amacıyla, Atg16L1 kompleksinin etkisiyle otofagozom zarına gömülür (Şekil 1). Otofagozom membranı kapanarak otofagozomu oluşturur ve daha sonra lizozomla birleşme sonucunda oluşan otofagolizozom içinde, kargo bozulur (48,49).

Otofajinin, inflamatuvar yanıtların düzenlenmesi üzerindeki kritik rolü; İBH da dahil olmak üzere birçok otoimmün ve kronik inflamatuvar hastalıkta, disfonksiyonel otofajinin bir neden ya da katkıda bulunan bir faktör olarak gösterilmesiyle ortaya konulmuştur (48,49). Bir proinflamatuvar kompleks olan B-Hücre Lenfoma/Lösemi 10 (BCL10) degradasyonunun, otofaji ile gerçekleştiği ve bu süreçte p62'nin ekspresyonunun gerekli olduğu bildirilmiştir (48). BCL10 nun yüksek sitosolik seviyesinin (birikiminin), kanonik (Iκ-Bα nın fosforilasyonu ile)

veya kanonik olmayan (NIK fosforilasyonu ile) yolaklar aracılığı ile NF-kB nin aktivasyonunu düzenlediği bilinmektedir (55,56). T hücre aktivasyonu, TCR tarafından yabancı bir antijen tanınması ile tetiklenir. TCR'nin anijenle etkileşimi NF-kB dahil olmak üzere anahtar transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonuyla sonuçlanan, hücre içi kompleks-kademeli bir sinyal sistemini başlatır. Adaptör protein olan BCL10, TCR'yi kappaB kinase (IKBK/IKK) kompleksinin inhibitörüne bağlayan yolakta gerekli bir aracıdır. IKBK aktivasyonu; NF-kB nüklear translokasyonunu tetikleyerek T hücre çoğalması, farklılaşması ve fonksiyonu için gerekli olan genlerin transkripsiyonunu başlatır. TCR'ye bağımlı olarak BCL10'nun poliubikutinasyonu; p62 (sitosolik kümelerde) ile etkileşimini tetikler. Aynı zamanda p62'nin aynı anda BCL10 ve LC3+ otofagozomlarıyla kendiliğinden etkileşime girdiği de tespit edilmiştir. p62-LC3 etkileşimi, p62'e bağlı BCL10'un otofajik alımı ve bozunması ile sonuçlanır. Böylece BCL10'un aktif poliubikutinleşmiş formu tükenir ve NF-kB aktivasyonu sınırlandırılır (57).

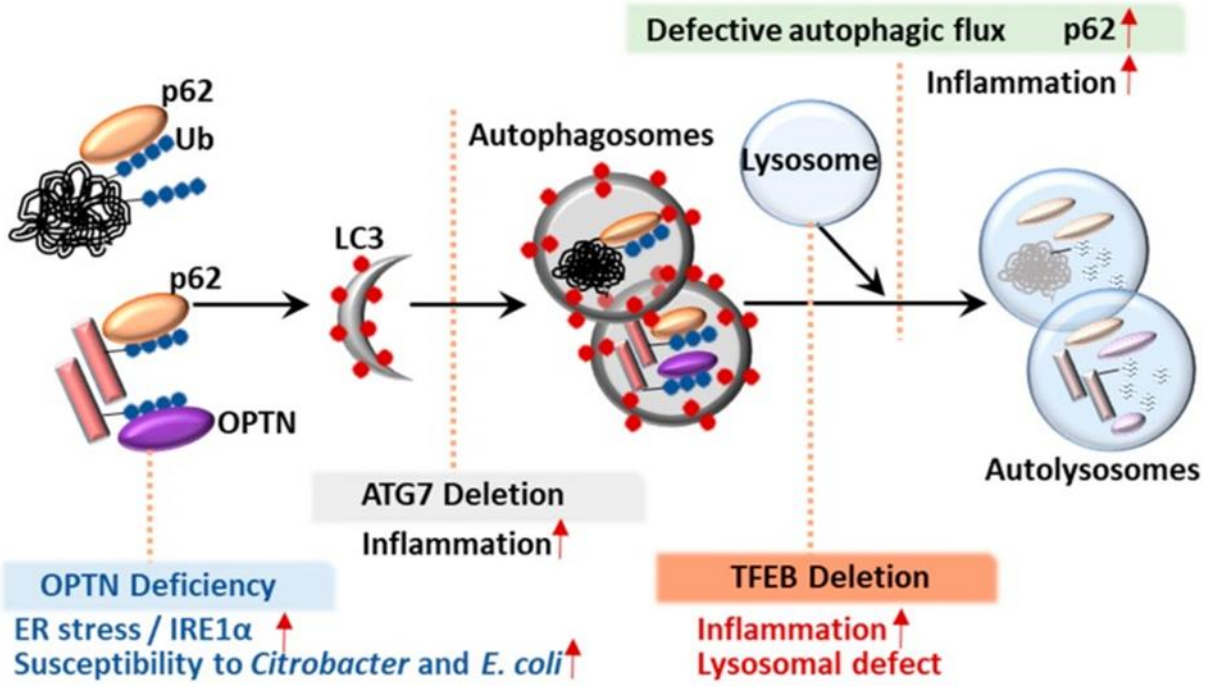
Beclin-1

Memelilerdeki otoloğu Atg6 olan, 1998'de ilk kez Beth Levine grubu tarafından mayalardan klonlanan Beclin-1'in otofajide merkezi bir role sahip olduğu bilinmektedir (7). Birçok insan dokusunda eksprese edilir ve esas olarak ER, mitokondri ve perinükleer membran dahil olmak üzere sitoplazmik yapılar içerisinde lokalizedir. İnsan kolon kanseri dokusunda imminohistokimyasal yöntemle gözlendiğinde plazma zarı, sitoplazma ve nukleusa yayılmış haldedir (58). Beclin-1, sınıf III PI3K Vps34 ile etkileşime bağlı olarak, otofajik proteinlerin pre-otofagozomal yapıya (pre-autophagosomal structure (PAS)) lokalizasyonu için önemlidir. Bu proteinler hep birlikte Beclin-1-Vps34-Vps15 çekirdek kompleksini oluştururlar (59). Yapılan çalışmalar, Beclin-1'in, çeşitli fizyolojik ve patolojik süreçlerle ilişkili otofajide membran uzamasını koordine ettiğini göstermektedir (7).

Sequestosome 1 (SQSTM1/p62)

İnsanlarda sequestosome 1 (SQSTM1) olarak da bilinen p62, sitozolik proteinlerin agregasyonuna bağlı olarak farklı kronik, toksik ve dejeneratif hastalıklarda biriken bir mono veya poliubikutin bağlayıcı proteindir (60). Hücrenin çeşitli oksidatif uyarıcılara maruziyeti sonucunda indüklenen bir stres yanıt proteini olarak bilinen p62, otofaji ve apoptozisin düzenlenmesi yoluyla, sitotoksik strese cevaben hücre canlılığını kontrol altına alır (61). Bir otofaji reseptörü ve otofaji için özel bir substrat olan p62, otofajik süreçte kargo oluşumunda görev yapan, selektif otofajinin önemli regülatörüdür (62). Otofajik bir reseptör olarak p62,

otofaji sırasında ubikutinlenmiş proteinleri otofaji-lizozom yoluna aktarır (61). p62, selektif otofajide LC3 ve ubikutinlenmiş substratlar arasında bir bağlantı görevi görür (63). p62 ve p62'ye bağlı ubikutinlenmiş proteinler, tamamlanmış otofagosomun içine katılır ve otolizomomlarda parçalanır, bu nedenle otofajik yıkım indeksi olarak işlev görür. Artmış otofajik aktivite ile p62 degrade edildiğinden, sitoplazmada p62 birikimi, genellikle azalmış ya da yetersiz otofajik aktivitenin bir işareti olarak kabul edilir (Şekil 2) (6). Selektif otofaji dışında, otofaji aracılı patojen kleransı olarak bilinen ksenofajinin aktivasyonunda da post-translasyonel değişiklikler (ubikutinasyon) ve p62 proteinlerinin rol aldıkları bilinmektedir (64). Fizyolojik koşullarda, bazal otofaji aracılığı ile sürekli bozulmaya uğraması (harcanması) nedeniyle, hücre içi p62 seviyeleri oldukça düşüktür (65). Hayvan ve insan çalışmaları; İBH' da bozulmuş otofajinin etkisiyle p62 seviyelerinin artmış olduğunu bildirmektedir (9,10).



Şekil 2. Bozulmuş otofajik süreç ve ilişkili proteinler (66).

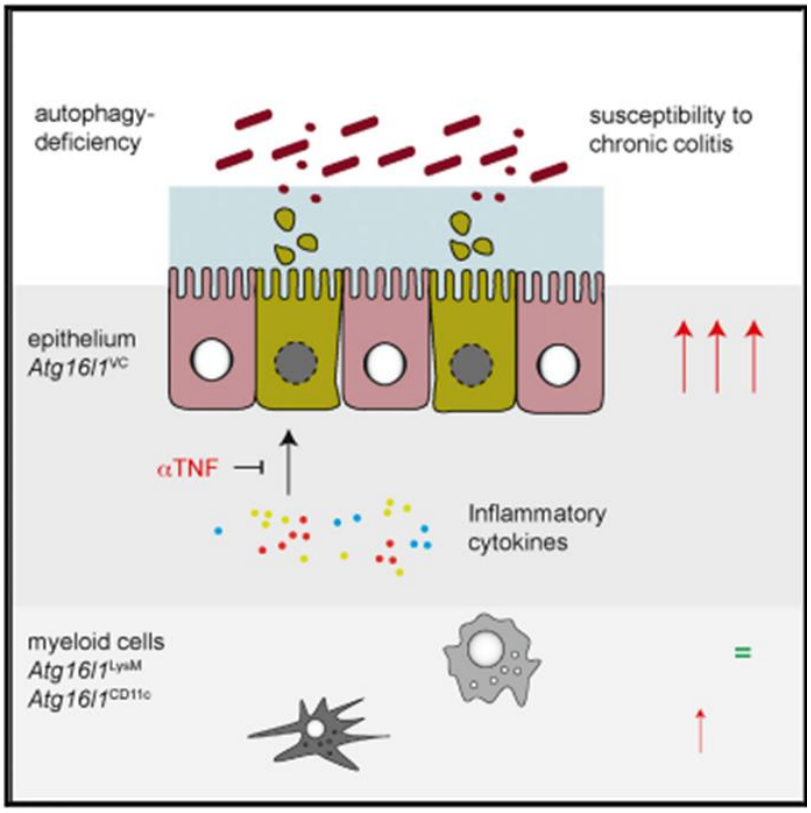
İnflamatuvar Bağırsak Hastalıkları ve Otofaji

İnflamatuvar bağırsak hastalığının patogenezi karışıktır ve genetik olarak duyarlı bir konakçıda, kronik intestinal inflamasyona yol açan çoklu risk faktörlerini içerir. Crohn hastalığı ve ülseratif kolit ile ilişkili genetik varyantların çoğu hücrelerdeki otofajik mekanizmayı kontrol

eden proteinler de dahil olmak üzere, bağırsakların bağışıklık yanıtını etkileyen düzenleyici proteinleri etkiler. İBH ile ilişkili genetik polimorfizmler otofaji yolunun tüm basamaklarını etkiler. Yapılan çalışmalarda, birçok kanıt İBH hastalarında otofajinin bozulduğunu göstermektedir. İBH başlangıcında disfonksiyonel otofajinin nasıl katkıda bulunduğu araştırmacılar tarafından halen araştırılmaktadır (48). İBH'na duyarlılığın temel nedenlerini açığa çıkarmak üzerine yoğunlaşmış büyük ölçekli genetik analizlerin sonucunda; İBH ile ilişkili 200'den fazla gen lokusu tespit edilmiştir. Bunların çoğu; doğal mukozal immünite, sitokin üretimi, lenfosit aktivasyonu ve epitelyal bariyer bütünlüğüyle ilişkili proteinlerin yanı sıra otofajide rol oynayan proteinler ile interlökin-23 reseptör ve Janus-activated kinase (JAK) sinyalleşmesini içeren, bir dizi bağışıklıkla ilgili yanıtlarda anahtar reseptörlerin ve sinyalleşme proteinlerinin fonksiyonunu kodlar ya da düzenler (67).

Otofaji ile ilişkili genetik değişiklikler (varyantlar) hem Crohn hastalığı hem de ülseratif kolit ile örtüşmektedir, bununla birlikte tanımlanan değişikliklerin çoğunluğu ileal Crohn hastalığı ile daha çok ilişkilendirilmiştir. Bu güçlü ilişkiye rağmen otofaji varyantlarını taşıyan bireylerde tahmini hastalık gelişimi düşüktür. Dikkat çekici bir örnek, Atg16L1 T300A polimorfizmine bağlı Crohn hastalığı duyarlılığıdır, fakat bu durum aynı zamanda İBH gelişmeyen sağlıklı bireylerin büyük bir kısmında da mevcuttur. Atg3, Atg5, Atg7 veya Atg16L1'in bozukluğu, ciddi Crohn hastalığı benzeri transmural ileit ile sonuçlanır (49,68).

Otofaji ilişkili genlerdeki varyantlar bağırsaklarda doğuştan gelen ve edinilmiş inflamatuvar yanıtları çok yönlü etkiler. Bunlar bakteriyel, fungal ve viral klerans, Paneth hücrelerinin antimikrobiyal peptit üretiminin yanı sıra sitokin üretimi, antijen sunumu ve endoplazmik retikulum stresine (ER stresi) yanıt gibi değişiklikleri içerir (12). Çalışmalarda otofajik defektlerin; Goblet hücre fonksiyonu ve dolayısıyla mukus üretimini etkilediği ve enterositlerin emilim fonksiyonlarını azalttığı bildirilmiştir (13). Genetik olarak otofaji ile ilişkili bazı genleri susturulmuş ya da eksik farelerde; bozulmuş otofaji nedeniyle Goblet hücrelerinin morfolojilerinin değiştiği ve belirgin olarak mukus sekresyonunun azaldığı ve bu durumun mikrobiyotanın epitel tabakaya kronik inflamasyonuna ya da mikrobiyotaya karşı immün tepkilerin gelişmesine neden olarak İBH'nın gelişmesine katkı sağladığı gösterilmiştir (Şekil 3) (14,48).



Şekil 3. İnflamatuvar bağırsak hastalıklarında otofajinin rolü (14).

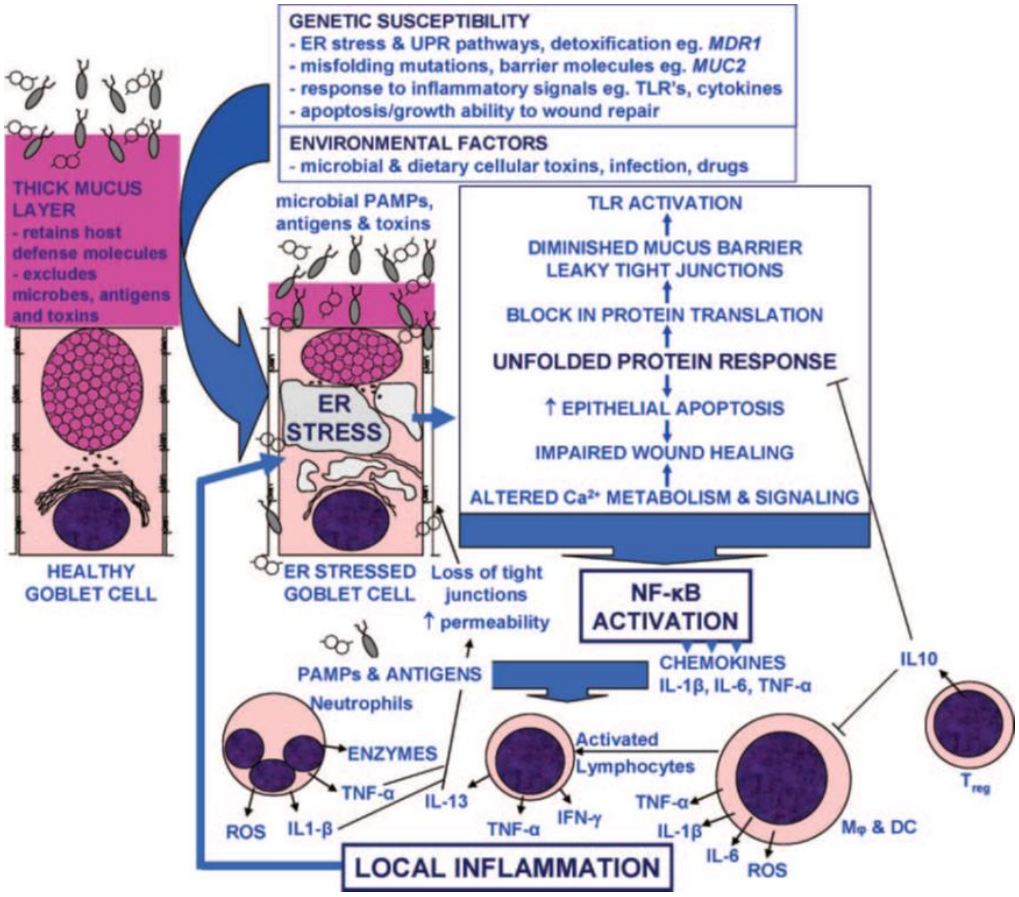
Paneth hücreleri antimikrobiyal peptit üretimi ve krinofaji yoluyla sekresyon dahil olmak üzere birçok fizylojik fonksiyonu koordine eden, ince bağırsağın oldukça uzmanlaşmış epitelyal hücreleridir. Yüksek seviyede lizozim üretirler, bağırsakta mikrobiyal kompozisyona şekil veren ve mukus bariyerini koruyan insan defensin 5 ve 6 (HD-5 ve HD-6) sentezlerler (13). Paneth hücrelerindeki disfonksiyonel otofajinin, intestinal dysbiosis (kalın bağırsakta bakteriyel bozulma) yoluyla bireyleri çevresel etkilere duyarlı hale getirerek İBH'na katkıda bulunabileceği gösterilmiştir (69). Genetiği değiştirilmiş farelerde; Atg5, Atg7 veya Atg4B'nin azalmış seviyelerinin, anormal Paneth hücre fonksiyonuna ve inflamatuvar mediyatörlerin üretiminde artışa neden olduğu, Atg16L1 proteini azaltılmış transgenik farelerde, Paneth hücre morfolojisinin bozulduğu ve ileumda Crohn hastalığı benzeri iltihaba neden olduğu bildirilmiştir (69).

Otofaji; sadece invazif patojenlere karşı bir bağışılık yanıtının oluşmasında değil, aynı zamanda bağırsak inflamasyonunu azaltmak için hücre içindeki inflamatuvar tepkilerin dengelenmesinde de önemli rol oynamaktadır (14,48). Fare modellerinde otofaji yolaklarında rol oynayan Atg7 ve Atg16L1 proteinlerinin eksiklikleri, hem invitro hem de invivo olarak

makrofajlarda, inflamatuvar tetikleyicilere karşı IL-1β ve IL-18'in yüksek miktarda salgılanmasına yol açmıştır (49,70).

Dendritik hücreler, edinilmiş bağışıklık sisteminin ayrılmaz bir parçasıdır. Lenfoid doku ya da bağışıklık organlarında, çevrelerinde ve ayrıca intestinal mukozada bulunurlar. Dendritik hücrelerin ana işlevi lenfositlerin major doku uyumu kompleksleri sınıf I (MHC I) ve sınf II (MHC II) yönlendirilmesi ve sunumudur. Disfonksiyonel otofajinin, hayvan modellerinde antijen sunumuna dair süreçlere müdahale ettiği gösterilmiştir (71,72). NOD-2 aracılı otofaji hem bakteriyel işleme hem de dendritik hücrelerde MHC-II aracılı CD4-T hücresi yanıtlarının oluşturulması için gereklidir. İnsanlarda antijen sunumu ile İBH defektleri arasında güçlü bir ilişki olduğu bilinmektedir (71).

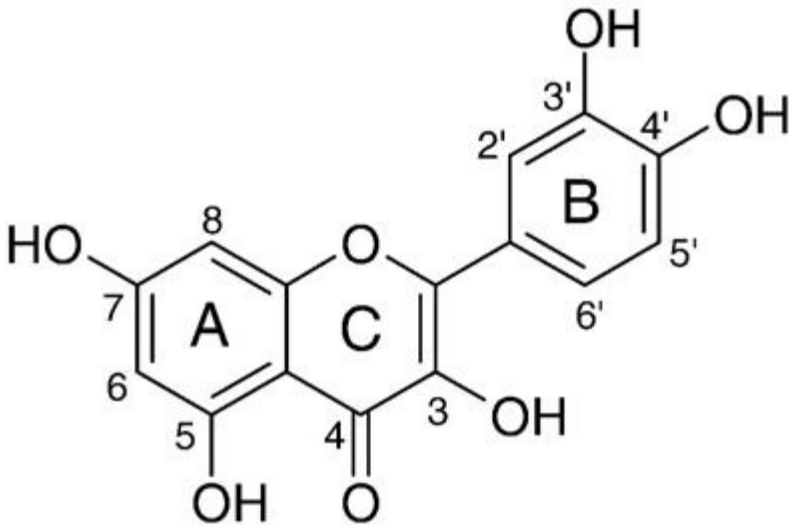
Endoplazmik retikulum stresinin İBH patogenezinde rol oynadığı ve disfonksiyonel otofajinin erken belirteci olduğu düşünülmektedir (Şekil 4) (48,73). İBH hastalarının inflamasyonsuz intestinal mukozasında ve aynı zamanda Atg16L1 T300A risk genotipine sahip sağlıklı bireylerin mukozasında, ER stresi aracılığı ile aktive edilen çeşitli proteinlerin seviyelerinde artış gözlemlenmiştir (13). Katlanmamış proteinler ER stresini tetikler. Katlanmamış protein cevabı, birçok yolla hücresel yanıtı kolaylaştırır. İnositol gerektiren enzim 1 (inositol-requiring enzyme 1 (IRE1)) bu yollardan biridir ve hem İBH hem de otofaji ile ilişkilidir. X-kutu bağlama protein 1 (X-box binning protein 1 (XBP1), IRE1 yolağının anahtar bir bileşenidir. Genetik varyasyon sonucu XBP1 ifadesinde azalma, İBH ile ilişkilidir (48). Ayrıca epitelyal hücrelerde IRE1 yolağına müdahale, Goblet hücrelerinin kaybı ve bağırsak epitel bariyerinde azalmayla sonuçlanır (74).



Şekil 4. Bağırsak inflamasyonu patofizyolojisinde endoplazmik retikulum stresinin rolü (73).

QUERCETİN

En iyi bilinen flavonoidlerden biri olan quercetin (3,3’,4’,5,7-pentahidroksiflavon); yapısında 3,3',4' ve 5,7 pozisyonlarında –OH bağlı olan polifenol grubu bir antioksidandır (Şekil 5) (75). İlk kez 1857 yılında meşe *(Quercus)* ağacı reçinesinden elde edilmiş ve bu dönemden itibaren insan diyetine dahil olmuş; antioksidan, antiinflamatuvar, antiviral, antikanser ve kardiyoprotektif etkili bir bioflavonoiddir (75,76). Keşfinden sonra, 1970’li yıllara kadar vitamin P olarak bilinen quercetinin; Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (Food and Drug Administration-FDA) tarafından güvenli bir madde olarak kabul edilmesi, 2000’li yıllara uzanmaktadır (77).



Şekil 5. Quercetinin yapısal formülü (75).

Bitkilerde yaygın olarak bulunan flavonoid glikozitleri içeren quercetin; elma, kızılcık, fındık, kırmızı şarap, greyfurt, yeşil çay, ahududu, yaban mersini, kiraz ve brokoli gibi birçok sebze ve meyvede, genellikle sarı renkli kristaller halinde bulunur (75,76). Diyetle alınan quercetinin %5-20'sinin, büyük oranda ince bağırsaklardan emilmek suretiyle sindirim sisteminde kaldığı ve ayrıca kolon, karaciğer, böbrek ve akciğer gibi pek çok dokuya yayıldığı gösterilmiştir. Albumine bağlanan quercetin, alındıktan 30 dakika ve 8 saat sonra bifazik olarak plazmada en yüksek seviyeye ulaşır. İnsanlarda eliminasyonu oldukça yavaş olup, yarılanma ömrünün 11-28 saat olabileceği bildirilmiştir. Quercetinin, başlıca böbrekler aracılığı ile idrarla atıldığı tespit edilmiştir (78,79).

Quercetin, antioksidan, antikarsinojen, antiviral, antibakteriyel ve anti-inflamatuvar etkileri nedeniyle, son yılların dikkat çekici besinsel antioksidanları arasına girmiştir (76) Aynı zamanda quercetinin, bu özelliklerine ilaveten dendritik hücre fonksiyonu üzerinde immünosüpresif bir etkiyle, bağışıklık yanıtlarını düzenleyici role sahip olduğu bildirilmiştir (27,80-83).

Quercetin'in en dikkat çekici özelliklerinden biri inflamasyonu modüle etme kabiliyetidir. Hayvan modelleri ve insanlar üzerinde yapılan çalışmalarda, quercetinin, nitrit oksit (nitric oxide (NO)) sentaz, COX-2 ve C-reaktif protein (CRP) gibi inflamatuvar aracılarının seviyelerini azaltarak, akut ve kronik inflamasyonu inhibe ettiği bildirilmiştir. (27,80-83). Quercetin'in anti-inflamatuvar etkisi, pek çok çalışmada antioksidan ve serbest radikal temizleme özelliği ile ilişkilendirilmiştir (27,84). ROS sadece oksidasyon sürecinde

etkili değildirler, aynı zamanda, TNF-a sitokinlerin üretimini indükleyen NF-kB gibi transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonu ile inflamatuvar tepkiye de katılmaktadırlar (85,86). Bu nedenle, ROS elimine edilmesi, oksidasyonu ve dolayısı ile inflamasyonu önleyebilir. Ayrıca yapılan çalışmalarda quercetinin, NF-kB'nin düzenlenmesi yoluyla TNF-a'nın gen ekspresyonunu inhibe ettiği bildirilmiştir (83,87).

Quercetinin de ait olduğu polifenolleri içeren çeşitli bitki metabolitlerinin; otofaji gibi önemli bir mekanizmaya etki ettiği ve hatta düzenlediği tespit edilmiştir (22-26). Polifenollerin potansiyel olarak otofajiyi indüklediği, hatta çeşitli yollarla canlıların yaşam süresini uzattığı bulunmuştur. Quercetin ve resveratrol gibi bilinen polifenolik otofaji indükleyicilerinin, sirtuin aktivasyonu ile ökaryotların ömrünü uzattığı saptanmıştır (88). Bu polifenoller; FOXO transkripsiyon faktörlerinin hedef genleri üzerindeki pozitif etkileri, ana otofaji genlerinin deasetilasyonu (ve dolayısıyla aktivasyonu) ve AMPK ile etkileşimleri yoluyla otofajiyi indükler (89). Polifenollerin başka bir transkripsiyon faktörü olan NF-kB üzerinden, pro-otofajik (90) etki ve anti-otofajik (91) etki ettiğini gösteren çalışmalar bulunmaktadır. NF-kB, pro-inflamatuvar proteinlerin transkripsiyonunu yükseltir ve hücresel içeriğe bağlı olarak otofajiyi indükler veya baskılar (92).

GEREÇ VE YÖNTEMLER

Çalışmamızda, araştırma izni Trakya Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul'u tarafından onaylanan (TÜHADYEK-2018/03) "Deneysel Kolit Modelinde Endoplazmik Retikulum Stresi Üzerine Quercetinin Etkisinin İncelenmesi" isimli projenin hibe dokuları kullanılmıştır (Ek 1 ve 2). Projede, Trakya Üniversitesi Deney hayvanları Araştırma Birimi'nden temin edilen 24 adet Wistar albino dişi sıçandan rastgele üç grup; Grup I; kontrol grubu (n=8), Grup II; kolit grubu (n=8), Grup III; kolit+quercetin grubu (n=8)) oluşturuldu. Denekler, deney süresi boyunca optimum laboratuvar koşulları (22±1 ^{0}C, 12 saat aydınlık/karanlık siklusunda) altında, günlük içme suyu ve %21 ham protein içeren pelet yemlerle (Purina) beslendi.

TRİNİTROBENZEN SÜLFONİK ASİT ARACILI KOLİT MODELİ

Çalışmada, TNBS aracılığı ile oluşturulmuş kolit modeli kullanılmıştır. İnsandaki Crohn hastalığıyla önemli derecede benzerlik gösteren TNBS ile indüklenen kolit; tekrarlanabilir, kolay uygulanabilir ve düşük maliyetli olması nedeniyle, yaygın olarak deneysel hayvan modeli olarak kullanılmaktadır (46,93). Kolit indüksiyonu; 24 saat öncesinde aç bırakılmış 2. ve 3. grup deneklere, ketamin anestezisi altında iken, dış çapı 2mm olan plastik bir kateterin (6Fr kateter) anüsten itibaren 8 cm proksimale yerleştirilmesi aracılığı ile her bir deneğin kolonu içerisine, tek doz halinde, 0,25 ml %30 luk etanol içerisinde hazırlanmış, 25 mg TNBS (Sigma-Aldrich, MA, USA) verilmek suretiyle yapıldı ve erken bir sızıntıyı engellemek için denekler indüksiyondan sonra, 30 saniye rektum yukarıda olacak şekilde bekletildi (93). Kontrol grubu deneklere aynı teknikle, rektal yoldan 0,25 ml serum fizyolojik uygulandı. Kolit indüksiyonundan hemen sonra başlayarak 7 gün boyunca günde bir kez, 3.

grup deneklere, intragastrik yoldan, 0,5 ml dimetil-sülfoksit (DMSO) içerisinde 100 mg quercetin olacak şekilde hazırlanmış, 100 mg/kg quercetin (Alfa Aesar, Ward Hill, Massachusetts, USA) (27), kontrol ve 2. grup deneklere ise aynı şekilde 0,5 ml/kg DMSO verildi.

Çalışmada, TNBS ile kolit indüksiyonundan sonra tüm deneklerin günlük olarak vücut ağırlığı ve dışkı takipleri yapılarak, denekler kolit gelişimi açısından klinik olarak değerlendirildi.

İndüksiyondan 7 gün sonra, ketasol (Ricterpharma, Viyana, Avusturya) ve basilazin (Rompun, İstanbul, Türkiye) anestezisi altında, deneklerin anal orifisinin 2 cm proksimalinden itibaren 6 cm lik kolon segmenti çıkarıldı. Çıkarılan kolon dokusu, tartılıp, makroskopik olarak değerlendirildikten sonra, histopatolojik incelemeler için rutin olarak işlemlendirildi.

MAKROSKOBİK DEĞERLENDİRME

Makroskobik değerlendirme; çıkarılan 6 cm'lik kolon kısmının anti-mezenterik sınır boyunca açılıp, soğutulmuş sf ile içeriği temizlendikten sonra Tablo 2'de gösterilen kriterlere göre yapıldı. Bunun için her bir kolon; diyare, hiperemi, adezyon, ülserasyon ve megakolon gibi parametreler göz önüne alınarak, 0 ile 15 arasında skorlandı (94).

Tablo 2. Deneysel kolit modeli makroskobik hasar skorlama kriterleri (94).

	Makroskobik skor			
Özellik	**0**	**1**	**2**	**3**
Dışkı	Normal	Yumuşak dışkı	Diyare	Kanlı diyare
Hiperemi	Yok	Fokal	Fokal ve duvarda	Duvarda aşırı kalınlaşma
Adezyon	Yok	Hafif	kalınlaşma	Yaygın
Megakolon	Yok	Hafif	Orta	Toksik megakolon
Ülserasyon	Yok	Alanda < 1 cm (hafif)	Alanda > 1 cm (orta)	2 cm < alanda (yaygın)

IŞIK MİKROSKOBİK İNCELEME VE MİKROSKOBİK DEĞERLENDİRME

Işık mikroskobik incelemeler için; kolon doku örnekleri, %10'luk tamponlanmış nötral formalinde (Sigma-Aldrich) fikse edildikten sonra, dokular bir gece akarsuda yıkandı. Ardından sırasıyla %70, %80, %90, %96'lık alkollerden, 1'er saat; 2 tekrar ve 1,5 saat olmak

kaydı ile mutlak alkolden geçirilerek dehidratasyon işlemi tamamlandı. Daha sonra saydamlaştırma basamağı için dokular 3x15 dakika toluol (Merck Millipore, Darmstadt, Almanya) ile muamele edildikten sonra, 45 dk. boyunca 42-45 ^{0}C sıcaklıktaki yumuşak parafinde (Merck Millipore) bekletildi. Bu sürenin sonunda dokular yumuşak parafinden, sıvı sert parafine (Merck Millipore) alınarak, bloklandı. Parafin dispenser yardımı ile elde edilen parafin bloklardan, histopatolojik incelemeler için Leica RM-2245 silindirli mikrotom kullanılarak 5 μm kalınlığındaki kesitler alınarak, Hematoksilen+Eozin (H&E), Masson trikrom, toluidin mavisi ve histokimyasal Periodik asit Schiff (PAS) boyamaları uygulandı.

Hematoksilen+Eozin

Parafinin giderilmesi amacıyla, 30 dk. boyunca toluol ile muamele edilen kesitler sırasıyla %100, %96, %90, %70'lik alkol serilerinden geçirilerek, suya indirildi. Kesitler 5 dk. boyunca Mayer's hematoksilen (Merck Millipore) ile muamele edildi. Daha sonra morartma işlemi için akan çeşme suyu altında 10 dk. bekletilen kesitlere, 3 dk. Eosin (Merck Millipore) uygulandı. Dehidratasyon için; sırasıyla yükselen derecelerdeki alkol serilerinden geçirildikten sonra, kesitler toluol ile muamele edildi ve entellan (Merck Millipore) ile kapatıldı.

Periodik asit Schiff (PAS)

Parafin kesitler, suya indirilme işleminin ardından, 15 dk. %1'lik periyodik asit (Merck Millipore) solüsyonu içerisinde bekletildi. Schiff solüsyonu (15 dk.) ile muamele edilen kesitler 3 kez 5 dk. yıkama solüsyonlarından geçirilerek, nukleusların boyanması amacıyla hemalen ile muamele edildi. Akan çeşme suyu altında 10 dk. morartma işlemi gerçekleştirildikten sonra yükselen alkol serileri ve toluolden geçirilerek, entellan ile kapatıldı.

Masson Trikrom

Kesitler parafinden arındırılıp, suya indirildikten sonra, Weigert'in demirli hematoksileninde 5-10 dk boyandı. Çeşme suyu altında yapılan 10 dk morartma işleminin ardından, fuksinli ponzo boyası ile 1-3 dk muamele edildi. Çeşme suyunda kısaca çalkalanan kesitler, %1'lik asetik asit içerisinde 1-2 dk bekletildi. %1'lik fosfotungustik asit eriyiğinde 15 dk farklılaştırma işlemi yapıldıktan sonra, %1'lik asetik asitte 1-2 dk tutuldu. Işık yeşili ile 1-5 dk muamele edilen kesitler, tekrar %1'lik asetik asit çözeltisinde 1-2 dk tutuldu. Alkollerden geçirilerek, suyu giderilen kesitler, toluol ile saydamlaştırmanın ardından, entellan ile kapatıldı.

Mikroskobik değerlendirmeler esnasında; TNBS ile kolit indüksiyonu ve quercetin tedavisi sonucunda kolonda meydana gelen histopatolojik değişiklikler, ışık mikroskobu (Olympus BX 51, Japonya) aracılığı ile H&E, Masson trikrom ve PAS boyalı preparatlar incelenerek, aşağıdaki kriterlere göre 0-11 arasında skorlandı; *(1)* mukozal arşitektürde kayıp: 0 yok, 1 hafif, 2 orta, 3 şiddetli; *(2)* hücresel infiltrasyon: 0 yok, 1 hafif, 2 orta, 3 şiddetli; *(3)* tunika muskulariste kalınlaşma: 0 yok, 1 hafif, 2 orta, 3 şiddetli; *(4)* kript abse oluşumu: 0 yok, 1 var; *(5)* Goblet hücrelerinde azalma: 0 yok, 1 var (95). Ayrıca her bir deneğe ait farklı bloklardan hazırlanmış PAS boyalı preparatlar üzerinde, 5 farklı alanda ve yüksek büyütmede (X400) Goblet hücreleri sayıldı. Sonuçlar grup başına düşen ortalama Goblet hücre sayısı olarak ifade edildi.

Morfometrik değerlendirmeler ise, H&E boyalı kesitler üzerinde gerçekleştirildi. Görüntüleme Analiz Sistemi (Versiyon 2.11.5.1, Kameram, Argent, Türkiye) kullanılarak, her bir deneğe ait preparatta rastgele seçilmiş 10 farklı alan değerlendirilerek, Tunika mukoza, submukoza, muskularis ile aynı alanlarda total kolon duvar kalınlığı ölçüldü. Sonuçlar grup başına düşen ortalama değerler olarak ifade edildi.

Toluidin mavisi

Parafinden arındırılan kesitler, suya indirildikten sonra, taze olarak hazırlanmış %1'lik toluidin mavisi (Sigma-Aldrich) ile 40 sn muamele edildi. Fazla boyadan kurtarmak amacıyla suda çalkalanan kesitler, artan alkol derecelerinden geçirilerek suyu giderildikten sonra, toluol ile saydamlaştırma işlemi yapıldı ve ardından entellan ile kapatıldı.

Mast hücre sayımı, her hayvana ait, toluidin mavisi ile boyanarak hazırlanmış kolon preparatında, tüm alanlarda X20 objektif kullanılarak yapıldı. Sonuçlar grup başına düşen ortalama değerler olarak ifade edildi.

İMMÜNOHİSTOKİMYASAL İNCELEMELER

Bir gece 56 ^{0}C'de bekletilen, 5 µm kalınlığındaki parafin kolon kesitleri, deparafinizasyon işleminden sonra azalan alkol serilerinden geçirilerek rehidrate edildi. Antijen geri kazanımı için sitrat tamponunda (10 mM; pH 6.0) mikrodalga fırında (Vestel, 1550) kaynatılıp, 20–25 ^{0}C oda ısısında soğutulduktan sonra fosfat tampon solüsyonu (PBS) ile yıkamanın ardından, endojen peroksidaz aktivitesini inhibe etmek için kesitler %3'lük hidrojen peroksit (H_2O_2) içerisinde 15 dakika bekletildi. Spesifik olmayan bağlanmaları engellemek amacıyla, sekonder antikorun üretildiği türe uygun bloklama solüsyonunda (İnvitrogen

Histostain Plus Kit) 10 dk. inkübe edilen kesitler, antikor dilüe etme solüsyonuyla (İnvitrogen) hazırlanan 1/500 dilüsyonda Beclin-1 (NOVUSBİO, Colorado, ABD) ve 1/250 dilüsyonda p62 (Cell Signaling Technology, Leiden, Holllanda) primer antikorunda, oda ısısında 1 saat inkübe edildi. Primer antikorun üretildiği türe karşı olan biyotinlenmiş sekonder antikorda (İnvitrogen) 10 dk. oda ısısında inkübe edilen kesitler, son olarak HRP-streptavidin (İnvitrogen) ile 10 dk muamele edildi. 3,3-diaminobenzidine (DAB; İnvitrogen) ile kromojenize edilen kesitlere, hematoksilen ile zıt boyama yapıldı ve entellanla kapatıldı. Hazırlanan preparatlar BX-51 Olympus marka araştırma mikroskobunda incelenerek, fotoğrafları çekildi.

Kolon dokusunda, Beclin-1 ve p62 immunoreaktivitesi, ışık mikroskobunda, X20 büyütmede her bir hayvana ait bir kesit üzerinde, rastgele seçilen 5 alanda histolojik skor (HSCORE) ile değerlendirildi. Skorlama, kesitlerde immünoreaktivite gösteren hücrelerin yüzdesi (*Pi*) ve boyanma derecesi (*i*) dikkate alınarak gerçekleştirildi. Boyanmanın şiddeti; 0, boyanma yok; 1+, zayıf fakat tespit edilebilir boyanma; 2+, orta ya da belirgin boyanma; 3+, yoğun boyanma şeklinde skorlandı. Ortalama HSCORE değeri, her bir yoğunluk kategorisine ait boyanmış hücre yüzdesinin yoğunluk ile çarpımı şeklinde hesaplandı. İstatistiksel analizler için her grubun ortalama skorları kullanıldı.

İSTATİSTİKSEL ANALİZLER

İstatistiksel analizler T.Ü. Tıp Fakültesi Biyoistatistik ve Tıbbi Bilişim Anabilim Dalında SPSS 20.0 (Lisans No: 10240642) paket programı kullanılarak yapıldı. $P<0.05$ değeri istatistiksel anlamlı kabul edildi. Sonuçlar ortalama ± standart sapma olarak gösterildi. Niceliksel verilerin normal dağılıma uygunluğu Shapiro Wilk test ile incelendi. Grupların (Kontrol, kolit ve kolit+quercetin) normal dağılım gösteren niceliksel değerlerinin karşılaştırılmasında Tek Yönlü Varyans Analizi kullanıldı, gruplar arasında fark bulunduğunda bu farkın hangi gruplar arasında olduğunu belirlemede varyansların homojenlik durumuna göre Tukey HSD ya da Tamhane çoklu karşılaştırma testleri kullanıldı. Gruplar arasında normal dağılım göstermeyen niceliksel değerlerin karşılaştırılmasında Kruskal Wallis testi kullanıldı, gruplar arasında fark bulunduğunda bu farkın hangi iki grup arasında olduğunu belirlemede Bonferroni düzeltmeli Mann Whitney U testi kullanıldı. Grupların kendi içerisinde deney başlangıcı ve sonu ağırlık değerlerinin karşılaştırılmasında Eşlendirilmiş t testi kullanıldı.

BULGULAR

VÜCUT VE KOLON AĞIRLIĞI BULGULARI

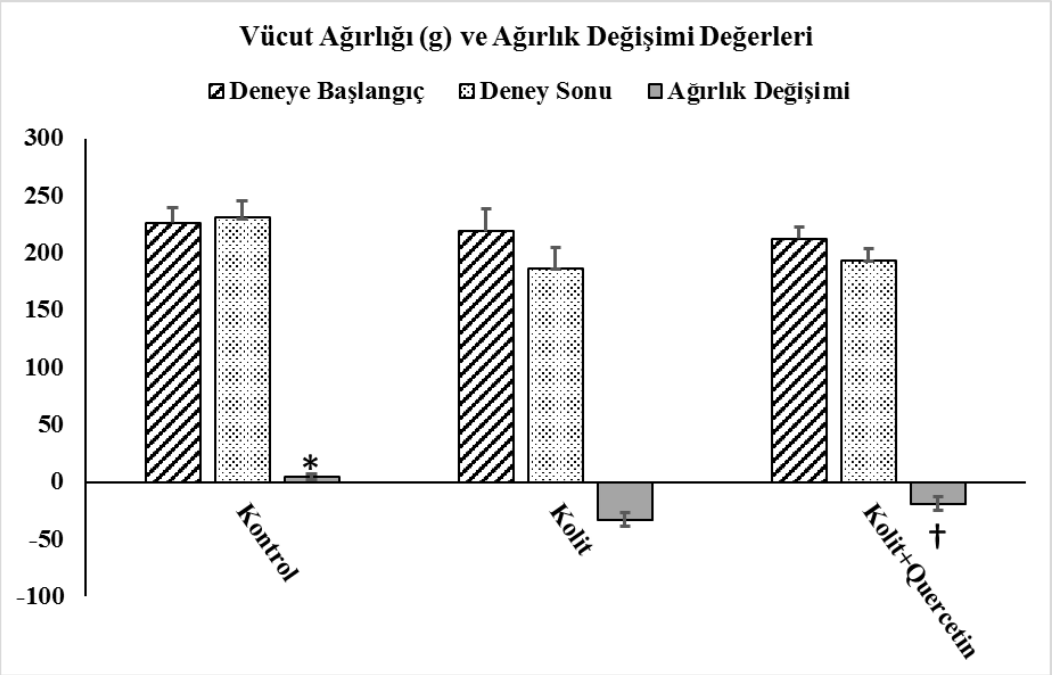
Trinitrobenzen sülfonik asitin kolonik infüzyonu sıçanlarda kanlı diyareye ve dolayısı ile vücut ağırlığında azalmaya neden oldu. Deney süresi boyunca, kontrol grubu deneklerde normal dışkılama gözlenirken, TNBS uygulanan deneklerde ilk 3 günde ortaya çıkan kanlı diyarenin, daha sonraki günlerde diyare ve yumuşak dışkıya dönüştüğü dikkati çekti. Quercetin tedavisi alan deneklerde ise diyare şiddetinin nisbeten azalmakla birlikte, bazı hayvanlarda 7. güne kadar devam ettiği görüldü (Tablo 3).

Tablo 3. Deneklerin günlük dışkı takibi sonuçları

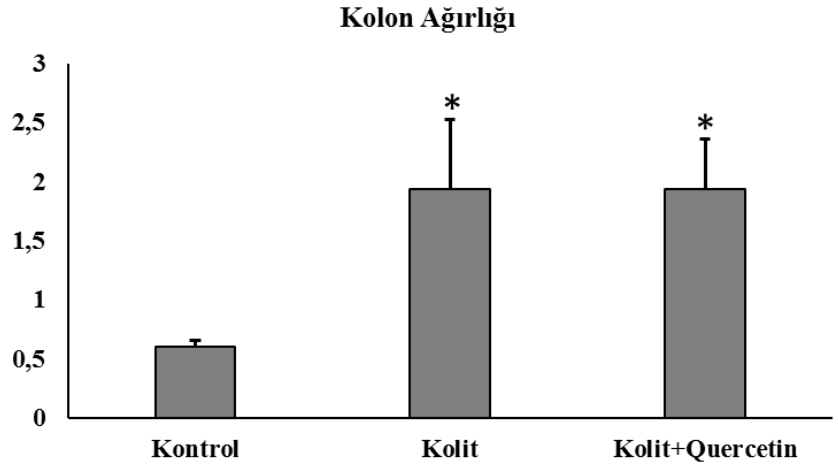
	Kontrol (n=8)	**Kolit (n=8)**	**Kolit+Quercetin (n=8)**
Gün	Normal/Yumuşak/sulu/kanlı	Normal/Yumuşak/sulu/kanlı	Normal/Yumuşak/sulu/kanlı
1	8/0/0/0	8/0/0/0	0/0/0/0
2	8/0/0/0	0/0/2/6	0/0/3/5
3	8/0/0/0	0/0/3/5	0/2/2/4
4	8/0/0/0	0/1/4/3	0/3/4/1
5	8/0/0/0	0/2/6/0	0/6/2/0
6	8/0/0/0	0/4/4/0	1/5/2/0
7	8/0/0/0	0/5/3/0	1/5/2/0

Deney gruplarına ait deneye başlangıç ve deney sonu vücut ağırlıkları ile vücut ağırlığı değişimleri grafik olarak Şekil 6'da gösterilmektedir. Deney süresince, kontrol deneklerin vücut ağırlığının arttığı (+4.6±2.5) tespit edilirken, kolitin yol açtığı diyarenin yanı sıra, ağrıya bağlı hareket kısıtlılığı nedeniyle besin almada azalmanın, TNBS uygulanan tüm deneklerde, anlamlı ölçüde kilo kaybına neden olduğu gözlendi ($p<0.001$). Kilo kaybı sadece TNBS uygulanan grupta en fazla (-32.6±6.1) iken quercetin tedavili grupta önemli ölçüde düşüktü (-18.6±5.5) ve bu fark istatistiksel açıdan anlamlı idi ($p=0.001$).

Kolonun inflamatuvar durumu, kolon ağırlığı aracılığı ile morfolojik olarak değerlendirildi. Çalışmada 6 cm kolon uzunluğu başına düşen kolon ağırlıkları ölçüldü ve sonuçlar grafik olarak Şekil 7'de gösterildi. Ödem ve inflamasyon için kaba bir ölçüt olan kolon ağırlığı grup bazında değerlendirildiğinde, kolit ve kolit+quercetin grubu deneklerde, kontrol grubuna kıyasla anlamlı düzeyde yüksek olduğu tespit edildi (sırasıyla $p=0.008$, $p=0.002$). Tedavi grubu ile kolit grubu arasında kolon ağırlığı açısından, istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmedi.



Şekil 6. Deneye başlangıç ve deney sonu vücut ağırlık değerleri ile vücut ağırlıkları değişimi. *: Kolit ve Kolit+Quercetin grupları ile karşılaştırıldığında, $p<0.001$. †: Kolit grubu ile karşılaştırıldığında, $p<0.01$.

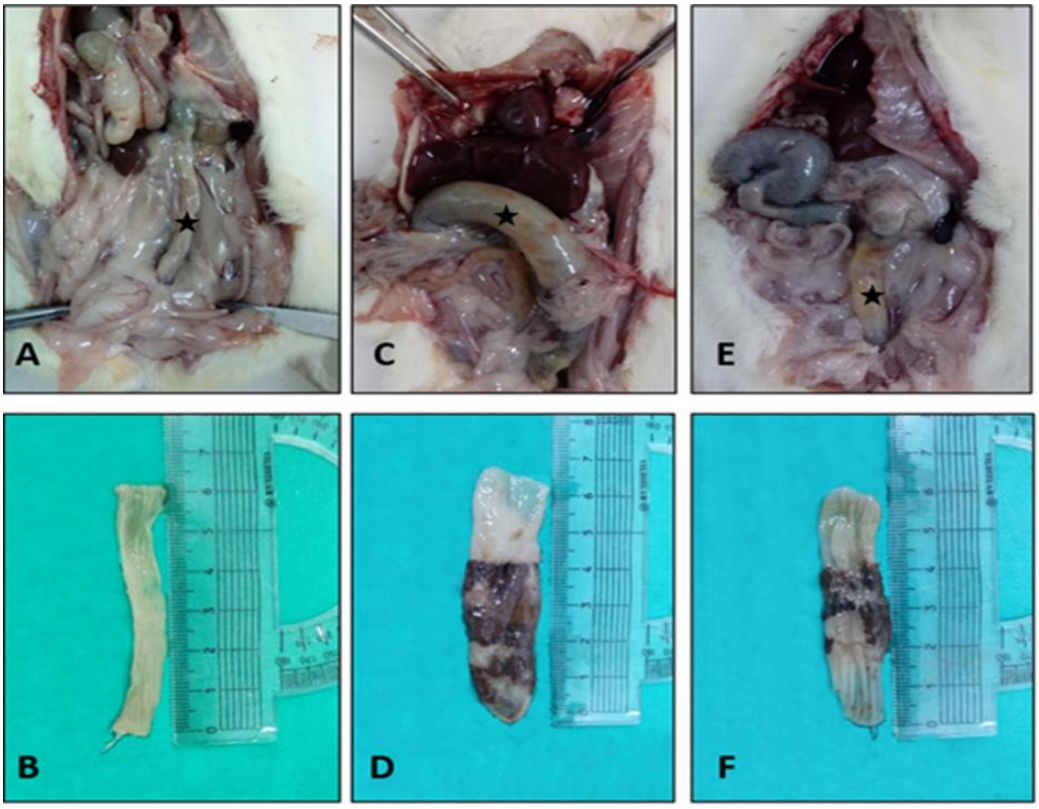


Şekil 7. Deney gruplarına ait kolon ağırlıkları. *: Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, p<0.01.

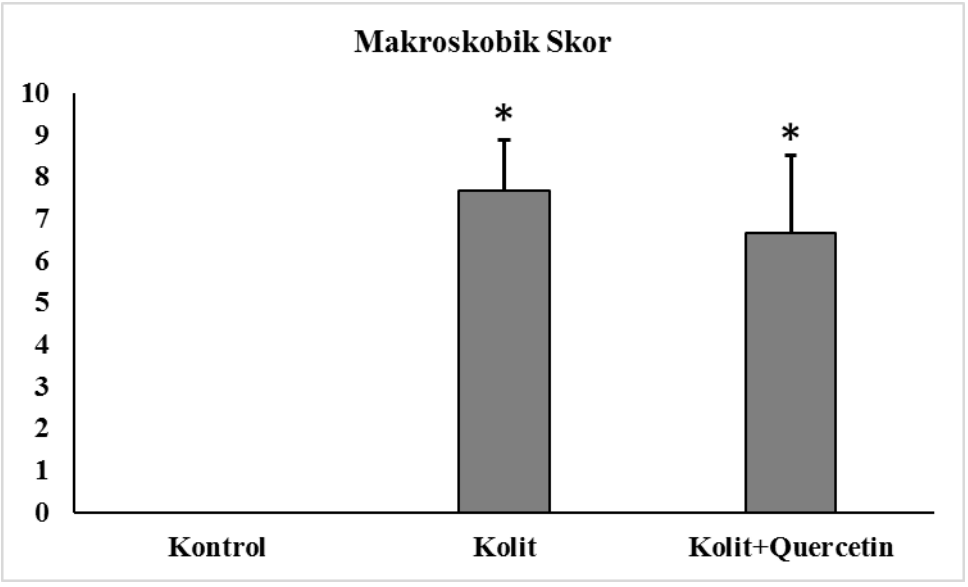
MAKROSKOBİK DEĞERLENDİRME BULGULARI

Deney süresi sonunda, anestezi altında her bir deneğin batın bölgesi açılarak 6 cm lik kolon dokusu makroskobik incelemeler için çıkartıldı. İntraabdominal incelemede, kontrol deneklerin kolonunda herhangi bir patoloji gözlenmezken, kolit grubu deneklerde kolonda ödem ve dilatasyon ile birlikte bazı bölgelerde kolonun çevre organlara yapıştığı görüldü. Quercetin tedavili deneklerde ise bu bulguların büyük oranda azaldığı tespit edildi (Şekil 8:A,C,E).

Makroskobik değerlendirme amacıyla longitudinal olarak açılan kolon dokusu incelendiğinde; rektal yoldan sf verilen kontrol grubu deneklerin kolon mukozasında patolojik bir değişikliğe rastlanmadı (Şekil 8B). Buna karşın, TNBS ile indüklenen kolit grubu deneklerinin duvarı kalınlaşmış kolon dokusunda, morfolojik olarak hiperemi ile birlikte arada normal görünümlü alanların yer aldığı yama benzeri mukozal ülserasyonlar dikkati çekti (Şekil 8D). Quercetin desteği yapılan deneklerin kolon dokusunda, ülserli alanların büyük oranda azaldığı görüldü (Şekil 8F). Bu değişiklikler, makroskobik hasar skoru kriterlerine göre değerlendirildi ve sonuçlar istatistiksel açıdan değerlendirilerek, grafik olarak Şekil 9'da gösterildi. Makroskobik skor; kolit indüksiyonu yapılan tedavisiz (7.67±1.2) ve quercetin tedavili (6.67±1.8) deneklerde, kontrole kıyasla anlamlı derecede yüksek saptandı (sırasıyla $p<0.001$, $p=0.001$). Tedavi grubu skorunun, tedavisiz gruba kıyasla düşük olduğu ancak bu farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı tespit edildi ($p=0.657$).



Şekil 8. Deney gruplarına ait makroskobik görüntüler. (A, B) Kontrol grubu. (C, D) Kolit grubu. (E, F) Kolit + Quercetin grubu. (★): Kolon.



Şekil 9. Deney gruplarına ait makroskobik skor sonuçlarını gösteren grafik. *: Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, $p<0.001$.

HİSTOPATOLOJİK BULGULAR

Histopatolojik değerlendirmeler; ışık mikroskobu aracılığı ile tüm gruplara ait H&E, Masson trikrom ve PAS boyalı kolon kesitleri üzerinde mikroskobik skorlama yöntemi ile yapıldı. Kolon dokusunun genel histolojik özellikleri H&E ve Masson trikrom boyamaları ile gösterildi ve ayrıca H&E boyalı kesitler üzerinde morfometrik değerlendirmeler gerçekleştirildi. Proteoglikanların histokimyasal olarak boyanmasını temel alan PAS boyamasında, Goblet hücreleri sayıldı. Mast hücre sayımı ise toluidin mavisi boyalı preparatlar üzerinde yapıldı. Gruplara ait mikroskobik skor, Goblet ve mast hücre sayımı sonuçları ile morfometri sonuçları, sırasıyla Tablo 4 ve Tablo 5'de sunuldu.

Tablo 4. Deney gruplarına ait mikroskobik skor sonuçları ile Goblet hücre ve mast hücre sayıları (Ortalama±Standart sapma)

	Kontrol	Kolit	Kolit+Quercetin	P değeri
Mikroskobik skor	0.33±0.5	9.67±1.2*	4.83±1.1*†	<0.001
Goblet hücre sayısı	144.66±13.2	34.86±7.9*	109.76±11.9*†	<0.001
Mast hücre sayısı	12.17±2.0	48.50±10.1‡	30.67±7.8‡§	<0.001

***: Kontrol grubu ile kıyaslandığında, p<0.001. †: Kolit grubu ile kıyaslandığında, p<0.001.**
‡: Kontrol grubu ile kıyaslandığında, p<0.01. §: Kolit grubu ile kıyaslandığında, p<0.05.

Tablo 5. Deney gruplarına ait T. mukoza, submukoza, muskularis ve kolon duvar kalınlıkları (Ortalama±Standart sapma)

Morfometri (µm)	Kontrol	Kolit	Kolit+Quercetin	P değeri
T. Mukoza	315.17±31.6	389.83±25.8*	379.33±24.9*	=0.001
T. Submukoza	75.67±11.2	453.50±24.9†	181.17±17.5†‡	<0.001
T. Muskularis	277.50±27.4	211.83±12.9†	301.33±22.9‡	<0.001
Kolon duvar kalınlığı	665.17±42.2	1686.65±53.8†	1244.83±12.9†‡	<0.001

***: Kontrol grubu ile kıyaslandığında, p<0.01. †: Kontrol grubu ile kıyaslandığında, p<0.001.**
‡: Kolit grubu ile kıyaslandığında, p<0.001.

Kontrol Grubu Bulguları

Kontrol grubuna ait H&E ve Masson trikrom boyalı kolon kesitleri incelendiğinde, sindirim kanalının karakteristik tabakaları olan; mukoza, submukoza, muskularis ve serozanın normal görünümde olduğu gözlendi (Şekil 10,11) ve grubun mikroskobik hasar skoru 0,33 olarak belirlendi (Tablo 4).

Plika sirkularis ve villus bulunmaması nedeniyle düz bir yüzeye sahip olan tunika mukozanın; mukus üreten Goblet hücrelerinden zengin tek katlı prizmatik epitel ile döşeli olduğu izlendi (Şekil 11,12). PAS boyamasında, yüzeyde çizgili kenar oluşturmayan enterositler ile pozitif boyanmış Goblet hücreleri ayırt edildi (Şekil 12). Ayrıca, epitelin altında uzanan, lenfoid dokudan zengin lamina propriya içerisinde bulunan, düz seyirli tübüler bezler olan Lieberkühn kriptalarının epitelinde çok sayıda Goblet hücresi görüldü (Şekil 12). Lamina propriya ile submukoza arasında sınır oluşturan, sirküler ve longitudinal seyirli düz kas liflerinden meydana gelen Lamina muskularis mukoza gözlendi (Şekil 11,12)

Kolonun diğer tabakaları olan; kan damarları ve sinirlerden zengin, yoğun bağ dokusu karakterine sahip submukoza ile, altında içte sirküler dışta longitudinal seyirli kas liflerinden oluşan kalın muskular tabaka ve çoğu kesitte seroza özelliği sergileyen son tabaka ayırt edildi (Şekil 11,13). Ayrıca Toluidin mavisi ile boyanmış kesitlerde mukoza ve submukoza tabakasında, metakromazi gösteren granülleri nedeniyle sitoplazması mor-menekşe renkte boyanmış mast hücreleri gözlendi (Şekil 13,14).

Kolit Grubu Bulguları

Kolit grubuna ait H&E ve Masson trikrom boyalı kolon kesitleri incelendiğinde, özellikle mukoza ve submukozada belirgin ödem ile birlikte gözlenen transmural (tüm duvarı tutan) inflamasyon, atlamalı olarak seyreden (arada normal alanlar bırakarak) mukozal ülserasyonlar ve erozyonlar dikkati çekti (Şekil 15-17).

Kolitli deneklerin kolon mukozası ayrıntılı olarak incelendiğinde; yaygın inflamatuvar hücre infiltrasyonu ve yer yer kanama alanları, yüzey epitelinde kayıp ve bozulmalar gözlendi. Ayrıca kript abseleri, kriptlerde yapısal değişiklikler, kript distorsiyonu ve kript kaybı mukozada göze çarpan belirgin değişiklikler idi (Şekil 15-17). PAS boyalı kesitlerde Goblet hücre sayının belirgin oranda azaldığı gözlendi (Şekil 18) ve Goblet hücre sayımı sonuçları; kolit grubu Goblet hücre ortalamasının, diğer iki gruptan istatistiksel anlamlı oranda düşük olduğunu gösterdi (Tablo 4). TNBS ile kolit indüksiyonu; nötrofil, makrofaj, lenfosit ve mast hücre infiltrasyonu ile kolonda transmural inflamasyona neden oldu (Şekil 15,19,20). Kolit

grubunun ortalama mast hücre sayısının, diğer gruplara kıyasla anlamlı düzeyde yüksek olduğu saptandı (Tablo 4). Mukozadan, submukozaya aşan ödem nedeniyle hem mukoza hem de submukoza kalınlığının arttığı, transmural yayılım gösteren inflamasyonun muskularis tabakasına ilerlemesi nedeniyle T. muskularisin inceldiği ve sonuç olarak kolitli deneklerin kolon duvarının kalınlaştığı tespit edildi (Tablo 5).

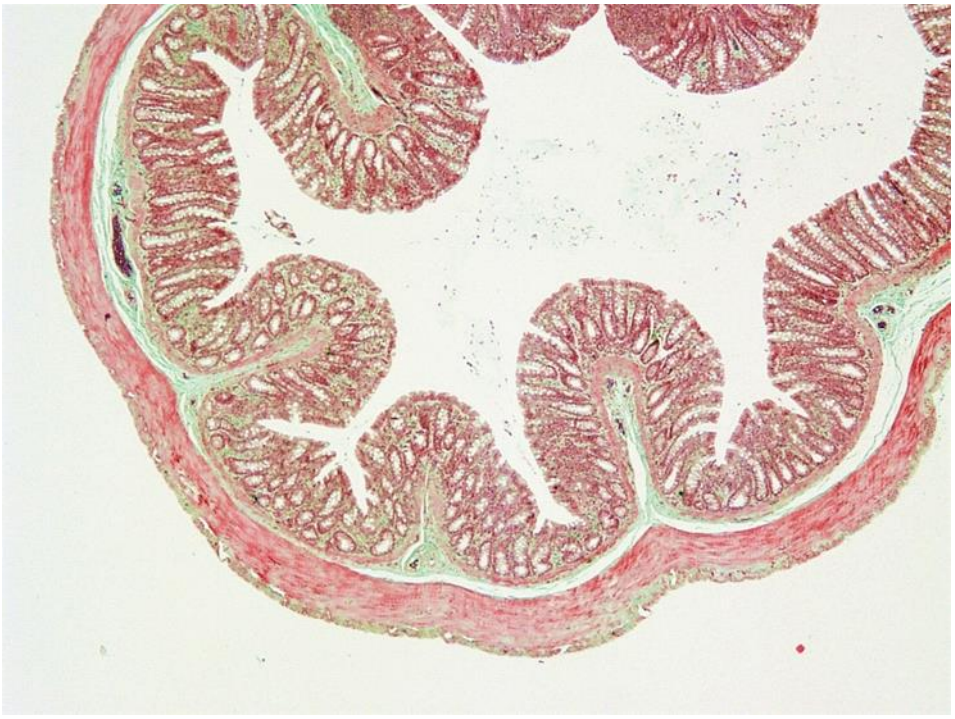
Bu bulgular ışığında yapılan değerlendirme sonucunda, mikroskobik skorun kolit grubunda (9.67), kontrol (0.33) ve quercetin (4.83) tedavili gruplara kıyasla istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek olduğu saptandı (Tablo 4).

Kolit+Quercetin Grubu Bulguları

Kolit indüksiyonundan hemen sonra başlayarak deney süresi boyunca, günde tek doz intragastrik yoldan verilen quercetin ile tedavi edilen grubun kolon kesitleri incelendiğinde; TNBS nin yol açtığı histopatolojik değişikliklerin büyük oranda azaldığı tespit edildi (Şekil 21-25).

Quercetin tedavisinin, TNBS aracılı kolonik inflamasyonun histolojik belirtilerini, yüzey epiteli ve kriptlerde ortaya çıkan hasarları ve ödemi önemli ölçüde azalttığı, bu nedenle tedavili deneklerin histolojik olarak normale yakın kolon dokusuna sahip olduğu gözlendi (Şekil 21,22). Ayrıca bu koruyucu etki, Goblet hücre kaybı (Şekil 23) ve mast hücre infiltrasyonunda (Şekil 24,25) belirgin bir azalma ile sonuçlandı (Tablo 4). Bu bulgular ışığında; tedavi grubunun mikroskobik skorunun, kolit grubuna oranla istatistiksel olarak anlamlı derecede azaldığı (Tablo 4), tabaka kalınlıklarında meydana gelen değişikliklerin büyük ölçüde düzelmesi nedeniye, morfometri sonuçlarının kontrol grubu değerlerine yaklaştığı tespit edildi (Tablo 5).

Kontrol Grubu Histopatolojik Gözlemleri



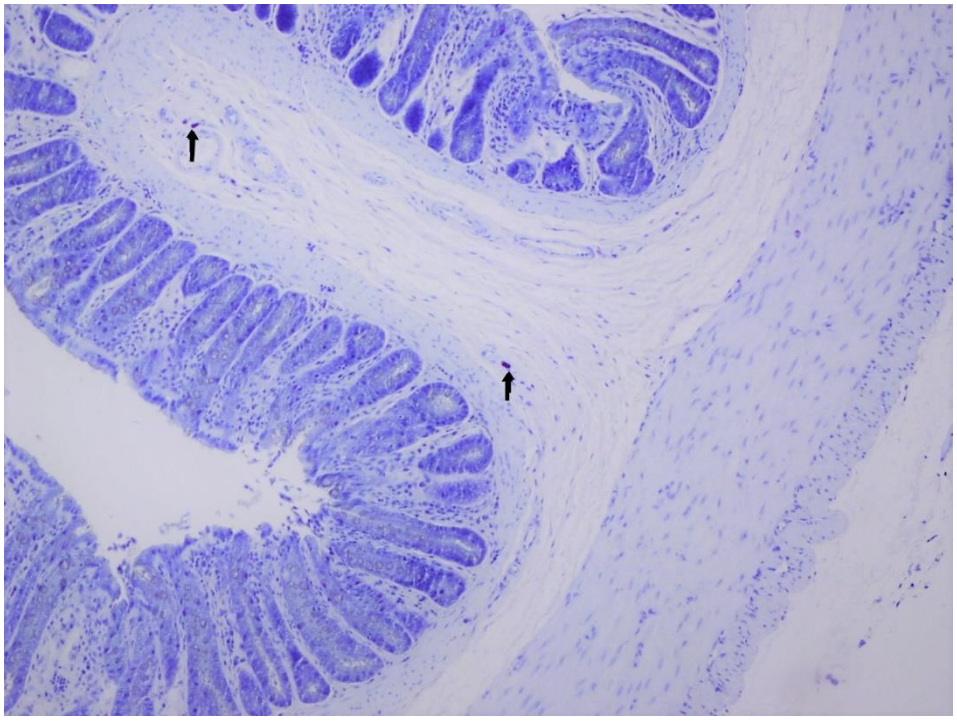
Şekil 10. **Kontrol grubunda normal yapıya sahip kolon dokusu gözlenmektedir. Masson trikrom, X40.**



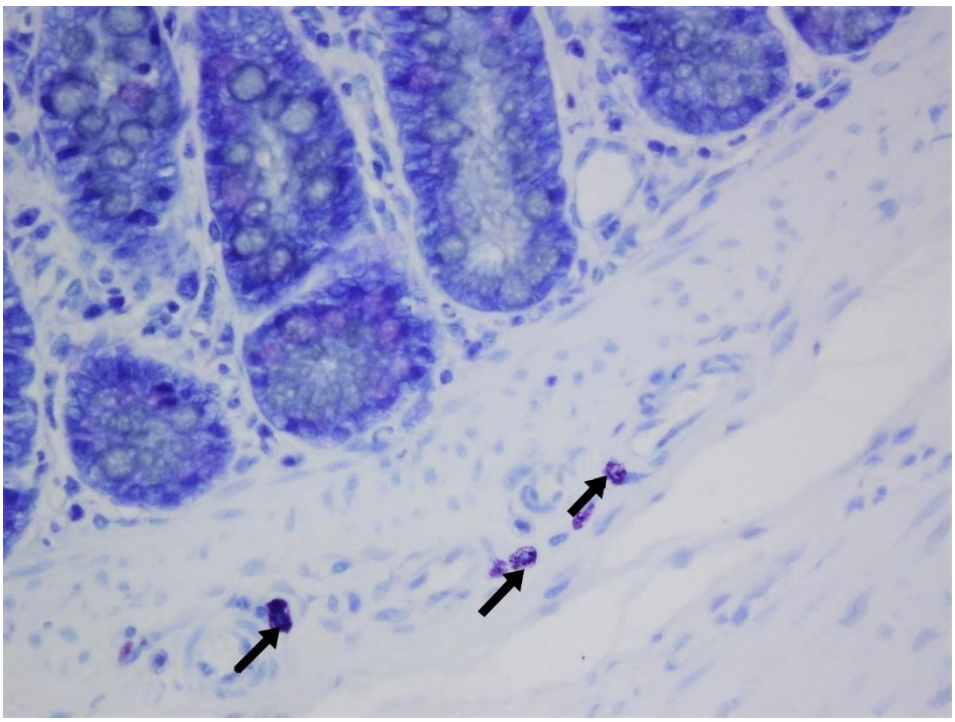
Şekil 11. **Kontrol grubu kolon kesitinde, tunika mukoza, submukoza, muskularis ve seroza tabakaları (★) izlenmektedir. H&E, X100.**



Şekil 12. **Kontrol grubuna ait deneklerin kolonunda; yüzey epiteli (★), Lieberkühn kriptalarının (►) yer aldığı lamina propriya (Lp) ve altında uzanan lamina muskularis mukoza (Lmm) gözlenmektedir. Goblet hücresi (→). PAS, X100.**

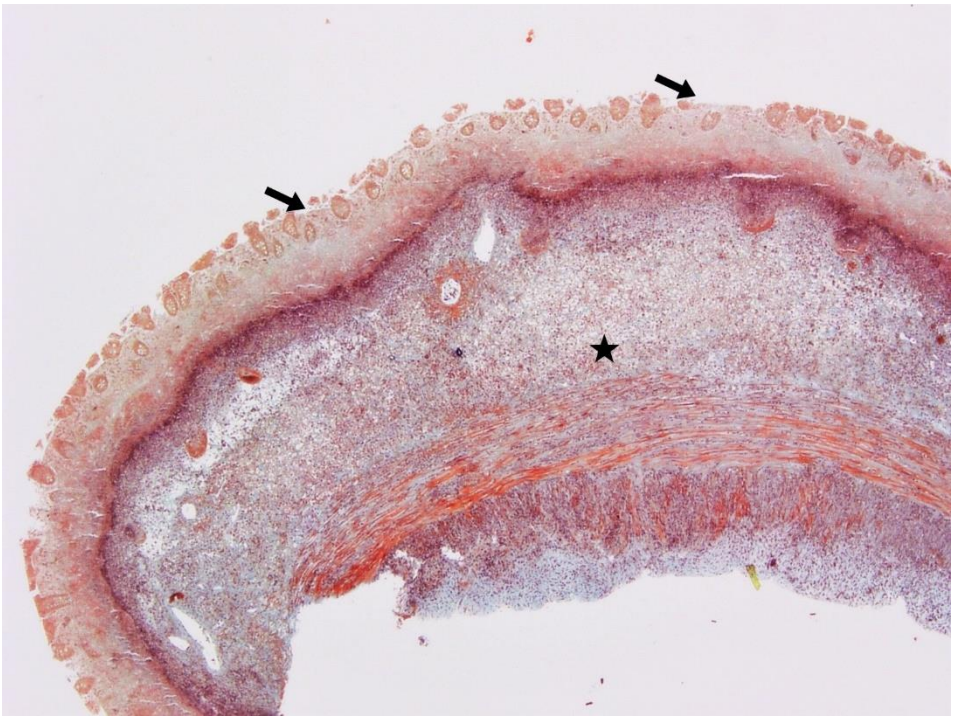


Şekil 13. **Kontrol grubuna ait kolon kesitinde, mast hücreleri izlenmektedir. Toluidin mavisi, X100.**

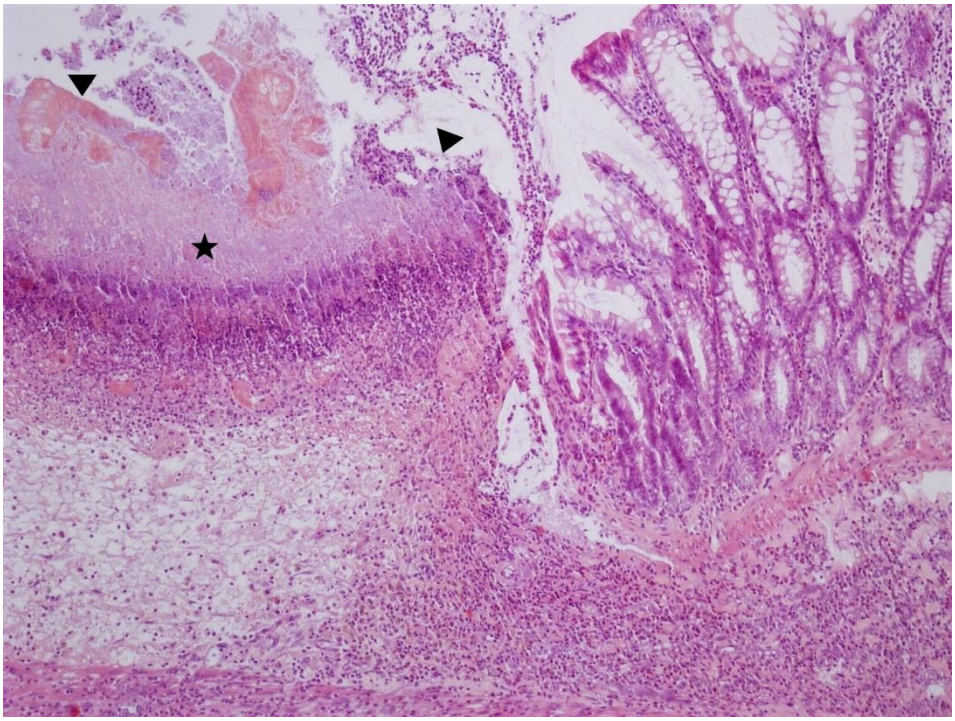


Şekil 14. Kontrol kolon kesitinde, metakromazi gösteren mast hücreleri (→) ayırt edilmektedir. Toluidin mavisi, X400.

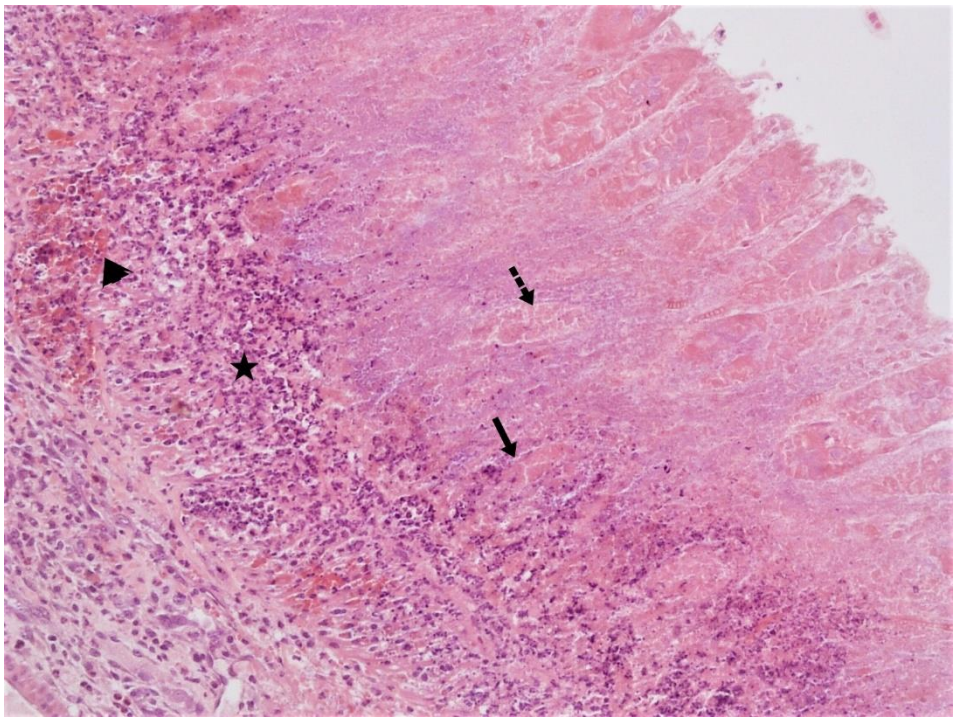
Kolit Grubu Histopatolojik Gözlemleri



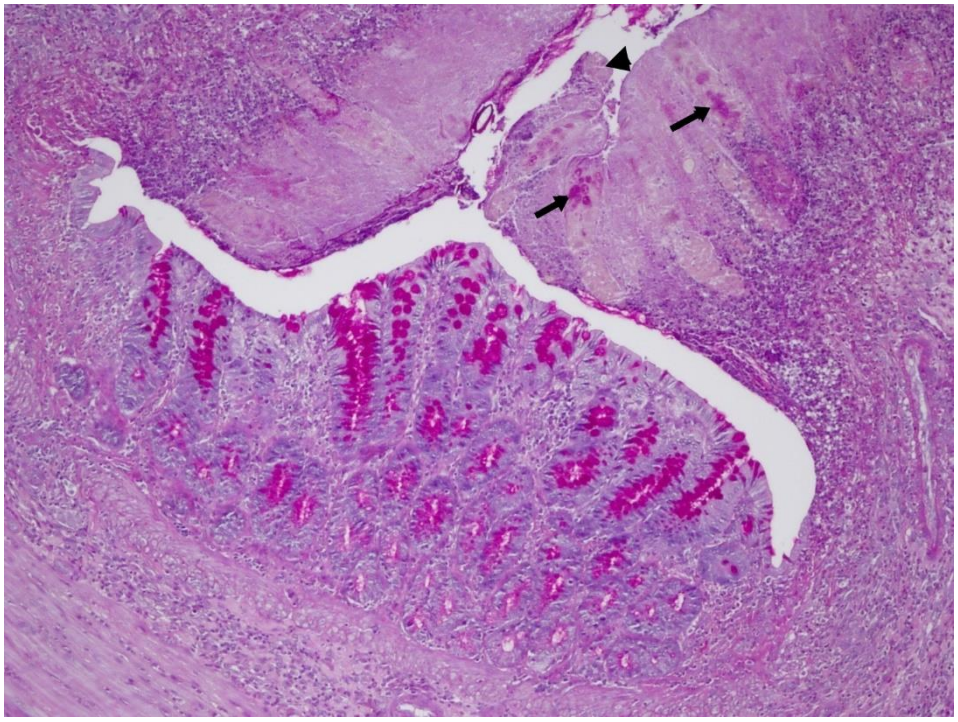
Şekil 15. **Kolit grubuna ait kolon kesitinde, yaygın mukozal ülserasyon (→) ve submukozada belirgin ödem (★) ile birlikte transmural inflamasyon dikkati çekmektedir. Masson trikrom, X40.**



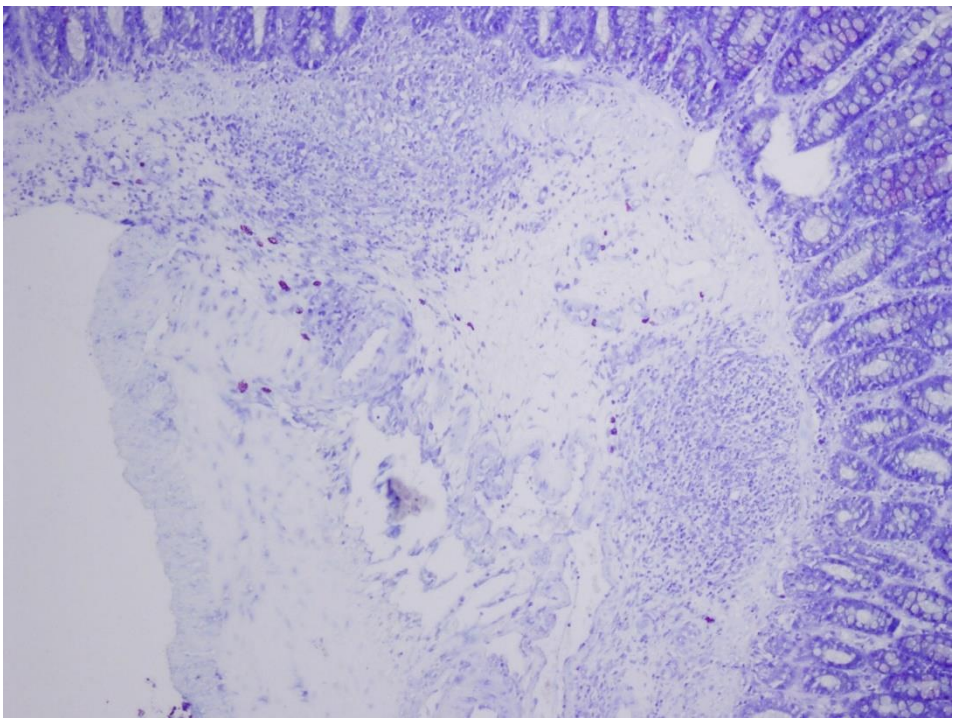
Şekil 16. **Kolit grubu kolon kesitinde, normal görünümlü mukoza alanlarının yanı sıra epiteliyal erozyon (►) ve belirgin kript kaybının (★) izlendiği mukozal hasarlar görülmektedir. H&E, X100.**



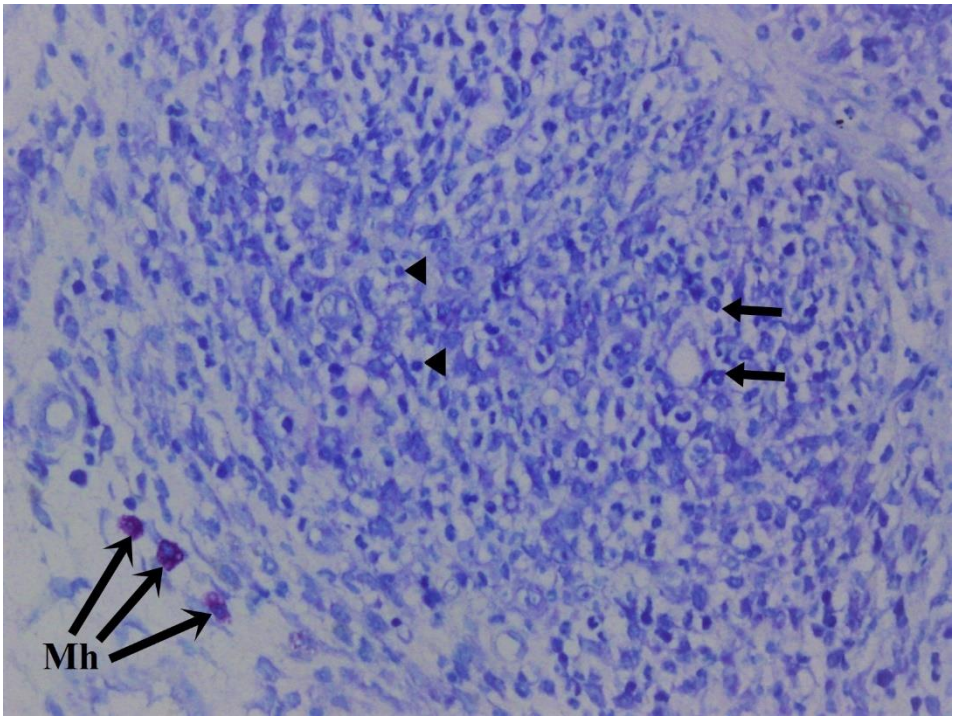
Şekil 17. **Kolit grubu kolon mukozasında, lamina muskularis mukozayı aşan inflamasyon (★) ve kanama alanları (►) ile birlikte kript abseleri (→) ve kript kaybı (⇢) dikkati çekmektedir. H&E, X200.**



Şekil 18. **Kolit grubu kolon kesitinde, yüzey epiteli (►) ve Lieberkühn kriptalarında (→) Goblet hücre kaybı izlenmektedir. PAS, X100.**



Şekil 19. **Kolit grubunda, kolon tunika submukozasında inflamatuvar ve mast hücre infiltrasyonu ile birlikte ödem dikkati çekmektedir. Toluidin mavisi, X100.**

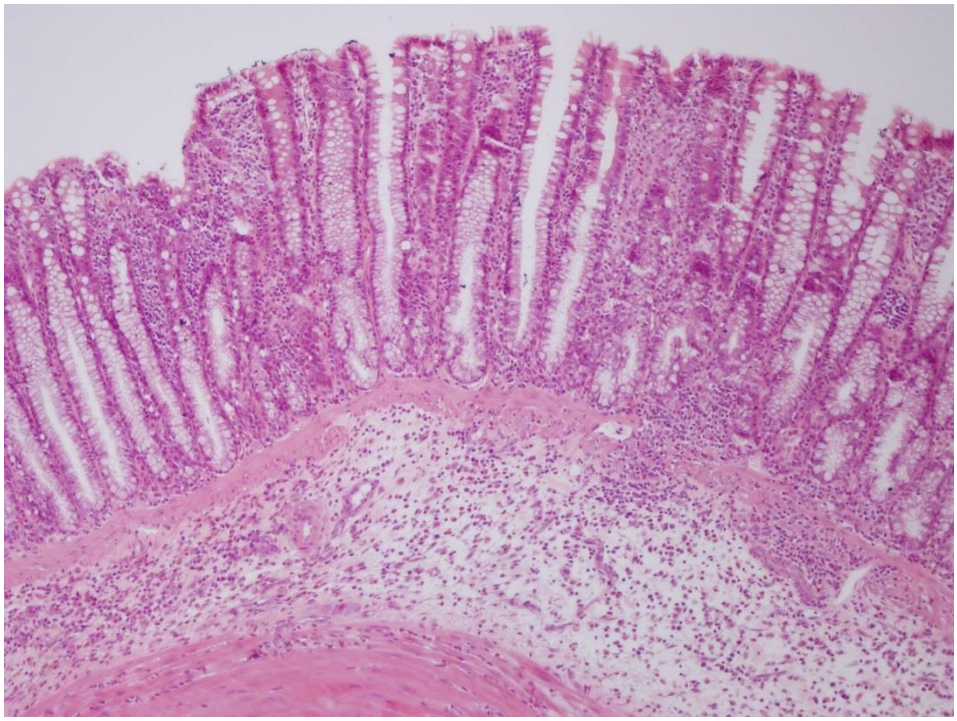


Şekil 20. **Kolit grubuna ait kolon kesitinde, submukozada nötrofil (→), lenfosit (►) ve mast hücreleri (Mh) izlenmektedir. Toluidin mavisi, X400.**

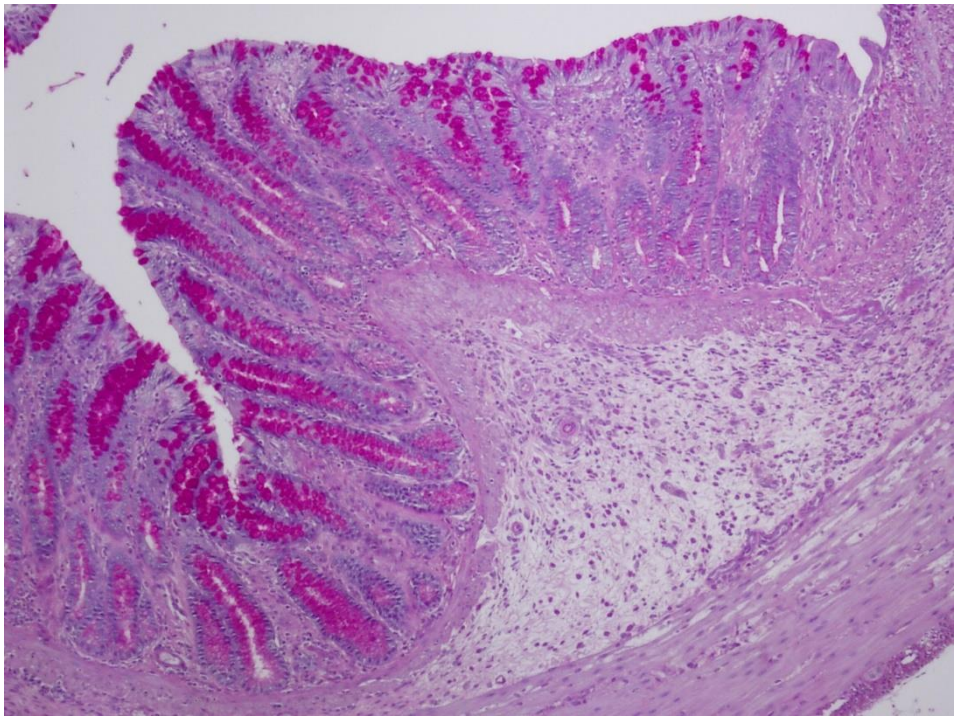
Kolit + Quercetin Grubu Histopatolojik Gözlemleri



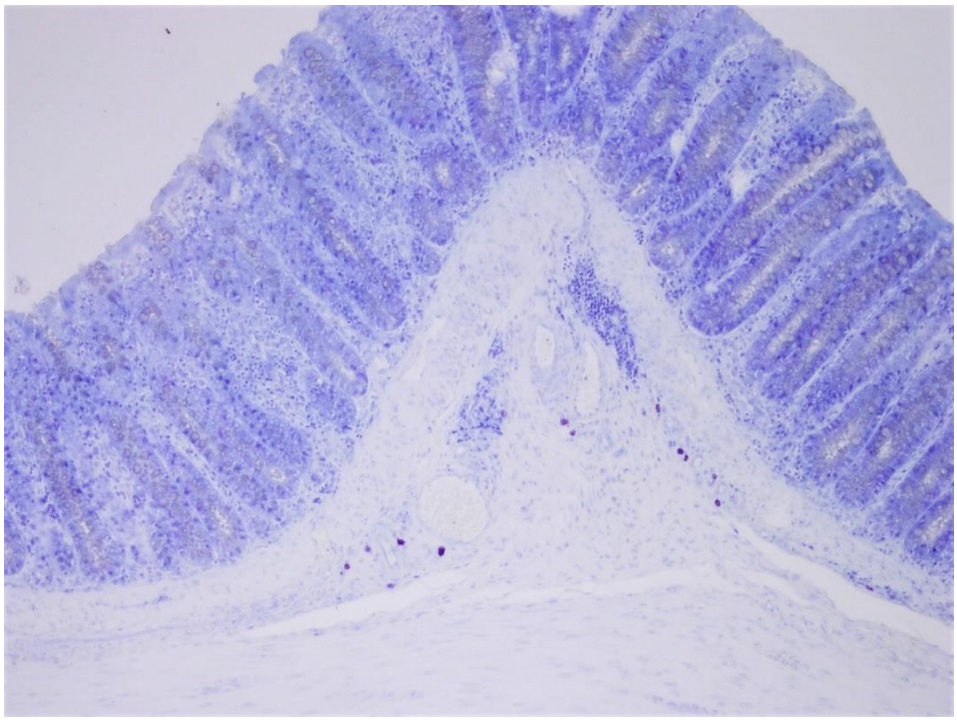
Şekil 21. **Quercetin tedavili gruba ait, normale yakın görünüme sahip kolon dokusu izlenmektedir. Masson trikrom, X40.**



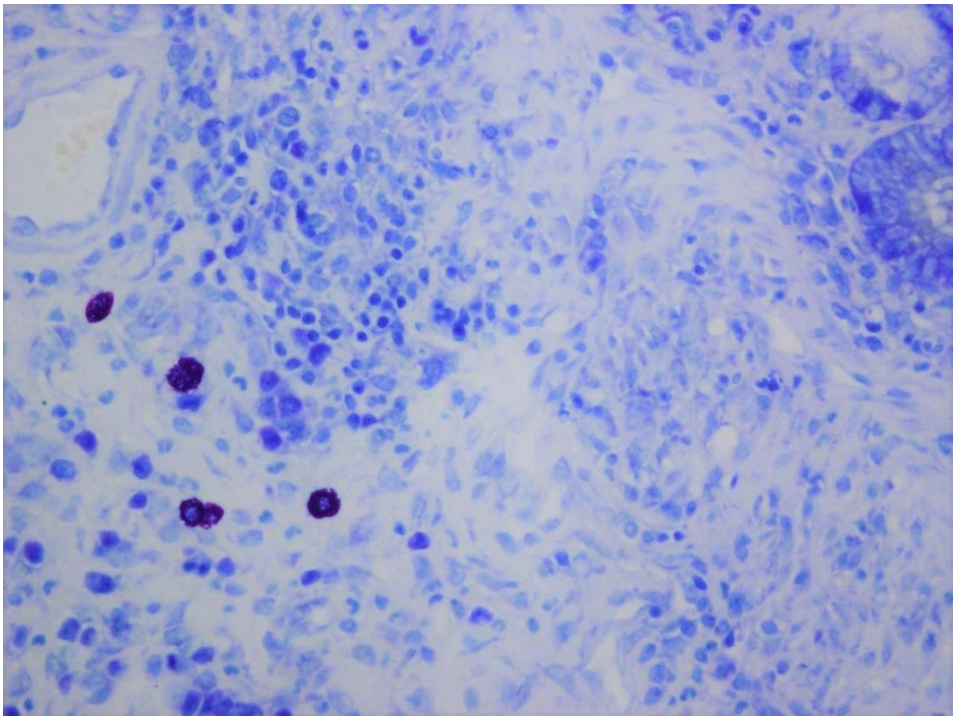
Şekil 22. **Quercetin tedavili gruba ait kolon kesitinde, hafif derecede inflamasyon ve ödem ile birlikte kısmen normal yapıya sahip mukoza ve submukoza görülmektedir. H&E, X100.**



Şekil 23. **Quercetin tedavili gruba ait kolon kesitinde, Goblet hücre kaybında belirgin azalma ile birlikte düzenli yüzey epiteli ve kript yapısı dikkati çekmektedir. PAS, X100.**



Şekil 24. **Quercetin tedavili gruba ait kolon tunika submukozasında inflamatuvar ve mast hücre infiltrasyonunda belirgin azalma gözlenmektedir. Toluidin mavisi, X100.**



Şekil 25. Quercetin tedavili gruba ait kolon submukozasında çeşitli inflamatuvar hücre ve mast hücreler izlenmektedir. Toluidin mavisi, X400.

İMMÜNOHİSTOKİMYASAL BULGULAR

Çalışmada, kolon dokusunda otofajik süreçteki değişiklikleri ortaya koymak amacıyla Beclin-1 ve p62 immünohistokimyasal boyamaları yapıldı. Antikorlara ait kolon immünoreaktivitesi, semikantitatif olarak HSCORE yöntemi ile değerlendirilerek, sonuçlar Tablo 6'da sunuldu.

Tablo 6. Deney gruplarına ait Beclin-1 ve p62 immünoreaktivite değerlendirme sonuçları (Ortalama±Standart sapma)

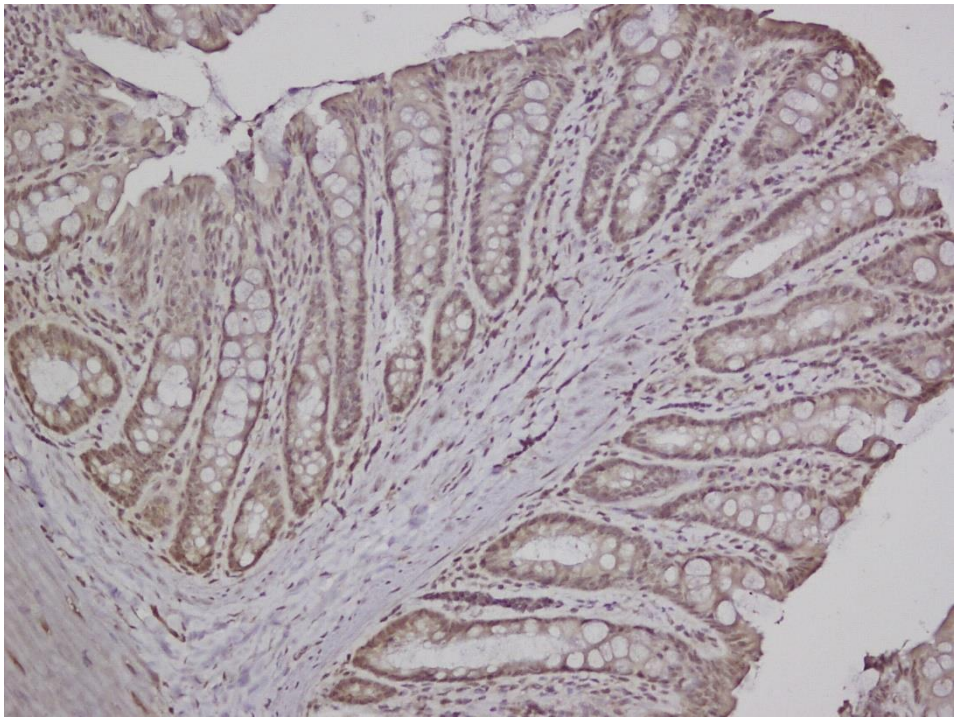
	Kontrol	Kolit	Kolit+Quercetin	P değeri
Beclin-1 (HSCORE)	180.00±17.8	90.00±6.32*	147.50±9.3†‡	<0.001
p62 (HSCORE)	78.33±6.8	135.00±8.9*	97.50±8.8†‡	<0.001

***: Kontrol grubu ile kıyaslandığında, p<0.001. †: Kontrol grubu ile kıyaslandığında, p<0.01.**
‡: Kolit grubu ile kıyaslandığında, p<0.001.

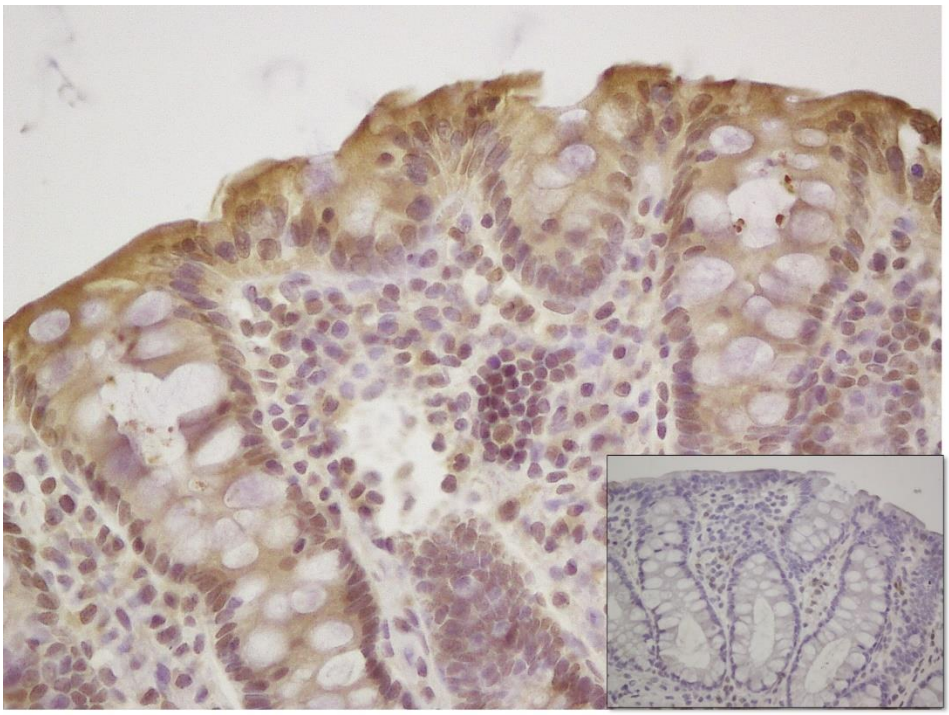
Beclin-1 İmmünoreaktivite Değerlendirmesi

Kontrol grubu kolon kesitlerinde, yüzey ve bez epitel hücrelerinde orta seviyede, yer yer nüklear da olmak üzere sitoplazmik Beclin-1 immünoreaktivitesi gözlenirken, bu immünoreaktivitenin bazı alanlarda lamina propriyadaki hücrelerde de hafif şiddette olduğu görüldü (Şekil 26,27). Kolit grubuna ait kesitlerde, hasarlı mukozada baskılanmış otofajinin göstergesi olarak Beclin-1 immünoreaktivitesinin azaldığı gözlendi. Boyanma şiddetinin yüzey ve bez epitel hücrelerinde zayıf olduğu izlenirken, epitel altı dokuda belirgin bir boyanma tespit edilemedi (Şekil 28,29). Quercetin tedavili grupta, kolonik mukozada kript ve yüzey epiteli ile lamina propriyada Beclin-1 immünoreaktivitesi gözlendi (Şekil 30,31).

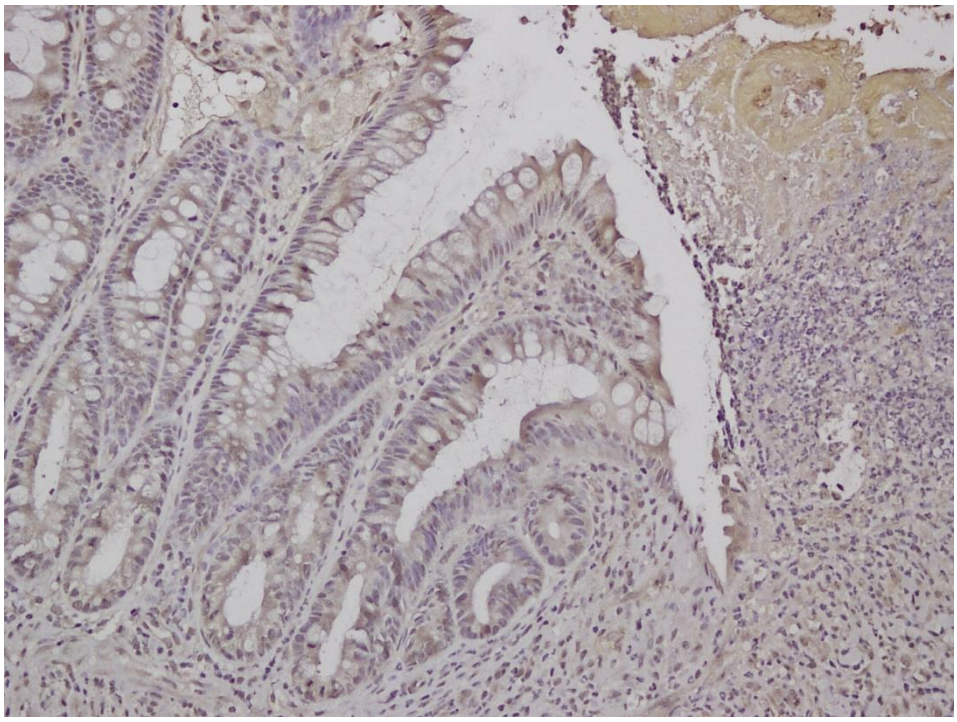
Deney gruplarına ait Beclin-1 boyalı kolon kesitleri incelendiğinde, kolit grubu HSCORE değerinin, kontrol ve quercetin tedavili gruplarla kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı seviyede ($p<0.001$) düşük olduğu görüldü. Quercetin tedavili grupta, bu değerin kontrol düzeylerine yaklaştığı ancak, iki grup arasındaki farkın istatistiksel açıdan anlamlı olduğu ($p<0.01$) tespit edildi (Tablo 6).



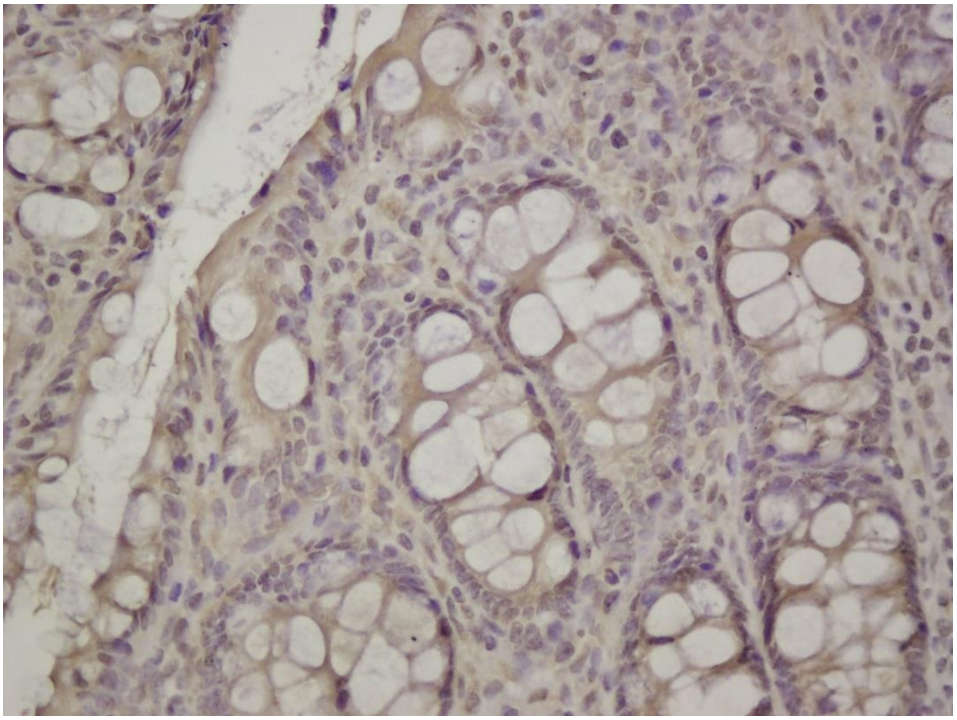
Şekil 26. Kontrol grubuna ait kolon mukozasında Beclin-1 immünoreaktivitesi gözlenmektedir. Hematoksilen zıt boyaması, X200.



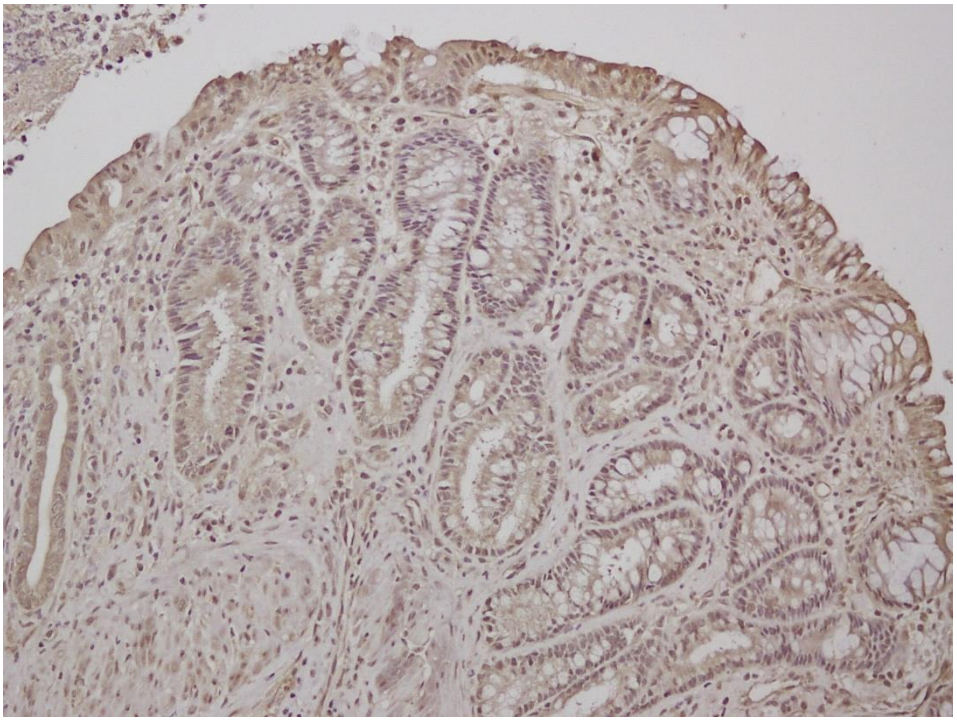
Şekil 27. Kontrol grubuna ait kolon kesitinde, kript ve yüzey epitelinde orta şiddette, lamina propriyada hafif şiddette Beclin-1 immünoreaktivitesi görülmektedir. İçsel şekil: Negatif kontrol. Hematoksilen zıt boyaması, X400.



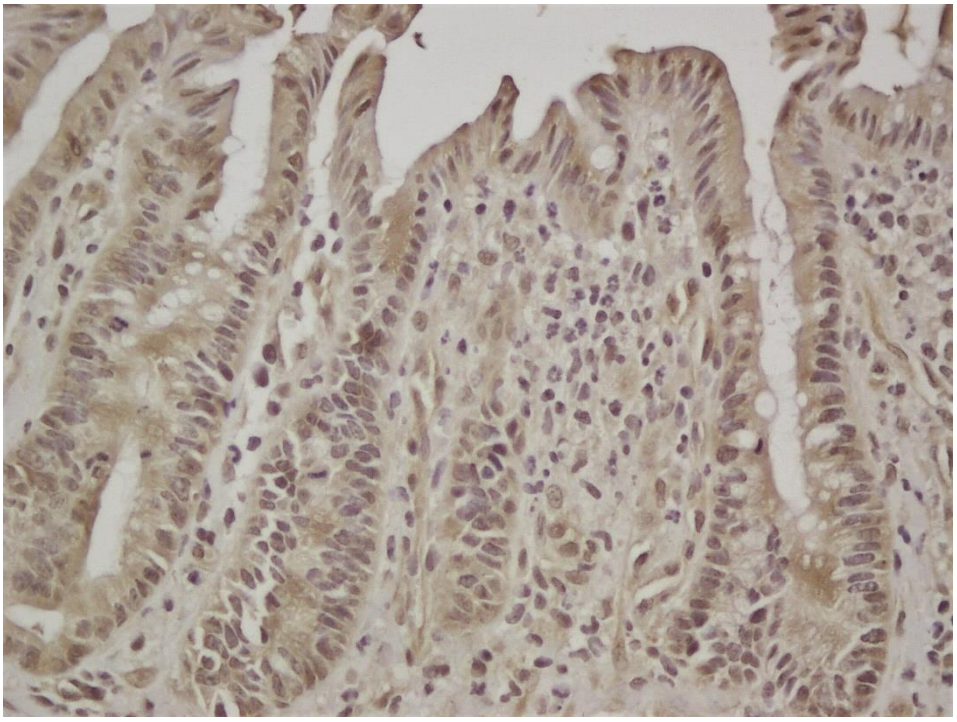
Şekil 28. **Kolit grubuna ait kolon mukozasında, azalmış Beclin-1 immünoreaktivitesi dikkati çekmektedir. Hematoksilen zıt boyaması, X200.**



Şekil 29. **Kolit grubuna ait kolon kesitinde, kript ve yüzey epitelinde zayıf şiddette Beclin-1 immünoreaktivitesi gözlenirken, lamina propriyada negatif boyanma gözlenmektedir. Hematoksilen zıt boyaması, X400.**



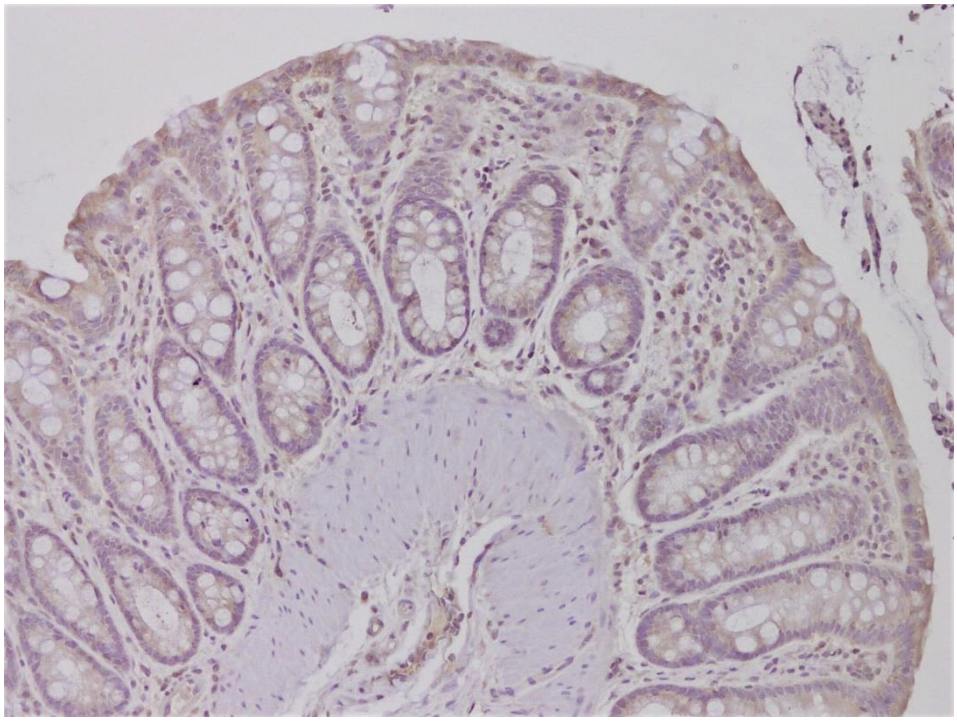
Şekil 30. **Quercetin tedavili gruba ait kolon mukozasında Beclin-1 immünoreaktivitesi gözlenmektedir. Hematoksilen zıt boyaması, X200.**



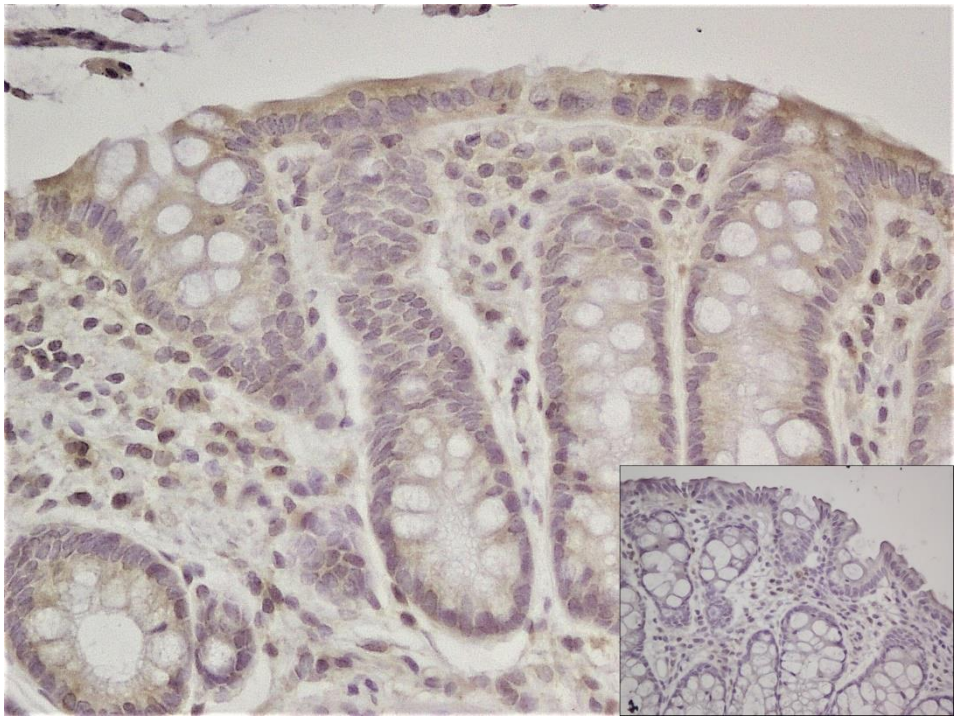
Şekil 31. **Quercetin tedavili gruba ait kolon kesitinde, kriptlerde, yüzey epitelinde ve lamina propriyada Beclin-1 immünoreaktivitesi izlenmektedir. Hematoksilen zıt boyaması, X400.**

p62 İmmünoreaktivite Değerlendirmesi

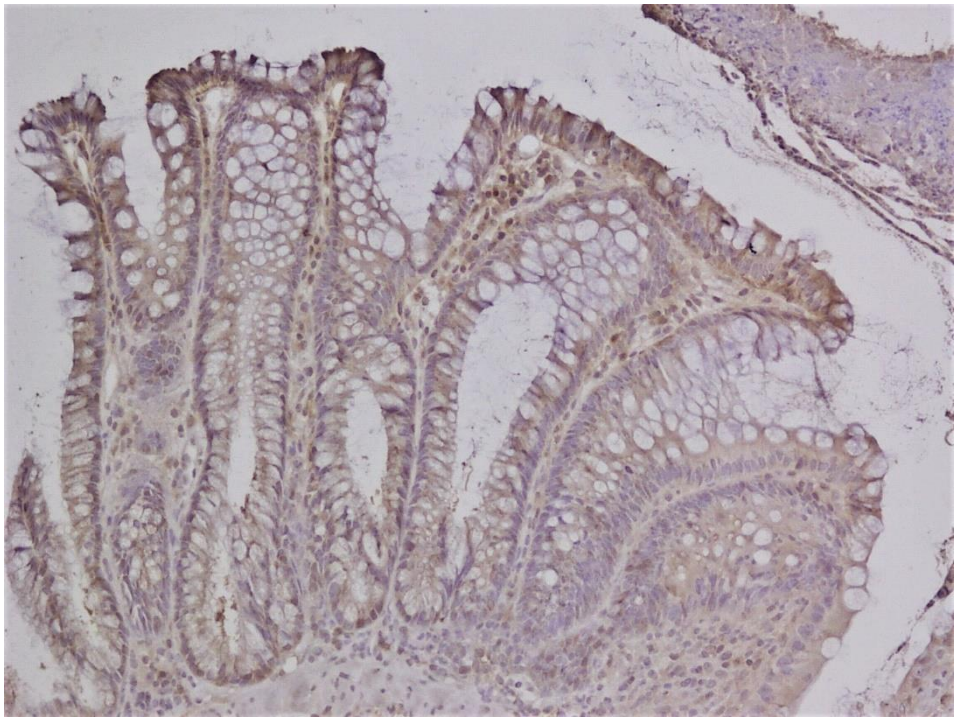
Deney gruplarına ait kolon kesitlerinde, p62 immünoreaktivitesi; çoğunlukla yüzey epiteli ve bezlerin apikal kısmındaki epitel hücrelerinin sitoplazmasında lokalize olmakla birlikte, lamina propriyadaki infiltre hücrelerde de görüldü (Şekil 32-37). Boyanmanın şiddeti semikantitatif olarak HSCORE ile değerlendirildi (Tablo 6). Kontrol grubu kolon mukozasında, hafif şiddette p62 immünoreaktivitesi gözlendi (Şekil 32,33). Kolit grubuna ait kesitlerde, azalmış ya da baskılanmış otofajinin göstergesi olarak mukozal p62 immünoreaktivitesinin arttığı görüldü (Şekil 34,35), dolayısı ile bu grubun p62 HSCORE değerinin; kontrol ($p<0.001$) grubuna kıyasla istatistiksel anlamlı düzeyde yüksek olduğu tespit edildi. Quercetin tedavisinin, kolit indüksiyonu sonucu kolon mukozasında ortaya çıkan otofajik değişiklikleri kısmen önlemesi nedeniyle (Şekil 36,37), p62 immünoreaktivitesinin, kolit grubuna kıyasla anlamlı ölçüde azalmasına ($p<0.001$) karşın, tedavili grubun HSCORE değerinin, kontrol grubundakinden önemli ölçüde yüksek olduğu ($p<0.01$) saptandı (Tablo 6).



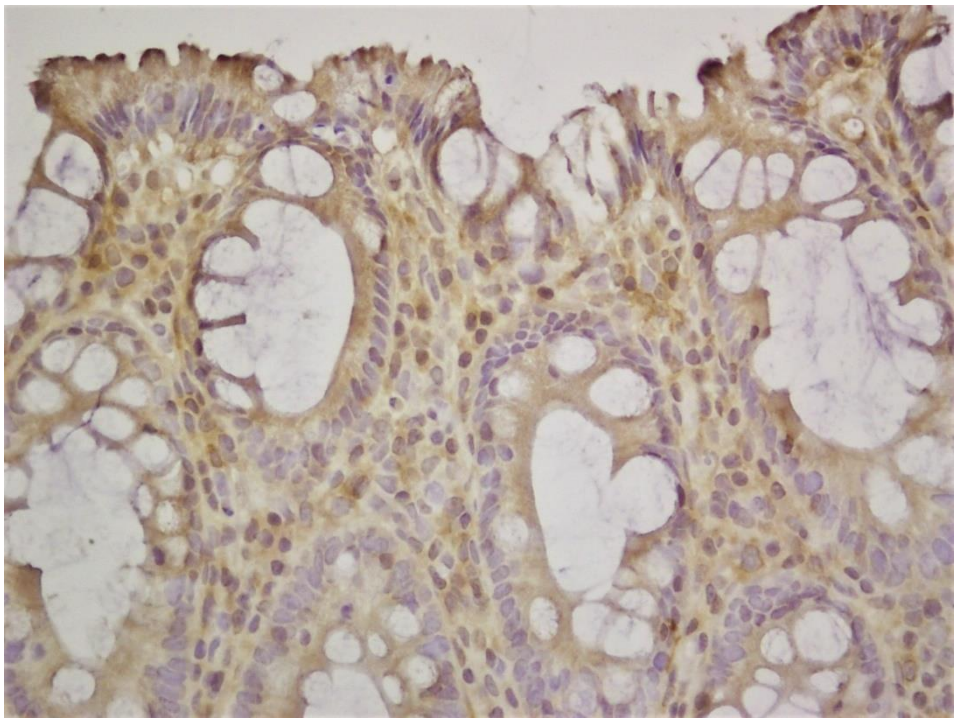
Şekil 32. Kontrol grubuna ait kolon mukozasında p62 immünoreaktivitesi gözlenmektedir. Hematoksilen zıt boyaması, X200.



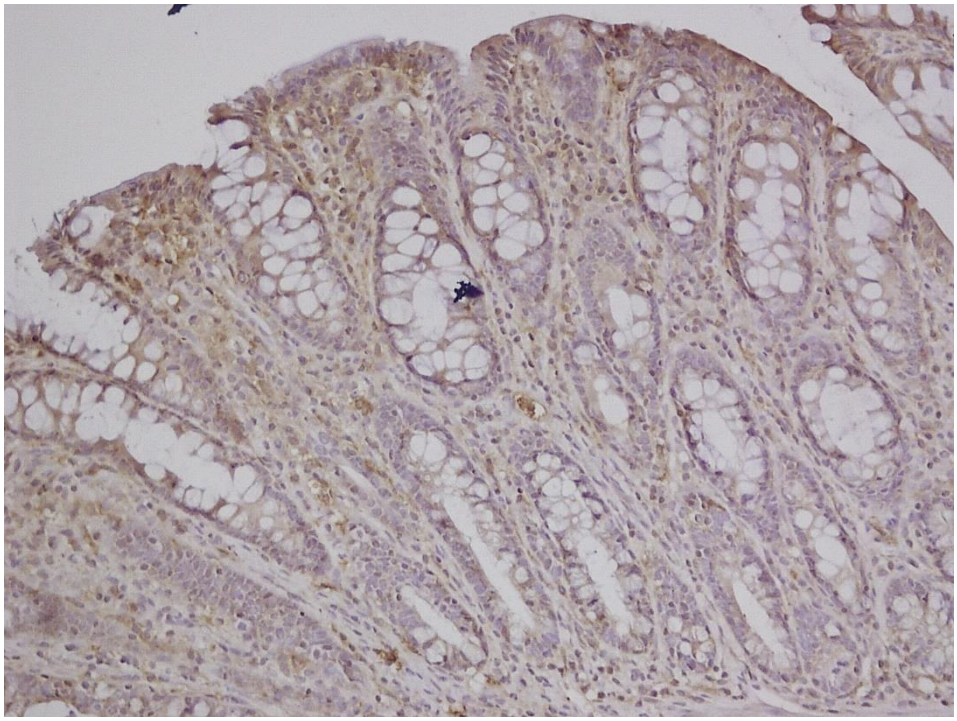
Şekil 33. Kontrol grubuna ait kolon kesitinde, kript, yüzey epiteli ve lamina propriyada hafif şiddette p62 immünoreaktivitesi görülmektedir. İçsel şekil: Negatif kontrol. Hematoksilen zıt boyaması, X400.



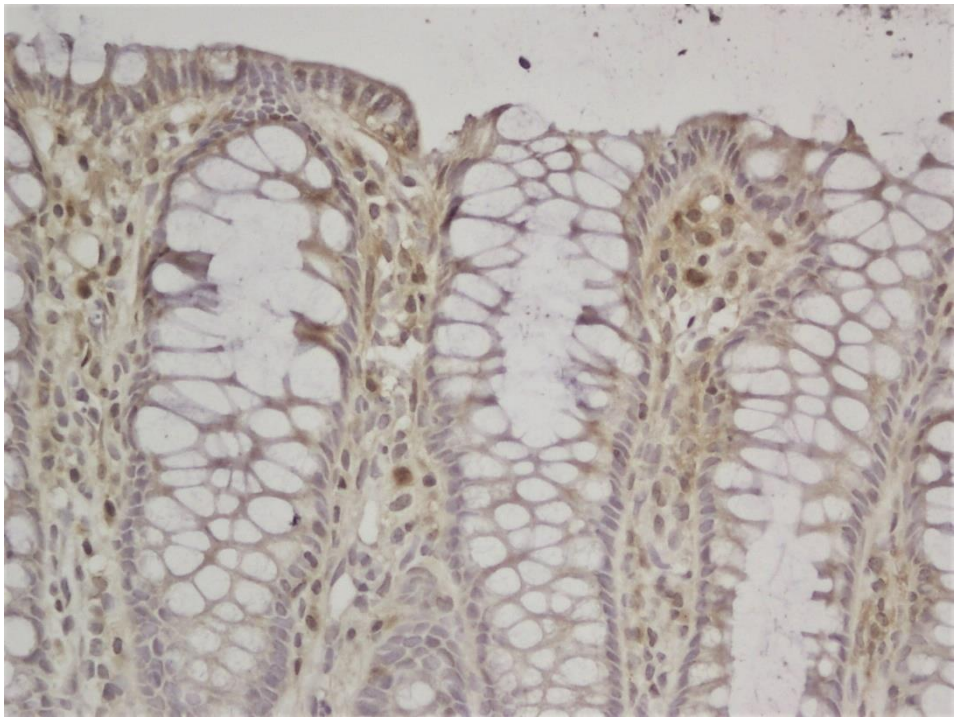
Şekil 34. **Kolit grubuna ait kolon mukozasında, artmış p62 immünoreaktivitesi dikkati çekmektedir. Hematoksilen zıt boyaması, X200.**



Şekil 35. **Kolit grubuna ait kolon kesitinde, kript, yüzey epiteli ve lamina propriyada orta şiddette p62 immünoreaktivitesi gözlenmektedir. Hematoksilen zıt boyaması, X400.**



Şekil 36. **Ouercetin tedavili gruba ait kolon mukozasında p62 immünoreaktivitesi gözlenmektedir. Hematoksilen zıt boyaması, X200.**



Şekil 37. **Ouercetin tedavili gruba ait kolon kesitinde, kriptlerde, yüzey epitelinde ve lamina propriyada hafif şiddette p62 immünoreaktivitesi izlenmektedir. Hematoksilen zıt boyaması, X400.**

TARTIŞMA

İnflamatuvar bağırsak hastalıklarının bir alt kategorisi olan Crohn hastalığı etiyopatogenezinden; genetik, mikrobiyal, inflamatuvar, bağışıklık ve geçirgenlik anormallikleri gibi birçok faktör sorumlu tutulmasına rağmen, kesin bir etiyoloji tanımlanamamıştır (32). Crohn hastalığında bağırsakların bağışıklık yanıtını düzenleyici proteinlerin yanı sıra, otofaji ve apoptoz gibi hücresel mekanizmaları kontrol eden proteinlerin de etkilendiği bilinmektedir (48). Son yıllarda, hastalığın gelişiminde baskılanmış veya yetersiz otofajinin rölü gösterilmiştir (8-11). İBH'nın başlangıcında disfonksiyonel otofajinin nasıl katkıda bulunduğu halen araştırılmaktadır (48). Otofaji ilişkili genlerdeki değişiklikler, bağırsaklarda doğal ve edinilmiş inflamatuvar yanıtları çok yönlü etkiler. Bunlar bakteriyel, fungal ve viral klerans, Paneth hücrelerinin antimikrobiyal peptit üretiminin yanı sıra sitokin üretimi, antijen sunumu ve ER stresine yanıt gibi değişiklikleri içerir (12). TNBS ile oluşturulan deneysel kolit modelinde quercetin kullanımının otofajik sürece etkisini değerlendirdiğimiz bu çalışmada elde ettiğimiz bulgular; quercetin tedavisinin, TNBS aracılı kolitte baskılanmış otofajiyi indüklemek (p62 ve Beclin-1 immünoreaktivitesi) ve inflamatuvar değişiklikleri düzenlemek suretiyle, kolon dokusunda meydana gelen hasarın gelişimini ve şiddetini (makroskobik ve histopatolojik değerlendirmeler) azalttığını göstermektedir.

Crohn hastalığının tanı ve tedavisindeki yaklaşımların belirlenmesi amacıyla yapılan çalışmalarda, farklı deneysel kolit modelleri kullanılmaktadır (45). Çalışmamızda Crohn hastalığını simüle eden TNBS aracılı deneysel kolit modeli (46); sıçanlara, 25 mg TNBS'in %30'luk etil alkol içerisinde çözünerek, tek doz halinde intrarektal uygulanmasıyla oluşturulmuştur (9,93). Kolit indüksiyonundan sonra hayvanlarda, anormal dışkı oluşumu ve

kanlı diyare gibi akut kolitin çeşitli belirtileri gözlenir. TNBS/etanolün sıçanlara intrakolonik olarak verilmesi, kanlı diyare ile karakterize İBH ile birlikte, ilk hafta boyunca çarpıcı bir şekilde gözlenen vücut ağırlığı kaybına neden olur (3,93,96). Yaptığımız çalışmada; günlük olarak yapılan vücut ağırlığı ölçümleri, kolit indüksiyonundan 24 saat sonra belirgin hale gelen diyare ile birlikte, kolit grubu deneklerinin deney sonu vücut ağırlığında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalmayı gösterdi. Bunun nedenleri arasında; TNBS'in bağırsak üzerindeki belirgin etkilerinin (diyare ve sıvı emiliminde azalma) yanı sıra, ağrıya bağlı hareket kısıtlılığı nedeniyle besin almada azalmanın olduğu düşünülmektedir (3). Kolonun inflamatuvar durumunu morfolojik olarak ortaya koymak amacıyla çalışmamızda, ödem ve inflamasyon için kaba bir ölçüt olarak kabul edilen kolon ağırlıkları değerlendirilme sonuçlarımız, TNBS verilen tüm gruplarda ortalama kolon ağırlıklarının kontrole kıyasla anlamlı düzeyde yüksek olduğunu gösterdi. Uyguladığımız quercetin tedavisinin, TNBS'in yol açtığı diyarenin şiddetini önemli ölçüde azaltmak suretiyle, kolite bağlı kilo kaybını istatistiksel anlamlı olarak önlediği, buna karşın artmış kolon ağırlıklarında belirgin bir etki oluşturmadığı tespit edildi. Daha önceki çalışmalarda; çeşitli kolit modellerinde quercetin tedavisinin, inflamasyon ve bağışıklık üzerinde oluşturduğu düzenleyici etkiyle kolon ağırlığındaki artışı, diyare gelişimini ve ilişkili olarak kilo kaybını engellediği bildirilmiştir (28,93,98).

Trinitrobenzen sülfonik asit ile oluşturulan kolit, histopatolojik düzeyde belirli lezyonların oluşumunu tetikler (3,46). Bu lezyonlar makroskobik veya mikroskobik olarak değerlendirilebilir. İnflamasyonun kolonik doku üzerindeki etkisini ölçmek ve ayrıca ajanların bu lezyonları önleme veya tedavi etmedeki rolünü test etmek amacıyla, çeşitli skorlar ve değerlendirme araçları geliştirilmiştir. Bu çalışmada da TNBS aracılı kolon hasarının şiddeti; makroskobik ve histopatolojik (mikroskobik skor, Goblet hücre sayısı, Mast hücre sayısı, morfometrik ölçümler) olarak değerlendirildi. TNBS ile kolit indüksiyonu yapılmış deneklerde; duvarı kalınlaşmış kolon dokusunda, makroskobik olarak hiperemi ile birlikte yama benzeri mukozal ülserasyonlar gözlenmiş olup, bu bulguların yanı sıra çalışmamızda, dışkı değerlendirilmesinin de dahil edildiği makroskobik skorun, kolit grubu deneklerde anlamlı düzeyde yüksek olduğu tespit edildi. Quercetin tedavili grubun, koruyucu etkiye paralel olarak, kolit grubuna kıyasla daha düşük makroskobik skora sahip olduğu ve iki grup arasındaki farkın istatistiksel anlamlılık sınırına yakın olduğu tespit edildi. Bizim bulgularımızla uyumlu olarak, daha önceki çalışmalar; kolitli hayvanların makroskopik incelemesinde gözlenen mukozal ödem ve hemorajik ülserasyonları içeren kolonik hasarın, quercetin gibi çeşitli flavonoidler tarafından büyük ölçüde azaltıldığını göstermektedir (3,28,93,97,98).

Crohn hastalığı, ağızdan anüse kadar sindirim kanalını segmentler halinde, arada sağlam bölgeler bırakarak tutan, bağırsağın tüm histolojik katmanlarını etkileyerek transmural yayılım gösteren, kronik, inflamatuvar bir hastalıktır (29). Bu histolojik katmanlardan tunika mukoza, bağırsak epitel bariyeri ile yüzeyel mukus tabakasını oluşturan hücreleri içermesi nedeniyle oldukça önemlidir. İntestinal epitel bariyerini, enterositlerin apikal membranı ile hücreler arasındaki sıkı bağlantılar oluşturmaktadır. Bağırsak epitelinin yüzeyini örten ve lümenini kaplayan mukus tabakası, Goblet hücrelerinin ürettiği salgıyla düzenli olarak oluşturulur. Oluşturulan bu tabaka bağırsak lümeninde yerleşik olan mikroorganizmaların tunika mukoza ve altındaki tabakalara geçişini önler (99). TNBS/etanol indüksiyonu ile kolit oluşturduğumuz çalışmamızda; kullandığımız etanolün, bağırsak bariyerini etkili bir şekilde yok etmesinin ardından, TNBS kolon dokusu proteinleri ile etkileşime geçer. TNBS yüksek moleküler ağırlıklı proteinlerle birleştiğinde, bu proteinleri konakçı immün sisteminde immünojenik hale getirerek, hastalığa yol açan mukozal immün yanıtı başlatır. Kolitin indüklenmesinden sonraki ilk günlerde yapılan histopatolojik analizlerde; nötrofillerin ve makrofajların kolonik mukoza ve submukoza tabakalarına sızdığı görülmüştür. Sonraki günlerde, nötrofilik infiltrasyon ile karakterize transmural inflamasyon, kolon duvarının kalınlaşması, ülserasyonlar, Goblet hücrelerinin kaybı gibi patolojik durumlar ortaya çıkar. Crohn hastalığının transmural olması sebebiyle tunika muskularis tabakası da etkilenmektedir. Yoğun bakteri infiltrasyonu nedeniyle tunika muskularis tabakasındaki sirküler ve longitudinal kasların zarar görmesi ve bu bölgeye aşırı nötrofil, makrofaj ve lenfosit göçü sonucu bu tabakada incelme meydana gelmektedir (3). Yaptığımız çalışmada, TNBS/etanolün intrarektal uygulaması, kolon dokusunda; yaygın inflamatuvar hücre infiltrasyonu ile birlikte transmural inflamasyon, yer yer kanama alanları, yüzey epitelinde kayıp ve bozulmalar, Goblet hücre sayısında azalma, kriptlerde yapısal değişiklikler ve kript kaybı ile birlikte atlamalı olarak seyreden mukozal ülserasyon ve erozyona neden olmuştur. Bu bulgular, çalışmamızda tespit ettiğimiz; mikroskobik skor ve total kolon kalınlığında artış ve Goblet hücre sayısında istatistiksel anlamlı ölçüde azalmayla desteklenmiştir. TNBS'in yol açtığı inflamasyon ve ödemin, T. mukoza ve submukoza kalınlığında meydana getirdiği artışın, T. muskularisde ki incelmeyle birlikte, kolit grubu deneklerinin total kolon duvarında kontrole kıyasla anlamlı düzeyde kalınlaşmaya yol açtığı gözlenmiştir. Bu bulgular, TNBS aracılı kolit modelini kullanan çalışmaların histopatolojik verileri ile de uyumludur (3,28,100,101). İBH'nın başlangıç ve ilerlemesinde oksidatif stresin rolü gösterilmiş olup, hastalığın gelişiminde, ROS üretiminde artış ve bozulmuş antioksidan savunma mekanizmalarının etken faktörler olduğu kabul edilmektedir (1,42,44). Ayrıca

iltihaplı mukozada artmış protein karbonillerinin varlığı, serbest radikallerin, İBH'nda mukozal proteinlere zarar verebileceği teorisini desteklemektedir (102). ROS'nin bağırsak mukozasının yüzeyini örten musini yıkmak suretiyle, mukus bariyerini ortadan kaldırdığı ve sonucunda nötrofil, monosit ve lenfosit gibi fagositik lökositlerin infiltrasyonunu ve bakteriyel toksinlerin lamina propriyaya difüzyonunu kolaylaştırdığı düşünülmektedir (1-3). Bunun yanı sıra, uyarılmış ve infiltre olmuş nötrofiller tarafından daha fazla miktarlarda reaktif oksijen ve nitrojen türlerinin üretimi, hastalığın ilerlemesine katkı sağlamaktadır (42). Endojen antioksidanlar, normalde açığa çıkan oksidatif stresi önleyebilir, ancak giderek artan inflamasyon, bu önemli antioksidanlara olan talebi artırır ve sonuçta prooksidanlar ve antioksidanlar arasındaki dengesizlik mukozal hasarı tetikler (43). Ayrıca, ROS'nin, TNF-a ve NF-kB aktivasyonunda da etkili olduğunu gösteren çalışmalar; oksidatif stres ile immün düzenleyici inflamatuvar faktörler arasındaki ilişkiyi ortaya koymaktadır (28,43). Çeşitli deneysel kolit modelleri ile yapılmış pek çok çalışma; inflamasyon belirteci MPO seviyesinde artış ile birlikte, oksidatif stres parametresi malondialdehit (MDA) düzeylerinde artış ve antioksidan enzimler olan katalaz, süperoksit dismutaz, glutatyon aktivitelerinde ise anlamlı ölçüde azalma ile İBH'nın gelişiminde oksidatif stresin etkisini ve inflamasyon ile ilişkisini vurgulamaktadır (28,44,93).

Reaktif oksijen türlerinin, sadece oksidasyon sürecinde değil aynı zamanda, TNF-a sitokinlerinin üretimini indükleyen NF-kB gibi transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonu aracılığı ile inflamatuvar tepkiye katıldığı bilinmektedir (85,86). Bir flavanoid olan quercetinin, NO sentaz, COX-2, CRP gibi inflamatuvar aracıların ve NF-kB yolağının inhibisyonu suretiyle akut ve kronik inflamasyonu önlediği bildirilmiştir (81,83,103). Quercetinin antiinflamatuvar etkisinin, çeşitli inflamatuvar mediyatörlerin inhibisyonu aracılığı ile gerçekleştirmesinin yanı sıra serbest radiakalleri temizleme (antioksidan) özelliği ile de ilişkili olduğu bilinmektedir (27,84). Çalışmalar çeşitli deneysel kolit modelleri üzerinde, quercetinin antioksidan özelliği ve NF-kB inhibisyonu aracılığı ile kolon dokusunda ortaya çıkan histopatolojik değişiklikleri azaltmak suretiyle koruyucu etkisini göstermiştir (21,27,28,103-105). Bu çalışmada da, antioksidan ve antiinflamatuvar özellikleri nedeniyle uygulamış olduğumuz quercetinin, TNBS aracılı kolit modelinde, kolon dokusunda gözlenen histopatolojik hasarları büyük oranda azalttığı ve buna paralel olarak, tedavili grubun, kolit grubu ile kıyaslandığında, istatistiksel düzeyde anlamlı oranda düşük mikroskobik skora sahip olduğunu tespit ettik.

Mast hücresi, doğrudan ve dolaylı inflamatuvar aracıların salınımıyla birlikte doğal ve edinilmiş bağışıklık sinyallerine yanıt veren kemik iliği kökenli inflamatuvar bir hücredir. Mast

hücreleri; deride, timus, lenfoid dokuda, akciğerde, burun mukozasında, konjonktiva, uterus, idrar kesesi, dil, sinoviyal sıvı ve mezenterde, büyük ve küçük kan damarlarının çevresinde ve sindirim kanalının subserozal ve submukozal tabakalarında bulunur. Tarihsel olarak, mast hücreleri tip I aşırı duyarlılığa dahil hücre tipi olarak bilinir. Son yıllarda, bu hücrenin, kronik obstrüktif akciğer hastalığı, Crohn hastalığı, ülseratif kolit, karaciğer sirozu, kardiyomiyopati, multipl skleroz ve romatoid artrit dahil olmak üzere, bir dizi alerjik olmayan hastalıkta da yaygın olarak yer aldığı bildirilmiştir (106,107). TNF-a, interlökin (IL)-1β, IL-6, IL-8, IL-4, IL-13 ve TGF-β gibi çeşitli inflamatuvar ve kemotaktik sitokinler, aktive olmuş mast hücreleri tarafından salgılanmaktadır. TNF-a, IL-1β ve IL-6 inflamasyon ve akut faz reaksiyonlarının başlamasını tetiklerken, IL-8 ise nötrofiller için potansiyel bir kemotaktik molekül olarak yangı esnasında tepkinin genişlemesinde rol oynar (107-109). Mast hücrelerinin aktivasyonu, tirozin kinazın fosforilasyonuna ve internal Ca^{+2} mobilizasyonuna yol açar. Bunu, protein kinaz C'nin, mitojenler tarafından aktive edilen protein kinaz (MAPK) ın, NF-kB'nin aktivasyonu ve inflamatuvar sitokinlerin salınması izler (107-109). Farklı deneysel kolit modellerinde ve İBH hastalarında, kolon dokusunda nötrofil, makrofaj ve lenfositlerin yanı sıra belirgin mast hücre infiltrasyonu bildirilmiştir (100,106,110,111). Bu verilerle uyumlu olarak çalışmamızda, kolit grubundaki mast hücre sayısının, kontrol grubu ve quercetin tedavili grup ile kıyaslandığında anlamlı ölçüde yüksek olduğu görüldü. Qercetinin mast hücre sayısı üzerinde göstermiş olduğu etkinin nedeni olarak, bu ajanın NF-kB'nin nüklear translokasyonunu inhibe etmek suretiyle inflamatuvar sitokinlerin salınımını engellemesi olduğunu düşünmekteyiz. Bu fikrimizi destekler nitelikte, Min ve ark. (108) yapmış oldukları çalışmada; quercetinin NF-kB ve p38MAPK aktivasyonunu üzerindeki düzenleyici etkisi ile mast hücre aracılı alerjik inflamatuvar hastalıkların tedavisinde faydalı olduğunu rapor etmiştir.

Otofajinin, inflamatuvar yanıtları düzenlemedeki kritik rolü; İBH da dahil olmak üzere birçok otoimmün ve kronik inflamatuvar hastalıkta, disfonksiyonel otofajinin bir neden ya da katkıda bulunan faktör olarak gösterilmesiyle ortaya konulmuştur (14,49,70). Otofaji, hücrelerin hasarlı organellerinin ortadan kaldırıldığı, protein agregatlarının temizlendiği, hücrenin besin açlığı süreleri boyunca hayatta kaldığı ve hücre içi patojen kleransı ve sitokin sekresyonunun düzenlendiği fizyolojik süreçlerde kilit rol oynayan, hücresel strese karşı bir yanıt mekanizmasıdır. Hem doğal hem de edinilmiş bağışıklık sisteminin işleyişi için gerekli olmasının yanı sıra, metabolik ve inflamatuvar yanıtların düzenlenmesinde de oldukça önemlidir (48,49). Daha önceki çalışmalar, İBH'nda otofaji mekanizmasının bozulduğunu göstermektedir. Bununla birlikte bu bozulmanın, otofajiyi indükleyici yönde mi, yoksa inhibe

edici yönde mi olduğu halen tartışmalıdır. Farklı deneysel kolit modellerinde ve insanlarda, İBH'nın gelişim ve ilerleyişinde defektif otofajinin rölü üzerine odaklanmış literatür bilgisi; otofajinin indüklendiği (112-115) veya otofajinin baskılandığı (8-11,15,116) yönünde ikiye ayrılmaktadır.

Hücresel kontrol mekanizmalarından biri olan otofajide; Beclin-1 otofaji sürecini başlatır. LC3, otofagozom oluşumuna katılır; p62, LC3'e bağlanır ve anormal proteinlerin otofagozom içine taşınmasından sorumludur (117). Yapılan çalışmalar, Beclin-1'in, çeşitli fizyolojik ve patolojik süreçlerle ilişkili otofajide membran uzamasını koordine ettiğini göstermektedir (7). Otofajik süreçte Beclin-1, sınıf III PI3K Vps34 ile etkileşimine bağlı olarak, otofajik proteinlerin pre-otofagozomal yapıya lokalizasyonu için büyük önem taşır. Bu proteinler hep birlikte Beclin-1-Vps34-Vps15 çekirdek kompleksini oluştururlar (59). Farklı deneysel kolit modelleri üzerinde yapılan çalışmalarda, indüklenmiş otofajinin bir göstergesi olarak Beclin-1 ve LC3 seviyelerinin kolitli deneklerin kolon mukozasında arttığı bildirilmiştir (112-115). Bu çalışmaların yanı sıra, TNBS (9,15) ve DSS (8) ile indüklenmiş veya IL-10 knockout fare kolit modellerinde (11) ve İBH hastalarında (10) polimeraz zincir reaksiyonu, immünohistokimya, western blot ve elektron mikroskobik değerlendirmeler gibi ileri teknikler kullanılarak, azalmış mukozal Beclin-1 ve LC3 seviyeleri ile baskılanmış otofajinin hastalık gelişimindeki temel rölü gösterilmiştir. İBH modellerinde yetersiz/baskılanmış otofajiyi rapor eden verilerle uyumlu olarak, çalışmamızda TNBS indüksiyonu ile kolit oluşturduğumuz sıçanlarda, özellikle kolon epiteli başta olmak üzere mukozada azalmış Beclin-1 immünoreaktivitesi gözledik.

İnflamatuvar bağırsak hastalıklarında, otofajinin önemli bir düzenleyicisi olan, mTOR yolağının ilişkili olduğu gösterilmiştir (9-11,15,16). mTOR sinyal yolağının baskılanmasının, otofajinin aktivasyonuna yol açtığı bilinmektedir (11,52,53). Yapılan çeşitli deneysel kolit modellerinde ve İBH hastalarında, artmış fosforile-mTOR seviyeleri ile birlikte, baskılanmış otofajinin göstergesi olan azalmış mukozal Beclin-1 ve LC3 düzeyleri bildirilmiştir (9-11,15,16). Otofajinin; inflamatuvar tepkileri dengelemek suretiyle, bağırsak inflamasyonunu azaltmada önemli rol oynadığı bilinmektedir (48). Fare modellerinde otofaji yolaklarında rol oynayan Atg7 ve Atg16L1 proteinlerinin eksiklikleri, hem invitro hem de invivo olarak makrofajlarda, inflamatuvar tetikleyicilere karşı IL-1β ve IL-18'in yüksek miktarda salgılanmasına yol açmıştır (49,70). Macias-Ceja ve ark. (9), TNBS ile indüklenmiş kolitik farelerin mukozasında, mTOR bağımlı olarak otofajinin inhibisyonu ile birlikte NF-kB aktivasyonunun düzenleyicisi olarak bilinen, bir pro-inflamatuvar kompleks olan BCL10'un

yüksek protein seviyelerini rapor etmişlerdir. Ayrıca, bununla uyumlu olarak, BCL10'un NF-kB aktivasyonundaki kritik rolü, Bhattacharyya ve ark. (118) tarafından, karajenan ile indüklenen kolonik inflamasyon modelinde de bildirilmiştir. Fizyolojik koşullarda, bazal otofaji aracılığı ile sürekli bozulmaya uğraması (harcanması) nedeniyle, hücre içi p62 seviyeleri oldukça düşüktür (65). Otofajik aktivite ile p62 degrade edildiğinden, sitoplazmada p62 birikimi genellikle azalmış ya da yetersiz otofajik aktivitenin bir işareti olarak kabul edilir (6). Farklı yöntemler kullanılarak oluşturulan kolit modellerinde ve İBH hastalarının kolon dokusunda, bozulmuş otofajinin etkisiyle p62 seviyelerinin artmış olduğu rapor edilmiştir (10,116). BCL10'un otofajiyle yıkımında, p62'nin gerektiği bilinmektedir (57). Bu bilgiyi destekler nitelikte, Macias-Ceja ve ark. (9) çalışmalarında, TNBS aracılı otofajinin inhibisyonu ile birlikte kolon dokusunda artmış BCL10 ve p62 seviyelerinin, otofajiyi indükleyici ajanlar tarafından azaltıldığını göstermişlerdir. Sonuç olarak, TNBS'nin, mTOR bağımlı olarak otofajiyi inhibe ederek, pro-inflamatuvar kompleks BCL10 un birikimine ve nihayetinde NF-kB aktivasyonuna neden olduğu bildirilmiştir (9). Benzer olarak, otofaji stimülatörleri tarafından tedavi edilen farelerde tespit edilen BCL10 seviyelerindeki azalmanın, Iκ-Ba fosforilasyonu ve NF-κB'nin nükleer translokasyonunda gözlenen azalmadan sorumlu olduğu gösterilmiştir (119). Bu literatür bilgisi, TNBS ile mukozal otofajinin inhibisyonunun (artmış p62 düzeyi), BCL10 birikmesi, NF-kB'nin nükleer translokasyonu ile birlikte pro-inflamatuvar sitokinlerin ifadesindeki artışla ilişkili olduğunu göstermektedir. Mukozal otofajinin farmakolojik aktivasyonu, BCL10 bozulmasını destekleyebilir ve TNBS kaynaklı enflamasyonu önleyebilir (9). Baskılanmış veya yetersiz otofajinin kolit gelişimi ve ilerleyişindeki aktif rolünü gösteren ve hastalığın tedavisinde otofajiyi tetikleyici ajanların yararlı etklerini vurgulayan deliller giderek artmaktadır (9,11) Sun ve Sun (15) çalışmalarında, alfa lipoik asitin, TNBS aracılı kolit üzerindeki faydalı etkisini, mTOR'u inhibe etmek suretiyle otofajiyi tetikleyerek gerçekleştirdiğini rapor etmişlerdir. Bununla birlikte kolitte, mTOR inhibitörlerinin, NF-kB aktivasyonunu düzenleyici ilaçlar olarak etkili olduğu gösterilmiştir (120,121). Park ve ark. (54), TNBS kolit modelinde, makrolid suksinil makrolaktin A'nın, TNF-aracılı PI3K, AKT, mTOR ve p70S6 kinazın fosforilasyonunu inhibe ederek kolitin şiddetini azalttığını bildirmiştir. Mukozal otofajinin farmakolojik stimülasyonunun, intestinal inflamasyonu ve dolayısı ile TNBS aracılı kolitin şiddetini azalttığı gösterilmiştir (9). Zhao ve ark. (11) IL-10 knockout fare modelinde, dokosaheksaenoik asitin, artmış TNF-a ve interferon-gama seviyelerini azaltmak ve mTOR yolağının inhibe ederek otofajiyi arttırmak suretiyle, kolitin şiddetini azalttığını rapor etmişlerdir. Biz de TNBS aracılı kolit modelini kullandığımız

bu çalışmada, NF-kB inhibisyonu aracılığı ile güçlü antiiflamatuvar potansiyele sahip olduğu bilinen quercetinin, kolitin yol açtığı baskılanmış otofajiyi düzenlemek suretiyle mukozal Beclin-1 immünoreaktivitesinde artışa ve p62 immünoreaktivitesinde azalmaya neden olduğunu gözlemledik. Quercetinin de ait olduğu polifenolleri içeren çeşitli bitki metabolitlerinin, otofaji üzerinde düzenleyici etkilerinin gösterildiği çalışmalar, bizim bulgularımızı destekler niteliktedir (22-26). Polifenollerin potansiyel olarak otofajiyi indüklediği, hatta çeşitli yollarla canlıların yaşam süresini uzattıkları bulunmuştur (23,88). Quercetin ve resveratrol gibi bilinen polifenolik otofaji indükleyicilerinin, sirtuin aktivasyonu ile ökaryotların ömrünü uzattığı saptanmıştır (88). Polifenollerin; FOXO transkripsiyon faktörlerinin hedef genleri üzerindeki etkileri aracılığı ile, ana otofaji genlerinin deasetilasyonu (ve dolayısıyla aktivasyonu) ve AMPK ile etkileşimleri yoluyla otofajiyi indükledikleri bildirilmiştir (89). Otofaji ile inflamazomlar (inflamatuvar yanıt ile ilişkili çoklu protein platformları) arasında yakın ilişki söz konusudur. Otofaji, inflamazom oluşumunu negatif yönde düzenleyebilir; baskılanmış otofaji inflamozom aktivasyonunu artırırken, otofajinin aktivasyonu, inflamazom degredasyonunu artırır (122-124). Xue ve ark. (25), quercetinin otofajiyi aktive etmek suretiyle, epithelial hücrelerde *Escherichia coli* O157:H7 ile tetiklenmiş inflamazom aktivasyonunu baskıladığını bildirmişlerdir. Bununla birlikte quercetinin, mTOR aktivitesini bloke etmek suretiyle, kanser hücrelerinde otofajiyi tetiklediği gösterilmiştir (24,26). Khajah ve ark. (16) quercetin gibi bazı önemli flavanoidleri içeren soğan özünün, DSS aracılı kolitte, kolonik dokuda PI3K/mTOR yolağının aktivasyonunu azalttığını rapor etmişlerdir.

Otofajik defektlerin, Goblet hücre fonksiyonunu etkileyerek mukus salınımını ve enterositlerin emilim fonksiyonlarını azalttığı bildirilmiştir (13). Goblet hücreleri; bağırsakta yüksek seviyede müsin glikoproteinlerini (Musin 2/MUC2), antimikrobiyal faktörleri (trefoil faktör) ve mukus çapraz bağlayıcı proteinleri (Fc-gama bağlayıcı protein) sentezleyip, salgılayarak, epitel bariyerinin ilk savunma hattı olan mukus tabakasını oluşturur. Bu tabaka normal bağırsak mikrobiyotası ile epitel yüzey arasında kritik bir alan oluşturur. İBH'nda, mukus tabakasının bozulduğu ve bu durumun, mikrobiyotanın epitele yakın yoğun bir tabaka oluşturmak suretiyle, kronik inflamasyona yol açtığı gösterilmiştir (1-3). Kolonik Goblet hücrelerinde, otofajide rol oynayan proteinlerin etkili mukus salınımı için gerekli olduğu gösterilmiştir (125). Patel ve ark. (125) çalışmalarında, genetik olarak Atg5, Atg7 veya LC3 knockout farelerde ya da bu genleri baskılanmış hücre kültürü modellerinde, bozulmuş otofaji nedeniyle Goblet hücrelerinin morfolojilerinin değiştiğini ve hücre içi mukus birikimine

rağmen yüzey mukus tabakasındaki azalmayı göstermişler, böylece bozulmuş otofajinin Goblet hücre granül ekzositozunda defektlere yol açtığını bildirmişlerdir. Bu bulgular, Goblet hücrelerindeki disfonksiyonel otofajinin, azalmış mukus tabakası nedeniyle, mikrobiyatanın epitel tabakaya kronik inflamasyonuna ya da mikrobiyataya karşı immün tepkilere neden olarak, İBH'nın gelişimine katkıda bulunabileceğini düşündürmektedir (48). Bağırsak epitel hücrelerinde yetersiz otofajinin, inflamatuvar koşullarda apoptozu indükleyerek, bariyer bütünlüğünü zayıflatabildiği gösterilmiştir (14). Tawiah ve ark. (126) artmış ROS aracılığı ile yanlış katlanmış MUC2 seviyelerinde artışın, Goblet hücre apoptozisini tetiklediğini gözlemlemişlerdir. Bu çalışmada, MUC2 katlanmasının düzeltilmesi ve ROS'nin inhibe edilmesi, ER stresini hafifletti ve hücreleri apoptozdan kurtardı. Sonuç olarak, kolitin erken safhasında, aşırı mukus üretiminin, ciddi ER stresine ve enterosit hasarından önce gözlenen Goblet hücre apoptozisine neden olduğu bildirildi. Böylece, gastrointestinal inflamasyonda, yüksek MUC2 biyosentezi ve Goblet hücre apoptozisinin, disfonksiyonel epitel bariyere yol açtığı gösterilmiştir. Daha önceki araştırmaların (3,44) sonuçları ile uyumlu olarak, çalışmamızda da kolit grubundaki Goblet hücre sayısında, kontrol grubu ve quercetin tedavili grup ile kıyaslandığında anlamlı derecede azalma olduğu tespit edilmiştir. Topçu-Tarladaçalışır ve ark. (44) çalışmalarında, kolit grubu deneklerin kolon dokusunda artmış epiteliyal apoptozis, Goblet hücre sayısında anlamlı düzeyde azalma ile birlikte epitel tabakada belirgin hücre kaybı ve hasarını ortaya koymuşlardır. Bu gözlemler bize, çalışmamızda tespit ettiğimiz, kolit grubu ortalama Goblet hücre sayısında anlamlı derecede azalmanın, TNBS aracılı mukozal otofajinin inhibisyonu nedeniyle meydana gelen ER stresini tolere edemeyen hücrelerin ölümü neticesinde ortaya çıktığını düşündürmektedir. Bununla birlikte, tedavi grubuna uyguladığımız, güçlü antiinflamatuvar etkili bir flavonoid olan quercetinin, antioksidan ve antiinflamatuvar özelliklerinin yanı sıra otofajik mekanizma üzerindeki düzenleyici etkisi ile Goblet hücre kaybını anlamlı oranda azalttığını tespit ettik. Bu bulgumuza paralel olarak, deneysel kolit modellerinde; çeşitli flavonoid türevlerinin, Goblet hücreleri ve dolayısı ile intestinal bariyerin bütünlüğü üzerinde koruyucu etkisi gösterilmiştir (21,104,105).

Sonuç olarak bu çalışmada; sıçanlara rektal yoldan verilen TNBS'in, mukozal otofajiyi baskılamak suretiyle, kolon dokusunda Crohn hastalığına karakteristik histopatolojik değişikliklere yol açtığı gösterilmiştir. Ayrıca uyguladığımız quercetin tedavisinin, kolite bağlı olarak ortaya çıkan otofajik ve inflamatuvar değişiklikleri düzenlemek suretiyle hastalığın gelişimini önlemede faydalı olduğu saptanmıştır. Bu çalışma, otofajik süreçlerin manipülasyonunun, İBH için terapötik bir hedef olabileceğini göstermenin yanı sıra, deneysel

kolit modelinde, quercetinin mukozal otofajiyi indükleyici etkisini ortaya koyan ilk çalışma olma özelliği taşımaktadır. Bununla birlikte; kolonun inflamatuvar durumunu ortaya koyacak, çeşitli sitokin düzeyleri ile birlikte otofaji ilişkili yolakların ve farklı otofajik proteinlerin değerlendirilmemiş olması çalışmamızın eksik yönleri olup, quercetinin bu etkisinin, inflamasyon ve otofajik süreç arasındaki karşılıklı ilişkiyi ortaya koyabilecek farklı araştırma metodlarının kullanıldığı, daha ileri çalışmalar ile desteklenmesi gerekmektedir.

SONUÇLAR

Çalışmamızda; TNBS ile oluşturulmuş deneysel kolit modelinde quercetinin, otofajik süreç (p62 ve Beclin-1 immünoreaktivitesi) üzerindeki etkisi ile kolon dokusunda meydana gelen histopatolojik hasarları (mikroskobik skor, Goblet hücre sayısı, Mast hücre sayısı, morfometrik ölçümler) önleyici/azaltıcı rolü araştırılmıştır.

Deney sürecinde yapılan tüm incelemeler sonucunda;

1. TNBS'in %30'lık etil alkol içerisinde çözünerek tek doz halinde intrarektal uygulanması, şiddetli diyare ile birlikte, kolit grubu deneklerinde anlamlı derecede kilo kaybına yol açtığı, günlük 100 mg/kg quercetin verilen tedavili grupta ise vücut ağırlığı kaybının anlamlı ölçüde azaldığı gözlendi.
2. Kolit indüksiyonu yapılmış kolit ve quercetin tedavili grupların ortalama kolon ağırlıklarında, ödem ve inflamasyona bağlı olduğu düşünülen anlamlı bir artış olduğu ve tedavinin bu parametre üzerine istatistiğe yansıyan bir etki oluşturmadığı tespit edildi.
3. Deney süresi sonunda, kolonun longitudinal olarak açılarak yapılan makroskopik değerlendirmesi sonucu, hasar skorunun kolit grubu ve quercetin tedavili gruplarda, kontrole kıyasla anlamlı ölçüde yüksek olduğu, tedavinin etkisi ile bulguların azalmasına bağlı olarak hasar skorunda meydana gelen düşüklüğün istatistiksel anlamlılık sınırına yakın olmakla birlikte kolit grubuna kıyasla anlamlı bir fark oluşturmadığı görüldü.
4. TNBS/etanolün intrarektal uygulamasının, sıçan kolon dokusunda; yaygın inflamatuvar hücre infiltrasyonu ile birlikte transmural inflamasyon, yer yer kanama alanları, yüzey epitelinde kayıp ve bozulmalar, Goblet hücre sayısında azalma, kriptlerde yapısal değişiklikler ve kript kaybı ile birlikte atlamalı olarak seyreden mukozal ülserasyon ve

erozyona neden olduğu ve bunun neticesinde yaptığımız değerlendirme sonucunda mikroskobik skorun, kolit grubunda kontrol ve quercetin tedavili gruba kıyasla anlamlı ölçüde yüksek olduğu tespit edildi. Güçlü antiinflamatuvar ve antioksidan özellikleri aracılığı ile quercetin tedavisnin bu hasarları önlediği/azalttığı gözlendi.

5. Doğal ve edinilmiş bağışıklık sinyallerine yanıt veren kemik iliği kökenli inflamatuvar bir hücre olan mast hücrelerinin kolit gelişimdeki rolünü ortaya koyacak şekilde, çalışmamızda TNBS aracılı kolit indüksiyonunun, diğer inflamatuvar hücrelerinin infiltrasyonu ile birlikte mast hücre sayısında anlamlı seviyede artışa neden olduğu ve quercetin tedavisi ile mast hücre infiltrasyonunun belirgin düzeyde azaldığı tespit edildi.
6. TNBS'in yol açtığı inflamasyon ve ödemin, T. mukoza ve submukoza kalınlığında meydana getirdiği artış, T. muskularisde ki incelmeyle birlikte, kolit grubu deneklerinin total kolon duvarında kontrole kıyasla anlamlı düzeyde kalınlaşmaya neden olduğu gözlendi. Antiinflamatuvar ve antioksidan özellikli quercetin desteği ile kolon duvarı tabakalarına ait morfometrik değişikliklerin büyük ölçüde önlendiği tespit edildi.
7. Otofajinin kolit gelişimdeki rolünü ve quercetinin otofajik süreç üzerindeki etkisini incelediğimiz çalışmada, TNBS aracılı kolit indüksiyonunun sıçan kolon dokusunda, azalmış mukozal Beclin-1 immünoreaktivitesi ve artmış p62 immünoreaktivitesi ile gözlemlediğimiz, baskılanmış/yetersiz otofajiye neden olduğu, quercetin tedavisinin otofajik süreci kontrol eden yolakları düzenleyerek otofajiyi indüklediği ve buna paralel olarak kolit grubuna kıyasla Beclin-1 ve p62 nin mukozal immünoreaktivitelerindeki değişiklikleri anlamlı ölçüde önlediği tespit edildi.
8. Bağırsak epitel hücrelerinde yetersiz otofajinin, inflamatuvar koşullarda apoptozu indükleyerek, bariyer bütünlüğünü zayıflatabildiği bilgisine dayanarak; çalışmamızda da, TNBS aracılı mukozal otofajinin inhibisyonu nedeniyle, hasarı tolere edemeyen bağırsak epitel hücrelerinin ölümü neticesinde, kolit grubu ortalama Goblet hücre sayısında anlamlı derecede azalma tespit edildi. Quercetinin, otofajik mekanizma üzerindeki düzenleyici etkisi ile Goblet hücre kaybını anlamlı oranda azalttığı gözlendi.

Sonuç olarak bu çalışmada; sıçanlara rektal yoldan verilen TNBS'in, mukozal otofajiyi baskılamak suretiyle, kolon dokusunda Crohn hastalığına karakteristik histopatolojik değişikliklere yol açtığı gösterilmiştir. Ayrıca uyguladığımız quercetin tedavisinin, kolite bağlı olarak ortaya çıkan otofajik ve inflamatuvar değişiklikleri düzenlemek suretiyle hastalığın gelişimini önlemede faydalı olduğu saptanmıştır. Bununla birlikte; kolonun inflamatuvar

durumunu ortaya koyacak, çeşitli sitokin düzeyleri ile birlikte otofaji ilişkili yolakların ve farklı otofajik proteinlerin değerlendirilmemiş olması çalışmamızın eksik yönleri olup, quercetinin bu etkisinin, inflamasyon ve otofajik süreç arasındaki karşılıklı ilişkiyi ortaya koyabilecek farklı araştırma metodlarının kullanıldığı, daha ileri çalışmalar ile desteklenmesi gerekmektedir.

ÖZET

Ülseratif kolit ve Crohn hastalığını kapsayan inflamatuvar bağırsak hastalıkları (İBH); son yıllarda dünya çapında insidansı gittikçe artan, kronik ve tekrarlayan inflamatuvar bir bozukluktur. Bu çalışmada, 2,4,6 trinitrobenzen sülfonik asit (TNBS) ile kolit oluşturulmuş şıçanların kolon dokusunda, quercetin kullanımının otofajik süreç üzerindeki etkisi ile kolon dokusunda meydana gelen histopatolojik hasarları önleyici/azaltıcı rolü araştırıldı.

Bu amaçla 24 adet Wistar Albino sıçandan rastgele 3 grup (Kontrol, kolit ve kolit+quercetin) oluşturuldu. Kolit indüksiyonu; 24 saat öncesinde aç bırakılmış kolit ve kolit+quercetin grubu deneklere, 0,25 ml %30 luk etanol içerisinde hazırlanmış, 25 mg TNBS'in intrarektal yoldan verilmesiyle gerçekleştirildi. Kolit indüksiyonundan hemen sonra başlayarak 7 gün boyunca, kolit+quercetin grubu deneklerine, intragastrik yoldan 100 mg/kg/gün quercetin verildi. Deneklerin günlük olarak vücut ağırlığı ve dışkı takibi yapıldı. Işık mikroskobik incelemeler (mikroskobik skor, Goblet hücre sayısı, mast hücre sayısı, morfometrik ölçümler) ile kolon histopatolojisinin yanı sıra, mukozal Beclin-1 ve p62 immünoreaktivitesi ile de otofaji değerlendirildi.

Deneklere TNBS'in rektal yoldan uygulanması; şiddetli diyare ile birlikte belirgin kilo kaybı ile kendini gösteren kolit gelişimine neden oldu. Histopatolojik olarak kolon dokusunda gözlenen; yaygın inflamatuvar hücre infiltrasyonu ile birlikte transmural inflamasyon, yer yer kanama alanları, yüzey epitelinde kayıp ve bozulmalar, Goblet hücre sayısında azalma, kriptlerde yapısal değişiklikler ve kript kaybı ile birlikte atlamalı olarak seyreden mukozal ülserasyon ve erozyon nedeniyle, kolit grubunda yüksek mikroskobik hasar skoru tespit edildi.

Ayrıca, baskılanmış otofaji nedeni ile mukozal Beclin-1 immünoreaktivitesinde azalma, p62 immünoreaktivitesinde artış gözlendi. Quercetin tedavisi, kolon dokusunda ortaya çıkan histopatolojik ve otofajik değişiklikleri önemli ölçüde önledi.

Bu çalışmanın bulguları; quercetinin, TNBS ile indüklenen kolite bağlı olarak ortaya çıkan otofajik ve inflamatuvar değişiklikleri düzenlemek suretiyle, İBH gelişimini önlemede faydalı olabileceğini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Trinitrobenzen sülfonik asit, Quercetin, İnflamatuvar bağırsak hastalıkları, Otofaji, Sıçan.

THE EFFECTS OF QUERCETIN ON AUTOPHGY IN EXPERIMENTAL COLITIS INDUCED BY TRINITROBENZENE SULFONIC ACID

SUMMARY

Inflammatory bowel diseases (IBD) including ulcerative colitis and Crohn's disease, is a chronic and recurrent inflammatory disorder of the digestive tract and the incidence of IBD is increasing worldwide. In this study, the effect of quercetin on the autophagic process and its role in preventing / reducing histopathological damage in the colon tissue of rats treated with 2,4,6 trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS) were investigated.

Twenty-four Wistar albino rats divided from randomly 3 groups (control, colitis and colitis + quercetin). For the colitis induction, TNBS (25 mg) was prepared in 0.25 ml of 30% ethanol and then intrarectally was administered to fasted colitis and colitis + quercetin group of animals for 24 hours. Beginning immediately after the induction of colitis, intragastrically, 100 mg/kg per day quercetin was given for 7 days. Following colitis induction, all rats were monitored daily for body weight and stool consistency. At the end of the experiment, colon tissues were removed and evaluated the colon histopathology by light microscopic examination (microscopic score, Goblet cell count, mast cell count, morphometric measurements), and the autophagy by immunohistochemically mucosal Beclin-1 and p62.

Rectal administration of TNBS to rats was caused severe diarrhea accompanied by marked weight loss. Histopathologically; transmural inflammation with diffuse inflammatory cell infiltration, occasional hemorrhagic areas, loss and deterioration of surface epithelium, decrease in number of Goblet cells, crypt distortion, crypt loss and patch-like ulceration were observed in colon of colitic rats. As a result, high microscopic damage score was determined in

colitis group. As indicator of suppressed autophagy, we also shown that a decrease in mucosal Beclin-1 immunoreactivity and an increase in p62 immunoreactivity. Quercetin treatment significantly prevented histopathological and autophagic changes in colon tissue of TNBS-induced colitic rats.

The findings of this study suggested that quercetin may be useful in preventing and treatment of IBD by regulating autophagic and inflammatory changes in colon.

Keywords: Trinitrobenzene sulfonic acid, Quercetin, Inflammatory bowel diseases, Autophagy, Rat

KAYNAKLAR

1. Tian T, Wang Z, Zhang J. Pathomechanisms of Oxidative Stress in Inflammatory Bowel Disease and Potential Antioxidant Therapies. Oxid Med Cell Longev 2017;2017:1-18.
2. Goyette P, Labbe C, Trinh TT, Xavier RJ, Rioux JD. "Molecular pathogenesis of inflammatory bowel disease: genotypes, phenotypes and personalized medicine," Annals of Medicine 2017;39(3):177-200.
3. Antoniou E, Margonis GA, Angelou A, Pikouli A, Argiri P, Karavokyros I et al. The TNBS-induced colitis animal model: An overview. Ann Med Surg (Lond) 2016;11:9-15.
4. Leal RF, Ayrizono Mde L, Milanski M, Fagundes JJ, Moraes JC, Meirelles LR et al. Detection of epithelial apoptosis in pelvic ileal pouches for ulcerative colitis and familial adenomatous polyposis. J. Trans. Med 2010;8(1):11.
5. Zhou F, Yang Y, Xing D. Bcl-2 and Bcl-xL play important roles in the crosstalk between autophagy and apoptosis. FEBS J 2010;278(3):403-13.
6. Klionsky DJ, Abdelmohsen K, Abe A, Abedin MJ, Abeliovich H, Acevedo et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition). Autophagy 2016;12(1);1-222.
7. Kang R, Zeh HJ, Lotze MT, Tang D. The Beclin 1 network regulates autophagy and apoptosis. Cell Death Differ 2011;18(4):571-80.
8. Műzes G, Kiss AL, Tulassay Z, Sipos F. Cell-free DNA-induced alteration of autophagy response and TLR9-signaling: Their relation to amelioration of DSS-colitis. Comp Immunol Microbiol Infect Dis 2017;52:48-57.
9. Macias-Ceja DC, Cosín-Roger J, Ortiz-Masiá D, Salvador P, Hernández C, Esplugues JV et al. Stimulation of autophagy prevents intestinal mucosal inflammation and ameliorates murine colitis. Br J Pharmacol 2017;174(15):2501-11.
10. Ortiz-Masiá D, Cosín-Roger J, Calatayud S, Hernández C, Alós R, Hinojosa J et al. Hypoxic macrophages impair autophagy in epithelial cells through Wnt1: relevance in IBD. Mucosal Immunol 2014;7(4):929-38.

11. Zhao J, Dong JN, Wang HG, Zhao M, Sun J, Zhu WM et al. Docosahexaenoic Acid Attenuated Experimental Chronic Colitis in Interleukin 10-Deficient Mice by Enhancing Autophagy Through Inhibition of the mTOR Pathway. JPEN J Parenter Enteral Nutr 2017;41(5):824-9.

12. Scharl M, Rogler G. Inflammatory bowel disease: dysfunction of autophagy? Dig Dis 2012;30(3):12-9.

13. Baxt LA, Xavier RJ. Role of Autophagy in the Maintenance of Intestinal Homeostasis. Gastroenterology 2015;149(3):553-62.

14. Pott J, Kabat AM, Maloy KJ. Intestinal Epithelial Cell Autophagy Is Required to Protect against TNF-Induced Apoptosis during Chronic Colitis in Mice. Cell Host Microbe 2018;23(2):191-202.

15. Sun J, Sun MJ. Mechanism of alpha-lipoic acid in treating TNBS-induced colitis in mice. Zhonghua Yi Xue Za Zhi 2016;96(40):3246-50.

16. Khajah MA, Orabi KY, Hawai S, Sary HG, El-Hashim AZ. Onion bulb extract reduces colitis severity in mice via modulation of colonic inflammatory pathways and the apoptotic machinery. J Ethnopharmacol 2019;241:112008.

17. Zhang Z, Kennedy H. Ulcerative colitis: current medical therapy and strategies for improving medication adherence. Eur J Gastroenterol Hepatol 2009;21(1):1-8.

18. Borrelli O, Cordischi L, Cirulli M, Paganelli M, Labalestra V, Uccini S et al. Polymeric diet alone versus corticosteroids in the treatment of active pediatric Crohn's disease: a randomized controlled open-label trial. Clin Gastroenterol Hepatol 2006;4(6):744-53.

19. Froslie KF, Jahnsen J, Moum BA, Vatn MH. Mucosal healing in inflammatory bowel disease: results from a Norwegian population-based cohort. Gastroenterology 2007;133(2):412-22.

20. Middleton EJ, Kandaswami C, Theoharides TC. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for infl ammation, heart disease, and cancer. Pharmacol Rev 2000;52(4):673-751.

21. Guazelli CF, Fattori V, Colombo BB, Georgetti SR, Vicentini FT, Casagrande R et al. Quercetin-loaded microcapsules ameliorate experimental colitis in mice by anti-inflammatory and antioxidant mechanisms. J Nat Prod 2013;76(2):200-8.

22. Pallauf K, Rimbach G. Autophagy, polyphenols and healthy ageing. Ageing Res Rev 2013;12(1):237-52.

23. Pazoki-Toroudi H, Amani H, Ajami M, Nabavi SF, Braidy N, Kasi PD et al. Targeting mTOR signaling by polyphenols: A new therapeutic target for ageing. Ageing Res Rev 2016;31:55-66.

24. Granato M, Rizzello C, Gilardini Montani MS, Cuomo L, Vitillo M, Santarelli R et al. Quercetin induces apoptosis and autophagy in primary effusion lymphoma cells by inhibiting PI3K/AKT/mTOR and STAT3 signaling pathways. J Nutr Biochem 2017;41:124-36.

25. Xue Y, Du M, Zhu MJ. Quercetin suppresses NLRP3 inflammasome activation in epithelial cells triggered by Escherichia coli O157:H7. Free Radic Biol Med 2017;108:760-9.

26. Klappan AK, Hones S, Mylonas I, Brüning A. Proteasome inhibition by quercetin triggers macroautophagy and blocks mTOR activity. Histochem Cell Biol 2012;137(1):25-36.

27. Dodda D, Chhajed R, Mishra J. Protective effect of quercetin against acetic acid induced inflammatory bowel disease (IBD) like symptoms in rats: possible morphological and biochemical alterations. Pharmacol Rep 2014;66(1):169-73.

28. 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 Jan;19(1):43-50.

29. Griffiths AM, Buller HB. Inflammatory Bowel Disease. In: Walker, Durie, Hamilton (eds). Pediatric Gastrointestinal Disease 3th edition. Ontario: B.C. Decker Inc; 2000. p.613-52.

30. Gore RM, Balthazar EJ, Ghahremani GG, Miller FH. CT features of ulcerative colitis and Crohn's disease. AJR Am J Roentgenol 1996;167(1):3-15.

31. Kwon JH, Peppercorn MA, Farrelll RJ. Diagnostic features of inflammatory bowel disease. Gastroenterol Endosc News 2002;53:28-9.

32. Head K, Jurenka JS. Inflammatory bowel disease. Part II: Crohn's disease pathophysiology and conventional and alternative treatment options Altern Med Rev 2004;9(4):360-401.

33. Buran T. Inflammatory Bowel Disease; Epidemiology, Prevalence, Incidence Gastroenteroloji BD. Turkiye Klinikleri J Gastroenterohepatol-Special Topics 2017;10(1):15-7.

34. Ogura Y, Bonen DK, Inohara N, Nicolae DL, Chen FF, Ramos R et al. A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn’s disease. Nature 2001;411(6837):603-6.

35. Peltekova VD, Wintle RF, Rubin LA, Amos CI, Huang Q, Gu X et al. Functional variants of OCTN cation transporter genes are associated with Crohn disease. Nat Genet 2004;36:471-5.

36. Stoll M, Corneliussen B, Costello CM, Waetzig GH, Mellgard B, Koch WA et al. Genetic variation in DLG5 is associated with inflammatory bowel disease. Nat Genet 2004;36:476-80.

37. Collins SM. Stress and the gastrointestinal tract IV. Modulation of intestinal inflammation by stress: basic mechanisms and clinical relevance. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 2001;280(3):315-8.

38. Hollander D. Intestinal permeability, leaky gut, and intestinal disorders. Curr Gastroenterol Rep 1999;1(5):410-6.

39. Sartor RB. Enteric microflora in IBD: pathogens or commensals? Inflamm Bowel Dis 1997;3:230-5.

40. Kleessen B, Kroesen AJ, Buhr HJ, Blaut M. Mucosal and invading bacteria in patients with inflammatory bowel disease compared with controls. Scand J Gastroenterol 2002;37(9):1034-41.

41. Sonnenberg A, McCarty DJ. Jacobsen SJ. Geographic variation of inflammatory bowel disease within the United States. Gastroenterology 1991;100(1):143-9.

42. Girgin F, Karaoglu O, Erkuş M, Tüzün S, Ozütemiz O, Dinçer C et al. Effects of trimetazidine on oxidant / antioxidant status in trinitrobenzenesulfonic acid-induced chronic colitis. J Toxicol Environ Health A 2000;59(8):641-52.

43. D'Odorico A, Bortolan S, Cardin R, D'Inca' R, Martines D, Ferronato A et al. Reduced plasma antioxidant concentrations and increased oxidative DNA damage in inflammatory bowel disease. Scand J Gastroenterol 2001;36(12):1289-94.

44. Topcu-Tarladacalisir Y, Akpolat M, Uz YH, Kizilay G, Sapmaz-Metin M, Cerkezkayabekir A et al. Effects of curcumin on apoptosis and oxidoinflammatory regulation in a rat model of acetic acid-induced colitis: the roles of c-Jun N-terminal kinase and p38 mitogen-activated protein kinase. J Med Food 2013;16(4):296-305.

45. Jurjus AR, Khoury NN, Reimund JM. Animal models of inflammatory bowel disease, J Pharmacol Toxicol Methods 2004;50(2):81-92.

46. Neurath M, Fuss I, Strober W. TNBS-colitis. Int Rev Immunol 2000;19(1):51-62.

47. Neurath MF, Fuss I, Kelsall BL, Stüber E, Strober W. Antibodies to interleukin 12 abrogate established experimental colitis in mice. J Exp Med 1995;182(5):1281-90.

48. El-Khider F, McDonald C. Links of Autophagy Dysfunction to Inflammatory Bowel Disease. Onset. Dig Dis 2016;34(1-2):27-34.

49. Cadwell K, Stappenbeck TS, Virgin HW. Role of autophagy and autophagy genes in inflammatory bowel disease. Curr Top Microbiol Immunol 2009;335:141-67.

50. Salem M, Ammitzboell M, Nys K, Seidelin JB, Nielsen OH. ATG16L1: A multifunctional susceptibility factor in Crohn disease. Autophagy. 2015;11(4):585-94.

51. Mizushima N, Yoshimori T, Ohsumi Y. The role of Atg proteins in autophagosome formation. Annu. Rev. Cell Dev. Biol 2011;27:107-32.

52. Mihaylova MM, Shaw RJ. The AMPK signalling pathway coordinates cell growth, autophagy and metabolism. Nat Cell Biol 2011;13(9):1016–23.

53. Bowman CJ. Ayer DE, Dynlacht BD. Foxk proteins repress the initiation of starvation-induced atrophy and autophagy programs. Nat. Cell Biol 2014;16(2):1202-14.

54. Park S, Regmi S.C, Park S.Y, Lee E.K, Chang J.H, Ku et al. Protective effect of 7-O-succinyl macrolactin A against intestinal inflammation is mediated through PI3-kinase/Akt/mTOR and NF-kappaB signaling pathways. Eur. J. Pharmacol 2014;735:184-92.

55. Bonizzi G, Karin M. The two NF-kappaB activation pathways and their role in innate and adaptive immunity. Trends Immunol 2004;25(6):280-8.

56. Zhou H, Wertz I, O'Rourke K, Ultsch M, Seshagiri S, Eby M et al. Bcl10 activates the NF-kappaB pathway through ubiquitination of NEMO. Nature 2004;27(6970):167-71.

57. Paul S, Schaefer BC. Selective autophagy regulates T cell activation. Autophagy 2012;8(11):1690-2.

58. Li BX, Li CY, Peng RQ, Wu XJ, Wang HY, Wan DS et al. The expression of beclin 1 is associated with favorable prognosis in stage IIIB colon cancers. Autophagy 2009;5(3):303-6

59. He C, Levine B. The Beclin 1 interactome. Curr Opin Cell Biol 2010;22(2):140-9.

60. Pankiv S, Clausen T.H, Lamark T, Brech A, Bruun JA, Outzen H et al. p62/SQSTM1 binds directly to Atg8/LC3 to facilitate degradation of ubiquitinated protein aggregates by autophagy. J. Biol. Chem 2007;282(33):24131-45.

61. Huang S, Okamoto K, Yu C, Sinicrope F.A.p62/sequestosome-1 up-regulation promotes ABT-263-induced caspase-8 aggregation/activation on the autophagosome. J. Biol. Chem 2013;288(47):33654-66.

62. Ichimura Y, Kominami E, Tanaka K, Komatsu M. Selective turnover of p62/A170/SQSTM1 by autophagy. Autophagy 2008;4(8):1063-6.

63. Bjørkøy G, Lamark T, Brech A, Outzen H, Perander M, Øvervatn A et al. p62/SQSTM1 forms protein aggregates degraded by autophagy and has a protective effect on huntingtininduced cell death. J Cell Biol 2005;171(4):603-14.

64. Gardet A, Xavier RJ. Common alleles that influence autophagy and the risk for inflammatory bowel disease. Curr Opin Immunol 2012;24(5):522-9.

65. Mathew R, Karp C.M, Beaudoin B, Vuong N, Chen G, Chen H.Y et al. Autophagy suppresses tumorigenesis through elimination of p62. Cell 2009;137(6):1062-75.

66. Kim S. Eun HS. Jo EK. Roles of Autophagy-Related Genes in the Pathogenesis of Inflammatory Bowel Disease. Cells 2019;8(1):77.

67. de Lange KM, Barrett JC. Understanding inflammatory bowel disease via immunogenetics. J Autoimmun 2015;64:91-100.

68. Adolph TE, Tomczak MF, Niederreiter L, Ko HJ, Böck J, Martinez-Naves E, et al. Paneth cells as a site of origin for intestinal inflammation. Nature 2013;503(7475):272-6.

69. Cadwell K, Patel KK, Komatsu M, Virgin HW, Stappenbeck TS. A common role for Atg16L1, Atg5 and Atg7 in small intestinal Paneth cells and Crohn disease. Autophagy 2009;5(2):250-2.

70. Saitoh T, Fujita N, Jang MH, Uematsu S, Yang BG, Satoh T et al. Loss of the autophagy protein Atg16L1 enhances endotoxin-induced IL-1beta production. Nature 2008;456(7219):264-8.

71. Cooney R, Baker J, Brain O, Danis B, Pichulik T, Allan P et al. NOD2 stimulation induces autophagy in dendritic cells influencing bacterial handling and antigen presentation. Nat Med 2010;16(1):90-7.

72. Lee HK, Mattei LM, Steinberg BE, Alberts P, Lee YH, Chervonsky A et al. In vivo requirement for Atg5 in antigen presentation by dendritic cells. Immunity. Immunity 2010;32(2):227-39.

73. Heazlewood CK, Cook MC, Eri R, Price GR, Tauro SB, Taupin D et al. Aberrant mucin assembly in mice causes endoplasmic reticulum stress and spontaneous inflammation resembling ulcerative colitis. Ulcerative Colitis PLoS Med 2008;5(3):e54.

74. Zhang HS, Chen Y, Fan L, Xi QL, Wu GH, Li XX et al. The Endoplasmic Reticulum Stress Sensor IRE1alpha in Intestinal Epithelial Cells Is Essential for Protecting against Colitis. J Biol Chem 2015;290(24):15327-36.

75. Boots AW, Haenen GR, Bast A. Health effects of quercetin: from antioxidant to nutraceutical. Eur J Pharmacol 2008;585(2-3):325-37.

76. Wang W, Sun C, Mao L, Ma P, Liu F, Yang J et al. The biological activities, chemical stability, metabolism and delivery systems of quercetin: A review. Trends in Food Science & Technology 2016;56:21-38.

77. Middleton E, Kandaswami C. The impact of plant flavonoids on mammalian biology: implications for immunity, inflammation and cancer. Advances in Research Since 1994;676:619-52.

78. Hollman P.C. Absorption, metabolism and bioavailability of flavonoids. Pharmaceutical Biology 2004;42:74-83.

79. Manach C, Morand C, Texier O, Favier ML, Agullo G, Demigné C et al. Quercetin metabolites in plasma of rats fed diets containing rutin or quercetin. J Nutr 1995;125(7):1911-22.

80. Huang RY, You YL, Cheng WC, Ou Yang CN, Fu E, Chu CL. Immunosuppressive effect of quercetin on dendritic cell activiation and function. J. Immunol. 2010;184(12);6815-21.

81. García-Mediavilla V, Crespo I, Collado PS, Esteller A, Sánchez-Campos S, Tuñón MJ et al. The anti-inflammatory flavones quercetin and kaempferol cause inhibition of inducible nitric oxide synthase, cyclooxygenase-2 and reactive C-protein, and down-regulation of the nuclear factor kappaB pathway in Chang Liver cells. Eur J Pharmacol 2007;557(2-3):221-9.

82. Camuesco D, Comalada M, Rodríguez-Cabezas ME, Nieto A, Lorente MD, Concha A et al. The intestinal antiinflammatory effect of quercitrin is associated with an inhibition in iNOS expression. Br J Pharmacol 2004;143(7):908-18.

83. Nair MP, Mahajan S, Reynolds JL, Aalinkeel R, Nair H, Schwartz SA et al. The flavonoid quercetin inhibits proinflammatory cytokine (tumor necrosis factor alpha) gene expression in normal peripheral blood mononuclear cells via modulationof the NF-kb system. Clinical and Vaccine Immunology 2006;13(3):319-28.

84. Nijveldt RJ, Van Nood E, Van Hoorn DE, Boelens PG, Van Norren K, Van Leeuwen PA. Flavonoids: A review of probable mechanisms of action and potential applications. The American Journal of Clinical Nutrition 2001;74(4):418-25.

85. MacNee, W. Oxidative stress and lung inflammation in airways disease. European Journal of Pharmacology 2001;429(1-3):195-207.

86. Xu H, He Y, Yang X, Liang L, Zhan, Z, Ye Y et al. Anti-malarial agent artesunate inhibits TNF-a-induced production of proinflammatory cytokines via inhibition of NF-kB and PI3 kinase/Akt signal pathway in human rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes. Rheumatology 2007;46(6):920-6.

87. Comalada M, Camuesco D, Sierra S, Ballester I, Xaus J, Galvez J et al. In vivo quercitrin anti-inflammatory effect involves release of quercetin, which inhibits inflammation

through down-egulation of the NF-kB pathway. EuropeanJournal of Immunology 2005;35(2):584-92.

88. Howitz K.T, Bitterman K.J, Cohen H.Y, Lamming D.W, Lavu S, Wood, J.G et al. Small molecule activators of sirtuins extend Saccharomyces cerevisiae lifespan. Nature 2003;425(6954):191-6.

89. Chung S, Yao H, Caito S, Hwang J.W. Arunachalam G, Rahman I, Regulation of SIRT1 in cellular functions: role of polyphenols. Archives of Biochemistry and Biophysics 2010;501(1):79-90.

90. Copetti T, Bertoli C, Dalla E, Demarchi F, Schneider C. p65/RelA modulates BECN1 transcription and autophagy. Mol Cell Biol 2009;29(10):2594-608.

91. Djavaheri-Mergny M, Amelotti M, Mathieu J, Besancon F, Bauvy C, Souquere S et al. NF-kappaB activation represses tumor necrosis factor-alpha-induced autophagy. Th J Biol Chem 2006;281(41):30373-82.

92. Mehrpour M, Esclatine A, Beau I, Codogno P. Overview of macroautophagy regulation in mammalian cells. Cell Res 2010;20(7):748-62.

93. Dodda D, Chhajed R, Mishra J, Padhy M. Targeting oxidative stress attenuates trinitrobenzene sulphonic acid induced inflammatory bowel disease like symptoms in rats: role of quercetin. Indian J Pharmacol 2014;46(3):286-91.

94. Morris GP, Beck PL, Herridge MS, Depew WT, Szewczuk MR, Wallace JL. Hapten-induced model of chronic inflammation and ulceration in the rat colon. Gastroenterology 1989;96(3):795-803.

95. Appleyard CB, Wallace JL. Reactivation of hapten-induced colitis and its prevention by anti-inflammatory drugs. Am J Physiol 1995;269(1):119-25.

96. Martínez-Herrero S, Larrayoz IM, Narro-Íñiguez J, Rubio-Mediavilla S, Martínez A. Lack of Adrenomedullin Aggravates Acute TNBS-Induced Colitis Symptoms in Mice, Especially in Females. Front Physiol 2017;8:1058.

97. Hong Z, Piao M. Effect of Quercetin Monoglycosides on Oxidative Stress and Gut Microbiota Diversity in Mice with Dextran Sodium Sulphate-Induced Colitis. Biomed Res Int 2018;2018:1-7.

98. Zhang D, Zhu P, Liu Y, Shu Y, Zhou JY, Jiang F et al. Total flavone of Abelmoschus manihot ameliorates Crohn's disease by regulating the NF κB and MAPK signaling pathways. Int J Mol Med 2019;44(1):324-34.

99. Grootjans J, Hundscheid IH, Lenaerts K, Boonen B, Renes IB, Verheyen FK. Ischemia-induced mucusbarrier loss and bacterial penetration are rapidlycounteracted by increased goblet cell secretoryactivity in human and rat colon. Gut 2013;62(2):250-8.

100. El-Salhy M, Hatlebakk JG. Changes in enteroendocrine and immune cells following colitis induction by TNBS in rats. Mol Med Rep 2016;14(6):4967-74.

101. Seto Y, Kato K, Tsukada R, Suzuki H, Kaneko Y, Kojo Y et al. Protective effects of tranilast on experimental colitis in rats. Biomed Pharmacother 2017;90:842-9.

102. Head KA, Jurenka JS. Inflammatory bowel disease Part 1: ulcerative colitis pathophysiology and conventional and alternative treatment options. Altern Med Rev 2003;8(3):247-83.

103. Comalada M, Camuesco D, Sierra S, Ballester I, Xaus J, Galvez J et al. In vivo quercitrin anti-inflammatory effect involves release of quercetin, which inhibits inflammation through down-egulation of the NF-kB pathway. European Journal of Immunology 2005;35(2):584-92.

104. Songwen Ju, Yan Ge, Ping Li, Xinxin Tian, Haiyan Wang, Xiaocui Zheng et al. Dietary quercetin ameliorates experimental colitis in mouse by remodeling the function of colonic macrophages via a heme oxygenase-1-dependent pathway. Cell Cycle 2018;17(1):53-63.

105. Choi S, Woo JK, Jang YS, Kang JH, Jang JE, Yi TH et al. Fermented Pueraria Lobata extract ameliorates dextran sulfate sodium-induced colitis by reducing proinflammatory cytokines and recovering intestinal barrier function. Lab Anim Res 2016;32:151-9.

106. He SH. Key role of mast cells and their major secretory products in inflammatory bowel disease. World J Gastroenterol 2004;10(3):309-18.

107. Prussin C, Metcalfe DD J. 4. IgE, mast cells, basophils, and eosinophils. Allergy Clin Immunol 2003;111(2):486-94.

108. Min YD, Choi CH, Bark H, Son HY, Park HH, Lee S et al. Quercetin inhibits expression of inflammatory cytokines through attenuation of NF-kappaB and p38 MAPK in HMC-1 human mast cell line. Inflamm Res 2007;56(5):210-5.

109. Azzolina A, Bongiovanni A, Lampiasi N. Substance P induces TNF-alpha and IL-6 production through NF kappa B in peritoneal mast cells. Biochim Biophys Acta 2003;1643(1-3):75-83.

110. El-Salhy M, Hatlebakk JG, Gilja OH. Abnormalities in endocrine and immune cells are correlated in dextran sulfate sodium induced colitis in rats. Mol Med Rep 2017;15(1):12-20.

111. Nishida Y, Murase K, Isomoto H, Furusu H, Mizuta Y, Riddell RH et al. Different distribution of mast cells and macrophages in colonic mucosa of patients with collagenous colitis and inflammatory bowel disease. Hepatogastroenterology 2002;49(45):678-82.

112. Zhao H, Xi H, Wei B, Cai A, Wang T, Wang Y et al. Expression of decorin in intestinal tissues of mice with inflammatory bowel disease and its correlation with autophagy. Exp Ther Med 2016;12(6):3885-92.

113. Hao X, Yang B, Liu X, Yang H, Liu X. Expression of Beclin1 in the colonic mucosa tissues of patients with ulcerative colitis. Int J Clin Exp Med 2015;8(11):21098-105.

114. Dai YC, Zheng L, Zhang YL, Chen X, Chen DL, Wang LJ et al. Jianpi Qingchang decoction regulates intestinal motility of dextran sulfate sodium-induced colitis through reducing autophagy of interstitial cells of Cajal. World J Gastroenterol 2017;23(26):4724-34.

115. Talero E, Alcaide A, Ávila-Román J, García-Mauriño S, Vendramini-Costa D, Motilva V. Expression patterns of sirtuin 1-AMPK-autophagy pathway in chronic colitis and

inflammation-associated colon neoplasia in IL-10-deficient mice. Int Immunopharmacol 2016;35:248-56.

116. Paiva NM, Pascoal LB, Negreiros LMV, Portovedo M, Coope A, Ayrizono MLS et al. Ileal pouch of ulcerative colitis and familial adenomatous polyposis patients exhibit modulation of autophagy markers. Sci Rep 2018;8(1):2619.

117. Bjørkøy G, Lamark T, Pankiv S, Øvervatn A, Brech A, Johansen T. Monitoring autophagic degradation of p62/SGSTM1. Methods Enzymol 2009;452:181-97.

118. Bhattacharyya S, Xue L, Devkota S, Chang E, Morris S, Tobacman JK. Carrageenan-induced colonic inflammation is reduced in Bcl10 null mice and increased in IL-10-deficient mice. Mediators Inflamm 2013;2013:1-13.

119. Chang CP, Su YC, Hu CW, Lei HY. TLR2-dependent selective autophagy regulates NF-kappaB lysosomal degradation in hepatomaderived M2 macrophage differentiation. Cell Death Differ 2013;20(3):515-23.

120. Bhonde MR, Gupte RD, Dadarkar SD, Jadhav MG, Tannu AA, Bhatt P et al. A novel mTOR inhibitor is efficacious in a murine model of colitis. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 2008;295(6):1237-45.

121. Deore V, Yewalkar N, Bhatia D, Desai N, Gupte RD, Dadarkar SS et al. Synthesis and therapeutic evaluation of pyridyl based novel mTOR inhibitors. Bioorg Med Chem Lett 2009;19(11):2949-52.

122. Nakahira K, Haspel JA, Rathinam VA, Lee SJ, Dolinay T, Lam HC et al. Autophagy proteins regulate innate immune responses by inhibiting the release of mitochondrial DNA mediated by the NALP3 inflammasome, Nat Immunol 2011;12(3):222-30.

123. Harris J, Hartman M, Roche C, Zeng SG, O'Shea A, Sharp FA et al. Autophagy controls IL-1beta secretion by targeting pro-IL-1beta for degradation, J Biol Chem 2011;286(11):9587-97.

124. Shi CS, Shenderov K, Huang NN, Kabat J, Abu-Asab M, Fitzgerald KA et al. Activation of autophagy by inflammatory signals limits IL-1beta production by targeting ubiquitinated inflammasomes for destruction. Nat. Immunol 2012;13(3):255-63.

125. Patel KK, Miyoshi H, Beatty WL, Head RD, Malvin NP, Cadwell K et al. Autophagy proteins control goblet cell function by potentiating reactive oxygen species production. EMBO J 2013;32(24):3130-44.

126. Tawiah A, Cornick S, Moreau F, Gorman H, Kumar M, Tiwari S et al. High MUC2 Mucin Expression and Misfolding Induce Cellular Stress, Reactive Oxygen Production, and Apoptosis in Goblet Cells. Am J Pathol 2018;188(6):1354-73.

ŞEKİLLER LİSTESİ

ŞEKİLLER **Sayfa No**

Şekil 1. Otofajik yolağın şematik aşamaları……10
Şekil 2. Bozulmuş otofajik süreç ve ilişkili proteinler…….13
Şekil 3. İnflamatuvar bağırsak hastalıklarında otofajinin rolü…….15
Şekil 4. Bağırsak inflamasyonu patofizyolojisinde endoplazmik retikulum stresinin rolü…. 17
Şekil 5. Quercetinin yapısal formülü..... 18
Şekil 6. Deneye başlangıç ve deney sonu vücut ağırlık değerleri ile vücut ağırlıkları değişimi 26
Şekil 7. Deney gruplarına ait kolon ağırlıkları 27
Şekil 8. Deney gruplarına ait makroskobik görüntüler 28
Şekil 9. Deney gruplarına ait makroskobik skor sonuçlarını gösteren grafik 28
Şekil 10. Kontrol grubu, Masson trikrom, X40..... 32
Şekil 11. Kontrol grubu, H&E, X100…… 32
Şekil 12. Kontrol grubu, PAS, X100..... 33
Şekil 13. Kontrol grubu**,** Toluidin mavisi, X100..... 33
Şekil 14. Kontrol grubu, Toluidin mavisi, X400..... 34
Şekil 15. Kolit grubu, Masson trikrom, X40..... 35
Şekil 16. Kolit grubu, H&E, X100..... 35
Şekil 17. Kolit grubu, H&E, X200..... 36
Şekil 18. Kolit grubu, PAS, X100..... 36
Şekil 19. Kolit grubu, Toluidin mavisi, X100..... 37

Şekil 20. Kolit grubu, Toluidin mavisi, X400 37
Şekil 21. Kolit + quercetin grubu, Masson trikrom, X40 38
Şekil 22. Kolit + quercetin grubu, H&E, X100 38
Şekil 23. Kolit + quercetin grubu, PAS, X100 39
Şekil 24. Kolit + quercetin grubu, Toluidin mavisi, X100 39
Şekil 25. Kolit + quercetin grubu, Toluidin mavisi, X400 40
Şekil 26. Kontrol grubu, Beclin-1, hematoksilen zıt boyanması, X200 42
Şekil 27. Kontrol grubu, Beclin-1, hematoksilen zıt boyanması, X400 42
Şekil 28. Kolit grubu, Beclin-1, hematoksilen zıt boyanması, X200 43
Şekil 29. Kolit grubu, Beclin-1, hematoksilen zıt boyanması, X400 43
Şekil 30. Kolit + quercetin grubu, Beclin-1, hematoksilen zıt boyanması, X200 44
Şekil 31. Kolit + quercetin grubu, Beclin-1, hematoksilen zıt boyanması, X400 44
Şekil 32. Kontrol grubu, p62, hematoksilen zıt boyanması, X200 46
Şekil 33. Kontrol grubu, p62, hematoksilen zıt boyanması, X400 46
Şekil 34. Kolit grubu, p62, hematoksilen zıt boyanması, X200 47
Şekil 35. Kolit grubu, p62, hematoksilen zıt boyanması, X400 47
Şekil 36. Kolit + quercetin grubu, p62, hematoksilen zıt boyanması, X200 48
Şekil 37. Kolit + quercetin grubu, p62, hematoksilen zıt boyanması, X400 48

TABLOLAR

Tablo 1. Crohn hastalığı ve ülseratif kolitin klinik ve diagnostik özellikleri 4
Tablo 2. Deneysel kolit modeli makroskobik hasar skorlama kriterleri. 21
Tablo 3. Deneklerin günlük dışkı takibi sonuçları 25
Tablo 4. Deney gruplarına ait mikroskobik skor sonuçları ile Goblet hücre ve mast hücre sayıları 29
Tablo 5. Deney gruplarına ait T. mukoza, submukoza, muskularis ve kolon duvar kalınlıkları 29
Tablo 6. Deney gruplarına ait Beclin-1 ve p62 immünoreaktivite değerlendirme sonuçları...41

ÖZGEÇMİŞ

1993 yılında Şanlıurfa ilinin Birecik ilçesinde doğdu. İlk ve ortaöğretimini Şanlıurfa'da tamamladıktan sonra, 2011 yılında başladığı Celal Bayar Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nden 2015 yılında mezun oldu. 2017 yılında Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü (Histoloji ve Embriyoloji) Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimine başladı. Halen aynı Anabilim Dalı'nda, yüksek lisans eğitimine devam etmektedir.

EKLER

EK-1

T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanlığı

Sayı : 59355220-050.04.04 -E.238593 11/06/2018
Konu : Kararlar

Sayın Doç. Dr. Yeter TOPÇU TARLADAÇALIŞIR

İlgi : 11/06/2018 tarihli ve 238569 sayılı yazı,

Yürütücülüğünü üstlendiğiniz "**Trinitrobenzen Sülfonik Asit ile Oluşturulan Deneysel Kolit Modelinde Quercetin Kullanımının Otofajik Sürece Etkisi**" başlıklı çalışma TÜHADYEK'in 25/05/2018 tarihli toplantısında, 15/02/2014 tarih ve 28141 sayılı Resmi Gazete'de yayımlanarak yürürlüğe giren "Hayvan Deneyleri Etik Kurullarının Çalışma Usul ve Esaslarına Dair Yönetmelik" çerçevesinde incelemiş ve görüşülmüştür.

Bu çalışmada kullanılacak dokuların TÜHADYEK-2018/03 protokol nolu ""**Deneysel Kolit Modelinde Endoplazmik Retikulum Stresi Üzerine Quercetinin Etkisinin İncelenmesi**" isimli çalışmadaki deney hayvanlarından alındığı görüldüğünden, yapılacak çalışma yönetmeliğin 8.maddesi 8.fıkrası k bendinde bahsedilen "Aşağıdaki müdahaleler HADYEK iznine tabi değildir: 2) Ölü hayvan veya dokusu, mezbaha materyalleri, atık fetüsler ile yapılan prosedürler." hükmü gereğince, çalışılacak dokular ölü hayvan veya dokusu kabul edildiğinden yönetmelik kapsamı dışında olarak değerlendirilmiş olup, Trakya Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurlundan izin alınmasına gerek yoktur.

Bilgilerinize rica ederim.

e-imzalıdır
Prof. Dr. Enis ULUÇAM
Başkan

Adres:Trakya Üniversitesi Rektörlüğü Balkan Yerleşkesi 22030 Edirne
Telefon:2842357641 Faks2842234203
E-Posta:hdek@trakya.edu.tr Elektronik Ağ:http://hdek.trakya.edu.tr/
Bilgi için: Enis ULUÇAM
Unvanı: Başkan

Bu belge, 5070 sayılı Elektronik İmza Kanununa göre Güvenli Elektronik İmza ile imzalanmıştır.

EK-2

T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu
(Trakya University, Local Ethics Committee of Animal Experiments)

HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU KARARLARI

Oturum Sayısı: 2018/02 **Karar Tarihi: 28.02.2018**

KARAR NO: 2018.02.01

Yürütücülüğünü Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi öğretim üyesi Yeter TOPÇU TARLADAÇALIŞIR'ın yaptığı TÜHADYEK-2018/03 protokol nolu "**"Deneysel Kolit Modelinde Endoplazmik Retikulum Stresi Üzerine Quercetinin Etkisinin İncelenmesi''** başlıklı çalışma 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.

Prof. Dr. Enis ULUÇAM
Başkan
Araştırma ile İlişki: □ var ☒yok
Toplantı Katılım: ☒evet □ hayır

Vet. Hekim Ziya ÇUKUR
Vet. Hek. Üye
Araştırma ile İlişki: □ var □yok
Toplantı Katılım: □ evet □ hayır

-İZİNLİ-
Yrd. Doç. Dr. Hayati ARDA
Fen Fakültesi Öğretim Üyesi
Araştırma ile İlişki: □ var □yok
Toplantı Katılım: □ evet □ hayır

-İZİNLİ-
Yrd. Doç. Dr. Beytullah ÖZKAN
Fen Fakültesi Öğretim Üyesi
Araştırma ile İlişki: □ var □yok
Toplantı Katılım: □ evet □ hayır

Prof. Dr. Y. Atakan SEZER
Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi
Araştırma ile İlişki: □ var □yok
Toplantı Katılım: □ evet □ hayır

Prof. Dr. Tevfik AKTOZ
Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi
Araştırma ile İlişki: □ var ☒yok
Toplantı Katılım: ☒evet □ hayır

Doç. Dr. Hakan GÜRKAN
Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi
Araştırma ile İlişki: □ var ☒yok
Toplantı Katılım: ☒evet □ hayır

Doç. Dr. Elvan BAKAR
Eczacılık Fakültesi Öğretim Üyesi
Araştırma ile İlişki: □ var ☒yok
Toplantı Katılım: ☒evet □ hayır

Ecz. F. Uygar GÜLER
Sivil Toplum Kuruluşu Sivil Üye
Araştırma ile İlişki: □ var □yok
Toplantı Katılım: □ evet □ hayır

-KATILMADI-
Osman GÜLTEKİN
Sivil Üye
Araştırma ile İlişki: □ var □yok
Toplantı Katılım: □ evet □ hayır