

ANKARA ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ
KOORDİNASYON BİRİMİ KOORDİNATÖRLÜĞÜNE

Proje Türü : Bağımsız proje (50000 TL üzeri B+)
Proje No : 17B0230007
Proje Yürütücüsü : Prof. Dr. Mehmet MELLİ
Proje Başlığı : Sıçanlarda Dekstran Sodyum Sülfat ile Oluşturulan Deneysel Ülseratif Kolit Modelinde Misoprostolün Koruyucu Etkisi

Yukarıda bilgileri yazılı olan projemin sonuç raporunun e-kütüphanede yayınlanmasını;

İSTİYORUM

İSTEMİYORUM

GEREKÇESİ:

23.12.2019

Proje Yürütücüsü

İmza

M. Mell

ANKARA ÜNİVERSİTESİ

**BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJESİ
SONUÇ RAPORU**

Sıçanlarda Dekstran Sodyum Sülfat ile Oluşturulan Deneysel lseratif Kolit Modelinde Misoprostolün
Koruyucu Etkisi

Prof. Dr. Mehmet MELLİ

Prof. Dr. Berna SAVAŞ

Nihan KÜÇÜK (GÜRCAN)

17B0230007

BaŐlama Tarihi: 06/11/2017

BitiŐ Tarihi: 06/11/2019

Rapor Tarihi: 23/12/2019

Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri
Ankara - " 2019 "

I. Projenin Türkçe ve İngilizce Adı ve Özetleri

SIÇANLARDA DEKSTRAN SODYUM SÜLFAT İLE OLUŞTURULAN ÜLSERATİF KOLİT MODELİNDE MİSOPROSTOLÜN KORUYUCU ETKİSİ

Ülseratif kolit; kolon mukozasının yaygın inflamasyonuna bağlı gelişen, nedeni bilinmeyen ve kesin tedavisi olmayan kronik inflamatuvar bir bağırsak hastalığıdır. İnflamasyonun rezolüsyonu genel olarak, homeostaza ulaşmak için inflamatuvar alandaki lökositleri ve debrisyi azaltmayı ya da ortadan kaldırmayı ifade etmektedir. Başka bir ifade ile konağın, denge durumuna dönmesi için verdiği ideal ve koruyucu bir yanıtıdır ve farklı düzeylerde programlanmış koordineli, aktif bir süreçtir. İnflamatuvar süreçte rezolüsyon gerçekleşmez ise, akut inflamasyon fazı uzayabilir, kardiyovasküler hastalıklar ve metabolik bozukluklar gibi çeşitli hastalıkların patogeneğinde yer alan kronik inflamasyona neden olabilir. İnflamatuvar süreçte üretilen spesifik mediyatörler; inflamasyonun rezolüsyon fazına geçmesini sağlarlar. Kronik inflamatuvar bir hastalık olan ülseratif kolitte bir rezolüsyon mediyatörü olan lipoksin A₄ sentezindeki bozuklukların hastalığa katkıda bulunabileceği, lipoksin A₄ seviyesinin artışı sağlayan yaklaşımların bu hastalıkların tedavisinde yeni bir terapötik hedef olabileceği düşünülmektedir. Misoprostol, NSAİİ'ler tarafından indüklenen gastrik ülserin önlenmesi ve tedavisi için kullanılan bir prostaglandin E₁ analogudur. Misoprostolün lipoksin A₄ sentezini arttırdığı bilinmektedir. Bu çalışmada, misoprostolün profilaktik uygulamasının sıçanlarda dekstran sodyum sülfat (DSS) ile oluşturulan ülseratif kolit modelinde faydalı olup olmayacağı araştırılmıştır.

Misoprostol 6.25, 12.5 ve 25 µg/kg/gün dozlarında ikiye bölünmüş olarak, DSS uygulanmasından 5 gün önce orogastrik yolla uygulanmaya başlayarak DSS ile birlikte 15. güne kadar uygulanmış, DSS'nin kesilmesini takiben misoprostol tedavisine 19. güne kadar devam edilmiştir. DSS içme suyuna katılarak uygulanmıştır. 5. (akut dönem) ve 19. günlerde (iyileşme dönemi) kolon çekumdan rektuma kadar çıkarılmıştır. Hastalık şiddetini değerlendirmek için kolon ağırlık/uzunluk oranı ve histopatolojik skor belirlenmiş ve belirtilen günlerde gaita kıvamı, ağırlık değişimi, dışkıda kan varlığı değerlendirilerek hastalık aktivite indeksi belirlenmiştir. Kolon mukozası homojenize edilmiş, C18 ve silika kartuşlar kullanılarak 'solid faz ekstraksiyon' yöntemi ile ekstrakte edilmiştir. Örneklerde, 'Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay' (ELISA) yöntemiyle lipoksin A₄ ölçümü yapılmıştır.

Misoprostol akut dönemde 3 dozda (6.25,12.5 ve 25 µg/kg/gün), iyileşme döneminde ise 6.25,12.5 µg/kg/gün dozlarında hastalık aktivite indeksini, DSS uygulanan gruplara göre azaltmıştır. Histopatolojik skor, akut ve iyileşme döneminde misoprostol 25 µg/kg/gün tedavisi alan gruplarda DSS uygulanan gruba göre düşük bulunmuştur. İyileşme döneminde misoprostol 25 µg/kg/gün tedavisi kolon ağırlık/uzunluk oranını iyileştirmiştir. Standart tedavi olarak kullanılan 5-amino salisilik asit (100mg/kg/gün) hastalık aktivite indeksi, histopatolojik skor ve kolon ağırlık/uzunluk oranı üzerinde iyileştirici etki göstermemiştir. Kolon mukozasında ölçülen lipoksin A₄ düzeyi, iyileşme döneminde misoprostol uygulanan tüm gruplarda DSS uygulanan gruba göre yüksek seviyede bulunmuştur. İyileşme döneminde misoprostol 25 µg/kg/gün tedavisi alan grupta lipoksin A₄ ve histopatolojik skor arasında anlamlı negatif kolerasyon olduğu bulunmuştur.

Misoprostolün profilaktik uygulaması akut dönemde ve iyileşme döneminde sıçanlarda DSS ile oluşturulan ülseratif kolit modelinde histopatolojik skoru, hastalık aktivite indeksini ve iyileşme döneminde kolon ağırlık /uzunluk oranını iyileştirmiştir. İyileşme döneminde gözlenen faydalı etkinin mukozal lipoksin A₄ düzeyinde artışla ilişkili olabileceği düşünülmüştür.

Anahtar sözcükler: Dekstran Sodyum Sülfat, Lipoksin A₄, Misoprostol, Ülseratif Kolit.

THE PROTECTIVE EFFECT OF MISOPROSTOL ON DEXTRAN SODIUM SULPHATE-INDUCED ULCERATIVE COLITIS MODEL IN RATS

Ulcerative colitis is a chronic inflammatory bowel disease with massive inflammation of colonic mucosa. It has unknown etiology and no definitive therapy. The resolution of inflammation generally refers to reducing and/or eliminating leukocytes and debris in the inflammatory area to achieve homeostasis. It is an ideal protective response of the tissue for homeostasis and is a programmed and well-coordinated dynamic process. In case resolution does not occur during inflammatory process, prolonged acute inflammatory phase results in differential chronic inflammatory disturbances such as cardiovascular diseases and metabolic disorders. Specific mediators which are synthesized during the inflammatory process are cause of resolution. Lipoxin A₄ is one of these mediators and has been proposed that decrease in lipoxin A₄ synthesis might play a role in the pathogenesis of ulcerative colitis, vice versa, approaches increasing lipoxin A₄ synthesis might be a new therapeutic target for therapy. Misoprostol is an analogue of prostaglandin E₁ and is used for the prevention and therapy of gastric ulcer induced by NSAIDs. It is also known that misoprostol induces increases in lipoxin A₄ synthesis. In this study, we investigated whether prophylactic administration of misoprostol would be beneficial in dextran sodium sulphate (DSS)-induced ulcerative colitis model in rats.

Misoprostol was started to administration orogastrically 5 days before DSS application and continued for 15 days with DSS administration in three different daily doses of 6.25, 12.5 and 25 µg/kg, divided into two doses. DSS administration was cut off on day 15 but misoprostol administration was continued up to 19 days. DSS was administered within drinking tap water. Colon was excised from caecum to rectum on day 5 (acute phase) and day 19 (recovery phase). To evaluate the severity of the disease, bowel weight/length ratio and a histopathological score were defined and additionally, a disease activity index was determined by evaluating stool consistency, weight change and blood in stool on before-mentioned days. Colonic mucosa was homogenized and extracted via solid phase extraction method using C18 and silica cartridges. Lipoxin A₄ was measured in samples with Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA).

Misoprostol was found to decrease the disease activity index with all three doses during acute phase and with 6.25 and 12.5 µg/kg/day doses during recovery phase. Histopathological score was found to be lower in 25 µg/kg/day misoprostol groups both in acute and recovery phases. Misoprostol, 25 µg/kg/day, was also found to improve bowel weight/length ratio during resolution phase. 5-amino salicylic acid (100 mg / kg / day), which was used as standard therapy, showed no improvement on disease activity index, histopathological score and colon weight/length ratio. Colonic

mucosa lipoxin A₄ levels were found to be significantly higher in all misoprostol administered groups during resolution phase. A negative correlation was determined between lipoxin A₄ level and histopathological score in 25 µg/kg/day misoprostol administered group during recovery phase.

In conclusion, prophylactic administration of misoprostol improved histopathological score, disease activity index in acute and recovery phase and improved colon weight / length ratio in recovery period on DSS-induced ulcerative colitis model in rats. It was thought that its beneficial effect which was observed in recovery phase associated with increased mucosal lipoxin A₄ levels.

Key words: Dextran Sodium Sulphate, Lipoxin A₄, Misoprostol, Ulcerative Colitis

II. Amaç ve Kapsam

Ülseratif kolit (ÜK), kolon mukozasının yaygın inflamasyonuna bağlı gelişen akut alevlenme ve remisyon dönemleriyle seyreden, ülser alanları ile karakterize ve genellikle rektumdan başlayıp proksimale doğru ilerleyebilen kronik inflamatuvar bir bağırsak hastalığıdır (Gitter ve ark., 2001). Mevcut kesin bir tedavisi yoktur. Ülseratif kolitte görülen kronik inflamasyonun genetik olarak duyarlı kişilerde mukozal permeabilite artışı sonucu mukozal bariyeri geçen çeşitli antijenlere ya da çevresel faktörlere karşı oluşan abartılı bir immün yanıt sonucu oluştuğu ileri sürülmektedir. Fizyolojik koşullar altında inflamasyon sonucu oluşan doku hasarı nedeni ile bağırsak işlevi bozulduğunda, organizmada bu durumu düzeltme yönünde faaliyet gösteren endojen mekanizmalar devreye sokulmakta ve dokunun tekrar sağlıklı denge konumuna gelmesi sağlanılmaktadır. Ancak ÜK hastalığında bu döngü bozulur, devam eden bir inflamatuvar süreç gözlenmektedir. Bunun yanı sıra ÜK'de oluşan kronik inflamasyona, inflamasyonun rezolüsyon mekanizmalarındaki bozukluklarında katkıda bulunabileceği düşünülmektedir (Das, 2016; Quiros ve Nusrat, 2019)

İnflamasyon; konağın doku homeostazını sağlamak amacı ile infeksiyon ve her türlü zararlı etkene karşı verdiği patofizyolojik bir cevaptır (Medzhitov, 2008). İnflamasyon normal şartlar altında zedeleyici ajanın ortadan kalkması ve hasarın düzelmesi ile sonlanır. İnflamasyon devam ederken bir yandan da rezolüsyon süreci devam eder. İnflamasyonun rezolüsyonu genel olarak inflamatuvar alandaki lökositleri ve debriyi azaltmayı ya da ortadan kaldırmayı ifade etmektedir. Rezolüsyon süreci bir takım spesifik mediyatörler tarafından aktif ve koordineli bir şekilde yürütülmektedir (Serhan ve ark., 2008). Rezolüsyonla ilişkili sinyal yollarının uyarılmasının inflamasyonun rezolüsyon fazını hızlandırarak inflamasyonun süresini kısaltabileceği düşünülmektedir (Buckley ve ark., 2014). Lipoksin A₄ (LXA₄) arakidonik asitten sentezlenen lipid kökenli rezolüsyon mediyatörüdür. Ülseratif kolitte dahil bazı inflamatuvar hastalıklarda LXA₄ düzeyinin inflamasyon alanında düşük seviyede olduğu bildirilmiştir (Goh ve ark., 2003; Mangino ve ark., 2006). Bununla birlikte; E serisi prostaglandinlerin lipoksin sentezini arttırdığı bilinmektedir (Chan ve Moore, 2010). Bu kapsamda;

prostaglandin E₁ analogu olan misoprostolün kronik inflamatuvar bir hastalık olan ülseratif kolitte LXA₄ seviyelerini arttırarak iyileştirici etki sağlayabileceği öngörülmektedir.

Bu çalışma kapsamında; sıçanlarda dekstran sodyum sülfat (DSS) ile oluşturulmuş ülseratif kolit modelinde, misoprostolün profilaktik olarak uygulanması ile olası yararlı etkisi incelenmek istenmiştir. Bu amaçla misoprostol DSS uygulanmasından 5 gün önce uygulanmaya başlayarak DSS ile birlikte 15. güne kadar uygulanmış, DSS'nin kesilmesini takiben misoprostol tedavisine 19. güne kadar devam edilmiştir. 5. ve 19. günlerde çıkartılan kolon mukozasında misoprostolün hastalığın akut ve iyileşme dönemlerine etkisi; hastalık aktivite indeksi (HAI) ve kolon ağırlık/uzunluk oranı ile ve histopatolojik olarak değerlendirilmiştir. Örneklerde lipoksin düzeyleri de ölçülerek misoprostolün olası profilaktik etkisinin lipoksin düzeyleriyle ilişkisi araştırılmıştır.

Misoprostol dozu olarak daha önce yapılan bir çalışmada etkili olduğu gösterilen 25 µg/kg/gün olarak seçilmiştir (Ağış ve ark., 2015). Ancak bu dozun klinik eşdeğer dozunda, sıklıkla gastrointestinal yan etkilerden biri olan diyare görülmesi nedeni ile daha düşük dozlarda (12,5 µg/kg/gün ve 6,25 µg/kg/gün) profilaktik etkinin gözlenip gözlenmediği değerlendirilmiştir. Misoprostolün belirtilen günlük dozu klinik uygulamalar ile paralellik göstermesi açısından ikiye bölünerek uygulanmış ve misoprostolün etkililiği bu hastalıkta standart tedavi olan 5-amino salisilik asit (5-ASA) uygulamasıyla karşılaştırılmıştır.

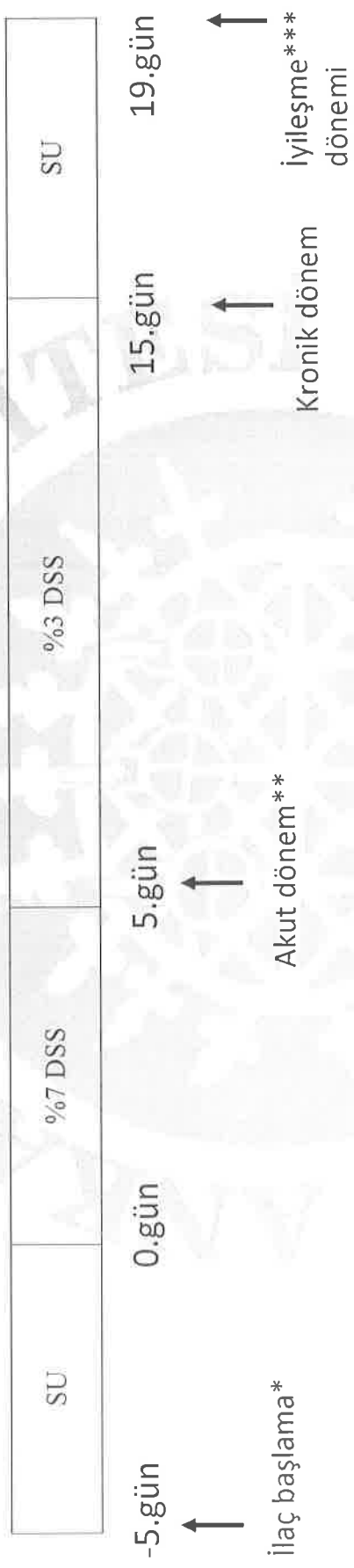
III. Materyal ve Yöntem

3.1 Deney hayvanları

Çalışmamızda Ankara Üniversitesi Deney Hayvanları Yetiştirme ve Araştırma Laboratuvarından alınan 8-10 haftalık 130 adet erkek Wistar albino sıçanlar kullanılmıştır. Deney hayvanlarıyla yapılan çalışmalar için Ankara Üniversitesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulu'ndan onay alınmıştır (15-02-2017 tarihli 2017-4-24 nolu karar). Sıçanların bakımı Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Ab.D. Deney Hayvanları Ünitesi'nde (standart kafeslerde $22\pm 1^{\circ}\text{C}$ ve 12 saat aydınlık 12 saat karanlık ortamda) yapılmıştır. Sıçanlar standart yem ve su ile *ad libitum* beslenmiştir. Deney gruplarına protokolda belirtilen konsantrasyonlarda DSS içme suyuna eklenmiştir.

3.2 DSS ile Kolit Oluşturulması

Sıçanlar rastgele gruplara ayrılarak şekil 3.1'de belirtilmiş süre ve konsantrasyonlarda DSS uygulanarak kolit oluşturulmuştur. Misoprostol için çözücü olarak fosfat buffer salin (PBS) (137 milimolar (mM) sodyum Klorür, 2,7 mM potasyum klorür, 10 mM disodyum hidrojen fosfat iki hidröz, 2 mM potasyum dihidrojen fosfat iki hidröz) ve 5-ASA için çözücü olarak % 0,5 (ağırlık/hacim) karboksimetilselüloz (CMS) kullanılmıştır. Misoprostol/5-ASA ve çözücülerinin verilmesine DSS uygulamasından 5 gün önce başlanmış ve sıçanların değerlendirildiği güne kadar devam edilmiştir (akut dönem değerlendirmesi DSS uygulamasından 5 gün sonra, iyileşme dönemi değerlendirmesi DSS uygulamasından 19 gün sonra yapılmıştır). Misoprostol 6.25, 12.5 ve 25 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{gün}$ dozlarında günde iki kezde verilmiştir. 5-ASA dozu ise 100 $\text{mg}/\text{kg}/\text{gün}$ olarak belirlenmiştir. Misoprostol/5-ASA kontrolü için DSS ile kolit oluşturulmayan sıçanlara tek doz misoprostol (12,5 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{gün}$) ve 5-ASA (100 $\text{mg}/\text{kg}/\text{gün}$) protokolda gösterildiği gibi uygulanmıştır. Sıçanların gruplara göre dağılımı Çizelge 3.1'de verilmiştir.



* DSS uygulamasından 5 gün önce meselazın (tek doz, 100 mg/kg) ve misoprostol (ikiye bölünmüş dozlarda 12 saat ara ile 6.25, 12.5, 25 µg/kg/gün) orogastrik olarak uygulanmıştır.

** Akut dönemde (5.gün) hayvanlara ötenazi uygulanmış ve kolon mukozası çıkarılmıştır.

*** İyileşme döneminde (19.gün) hayvanlara ötenazi uygulanmış ve kolon mukozası çıkarılmıştır.

Sekil 3.1. Dekstran sodyum sülfat (DSS) ile oluşturulmuş ülseratif kolit modelinde uygulama-zaman cetveli.

Grup no	Grup	DSS	Günlük doz	Sıçan sayısı		
				Akut	İyileşme	Toplam
1	DSS KOLİT ÇALIŞMASI	+	Geçerli değil	10	10	20
2	DSS ÇÖZÜCÜ ÇALIŞMASI	-	Geçerli değil	5	5	10
3	MİSOPROSTOL PROFİLAKTİK KOLİT ÇALIŞMASI	+	6.25/12.5/25 µg/kg/gün	3X6=18	3X10=30	48
4	MİSOPROSTOL ÇÖZÜCÜ ÇALIŞMASI	+	Geçerli değil	4	4	8
5	MİSOPROSTOL PROFİLAKTİK KONTROL ÇALIŞMASI	-	12.5 µg/kg/gün	5	5	10
6	5-ASA PROFİLAKTİK KOLİT ÇALIŞMASI	+	100 mg/kg/gün	6	10	16
7	5-ASA ÇÖZÜCÜ ÇALIŞMASI	+	Geçerli değil	4	4	8
8	5-ASA PROFİLAKTİK KONTROL ÇALIŞMASI	-	100 mg/kg/gün	5	5	10
	TOPLAM			57	73	130

Çizelge 3.1 Sıçanların gruplara göre dağılımı

3.3 Hastalık Aktivite İndeksi

Kolitin değerlendirilmesinde daha önce birçok araştırmada tarif edilmiş olan Çizelge 3.2’de detayları verilen hastalık aktivite indeksi (HAI) kullanılmıştır (Cooper ve ark., 1993). Sıçanlarda ağırlık ve makroskobik gaita değerlendirmesine gınaşırı, gaitada gizli kan varlığına ise hayvanların değerlendirildiği gün bakılmıştır. Gaitada gizli kana “guiac” metodu ile bakılmıştır (Cummings ve ark., 1984).

Skor	Kilo kaybı	Dışkı kıvamı	Rektal kanama
0	Yok	Normal	Yok
1	%1-5	-	-
2	%5-10	Yumuşak	Mikroskobik kanama
3	%10-20	-	-
4	>%20	İshal	Görünür kan

Çizelge 3. 2 Sıçanların kolit şiddetini değerlendirmek için kullanılan hastalık aktivite indeksi (Cooper ve ark., 1993).

3.4 Kolitin Histopatolojik Değerlendirilmesi ve Kolon Ağırlık/Uzunluk Oranı

Kolitin histopatolojik değerlendirmesinde aşağıda ayrıntıları verilmiş olan skorlama kullanılmıştır (Saverymuttu ve ark., 1986). Değerlendirilme gününde, eter anestezisi altında hayvanların kolonu total olarak rektumdan çekuma kadar çıkarılmış, oda sıcaklığında % 0.9 salin ile yıkandıktan sonra kolon uzunlamasına açılmış ve rektosigmoid bölgeden alınan mukoza formalin içinde muhafaza edilerek histopatolojik incelemede kullanılmıştır. Histopatolojik skorlama Çizelge 3.3’de verilmiştir. Olası en yüksek skor 12 olabilmektedir. Rektumdan çekuma kadar çıkarılan kolonun içeriği temizlendikten sonra ise uzunluğu ve ağırlığı ölçülmüş, sonuçlar ağırlık (mg) uzunluk (cm) oranı olarak verilmiştir.

Bölge	Bulgu	Skor
Enterosit	Normal	0
	Tek hücre kayıpları	1
	Gruplar halinde hücre kaybı	2
	Belirgin ülser	3
Lamina Propria Mononükleer hücreler	Normal	0
	Hafif artmış	1
	Orta derecede artmış	2
	Belirgin artış	3
Lamina Propria Nötrofiller	Normal	0
	Hafif artmış	1
	Orta derecede artmış	2
	Belirgin artış	3
Kriptler	Normal	0
	Tek inflamatuvar hücreler	1
	Kriptit	2
	Kript absesi	3

Çizelge 3.3 Kolonun histopatolojik skorlaması (Saverymattu ve ark., 1986)

3.5 Kolon mukozasında LXA₄ düzeyinin değerlendirilmesi

Rektosigmoid kolon bölgesinin hemen üstünden yaklaşık 100 mg ağırlığında 2 adet kolon mukozası submukosal dokulardan bisturi yardımı ile sıyrılıp tartılmıştır. Sıvı nitrojenle dondurulan örnekler derin dondurucuda -80°C'de saklanmıştır.

3.5.1 Homojenizasyon

Dondurulmuş doku örneğine (~100 mg) 10 ml/g soğuk etanol eklendikten sonra homojenizatörde 10 saniye 4000 rpm de 2 kez homojenize edilmiş ve 12000g, 4 °C de 20 dakika santrifüjlenmiştir. Sonrasında alınan supernatana 4X deiyonize su eklenmiş ve 1N HCl ile pH 3.5'a ayarlanmıştır.

3.5.2 Ekstraksiyon

Örnekler 'solid faz ekstraksiyon' yöntemi ile ekstrakte edilmiştir. Ekstraksiyon işlemi için ekstraksiyon vakum manifold sistemi ile C₁₈ (1 cc/100 mg) ve silika (1 cc/100 mg) olmak üzere 2 kartuş kullanılmıştır (Romano ve ark., 2002).

- (i) *C₁₈ kartuş kullanılarak yapılan ekstraksiyon işlemi;* Kartuştan önce 2 ml metanol ve sonra 2 ml deiyonize su geçirdikten sonra akım hızı en fazla 1ml/dak olacak şekilde örnek geçirilmiştir. Daha sonra kartuş 2 ml su ile nötralize edilip 2 ml hekzanla yıkanmış ve örnek 1 ml of hekzan/etil asetat (40/60; v:v) ile elüe edilmiştir. Elüent vakum kondansatörde uçurulmuş akabinde 200 µl benzen/etil asetat /metanol (60/40/20; v:v:v) ile sulandırılmış, ardından 800 µl benzen/etil asetat (60/40; v:v) eklenmiştir.
- (ii) *Silika kartuş kullanılarak yapılan ekstraksiyon işlemi;* kartuş 1 ml benzen/etil asetat/metanol (60/40/30; v:v:v) ile preaktive edildikten sonra 1 ml benzen/etil asetat (60/40; v:v) ile yıkanmıştır. Örnek akım hızı en fazla 1ml/dak olacak şekilde geçirildikten sonra kolon 1 ml benzen/etil asetat (60/40; v:v) ile yıkanmıştır. Örnekler 1 ml benzen/etil asetat/metanol (60/40/20; v:v:v) ile elüe edilerek elüent vakum kondansatörde uçurulmuştur. ELISA yapılacak örnekler ekstraksiyon solventi ile sulandırılarak derin dondurucuda -80°C'de saklanmıştır.

3.5.3 ELISA (*Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay*) yöntemi ile LXA₄ ölçümü

Örneklerdeki LXA₄ düzeyi ELISA yöntemiyle ölçülmüştür. LXA₄ ölçümü için kullanılan kit Neogen firmasından (Lexington, ABD) temin edilmiş olup ölçüm firmanın tarif ettiği protokole göre yapılmıştır. Sonuçlar pg/mg doku başına verilmiştir.

3.6 İlaçlar ve Kimyasallar

Misoprostol (SPI-Bio, Montigny le Bretonneux, Fransa) PBS de 5 µg/ml, 5-ASA (SPI-Bio, Montigny le Bretonneux, Fransa) % 0.5 CMS de 20 mg/ml olacak şekilde çözüldükten sonra, sıçanlara 0,5 ml/100 gram olacak şekilde orogastrik gavajla verilmiştir. LXA₄ ölçümünde kullanılan ELISA kitler Neogen (Lexington, ABD), DSS ise TdB Consultancy (İsveç) firmasından temin edilmiştir. C18 Sep-Pak ve silika ekstraksiyon kartuşları Waters (ABD) firmasından temin edilmiştir. Gaitada gizli kan testi için kullanılan test Türklab Tıbbi Malz. San. Tic.A.Ş.' den (İzmir, Türkiye) temin edilmiştir.

3.7 İstatistiksel Değerlendirme

Tanımlayıcı değerlerin ölçümle belirlendiği durumlarda değerler ortalama±standart hata (SEM) olarak verilmiş, skorlamalar ise ortanca (en yüksek-en düşük değer) olarak verilmiştir. Hastalık aktivite indeksi ve histopatolojik skor karşılaştırmalarında Kruskal-Wallis testi kullanılmıştır. İkili karşılaştırmalar Mann-Whitney U testi kullanılarak yapılmış ve Bonferroni düzeltmesi kullanılarak değerlendirilmiştir. Ağırlığın zaman içerisindeki değişiminin istatistiksel anlamlılığı tekrarlayan ölçümler varyans analizi (Repeated measures ANOVA) kullanılarak incelenmiş, post hoc Dunnet T3 testi kullanılmıştır. Kolon ağırlık/uzunluk oranlarında gruplar arasındaki farkın istatistiksel anlamlılığı tek yönlü ANOVA testi kullanılarak karşılaştırılmış, post-hoc Bonferroni testi kullanılmıştır. LXA₄ düzeylerinin değerlendirilmesinde gruplar tek yönlü ANOVA testi kullanılarak karşılaştırılmış, post-hoc Dunnet-T3 testi kullanılmıştır. Korelasyon değerlendirmeleri için korelasyon katsayıları ve istatistiksel anlamlılıklar Sperman testi ile hesaplanmıştır.

IV. Analiz ve Bulgular

4.1. Sıçanlarda DSS ile oluşturulan kolit modelinde cinsiyetin hastalık gelişimine etkisi

DSS ile kolit oluşturulması amacı ile ön çalışma kapsamında 5 erkek ve 5 dişi Wistar albino sıçana DSS, “Materyal ve Yöntemler” bölümünde detaylı tarif edilen konsantrasyon ve süre ile içme suyuna katılmıştır. Planlanan çalışmada cinsiyet farkı gözetmeksizin sıçan kullanımı hedeflenmiş olmasına rağmen ön çalışma kapsamında DSS ile oluşturulan ülseratif kolit modelinde dişi sıçanlarda kolitin değerlendirilmesinde kullanılan parametrelerde (ağırlık kaybı, rektal kanama, diyare) değişiklik tespit edilememiştir. Dişi sıçanlar erkek sıçanlara oranla daha az miktarda (~ % 60 daha az oranda) DSS’li çözeltiyi tüketmişlerdir. Dolayısıyla belirgin kolit oluşmadığı görülmüştür. Bu nedenle, daha sonraki çalışmalara erkek sıçanlar kullanılarak devam edilmiştir.

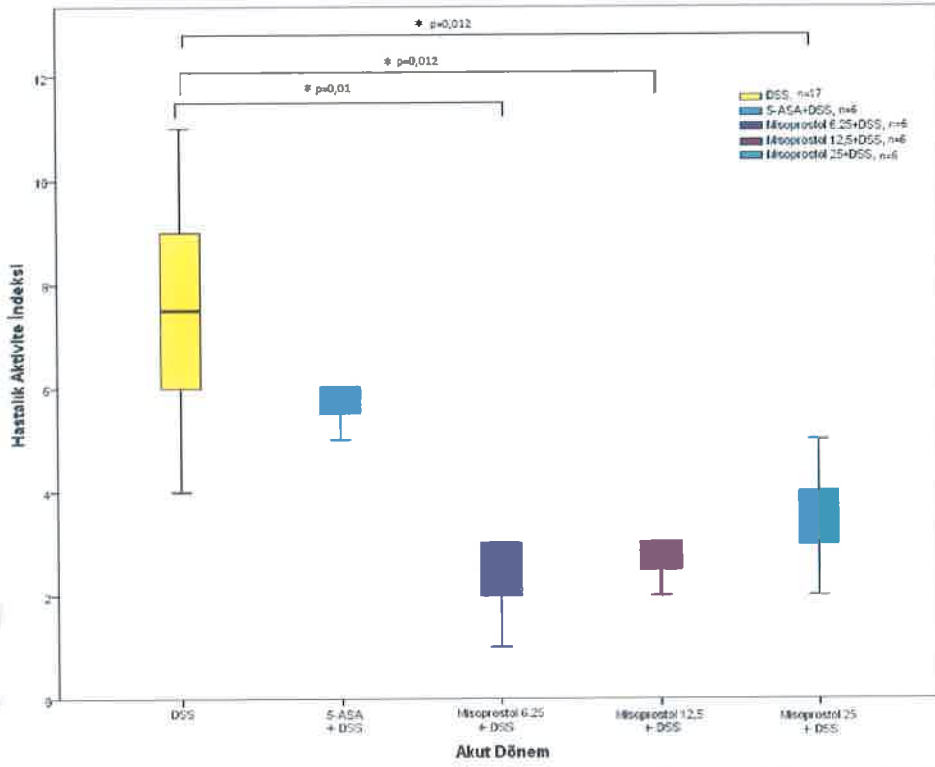
4.2. Hastalık Aktivite İndeksinin Değerlendirilmesi

HAİ, takip edilen sıçanların ağırlık değişimi, dışkı kıvamına ve gaitada kan varlığına göre skorlanmıştır.

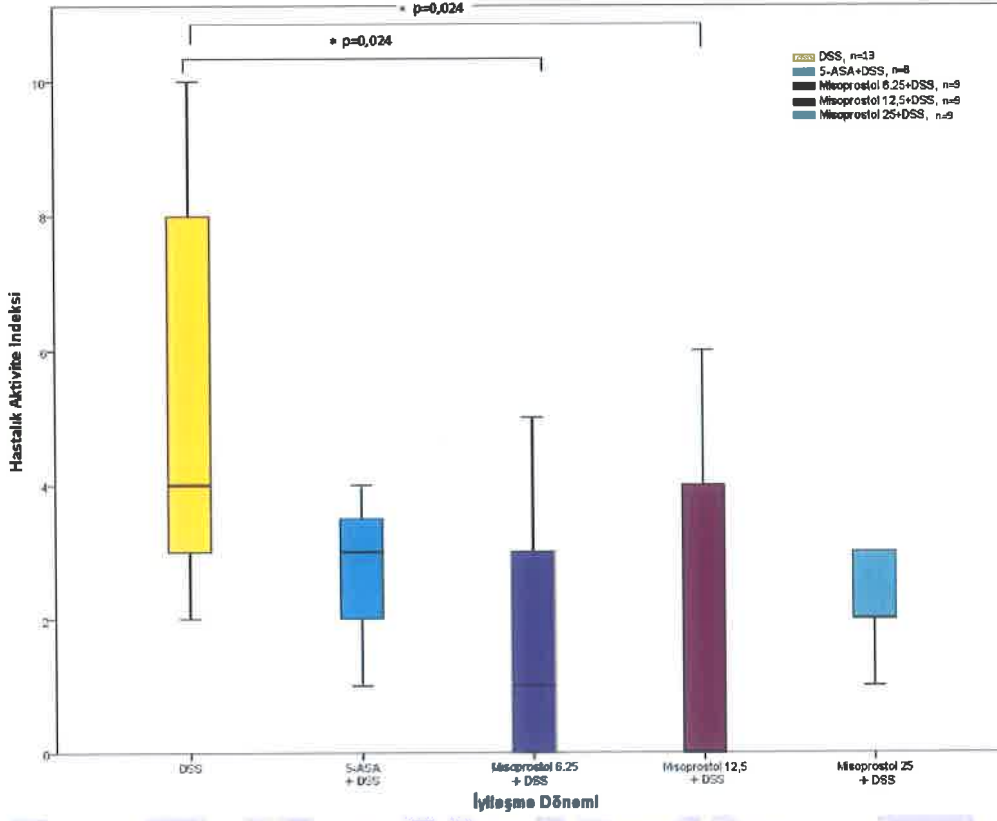
Misoprostol çözücü+DSS ve 5-ASA çözücü+DSS grupları ile DSS grubu arasında HAİ, histopatolojik skor, kolon ağırlık/uzunluk oranı ve LXA₄ düzeyleri değerlendirilmelerinde anlamlı bir fark tespit edilmemiş ve bu gruplar DSS grubuna dahil edilmiştir. Bununla birlikte sağlıklı sıçanlara misoprostol ve 5-ASA tedavisi verilen gruplar ile sağlıklı grup arasında da anlamlı bir fark oluşmamıştır.

Akut dönemde misoprostol 6,25 µg/kg/gün (p=0,01), misoprostol 12,5 µg/kg/gün (p=0,012) ve misoprostol 25 µg/kg/gün grubu (p=0,012) ile DSS grubu arasında anlamlı bir fark vardır. İyileşme döneminde ise misoprostol 6,25 µg/kg/gün (p= 0,024) ve misoprostol 12,5 µg/kg/gün (p=0,024) grupları ile DSS grubu arasında anlamlı bir fark bulunmuştur. HAİ akut dönemde misoprostol tedavisi alan bütün gruplarda, iyileşme döneminde ise misoprostol 6,25 ve 12,5 µg/kg/gün tedavisi alan gruplarda DSS grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı ölçüde düşmüştür (p<0,05).

Akut ve iyileşme döneminde 5-ASA tedavisi HAI'ı bir miktar düşürse de, bu düşüş istatistiksel olarak anlamlı seviyeye ulaşmamıştır.



Şekil 4.1 Akut dönemde gruplara göre hastalık aktivite indeksi. * P<0.05 DSS grubundan farklı (Kruskal-Wallis testi, Bonferoni düzeltmesi)



Şekil 4.2. İyileşme döneminde gruplara göre hastalık aktivite indeksi. * $P < 0.05$ DSS grubundan farklı (Kruskal-Wallis testi, Bonferoni düzeltmesi)

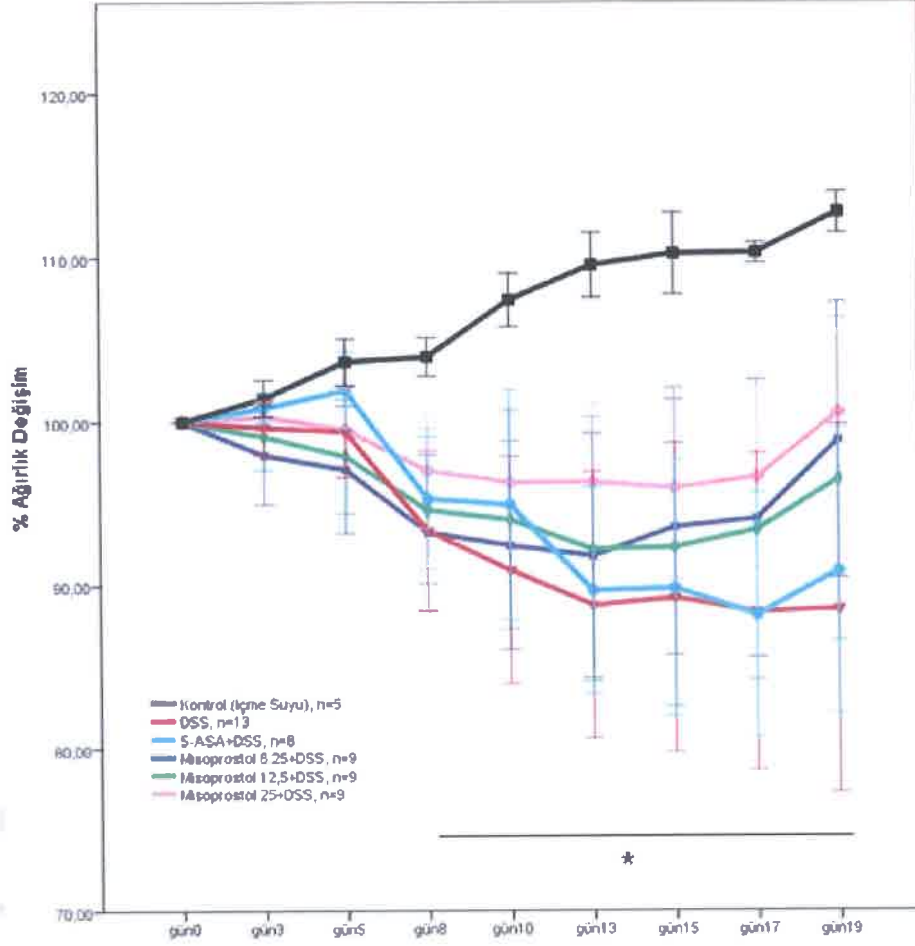
4.3. Grupların günler içindeki ortalama yüzde ağırlık değişimi

İyileşme dönemine kadar takip edilen hayvanların tedaviye başlamadan önceki ortalama ağırlıkları Çizelge 4.1'de verilmiştir.

Çizelge 4.1 Grupların tedaviye başlamadan önceki ortalama ağırlıkları

Gruplar	Hayvan sayıları	Ortalama ağırlık (g) ± SEM
Sağlıklı kontrol (içme suyu)	5	287,48 ± 11,85
DSS grubu	8	296,51 ± 9,66
5-ASA+DSS	8	308,67 ± 12,48
Misoprostol 6.25 (µg/kg/gün) +DSS	9	304,8 ± 12,84
Misoprostol 12.5 (µg/kg/gün)+DSS	9	299,96 ± 16,69
Misoprostol 25 (µg/kg/gün) +DSS	9	299,20 ± 10,71
Misoprostol çözücü (PBS) +DSS	3	291,66 ± 13,69
5-ASA çözücü (CMS) +DSS	2	296,90 ± 4,90

Gruplardaki hayvanların tedaviye başlamadan önceki (0.gün) ağırlıkları ölçülmüş ve gruplar arasında fark görülmemiştir (p=0,981) (Tek yönlü ANOVA).

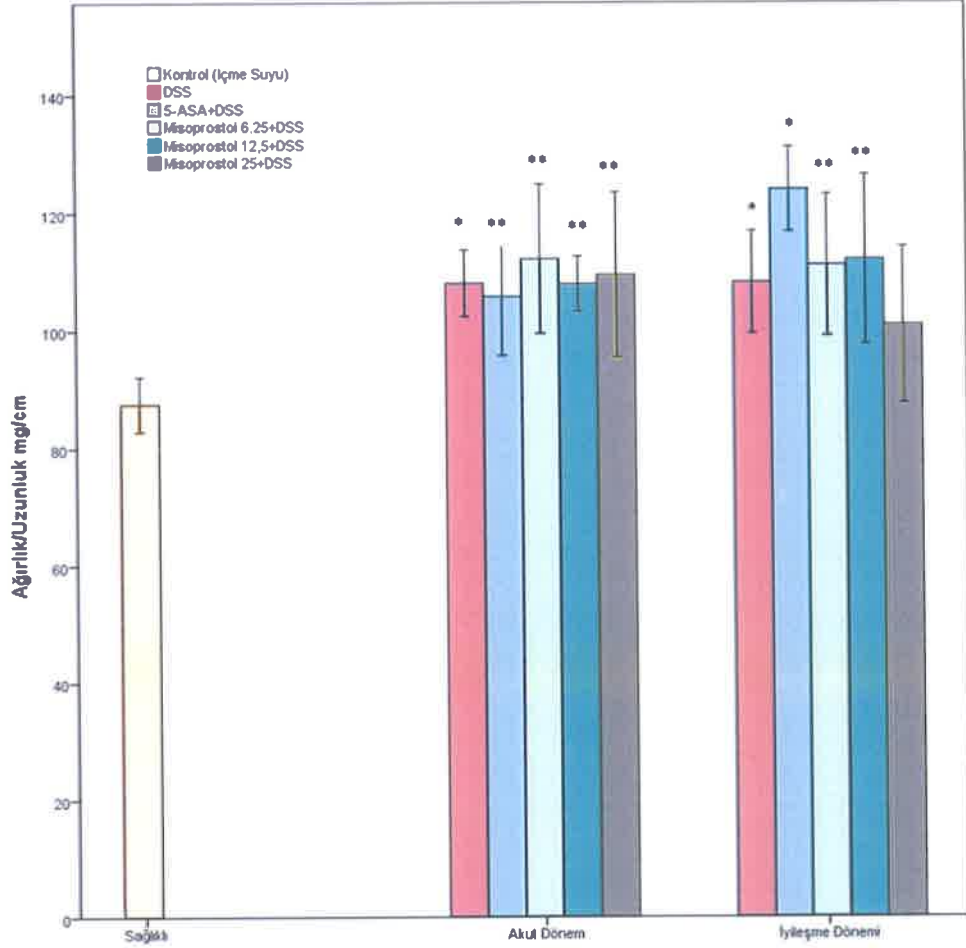


Şekil 4.3 Grupların günler içindeki yüzde ortalama ağırlıklarındaki değişim. * Kontrol grubu (içme suyu) diğer gruplardan istatistiksel olarak farklı $p < 0,05$. (Tekrarlayan ölçümlerde ANOVA testi, post hoc Dunnett T3 testi).

Kontrol grubu % ağırlık değişim açısından değerlendirildiğinde bazala göre %10 ağırlık artışı gösterirken, DSS grubunda ise % 13 ağırlık düşüşü gözlenmiştir. Kontrol grubu diğer bütün gruplardan anlamlı seviyede farklıdır ($p=0,036$). Gruplar arası karşılaştırma yapıldığında kontrol grubu ile diğer gruplar arasındaki fark 8. Günden itibaren istatistiksel olarak anlamlı hale gelmiştir ve 19. Güne kadar devam etmiştir. Standart tedavi olan 5-ASA ile DSS grubu arasında anlamlı bir fark gözlenmemiştir. Misoprostol gruplarında ise doz bağımlı olarak, ağırlık kaybı paterninde bir düzelme gözlenmekle beraber bu artış istatistiksel olarak anlamlı bir seviyeye ulaşmamıştır.

4.4. Kolon ağırlık/uzunluk oranı

Hastalık dönemlerine ve gruplara göre kolon ağırlık/uzunluk oranları Şekil 4.4.'de verilmiştir.



Şekil 4.4. Hastalık dönemlerine ve ilaç gruplarına göre kolon ortalama ağırlık/uzunluk oranları (mg/cm ± SEM). * Sağlıklı gruptan farklı p<0,001; ** Sağlıklı gruptan farklı p<0,05. (Tek yönlü ANOVA testi, Bonferoni düzeltmesi)

Kolon ağırlık/uzunluk oranlarında hastalısız, akut ve iyileşme dönemleri değerlendirildiğinde; DSS grubunda sağlıklı gruba göre akut dönemde (p<0,001) ve iyileşme döneminde (p<0,05) artış görülmektedir. 5-ASA tedavisi alan gruplarda ise bu oran sağlıklı gruba göre iyileşme döneminde (p<0,001) ve akut dönemde (p<0,05) artmıştır. Misoprostol 6,25 ve 12,5 (µg/kg/gün) tedavisi alan gruplarında sağlıklı gruba göre kolon ağırlık/uzunluk oranlarında akut ve iyileşme dönemlerinde artış

gözlenmiştir ($p<0,05$). Misoprostol 25 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{gün}$ tedavisi alan grupta ise sağlıklı gruba göre akut dönemde artış ($p<0,05$) gözlenirken, iyileşme dönemindeki artış istatistiksel olarak anlamlı değildir.

Akut dönemde DSS grubunda artmış olan bu orana 5-ASA ve misoprostol tedavilerinin etkisi gözlenmezken, iyileşme döneminde misoprostol 25 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{gün}$ tedavisine bağlı olarak anlamlı bir düzelme görülmektedir.

4.5. Kolitın Histopatolojik Değerlendirmesi

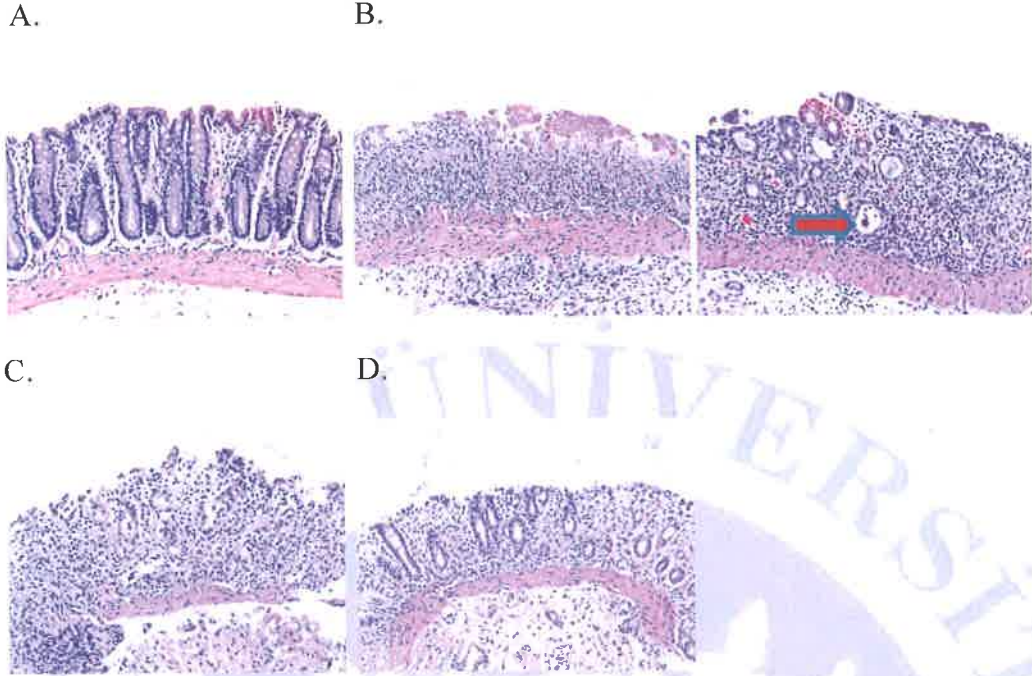
Hastalık dönemlerine ve gruplara göre histopatolojik skorlar Çizelge 4.2'de verilmiştir.

Çizelge 4.2 Hastalık dönemlerine göre grupların histopatolojik skorlaması

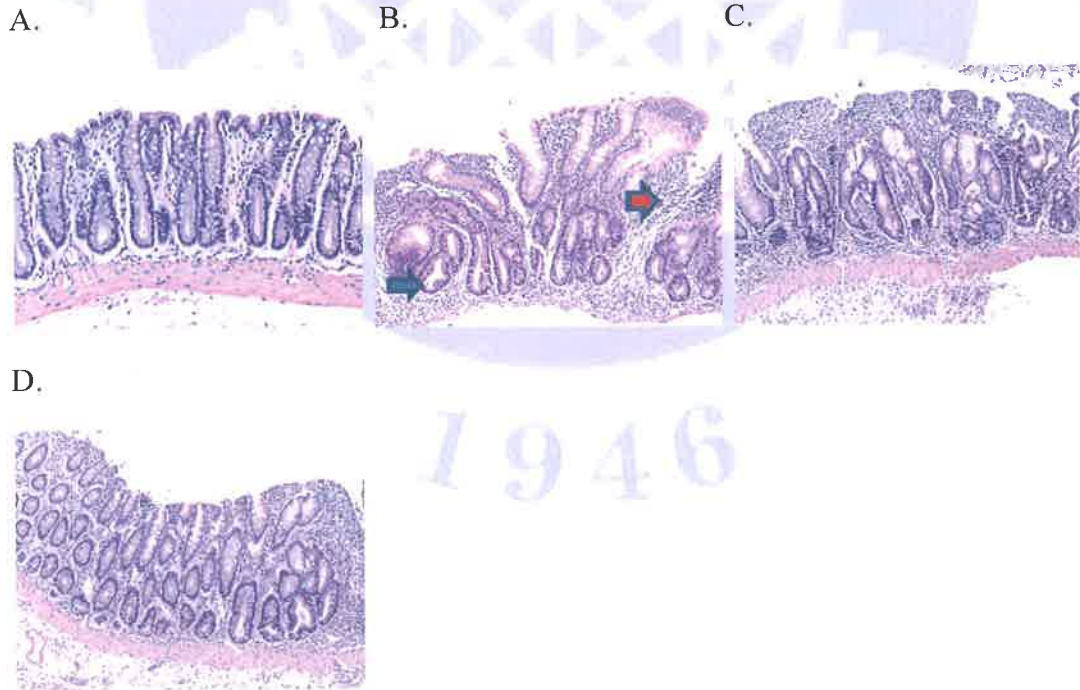
Grup	Hastalık Dönemi	Hayvan Sayısı	Histopatolojik skor [Ortanca (en düşük-en yüksek değeri)]
Sağlıklı kontrol (İçme suyu)	Akut	5	1,5 (1-3)
	İyileşme	5	
DSS	Akut	17	11,5 (10-12)
	İyileşme	13	9 (7-11)
5-ASA+DSS	Akut	6	9,5 (9-12)
	İyileşme	8	7,5 (4-12)
Misoprostol 6,25 µg/kg/gün+DSS	Akut	6	11,5 (8-12)
	İyileşme	9	7 (4-11)
Misoprostol 12,5 µg/kg/gün+DSS	Akut	6	11 (8-12)
	İyileşme	9	6 (5-11)
Misoprostol 25 µg/kg/gün+DSS	Akut	6	8 (8-9) *
	İyileşme	9	5 (4-7) *

* Akut ve iyileşme dönemlerinde hastalık (DSS) grubundan farklı $p < 0.05$. (Kruskall-Wallis testi, Bonferoni düzeltmesi)

Akut ve iyileşme döneminde değerlendirilen grupların hepsinde histopatolojik skor sağlıklı gruptan belirgin şekilde yüksektir ($p < 0,001$). Her iki dönemde de histopatolojik skor, misoprostol 25 µg/kg/gün tedavisi alan gruplarda DSS grubuna göre anlamlı ölçüde düşük bulunmuştur ($p < 0,05$).



Şekil.4.5 Akut dönemde sıçan kolon mukozasının histolojik görünümü (Hematoksilen-Eosin boyama X200 büyütme) A) Sağlıklı kolon mukozası B) DSS grubu kolon mukozası (kırmızı ok, kript apsesi) C) 5-ASA tedavisi alan grupta kolon mukozası D) Misoprostol 25 µg/kg/gün tedavisi alan grupta kolon mukozası



Şekil.4.6 İyileşme döneminde sıçan kolon mukozasının histolojik görünümü (Hematoksilen-Eosin boyama 200X büyütme) A) Sağlıklı kolon mukozası B) DSS grubu kolon mukozası (Mavi ok, kript distorsiyonu; kırmızı ok, lamina propriada

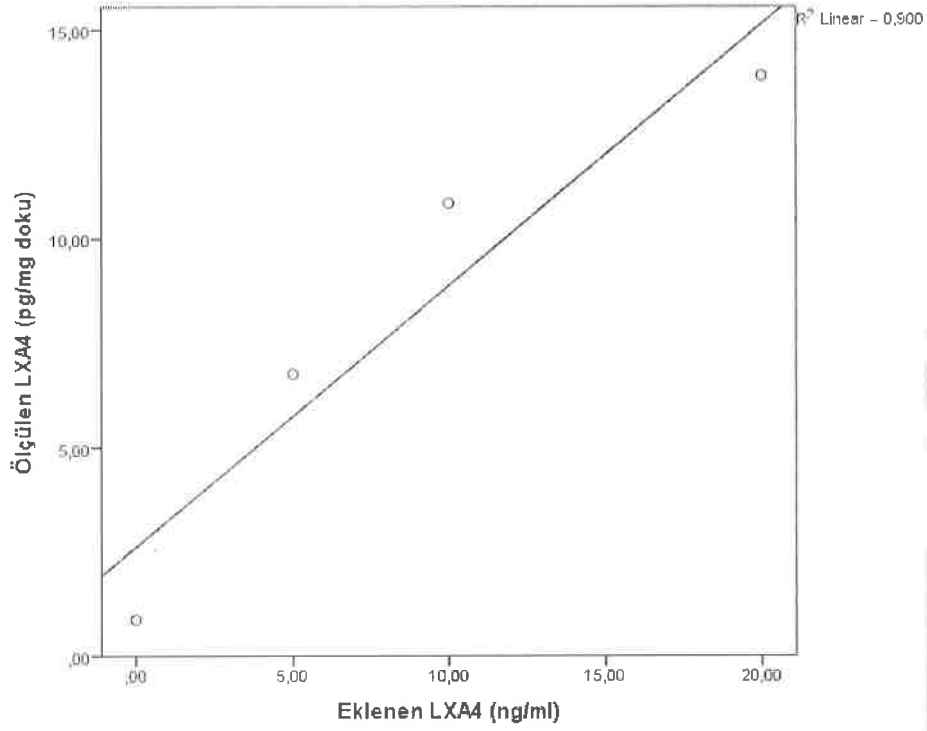
lenfositler) C) 5-ASA tedavisi alan grupta kolon mukozası D) Misoprostol 25 µg/kg/gün tedavisi alan grupta kolon mukozası.

Akut dönemde sıçan kolon mukozasının mikroskopik değerlendirmesinde, DSS grubunda epitelyal hücre kaybı, kriptlerde azalma, yaygın kript absesi, goblet hücre hasarı, lamina propriaya yoğun nötrofil infiltrasyonu görülmüştür (Şekil 4.5. B). 5-ASA tedavisi alan grupta benzer histomorfolojik özellikler saptanmıştır (Şekil 3.5. C). Misoprostol 25 µg/kg/gün tedavisi alan grupta ise inflamatuvar hücrelerin sayısının nisbeten daha az olduğu, kriptlerin nispeten korunmuş olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.5. D).

İyileşme döneminde sıçan kolon mukozasının mikroskopik değerlendirmesinde, DSS grubunda mukozada yüzey epitelinde rejeneratif değişiklikler ve kriptlerde distorsiyon, lamina propriaya yoğun lenfosit infiltrasyonu, lamina propriada seyrek nötrofiller görülmüştür (Şekil 4.6. B). 5-ASA tedavisi alan grupta da benzer histomorfolojik özellikler saptanmıştır (Şekil 4.6. C). Misoprostol 25 µg/kg/gün tedavisi alan grupta ise lamina propriada nötrofil gözlenmediği, kript distorsiyonunun daha az olduğu, epitel hücre kaybının azaldığı mononükleer iltihabi hücrelerinin de nispeten azaldığı gözlenmiştir (Şekil 4.6. D).

4.6 Kolon mukozasında hastalık dönemlerine göre LXA₄ seviyelerinin değerlendirilmesi

4.6.1 LXA₄ ölçümünde kullanılan ELISA yönteminin validasyonu

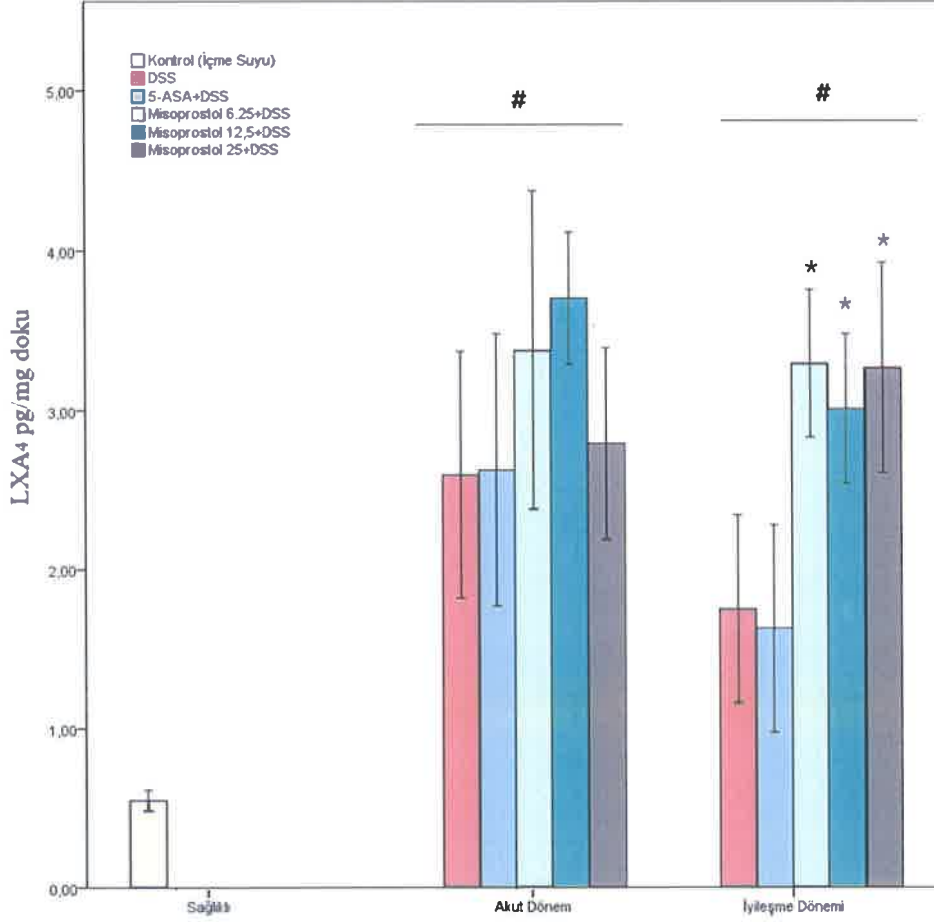


Şekil 4.7 LXA₄ ölçümünde ELISA'nın validasyonu. LXA₄ (0, 5, 10, 20 ng/ml) kolon mukozasına eklendi ve ekstraksiyon sonrası ELISA ile ölçüldü (p<0.05, Spearman korelasyon katsayısı; 1,000).

Sağlıklı kolon mukozasına eklenen ve ölçülen LXA₄ miktarları arasında pozitif yönde güçlü bir ilişki saptanmıştır (p<0.05, Spearman korelasyon katsayısı; 1,000).

4.6.2 Gruplarda LXA₄'ün hastalık dönemlerine göre seviyeleri

Hastalık dönemlerine ve gruplara göre LXA₄ seviyeleri şekil 4.8 de verilmiştir.

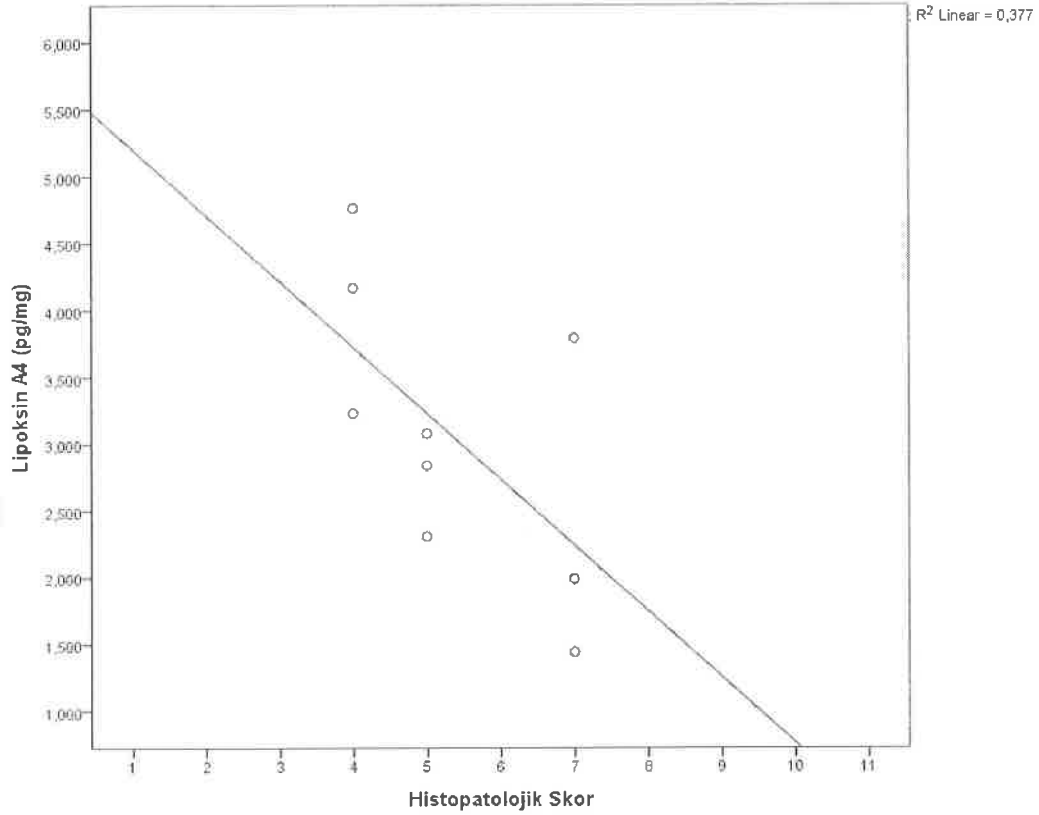


Şekil 4.8 Gruplarda LXA₄ seviyelerinin hastalık dönemlerine göre değişimi. *İyileşme döneminde, misoprostol grupları DSS ve 5-ASA+DSS gruplarından istatistiksel olarak farklı p<0,05, # Sağlıklı gruptan anlamlı olarak farklı p<0,05. (tek yönlü ANOVA, Dunnet T3 testi)

Akut ve iyileşme döneminde değerlendirilen grupların hepsinde LXA₄ düzeyleri sağlıklı gruptan belirgin şekilde yüksektir (p<0,001). İyileşme döneminde misoprostol gruplarında LXA₄ düzeyleri, DSS ve 5-ASA gruplarındaki düzeylerden istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. (p<0,05). Akut dönemde

ise misoprostol gruplarındaki LXA₄ düzeyleri artış, DSS ve 5-ASA grubuna göre anlamlı bulunmamıştır.

4.6.3. Kolon mukozası LXA₄ düzeyi ile histopatolojik skor arasındaki ilişki



Şekil 4.9 Misoprostol 25 µg/kg/gün tedavisi alan grubun iyileşme döneminde tespit edilen LXA₄ düzeyleri ile histopatolojik skor arasındaki korelasyon ilişkisi (p<0,05, Spearman korelasyon katsayısı; -0,685)

İyileşme döneminde misoprostol 25 µg/kg/gün grubundaki LXA₄ seviyeleri ve histopatolojik skor arasındaki ilişki incelendiğinde negatif yönde bir ilişki varlığı bulunmuştur. Misoprostol tedavisi alan diğer gruplarda benzer bir korelasyon ilişkisi tespit edilmemiştir.

V. Sonuç ve Öneriler

5.1 Sonuç

1. Sıçanlarda DSS ile oluşturulmuş ülseratif kolit modelinde, misoprostolün profilaktik uygulamasının hem akut hem iyileşme döneminde histopatolojik skor ve hastalık aktivite indeksi, iyileşme döneminde ise kolon ağırlık/uzunluk oranı değerlendirmelerinde faydalı etkileri olduğu görülmüştür.
2. Özellikle hastalığın iyileşme döneminde misoprostolün yararlı etkisinin kolon mukozasındaki LXA₄ artışı ile ilişkili olabileceği düşünülmüştür.

5.2 Öneriler

1. Bu çalışmada misoprostolün neden olduğu LXA₄ artışının fonksiyona yönelik bir değerlendirmesi yapılmıştır. Misoprostol/LXA₄ ilişkili moleküler mekanizmayı aydınlatmak için bu modelde misoprostolün, LXA₄ sentezinde aktivitesi bilinen 15-lipoksijenaz üzerindeki etkisi protein ve mRNA düzeyinde incelenebilir. Yine bu amaçla görülen faydalı etkide neden-sonuç ilişkisini güçlendirmek için 15-lipoksijenaz inhibitörleri ve spesifik LXA₄ reseptör antagonistleri ile etkinin geriye dönüp dönmeyeceği araştırılabilir.
2. Bu modelde LXA₄ seviyesinin artışı ile ilişkili faydalı etkiler gözlenmiştir. Bu kapsamda, DSS ile oluşturulmuş ülseratif kolit modelinde stabil LXA₄ analogları kullanılarak farmakolojik açıdan incelenebilir.
3. Ülseratif kolitte, 5-ASA hafif şiddetli kolitte kullanılan standart tedavidir. Misoprostol/5-ASA kombine edilmiş bir preparatın şiddetli bir kolitte fayda sağlayabileceği düşünülebilir. Bu hipotezi test etmek için aynı modelde misoprostol ve 5-ASA tedavisi birlikte verilebilir ve daha efektif bir klinik sonuç oluşturup oluşturmayacağı test edilebilir.

VI. Geleceğe İlişkin Öngörülen Katkılar

Bu çalışmanın; bundan sonraki çalışmalarda ülseratif kolit hastalığında, dayanıklı, oral yolla kullanılabilen lipoksin analoglarının profilaksi/tedavide kullanılma olasılıklarını ve yeni tedavi yaklaşımlarını gündeme getirmesi muhtemeldir.

VII. Sağlanan Altyapı Olanakları ile Varsa Gerçekleştirilen Projeler

Proje kapsamında sadece sarf malzemesi alınmıştır. Bu malzemeler sadece bu proje için kullanılmıştır.

VIII. Sağlanan Altyapı Olanaklarının Varsa Bilim/Hizmet ve Eğitim Alanlarındaki Katkıları

IX. Kaynaklar

AĞIŞ ER, SAVAŞ B, MELLİ M (2015). Impact of colonic mucosal lipoxin A₄ synthesis capacity on healing in rats with dextran sodium sulfate-induced colitis. *Prostaglandins and Other Lipid Mediat*, **121**: 63–69.

BUCKLEY CD, GILROY DW, SERHAN CN (2014). Proresolving lipid mediators and mechanisms in the resolution of acute inflammation. *Immunity*, **40**: 315–327.

CHAN MM, MOORE AR (2010). Resolution of inflammation in murine autoimmune arthritis is disrupted by cyclooxygenase-2 inhibition and restored by prostaglandin E₂–mediated lipoxin A₄ production. *J Immunol*, **184**: 6418–6426.

COOPER HS, MURTHY SN, SHAH RS, SEDERGRAN DJ (1993). Clinicopathologic study of dextran sulfate sodium experimental murine colitis. *Lab Invest*, **69**: 238–249.

CUMMINGS KM, MICHALEK A, METTLIN C, MITTELMAN A (1984). Screening for colorectal cancer using the hemocult II stool guaiac slide test. *Cancer*, **53**: 2201–2205.

DAS UN (2016). Inflammatory bowel disease as a disorder of an imbalance between pro- and anti-inflammatory molecules and deficiency of resolution bioactive lipids. *Lipids Health Dis*, **15**: 1–7.

GITTER AH, WULLSTEIN F, FROMM M, SCHULZKE JD (2001). Epithelial barrier defects in ulcerative colitis: Characterization and quantification by electrophysiological imaging. *Gastroenterology*, **121**: 1320–1328.

GOH J, GODSON C, BRADY HR, MACMATHUNA P (2003). Lipoxins: Pro-resolution lipid mediators in intestinal inflammation. *Gastroenterology*, **124**: 1043–1054.

MANGİNO MJ, BROUNTS L, HARMS B, HEİSE C (2006). Lipoxin biosynthesis in inflammatory bowel disease. *Prostaglandins and Other Lipid Mediat*, **79**: 84–92.

MEDZHİTOV R (2008). Origin and physiological roles of inflammation. *Nature*, **454**: 428–435.

ROMANO M, LUCIOTTI G, GANGEMI S, MARINUCCI F, PRONTERA C, D'URBANO E, DAVI G (2002). Urinary excretion of lipoxin A₄ and related compounds: Development of new extraction techniques for lipoxins. *Lab Invest*, **82**: 1253–1254.

SAVERYMUTTU SH, CAMILLERI M, REES H, LAVENDER JP, HODGSON HJF, CHADWICK VS (1986). Indium 111-granulocyte scanning in the assessment of disease extent and disease activity in inflammatory bowel disease. A comparison with colonoscopy, histology, and fecal indium 111-granulocyte excretion. *Gastroenterology*, **90**: 1121–1128.

SERHAN CN, CHIANG N, VAN DYKE TE (2008). Resolving inflammation: Dual anti-inflammatory and pro-resolution lipid mediators. *Nat Rev Immunol*, **8**: 349–361.

QUIROS M, NUSRAT A (2019). Saving problematic mucosae: SPMs in intestinal mucosal inflammation and repair. *Trends Mol Med*, **25**: 124–135.

X. Ekler

a. Mali Bilanço ve Açıklamaları

BÜTÇE KODU	AÇIKLAMA	BAŞLANGIÇ ÖDENEĞİ	HARCANAN	KALAN
03.2 03.5	TÜKETİME YÖNELİK MAL VE MALZEME ALIMLARI ve HİZMETLİ MLARI	60.000,00 TL 27.594,00 TL(EK ÖDENEK)	86.551,00 TL	1.043,00 TL
TOPLAM		87.594,00 TL	86.551,00 TL	1.043,00 TL

b. Makine ve Teçhizatın Konumu ve İlerideki Kullanımına Dair Açıklamalar

-

c. Teknik ve Bilimsel Ayrıntılar

-

d. Sunumlar (bildiriler ve teknik raporlar) (Altyapı ve Yönlendirilmiş Projeler için uygulanmaz)

Nihan Küçük, Sefa Metin, Mehmet Melli. Sıçanlarda Dekstran Sodyum Sülfat İle Oluşturulan Deneysel Ülseratif Kolit Modelinde Misoprostol'ün Koruyucu Etkisi. 25. ULUSAL FARMAKOLOJİ KONGRESİ. 4-7 Kasım 2019 Palm Wings Ephesus, Kuşadası, Sözlü bildiri.

e. Yayınlar (hakemli bilimsel dergiler) ve tezler (Altyapı ve Yönlendirilmiş Projeler için uygulanmaz)

-