



T.C.
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TR, Balıkesir University, Institute of Health Sciences



HARPAGOPHYTUM PROCUMBENS EKSTRAKTI'NIN
DENEYSEL RAT KOLİT MODELİNDE
KORUYUCU ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

DOKTORA TEZİ

MUSTAFA ERKEK

Veterinerlik Farmakoloji ve Toksikolojisi
Anabilim Dalı
Bilim Alan Kodu: 10102.08



BALIKESİR
2023

T.C.
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

HARPAGOPHYTUM PROCUMBENS EKSTRAKTI'NIN
DENEYSEL RAT KOLİT MODELİNDE
KORUYUCU ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

DOKTORA TEZİ

MUSTAFA ERKEK

TEZ DANIŞMANI
DOÇ. DR. DİLEK AKŞİT

Veterinerlik Farmakoloji ve Toksikolojisi Anabilim Dalı
Bilim Alan Kodu: 10102.08

Proje No: 2021/008 - Balıkesir Üniversitesi BAP

BALIKESİR
2023



T.C.
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



TEZ KABUL VE ONAY

Farmakoloji ve Toksikoloji (Veteriner) Anabilim Dalı Doktora Programı
çerçevesinde **Mustafa ERKEK** tarafından yürütülmüş ve tamamlanmış olan

“Harpagophytum procumbens Ekstraktı’nın
DeneySEL Rat Kolit Modelinde
Koruyucu Etkilerinin Araştırılması”

başlıklı tez çalışması,
Balıkesir Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin
ilgili maddeleri uyarınca aşağıdaki jüri tarafından

DOKTORA TEZİ
olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 28/11/2023

TEZ SINAV JÜRİSİ

Prof. Dr. Songül SONAL
Bursa Uludağ Üniversitesi
(**Başkan**)

Doç. Dr. Dilek AKŞİT
Balıkesir Üniversitesi
Üye (**Danışman**)

Prof. Dr. İzzet KARAHAAN
Balıkesir Üniversitesi
Üye

Prof. Dr. Hasan Hüseyin ORUÇ
Bursa Uludağ Üniversitesi
Üye

Prof. Dr. Ersoy BAYDAR
Balıkesir Üniversitesi
Üye

Yukarıdaki Doktora Tezi,
sınav jüri üyeleri tarafından imzalanarak 22 /12/ 2023 tarihinde teslim edilmiştir.

Prof. Dr. Ziya İLHAN
Enstitü Müdürü

BEYAN

Balıkesir Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dökümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde ve ortaya çıkan sonuçlarda herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıpları kabullendiğimi **beyan ederim.**

22 /12 /2023

İmza

Mustafa ERKEK

TEŞEKKÜR

Tez konumun belirlenmesi ve tez çalışmam boyunca yardımlarını esirgemeyen danışman hocam Sayın **Doç. Dr. Dilek AKŞİT**'e, tez çalışmamda biyokimyasal analizler esnasında yardımını esirgemeyen Sayın **Doç. Dr. Hasan AKŞİT**'e, tezimin histopatolojik incelemelerinde desteğini aldığım Sayın **Doç. Dr. Eren ALTUN**'a, sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Vermiş oldukları katkılar ve desteklerden dolayı Anabilim Dalımız öğretim üyeleri **Prof. Dr. İzzet KARAHAN**, **Prof. Dr. Şahver Ege HİŞMİOĞULLARI**'na tez izleme komitemde bulunup verdikleri katkılarından dolayı **Prof. Dr. Ersoy BAYDAR**'a bana her konuda yardımcı olan Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı doktora öğrencileri başta **YÖK 100/2000 Doktora Öğrencisi Hüseyin ŞEN** olmak üzere **Araş. Gör. Dr. Hasan SUSAR**, **Öğr. Gör. Murat ÇELEBİ** ve **YÖK 100/2000 Doktora Öğrencisi Çağla ÇELEBİ**' ye teşekkür ederim.

Yaşamım boyunca varlıklarını yanımda hissettiğim, çalışmam boyunca yaşadığım tüm zorluklara rağmen bana hedeflerimi unutturmayan, sevgilerini ve fedakarlıklarını hiçbir zaman esirgemeyen sevgili eşim **Zeynep ERKEK** ve oğlum **Yağız ERKEK**'e teşekkürü bir borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

İÇİNDEKİLER	i
ÖZET	iv
ABSTRACT	vi
SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
TABLolar DİZİNİ	xii

1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Ülseratif Kolit	3
2.1.1. Hastalığın Tanımı	3
2.1.2. Hastalığın Lokalizasyonu ve Klinik Belirtiler	3
2.1.3. Dünya ve Ülkemizdeki Durumu	4
2.2. Ülseratif Kolit'in Etiyopatogenezi	6
2.3. Tedavide Kullanılan İlaçlar	10
2.4. Oksidatif Stresin Ülseratif Kolit Üzerindeki Etki Mekanizması	12
2.5. Oksidatif Stres Değerlerini Belirleme Metodları	16
2.5.1. Malondialdehit (MDA)	16
2.5.2. Süperoksit Dismutaz (SOD)	16
2.5.3. Total Antioksidan Seviyesi (TAS)	18
2.5.4. Nitrik Oksit (NO)	18
2.5.5. Tümör Nekroz Faktörü- α (TNF- α)	18
2.5.6. İnterlökin-6 (IL-6)	20
2.5.7. Seruloplazmin	20
2.5.8. Sialik Asit	20
2.5.9. Apoptozis	21

2.6. Asetik Asitle Oluşturulan Deneysel Kolit Modeli	22
2.7. Harpagophytum Procumbens Bitkisi Hakkında Bilgi.....	23
2.7.1. Harpagophytum Procumbens Bitkisinin Genel Özellikleri	24
2.7.2. Farmakolojik Yapısı	26
2.7.3. Biyolojik Etkileri	28
2.7.3.1. Antienflamatuar Etki	28
2.7.3.2. Antioksidan Etki	28
2.7.4. Biyofarmasotik Özellikleri	29
3. GEREÇ VE YÖNTEM	30
3.1. Gereç	30
3.1.1. Deney Hayvanı Materyali	30
3.1.2. Kullanılan Cihazlar	30
3.1.3. Kullanılan Kimyasal Maddeler	31
3.2. Metot	31
3.2.1. Araştırmada Kullanılan Gruplar ve Analiz Prosedürleri.....	31
3.2.2. Serum ve Doku Örneklerinin Hazırlanması ve Analizleri	32
3.2.3. Biyokimyasal Analizler	32
3.2.3.1. MDA Analizi	32
3.2.3.2. SOD Analizi	33
3.2.3.3. TAS Analizi	34
3.2.3.4. NO Analizi	35
3.2.3.5. TNF- α Analizi	35
3.2.3.6. IL-6 Analizi	36
3.2.3.7. Seruloplazmin Analizi	37
3.2.3.8. Sialik Asit Analizi	38
3.2.4. Histopatolojik Analizler	39
3.2.5. İmmunohistokimyasal Analizler	39
3.2.6. İstatistiksel Değerlendirme	40
4. BULGULAR	41
4.1. Biyokimyasal Bulgular ve Oksidan/Antioksidan Parametreler	41

4.2. Histopatolojik Bulgular	50
4.3. İmmunohistokimyasal Bulgular	54
5. TARTIŞMA	60
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	66
7. KAYNAKLAR	68
8. ÖZGEÇMİŞ	77
9. EKLER	78
EK-1. Etik Kurul Onay Belgesi.....	78
EK-2. Bap Sözleşmesi.....	79



ÖZET

HARPAGOPHYTUM PROCUMBENS EKSTRAKTI'NIN DENEYSEL RAT KOLİT MODELİNDE KORUYUCU ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Ülseratif kolit, kolonda nötrofil infiltrasyonu, epitel hücre nekrozu ve ülserasyon ile karakterize, etiyolojisi bilinmeyen kronik inflamatuvar bir bağırsak hastalığıdır. *Harpagophytum procumbens* bitkisinin kökleri, Güney Afrika'da uzun yıllardır romatizma ve ağrı tedavisinde tamamlayıcı tıpta kullanılmaktadır. Çalışmada, ratlarda deneysel olarak oluşturulan kolit modelinde *Harpagophytum procumbens* ekstraktının proinflamatuvar sitokinler, oksidatif stres, apoptozis ve antioksidan parametreler üzerine olası koruyucu etkileri araştırıldı.

Toplam 40 adet erkek Wistar albino rat rastgele beş eşit gruba ayrıldı. Kontrol grubuna fizyolojik tuzlu su (FTS) 14 gün boyunca oral yolla 2 ml ve 14. günün sonunda intrarektal olarak 2 ml uygulandı. Harpagophytum procumbens (HP) grubu için; 14 gün boyunca HP 300 mg/kg dozunda 2 ml FTS'de oral olarak uygulandı. Kolit grubuna FTS 14 gün oral yolla 2 ml ve 14. gün sonunda 2 ml % 3'lük asetik asit intrarektal olarak uygulandı. Kolit+HP grubunda 14 gün süreyle HP 300 mg/kg dozunda 2 ml FTS içinde oral olarak uygulandı ve 14. günün sonunda % 3'lük asetik asitten 2 ml intrarektal olarak uygulandı. Kolit+Sülfasalazin (SS) grubuna 100 mg/kg sülfasalazin 14 gün oral, 14. gün sonunda ise 2 ml %3'lük asetik asit intrarektal infüze edildi. Her grubun son uygulamasından 24 saat sonra 4-5 ml kan örneği ve 5 cm distal kolon alındı. Bu çalışmada kolon doku kesitleri histopatolojik ve immunohistokimyasal (Bcl-2, Bax) olarak değerlendirildi. MDA, SOD, TAS, NO, TNF- α , IL-6, seruloplazmin ve sialik asit serumda analiz edildi.

Kolit grubu kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak MDA, NO, IL-6, TNF- α ve sialik asit düzeylerinde anlamlı bir artış, SOD, TAS ve seruloplazmin düzeylerinde anlamlı bir azalma olduğu görüldü. Kolit+HP grubunda ise Kolit grubuna göre azalan SOD, TAS ve seruloplazmin değerlerinde istatistiksel olarak önemli bir artış, artan MDA, NO, IL-6, TNF- α ve sialik asit düzeylerinde istatistiksel olarak önemli bir azalma belirlendi. Kolon dokusunun histopatolojik incelemesinde kolit grubunda; mukozal yapının kaybı, enflamatuvar hücre

infiltrasyonu, kript apse oluşumu, ödem, konjesyon ve goblet hücre depleksyonunda artış, Kolit+HP grubunda ise HP'nin ılımlı bir koruyucu etki gösterdiği belirlendi. İmmunohistokimyasal değerlendirme sonucunda Kolit grubunda Kontrol grubuna göre apoptozisin arttığı (Bcl-2 de düşüş, Bax da artış), Kolit+HP grubunda ise Kolit grubuna göre apoptozisin azaldığı gözlemlendi.

Sonuç olarak; ülseratif kolitte *Harpagophytum procumbens*in oksidatif stres, proinflatuar sitokinler, lipid peroksidasyonu, antioksidan ve apoptoz parametreler üzerine koruyucu etki gösterebileceği kanısına varıldı.

Anahtar Kelimeler: Antioksidan, apoptozis, *harpagophytum procumbens*, proinflatuar sitokinler, kolit



ABSTRACT

THE INVESTIGATION OF PROTECTIVE EFFECTS OF HARPAGOPHYTUM PROCUMBENS EXTRACT EXPERIMENTAL RAT COLITIS MODEL

Ulcerative colitis is a chronic inflammatory bowel disease of unknown etiology, characterized by neutrophil infiltration, epithelial cell necrosis and ulceration in the colon. The roots of the *Harpagophytum procumbens* plant have been used in complementary medicine for the treatment of rheumatism and pain in South Africa for many years. In the study, the possible protective effects of *Harpagophytum procumbens* extract on pro-inflammatory cytokines, oxidative stress, apoptosis and antioxidant parameters were investigated in an experimental colitis model in rats.

A total of 40 male Wistar albino rats were randomly divided into five equal groups. To the control group, 2 ml of physiological saline (FTS) was administered orally for 14 days, and 2 ml of was administered intrarectally at the end of the 14th day. For Harpagophytum procumbens (HP) group; HP was administered orally in 2 ml FTS at a dose of 300 mg/kg for 14 days. To the colitis group, 2 ml of FTS was administered orally for 14 days, and at the end of the 14th day, 2 ml of 3% acetic acid was administered intrarectally. In the colitis+HP group, HP was administered orally at a dose of 300 mg/kg in 2 ml FTS for 14 days, and at the end of the 14th day, 2 ml of 3% acetic acid was administered intrarectally. In the Colitis+Sulfasalazine (SS) group, 100 mg/kg sulfasalazine was infused orally for 14 days, and at the end of the 14th day, 2 ml of 3% acetic acid was infused intrarectally. 24 hours after the last administration of each group, 4-5 ml blood sample and 5 cm distal colon were taken. In this study, colon tissue sections were evaluated histopathologically and immunohistochemically (Bcl-2, Bax). MDA, SOD, TAS, NO, TNF- α , IL-6, ceruloplasmin and sialic acid were analyzed in serum.

When the colitis group was compared with the control group, there was a statistically significant increase in MDA, NO, IL-6, TNF- α and sialic acid levels, and a significant decrease in SOD, TAS and ceruloplasmin levels. In the Colitis+HP group, a statistically significant increase in the decreasing SOD, TAS and ceruloplasmin values, and a statistically significant decrease in the increased MDA, NO, IL-6, TNF- α and sialic acid levels were determined compared to the Colitis group. In the

histopathological examination of colon tissue in the colitis group; it was determined that loss of mucosal structure, inflammatory cell infiltration, crypt abscess formation, edema, congestion and goblet cell depletion increased, and in the Colitis + HP group, HP showed a moderate protective effect. As a result of immunohistochemical evaluation, it was observed that apoptosis increased in the Colitis group compared to the Control group (decrease in Bcl-2, increase in Bax), and decreased in the Colitis + HP group compared to the Colitis group.

In conclusion; It was concluded that *Harpagophytum procumbens* may have a protective effect on oxidative stress, proinflammatory cytokines, lipid peroxidation, antioxidant and apoptosis parameters in ulcerative colitis.

Keywords: Antioxidant, apoptosis, *harpagophytum procumbens*, proinflammatory cytokines, colitis

SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ

5-ASA	: 5 Aminosalisilik asit
ABTS	: 2,2'-azino-bis (3-etilbenzthiazoline- 6-sulfonik asid)
BAUNDEHAM	: Balıkesir Üniversitesi Deney Hayvanları Üretim, Bakım Uygulama ve Araştırma Merkezi
CAT	: Katalaz
COX	: Siklooksijenaz
CuCl ₂	: Bakır Klorür
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
DSÖ	: Dünya Sağlık Örgütü
EDTA	: Etilendiamintetraasetik asit
FTS	: Fizyolojik Tuzlu Su
GAG	: Glikozaminoglikan
GR	: Glutasyon Redüktaz
GPx	: Glutasyon Peroksidaz
GSH	: İndirgenmiş Glutasyon
GST	: Glutasyon-S-transferaz
H ₂ O ₂	: Hidrojen Peroksit
HADYEK	: Balıkesir Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu
HO	: Hidroksil Radikali
HP	: <i>Harpagophytum Procumbens</i>
IFN	: İnterferon
IFN- γ	: İnterferon Gamma
IL-1	: İnterlökin 1
IL-2	: İnterlökin 2

IL-4	: İnterlökin 4
IL-6	: İnterlökin 6
IL-8	: İnterlökin 8
IL-10	: İnterlökin 10
IL-12	: İnterlökin 12
IL-17	: İnterlökin 17
İBH	: İnflamatuvar Bağırsak Hastalıkları
İNOS	: Nitrik Oksit Sentetaz
MDA	: Malondialdehit
NAC	: N- Asetilsistein
NaCl	: Sodyum Klorür
NK	: Naturel Killer
NBT	: Nitroblue Tetrazolium
NO	: Nitrik Oksit
NSAİİ	: Non-steroidal Antienflamatuvar İlaç
NRF2	: Nükleer Faktör Eritroid 2
OSI	: Oksidatif Stres İndeksi
PPD	: p-fenilendiaminin
ROO	: Peroksil Radikali
ROS	: Reaktif Oksijen Türleri
SOD	: Süperoksit Dismutaz
SS	: Sülfasalazin
TAS	: Total Antioksidan Seviyesi
TBA	: Tiyobarbütirik Asit
TCAA	: Trikloroasetik Asit
TH	: T Helper

TNF- α : Tümör Nekroz Faktör Alfa
TNSB : Trinitrobenzen Sülfonik Asit
TOS : Total Oksidan Seviyesi
K : Ülseratif Kolit



ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 2.1. Ülseratif Kolitte Yangının Meydana Geliş Aşamaları	7
Şekil 2.2. Ülseratif Kolit Etiyolojisinde Etkili Olan Faktörler	8
Şekil 2.3. Reaktif Oksijen Türlerinin Hücrelere Verdiği Zarar	13
Şekil 2.4. Oksidatif Hasara Karşı Savunma Sistemleri ve Antioksidan Mekanizma.....	15
Şekil 2.5. Şeytan Pençesi Bitkisi	26
Şekil 4.1. MDA Sonuçları Grafiği	42
Şekil 4.2. SOD Sonuçları Grafiği	43
Şekil 4.3. TAS Sonuçları Grafiği	44
Şekil 4.4. NO Sonuçları Grafiği.....	45
Şekil 4.5. TNF- α Sonuçları Grafiği	46
Şekil 4.6. IL-6 Sonuçları Grafiği	47
Şekil 4.7. Seruloplazmin Sonuçları Grafiği	48
Şekil 4.8. Sialik Asit Sonuçları Grafiği	49
Şekil 4.9. Kontrol Grubu Kolon Dokusu.....	51
Şekil 4.10. HP Grubu Kolon Dokusu	51
Şekil 4.11. Kolit Grubu Kolon Dokusu	52
Şekil 4.12. Kolit+HP Grubu Kolon Dokusu	52
Şekil 4.13. Kolit+SS Grubu Kolon Dokusu	53
Şekil 4.14. Kontrol Grubu Kolon Dokusuna Ait Bcl-2 Görüntüsü	54
Şekil 4.15. HP Grubu Kolon Dokusuna Ait Bcl-2 Görüntüsü	55
Şekil 4.16. Kolit Grubu Kolon Dokusuna Ait Bcl-2 Görüntüsü	55
Şekil 4.17. Kolit+HP Grubu Kolon Dokusuna Ait Bcl-2 Görüntüsü	56
Şekil 4.18. Kolit+SS Grubu Kolon Dokusuna Ait Bcl-2 Görüntüsü	56
Şekil 4.19. Kontrol Grubu Kolon Dokusuna Ait Bax Görüntüsü	57
Şekil 4.20. HP Grubu Kolon Dokusuna Ait Bax Görüntüsü	58
Şekil 4.21. Kolit Grubu Kolon Dokusuna Ait Bax Görüntüsü	58
Şekil 4.22. Kolit+HP Grubu Kolon Dokusuna Ait Bax Görüntüsü	59
Şekil 4.23. Kolit+SS Grubu Kolon Dokusuna Ait Bax Görüntüsü	59

TABLÖLAR DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 2.1. İBH'nin Prevelans ve İnsidanslarının Kıtalaraya Göre Dağılımı	5
Tablo 2.2. Oksidatif Stresin Değerlendirme Metodları	17
Tablo 2.3. Apoptozisi Düzenleyici Proteinler	21
Tablo 4.1. Serum MDA Değerleri	42
Tablo 4.2. Serum SOD Değerleri	43
Tablo 4.3. Serum TAS Değerleri	44
Tablo 4.4. Serum NO Değerleri	45
Tablo 4.5. Serum TNF- α Değerleri	46
Tablo 4.6. Serum IL-6 Değerleri	47
Tablo 4.7. Serum Seruloplazmin Değerleri	48
Tablo 4.8. Serum Sialik Asit Değerleri	49
Tablo 4.9. Kolon Dokusuna Ait Histopatolojik Parametreler	50

1. GİRİŞ

İnflamatuvar bağırsak hastalıkları, kalın bağırsağın tekrarlayan ishal, dışkıda kan, abdominal ağrı ve kilo kaybı gibi klinik semptomlarla seyreden etiyolojisi tam olarak bilinmeyen karmaşık ve çok faktörlü hastalıklar olarak bilinmektedir (Safarpour ve ark., 2013).

İnflamatuvar bağırsak hastalıklarının (İBH) altında yatan nedenler tam olarak bilinmemekle birlikte, oksidatif stresin nedenlerden biri olabileceği belirtilmiştir. Kolon mukozasından normalin üstünde üretimi yapılan hidrojen peroksitin, bazal membran ve hücreler arasında devam eden sinyallere verdiği hasara bağlı olarak submukozal bölgeye bakteriyel antijen geçişine sebep olduğu ifade edilmiştir. Antijenlere karşı meydana gelen immün yanıtın kronik bağırsak hastalığına neden olabileceği ileri sürülmüştür (Pravda, 2005).

Bunların dışında toksinler, anormal bağışıklık sistemi, otoimmünite, radyasyon ve iskemi gibi sayılan birçok faktör bağırsaklarda yangıyı oluşturmaktadır. Kronik yangısal bağırsak hastalığı grubunun, belirtilen etkilerin herhangi birisiyle bağlantısı olmayan ve nedeni tam olarak açıklanamayan bir enfeksiyon olduğu belirtilmiştir (Xia ve ark., 1998).

Son otuz yılda, Asya ülkeleri başta olmak üzere İBH ve buna bağlı ülseratif kolit (ÜK) prevalansı önemli ölçüde artmıştır. ÜK kolon duvarının yangılandığı ve ülserli alanlarla karakterize, hemoraji ve diyare ile seyreden, gastrointestinal sistemin kronik idiyopatik bir inflamatuvar hastalığıdır. ÜK'in ilk defa bir hastalık olarak tespiti 1859 yılında Dr. Samuel Wilks tarafından yapılmış olup; tedavi yöntemi olarak da kendi uyguladığı metodları değerlendirmiştir. Wilks ve Moxon 1875 yılında yaptıkları araştırmalarında hastalığın kolon ve rektumda görüldüğünü gözlemlemişlerdir. Kolon

epitelinde ülserlerle birlikte kanama ile seyreden bağırsak enfeksiyonunu “Basit ülseratif kolit” olarak tanımlamışlardır (Wilks ve Moxon, 1875).

Özellikle son yıllarda prevalansın artmasıyla İBH tedavisi için immün baskılayıcılar, anti-tümör nekrozis faktörleri, monoklonal antikor gibi birçok yeni tıbbi tedavi yöntemi uygulanmış ve bu durumun, komplikasyonları azaltmaya katkıda bulunduğu belirtilmiştir (Masaki ve ark., 2018).

Harpagophytum procumbens (HP) geleneksel tıpta, artrit ve romatizmal hastalıklarda antienflamatuvar nitelikleri nedeniyle yaygın olarak tercih edilmektedir (Serrano ve Nieto, 2018). Günümüzde HP’nin en sık kullanım alanı osteoartritir (Sanders ve Grundmann, 2015). Genel olarak; analjezikler, merkezi sinir sistemi ya da periferik ağrı mekanizmaları üzerine tesir göstererek ağrıyı hafifletmektedirler. Ağrı tedavisinde kullanılan ilaçların güvenliği ve etkinliği sınırlı düzeydedir. Non-steroidal antienflamatuvar ilaçların (NSAİİ) günümüzde çok tercih edilmesi gastrointestinal sistem başta olmak üzere vücudun birçok yerinde yan etkilere yol açabilmektedir. Belirtilen yan etkilerin görülmesi nedeniyle günümüzde tamamlayıcı tıp oldukça önem kazanmıştır. HP, günümüzde antienflamatuvar ve analjezik etkileri başta olmak üzere, yan etkilerinin azlığından dolayı yaygın kullanım alanı bulmaya başlamıştır (Lim ve ark., 2014).

Araştırmamızda ratlarda deneysel olarak oluşturduğumuz kolit modelinde HP ekstraktının oksidatif stres, apoptozis, sitokinler ve antioksidanlar üzerine etkisinin belirlenmesi amaçlandı. Çalışmamızda öncelikle; ratlarda deneysel olarak asetik asit ile kolit oluşturularak HP’in oksidatif stres, apoptozis ve antioksidan değerleri belirlendi. Parafinlenmiş kolon kesitlerinde histopatolojik çalışma yapılarak, immunohistokimyasal olarak Bax ve Bcl-2 analizleriyle apoptotik hücreler tespit edildi. Bunun dışında serumda MDA, TAS, SOD, NO, TNF- α , IL-6, seruloplazmin ve sialik asit analizleri yapılarak oksidatif stres, sitokinler ve antioksidan durum değerlendirildi.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Ülseratif Kolit Hastalığı

2.1.1. Tanım

ÜK intestinal sistemde; kolon mukozası ve yüzeysel submukozada görülen diffüz inflamasyonla tanımlanan, immün sistemin verdiği cevap sonucu oluşan, tekrarlayıcı, ödematöz, ülseratif, kronik bir hastalıktır. Hastalığın etiyolojisi henüz tam olarak bilinmemekle birlikte, kolonda nötrofil infiltrasyonu ile beraber epitel hücre nekrozu ve ülserasyonla karakterize kronik yangısal bir bağırsak hastalığıdır. ÜK'in etiyolojisi çok az anlaşılmasına rağmen yapılan son çalışmalarda, hastalığın oluşumunda reaktif oksijen mediyatörleri, sitokinler, araşidonik asit metabolitleri gibi proinflamatuvar mediyatörlerin aşırı üretimi ile nötrofil infiltrasyonu gibi faktörlerin rol oynadığı bildirilmiştir (Bitiren ve ark., 2010).

2.1.2. Hastalığın Lokalizasyonu ve Klinik Belirtileri

ÜK hastalığında hedef organ genellikle kolon olmakla birlikte enfeksiyon ileum bölgesinde de görülebilmektedir. Bunun yanında ÜK'de inflamasyon rektumda başlamakla birlikte proksimale yani kolona doğru uzanarak kalın bağırsağın bütününe yayılabilmektedir. Dahası bazı durumlarda inflamasyon mukozadan daha derine kas tabakasına da yayılabilmektedir. Bu durumda kolon mukozası özelliğini kaybederek genişlemektedir (Yamada ve ark., 2011).

ÜK'de lezyonlar bağırsaklarda görüldüğü bölgeye göre isimlendirilmektedir. Örneğin; hastalık rektumda görülüyorsa ülseratif proktit ya da hemorajik proktit, enfeksiyon inen kolonda rastlanırsa distal kolit, enfeksiyon tüm kolonu kapsamışsa

pankolit olarak isimlendirilmiştir. Enfeksiyonda semptomlar aniden ortaya çıkabileceği gibi kademeli bir şekilde de sonradan da meydana gelebilmektedir. Hastalıkta gözlemlenen ilk semptomlar olarak; dışkıda yumuşama, karın sancıları ve ishal gözlemlenirken daha şiddetli belirtiler arasında kilo kaybı, yorgunluk, iştah kaybı, dışkıda mukus artışı, yoğun rektal kanama, ateş ve kansızlık görülebilmektedir (Head ve Jurenka, 2003).

Hastalığa yakalanan canlıların yarısında ÜK'in, oral ülser, oligo-artiküler veya poli-artiküler deforme olmayan periferik artrit, sakroillit, spondilit, hepatit, eritem ve skleroz gibi çeşitli bağırsak dışı belirtilerle ilişkili olduğu gösterilmiştir. Tüm bunlara bakılarak ÜK'in sadece sindirim sistemi ile ilgili olmayıp, bağırsak dışında da semptomlarla seyreden kompleks bir hastalık olduğundan bahsedilebilir (Patil ve ark., 2012). Kronik ÜK'li hastalarda, kolorektal kanser gelişme riskinin yaklaşık olarak 10 kat daha yüksek olduğu yapılan çalışmalarda ifade edilmiştir (Mehrabani ve Almasi, 2012).

2.1.3. Dünya ve Ülkemizdeki Durumu

Enfeksiyonun dünyada prevalansı ve insidansın etnik yapı, coğrafik, sosyoekonomik durum, yaş ve cinsiyete göre farklılık gösterdiği yapılan çalışmalar sonucu belirtilmiştir (Seyedian ve ark., 2019).

ÜK'in batı toplumlarında, özellikle kentsel alanlarda kırsal alanlardan daha yaygın olmakla birlikte, yıllık insidans oranının Hindistan ve Güneydoğu Asya gibi tropikal ülkelerde her geçen gün yükseldiği belirtilmektedir (Ray, 2016).

Hastalığın prevalansı Batıdan Doğuya, Kuzeyden Güneye doğru azalma eğilimindedir. Batıda prevalansın yüksek olmasının burda yaşayan toplumun, batılı yaşam tarzına (sanayi, beslenme,) ayak uyduran yapıda olmalarından kaynaklandığı düşünülmektedir. Araştırmacılar kuzey enlemlerde yaşayanlarda daha sık görülmesinin, güneş ışığına maruziyete, infeksiyöz ajanlarla karşılaşmaya ve fiziksel aktivite değişikliği ile ilgili olabileceğini ifade etmişlerdir (Karlinger ve ark., 2000).

ÜK insidansı batı ülkelerinde 2-10/100000 kişide iken; prevalansı 35-100/100000 kişi olarak bildirilmiştir. Güney Amerika dışında Asya ve Japonya gibi Uzak Doğu ülkelerinde ÜK'in görülme sıklığı ise düşük oranlardadır. İBH'nin prevelans ve insidanslarının kıtalara göre dağılımı **Tablo 2.1.**'de gösterilmiştir (Molodecky ve ark., 2012).

Tablo 2.1. İBH'nin prevelans ve insidanslarının kıtalara göre dağılımı (Molodecky ve ark., 2012).

Crohn Hastalığı			ÜK	
	İnsidans (%)	Prevelans (%)	İnsidans (%)	Prevelans (%)
Avrupa	0.3-12.7	0.6-322.0	0.6-24.3	4.9-505.0
Asya	0.04-5.0	0.88-67.9	0.1-6.3	4.9-168.3
Kuzey Amerika	0.00-20.2	16.7-318.5	0.00-19.2	24.6-37.5

Ülkemizde 2001-2003 yıllarında 12 merkezde 661 ÜK'li hastanın incelendiği "Clinical characteristics of inflammatory bowel disease in Turkey: a multicenter epidemiologic survey" çalışmanın sonucuna göre Türkiye'de ÜK insidansının her 100.000 kişide 4.4 olduğu saptanmıştır. (Tözün ve ark., 2009).

2.2. Ülseratif Kolitin Etyopatogenezi

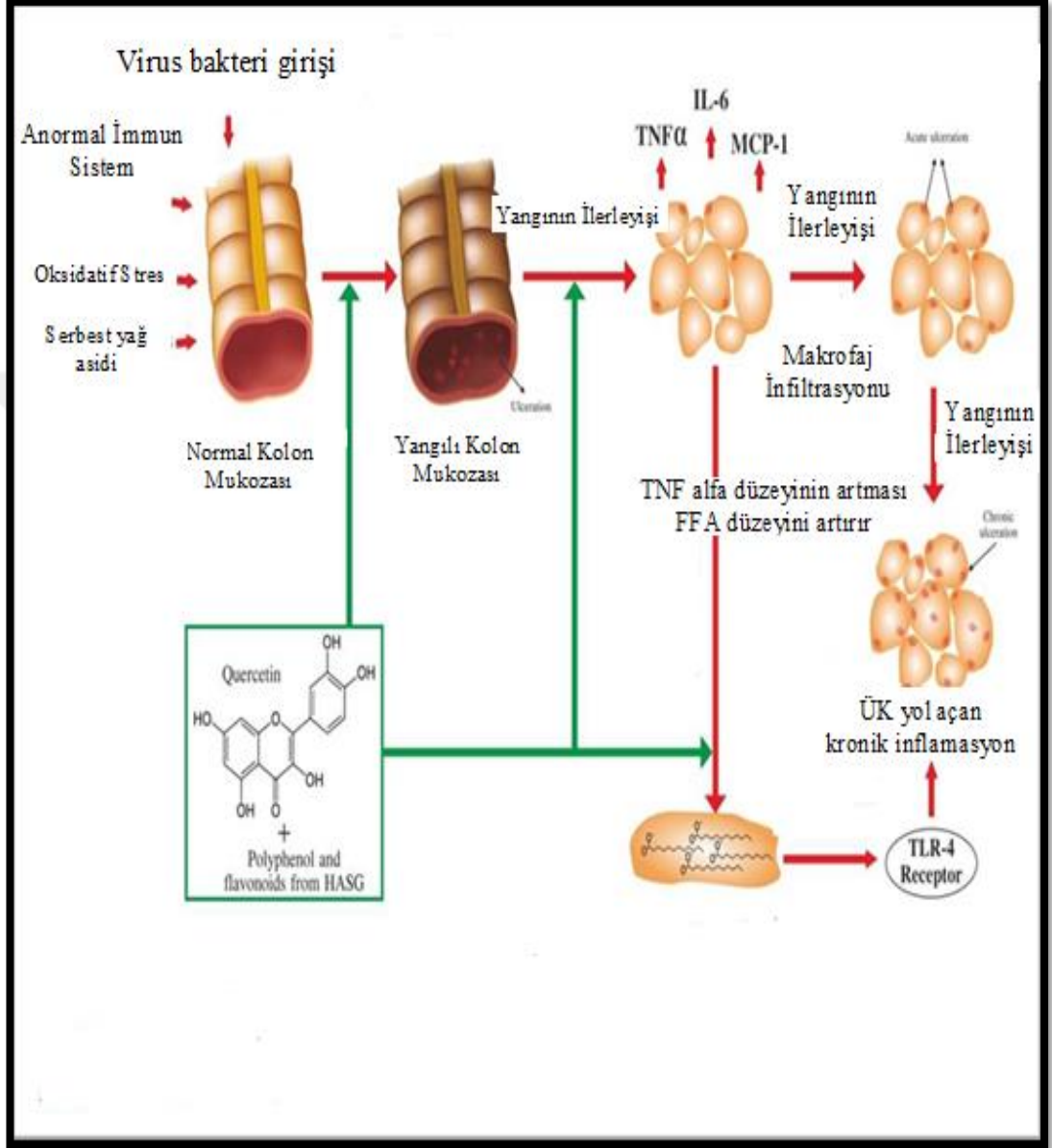
ÜK'in sebebi tam olarak bilinmeyen, en etkili tedavi seçenekleri halen araştırılan, yangıyla seyreden kronik seyirli bağırsak hastalığıdır. ÜK'nin etiyolojisinde genel olarak; genetik, immünolojik, infeksiyöz ve çevresel faktörler üzerinde durulduğu yapılan çalışmalarda gözlemlenmiştir (Rutgeerts, 1998).

ÜK'in etiyolojisi tam olarak bilinmemekle birlikte, şu anda lökotrienler ve prostaglandinler gibi araşidonik asit metabolitlerinin yanı sıra reaktif oksijen türlerinin (ROS) hastalığın oluşmasında ve gelişiminde rol aldığı bilinmektedir (Sedghi ve ark., 1993). ROS ve ardından lipid peroksidasyonun, hücresel antioksidan kapasiteyi azaltarak kronik inflamasyona neden olduğu belirtilmiştir. Aşırı inflamasyon ve oksidatif stres, ÜK hastalığı patogenezinde çok önemli rollere sahiptir. ÜK'te yangılı alanda yer değiştiren granülositlerden inflamatuvar mediatörlerin salgılandığı bilinmektedir (Çetinkaya ve ark., 2006).

ÜK'in patogenezinde diğer bir faktöründe bağırsak bakterilerine karşı meydana gelen, yetersiz ve durmaksızın devam eden immün cevabın etkin rol oynadığı ifade edilmiştir. Bağırsak muhteviyatına karşı artmış T hücre cevabı ile kolon mukozasına aşırı nötrofil infiltrasyonunun meydana geldiği gözlemlenmiştir. Bu durum neticesinde kronik yangı oluşmaktadır. İnsan ve hayvanlarda mukozal enflamasyonda, interlökin 1-beta (IL-1 β), interlökin-6 (IL-6), tümör nekrozis faktör (TNF- α), interlökin-12 (IL-12) ve interferon (IFN) gibi faktörler dikkat çekmektedir. (Xavier ve Podolsky, 2007).

ÜK'i tetikleyici sebep ne olursa olsun, her türlü saldırıya öncelikle müdahale edip yangı bölgesine ilk giden hücreler nötrofillerdir ve inflamasyon sürecinde merkezi roldedirler. İlk immün yanıt olarak nötrofillerin, dolaşımda vasküler endoteliumdaki boşluklardan geçip dokular arası boşluklara sızdığı görülür (Jungbauer ve Medjakovic, 2012). Nötrofiller sızdıkları bu bölgede antimikrobiyal peptitleri ve fazlaca doku hasarına neden olabilecek reaktif oksijen ara ürünlerini salgırlar. Nötrofiller ayrıca kemokinler ve proinflamatuvar sitokinler TNF- α , IL-1 β ,

IL-6 ve IL-8 üretimi yoluyla makrofajları aktive eder. ÜK'te kolon dokusunda gelişen hasarın, aşırı nötrofil göçü sonucu geliştiği düşünülmektedir. ÜK'de yangının meydana geliş aşamaları **Şekil 2.1**.de gösterilmiştir (Hanauer, 2006).



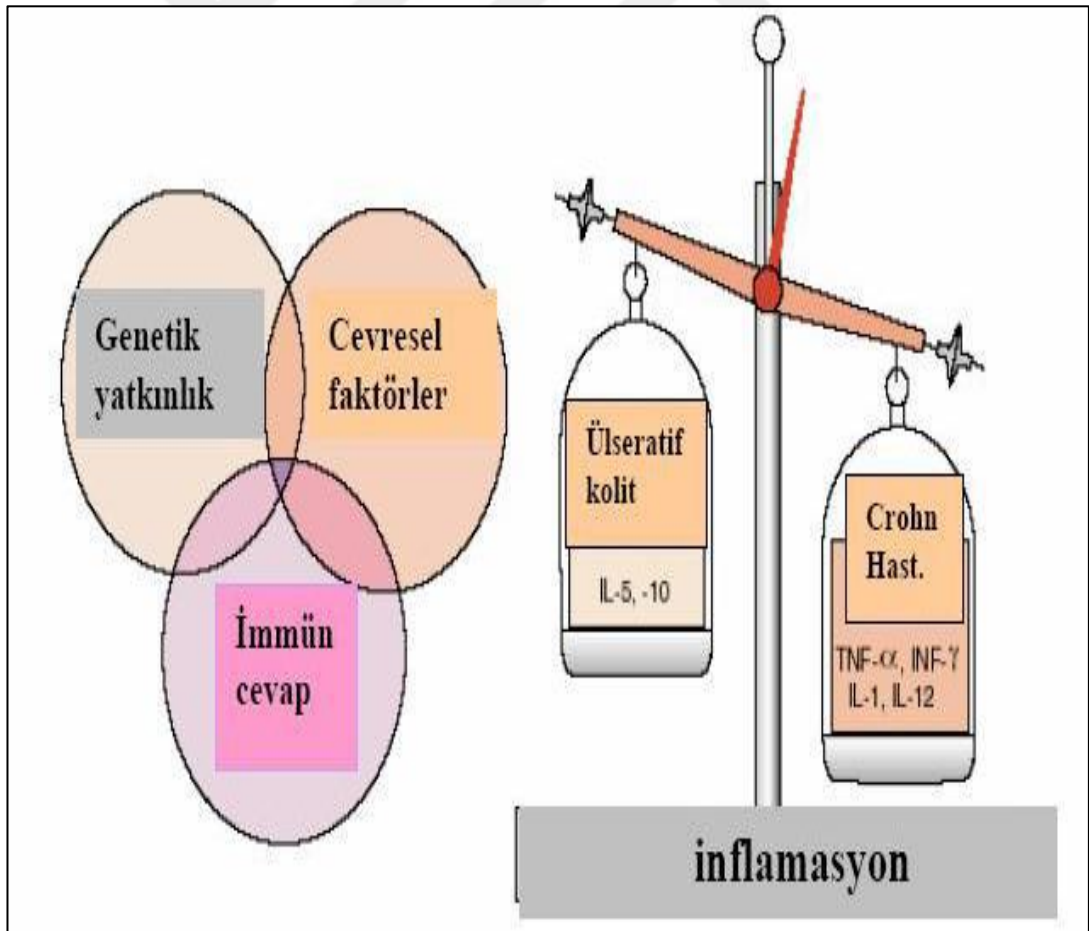
Şekil 2.1. ÜK'te yangının meydana geliş aşamaları (Hanauer, 2006).

NSAİİ, ÜK gelişme riskini artırdığı yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (Low ve ark., 2013; Ungaro ve ark., 2017). NSAİİ'nin ÜK'de nonspesifik olarak yangıyı başlattığı, mukozal bariyere zarar vererek bağışıklık sistemi hücrelerini aktivelediği bildirilmiştir. NSAİİ, prostaglandinlerin üretiminde görevli siklooksijenaz (COX) enzimini

inhibe ederek mevcut yangıyı kötüleştirdiği ve yeni inflamasyon gelişimini tetikleyici bir etkisi olduğu düşünülmüştür (Boyko ve ark., 1988).

ÜK enfeksiyonunda diğer etken olarak bakteriler ve antijenlerin nötrofillere yoğun nüfuzu sonrasında uzun süreli T hücre bağlantılı yangının oluştuğu ifade edilmiştir. Örnek olarak 14 gün süreyle NSAİİ'dan piroksikama maruz kalan farelerde kronik kolitin geliştiği bildirilmiştir (Berg ve ark., 2002).

ÜK'de inflamasyonun patogeneğinde, genetik, çevresel faktörler, immünolojik mekanizmalar ile humoral ve hücresel faktörlerin de önemli rolü vardır (**Şekil 2.2**) (Baykal, 2005). Bağışıklık hücrelerinin etkinliği sonucu, yoğun sayıda sitokin ve inflamatuvar mediatör aktivasyonuna bağlı olarak, mukozal hasar meydana gelmektedir. Belirtilen tüm mekanizmalara bağlı olarak daha fazla inflamasyon meydana gelir (Chen ve ark., 2022).



Şekil 2.2. Ülseratif kolit etiyolojisinde etkili olan faktörler (Baykal, 2005).

Hastalığın başlangıcında sinyal moleküllerinin ve yolaklarının sorumlu olduğu ifade edilmektedir. Sitokinler, kemokinler, adezyon molekülleri gibi inflamatuvar mediatörlerin regülasyonundaki artışın kolit oluşumunda rol oynadığı belirtilmiştir (Arai ve ark., 1998).

Klinik ve deneysel çalışmalar, kolonik inflamasyon sırasında prostaglandin E2, tromboksan A2, prostasiklin ve özellikle LTB4 seviyelerinin yüksek oranda arttığını doğrulamıştır (Niu ve ark., 2015). Diğer faktörler arasında ise; oksidatif stres, değişen kolonik ortam, glikozaminoglikan (GAG) anormal mukozal içeriği, azalmış kısa zincirli yağ asitlerinin oksidasyonu, bağırsak geçirgenliğinin artması, sülfür üretiminin artması ve metilasyonun azalmasında etkili olduğu bilinmektedir (Molodecky ve Kaplan, 2010).

ÜK'e neden olan faktörlere bağlı olarak immün yanıt aktive olmaktadır. Bunlara bağlı olarak makrofajlardan ortaya çıkan sitokinlerle beraber TNF- α ve IL-2 T hücrelerini sitotoksik olarak etkilemektedir. İmmün yanıt neticesinde T ve B hücreleri uyarılarak sitotoksik aktiviteyle birlikte antikor üretimini artırarak, antikor kaynaklı toksisite oranlarını yükseltmektedir. Sonuç olarak, lenfositler, araşidonik asit mekanizmasındaki ürünler ve serbest oksijen radikallerine bağlı olarak hasar meydana gelmektedir. Oluşan hasardan asıl sorumlu olarak T lenfositler ve makrofajların olduğu belirtilmiştir. İmmün cevap sonucu; lenfosit ve nötrofil sayısının artışı, sitokinlerin salınımının çoğalması meydana gelmektedir (Sartor, 2006).

Sitokinler yangıyla ilgili bütün mekanizmalarda ve immün cevap aktivasyonunda etkin faktörlerdir. Standart kolon homeostazisi için kolonik mukozada antiinflamatuvar ve proinflamatuvar sitokinlerin aynı seviyede bulunması gerekmektedir. ÜK'te oluşan immün hiperaktivasyonla birlikte; bu seviyelerde bozulmalar oluşmaktadır. Tüm bunlar sonucunda interlökin-1 (IL-1), IL-2, IL-6, IL-8, TNF- α gibi proinflamatuvar sitokin değerlerinde yükselme gözlemlenirken, IL-4 ve IL-10 gibi antiinflamatuvar sitokin değerlerinde azalma meydana geldiği ifade edilmiştir (Papadakis ve Targan, 2001).

İnsanlarda erken yaşlarda apandisitinin alınmasının, ÜK'ten korunmada etkili bir faktör olabileceği belirtilmiştir (Low ve ark., 2013; Ungaro ve ark., 2017).

2.3. Tedavide Kullanılan İlaçlar

ÜK'in patogenezi anlamaya yönelik çalışmalar sürmekle birlikte, hastalığın nedenlerini anlamak gelecekteki sağlık gelişimi için oldukça değerlidir. Bunun dışında bu çalışmaların ilaç geliştirme yöntemleri için yeni ufuklar açacağı düşünülmektedir. ÜK, tüm dünyada oldukça sık görülmekle birlikte, kolon kanser oranlarını yükseltmesiyle ilişkili olarak erken teşhis ve tedavisinin önem taşıdığı belirtilmiştir. Güncel olarak kolitli hastaların iyileştirilmesinde yararlanılan ilaçların antiinflatuar ilaçlar ve immunsupresif ajanlar olduğu ifade edilmiştir (Lewis ve ark., 2004).

Hastalıkta medikal tedavi olarak hedeflenen asıl noktanın; hastalığın belirtilerini kısa sürede hafifletmek, NSAİİ'nin tedavideki sürecini kısaltmak, hastaları iyileştirmede yararlanılan ajanların yan etkilerini önlemek olduğu ifade edilmiştir (Sachar, 1995).

ÜK dahil, yangısal bağırsak hastalıklarının tedavi seçenekleri, sülfasalazin, 5-aminosalisilik asit, kortikosteroidler, immünomodülatör ilaçlar, azatioprin, metotreksat, kalsinörin inhibitörleri (siklosporin ve takrolimus) ve anti-TNF- α (infliksimab) gibi ilaçların kullanımına dayanmaktadır. Tedavi seçiminin klinik amaca, hastalığın seyrine, mevcut veya önceki ilaca verilen yanıt ve hastalığın komplikasyonlarına göre değiştiği bildirilmektedir. Ayrıca standart tedavi protokolüne cevap alınamayan durumlarda heparin, nikotin, kısa zincirli yağ asitleri, antibiyotiklerin de uygulandığı bildirilmiştir (Bergamaschi ve ark., 2010).

ÜK tedavisinde yıllardır ana ilaç olarak kullanılan sülfasalazinin aktif parçasının 5-aminosalisilik asit (5-ASA) olduğu anlaşıldıktan sonra, yeni ilaçlar potansiyel yan etkili sülfapiridin kısmını içermeyecek şekilde geliştirilmiştir (Collins ve Rhodes, 2006). Sülfasalazin 1940'lardan beri ÜK'in tedavisinde kullanıldığı bilinmektedir. Fakat sülfasalazinin hastaların çoğunda intolerans ve hipersensitivite gibi yan etkilere yol açmasından dolayı kullanımında kısıtlamaya gidildiği belirtilmiştir (Rachmilewitz ve ark., 1989).

ÜK'in araştırılmasına yönelik son yıllarda yapılan çalışmalarda, bu hastalık dahil bütün inflamatuvar bağırsak enfeksiyonlardaki yangıya, eikosanoidler olarak bilinen bir dizi bileşiğin neden olduğu ifade edilmiştir. Öncelikle, eikosanoidlerin biyosentezinde merkezi bir ara ürün araşidonik asit üretimidir. Araşidonik asit, fosfolipaz A2'nin etkisiyle hücre zarından salınır. Bu enzim yangılı bir olay sırasında daha fazla üretilmektedir. Üretildikten sonra, prostaglandinler veya lökotrienler adı verilen bir veya daha fazla benzer bileşik grubuna dönüştürülür. Prostaglandinlere COX'lar aracılık eder (genellikle COX-1 veya COX-2 olarak adlandırılır). Araşidonik asit salınımı, kortikosteroid ilaçların kullanımı ile engellenebilir. En sık kullanılan ilaçlar, araşidonik asit oluşuktan sonra prostaglandinlerin üretimini bloke eder ve COX enzimlerini inhibe eden ilaçları içerir. Aspirin, asetaminofen, ibuprofen veya reçeteli NSAİİ, COX-1 ve/veya COX-2 enzimlerinin blokajının, homeostazda yer alan bazı arzu edilen prostaglandinleri inhibe ederek olumsuz uzun vadeli etkilere sahip olabileceği belirtilmiştir. Kortikosteroidlerin istenmeyen sistemik etkileri nedeniyle NSAİİ 'ler kortikosteroidlere tercih edilir (Furst ve Hillson, 2001). Bununla birlikte uzun süreler boyunca (özellikle yaşlılarda) NSAİİ kullanımına bağlı olarak gastrointestinal sistem lezyonları, böbrek ve karaciğer gibi organlardaki olumsuz etkilerin dışında, enfeksiyon riski, lenfoma, deri kanseri gibi komplikasyonların geliştiği bildirilmiştir (Lim ve ark., 2014). Bunun dışında ÜK, ilaç fiyatları dahil, bütün harcamaların masraflı seyrettiği kronik bir bağırsak enfeksiyonudur. Tüm bu sonuçlara bağlı olarak güncel, zararlı etkilerinin düşük olduğu, maliyeti az ve etkin ilaçların araştırıldığı bilinmektedir (Schwartz ve ark., 1982; Molodecky ve Kaplan, 2010).

Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ)'nün kaynakları göstermektedir ki; sosyoekonomik olarak gelişmiş ülkelerde yaşayan toplumun büyük çoğunluğunda tedavi seçenekleri olarak geleneksel ilaçlar tercih edilmektedir (Gautam ve ark., 2013). Sonuç olarak, HP ve ekstraktlarının veya bunlara benzer çoğunlukla hafif yan etkileri olan ürünlere, alternatif tedavi olarak giderek artan şekilde bir talep olduğu belirtilmiştir (Furst ve Hillson, 2001).

ÜK tedavisinde birçok tedavi türü önerilmiş ve klinik olarak kanıtlanmış olmasına rağmen, birçok hasta ya mevcut seçeneklere yanıt vermediğinden veya önemli yan etkiler gösterdiğinden, ek terapötik yaklaşımlara ihtiyaç duyulmuştur (Schreck ve ark., 1992; Cuzzocrea ve ark., 2002).

Geleneksel olarak halk hekimliği, ÜK dahil olmak üzere yangısal bağırsak hastalıkları semptomlarını kontrol etmek için birçok ülkede kullanılmaktadır. Birkaç deneysel klinik çalışma, aloe vera, sakız reçinesi (*boswellia serrata*), meyan kökü (*Glycyrrhiza glabra*), çemen, curcumin, psyllium ve yeşil çay (*camellia sinensis*) dahil olmak üzere birçok doğal ürünün ÜK'in rahatlatma etkisinin olduğunu belirtmiştir (Cabre ve ark., 2012; Sanchez ve ark., 2015).

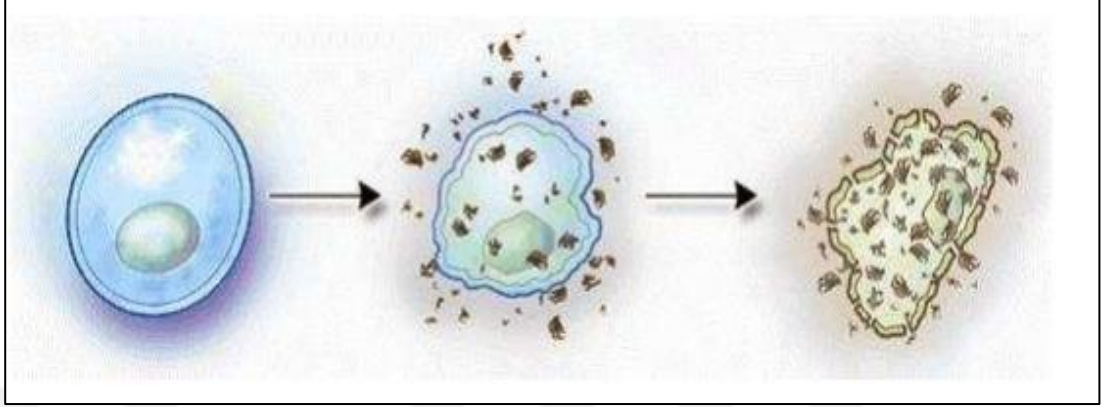
Bitkisel ilaçların ÜK gibi kronik inflamatuvar rahatsızlıklar için daha az yan etki ile etkili olduğu kanıtlanmış, ancak moleküler mekanizmaları üzerindeki gizem hala çözülmemiştir ve daha fazla araştırmaya ihtiyaç duyulduğu belirtilmiştir (El-Meligy ve ark., 2013). Tedavide kullanılan bitkisel ilaçların lipid peroksidasyonu azalttığı, süperoksit dismutaz (SOD) ve glutatyon peroksidaz (GPx) gibi antioksidan savunma bileşenlerinin seviyelerini arttırdığı belirtilmiştir (Doddola ve ark., 2008). Ayrıca belirtilen bu ilaçların COX2 ve iNOS (nitrik oksit sentetaz) enzimlerinin seviyesini düşürdüğü bildirilmektedir (Abdallah ve Ismael, 2011).

2.4. Oksidatif Stresin Ülseratif Kolit Üzerindeki Etki Mekanizması

Canlılar hayatları boyunca düşük ya da fazla miktarda etkin serbest oksijen radikallerini ortaya çıkarabilirler. Düşük sayıdaki serbest radikaller immun sistem hücreleri için (nötrofil ve makrofajlar) önemlidir. Fakat, serbest bırakılmalarına bağlı olarak hücreler aşırı serbest radikal üretilmektedir. Bunun sonucunda hücrelerin savunma bariyerlerinin zayıfladığı belirtilmiştir (Halliwell ve Gutteridge, 2015).

Oksidatif stres, oksidan ve antioksidanlar arasındaki bağlantının oksidanlar lehine bozulması sonucunda, lipid peroksidasyonu ve reaktif oksijen ürünlerinin açığa çıkmasına bağlı olarak organizmada hücre hasar meydana gelmesidir. Oksidatif strese karşı vücudun bariyer sistemlerinin (antioksidan fonksiyonlar) yetersiz görev yapması durumunda, dokularda oksidatif hasar gelişerek vücut fonksiyonları büyük oranda aksamaktadır (**Şekil 2.3.**) (Halliwell ve Gutteridge, 2015). Oksidatif stres birçok enfeksiyonun patogeneğinde önemli rol oynadığından hastalığın şiddetlenmesine neden olmaktadır. Oksidatif stres sürecinin aynı zamanda, kardiyovasküler hastalıklar,

kanser, sepsis, dejeneratif nörolojik bozukluklar, böbrek enfeksiyonları, infertilite, kas ve karaciğer gibi birden çok organda fonksiyon bozukluğuna neden olduğu belirtilmiştir (Ercan ve Fidancı, 2012).



Şekil 2.3. Reaktif oksijen türlerinin (ROS) hücrelere verdiği zarar (Halliwell ve Gutteridge, 2015).

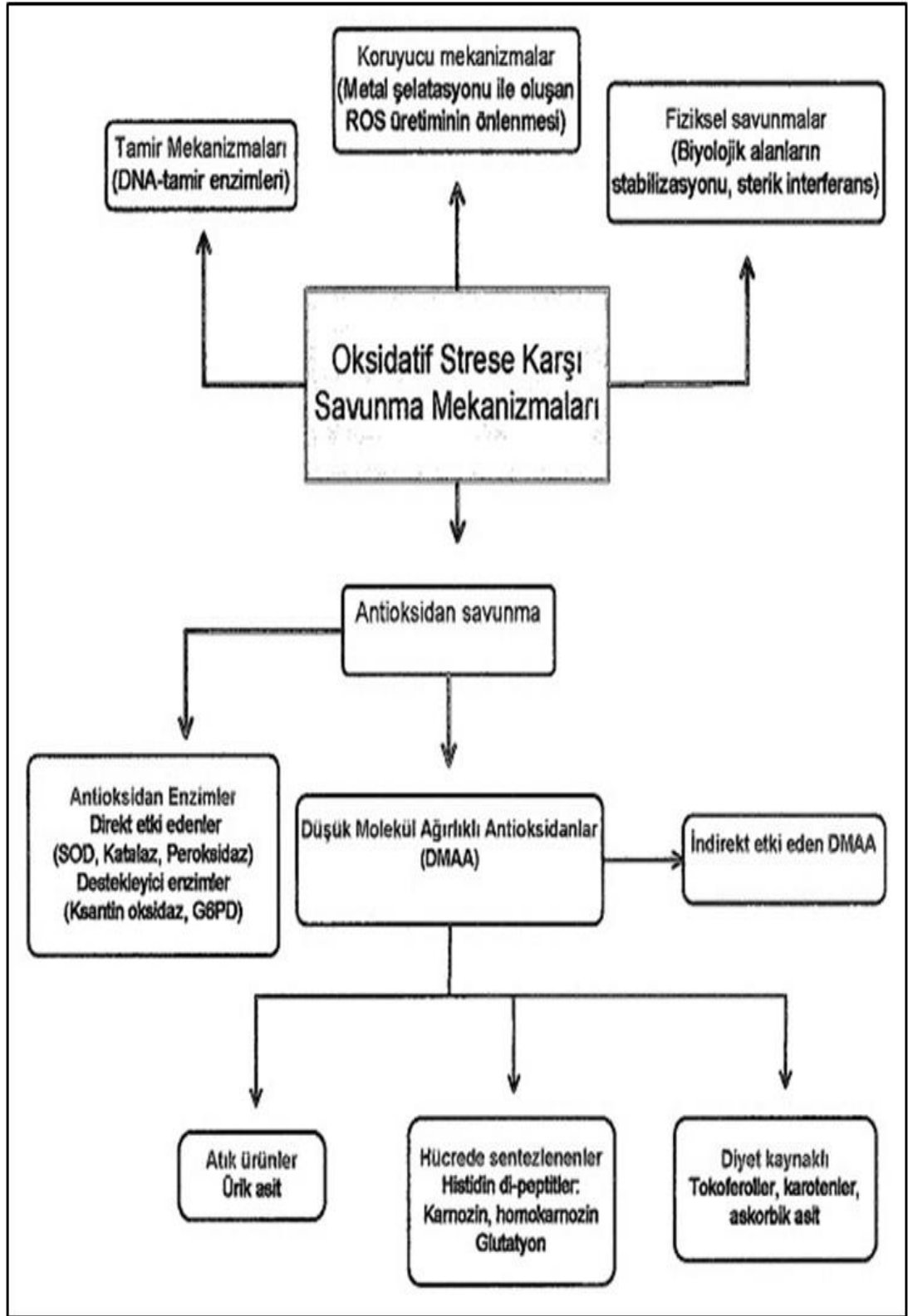
ROS, güçlü olarak aktif kimyasal yapıları hedef almaktadır. Bunun dışında protein, lipit ve nükleik asit gibi makromolekülleri de hedeflemektedir. Bahsedilen yapılardaki protein mekanizmasındaki bozukluğun, lipit peroksidasyon ve DNA'nın yapısında bozulmalara sebebiyet verdiği belirtilmiştir (**Şekil 2.3.**). Bu ifadeye bağlı olarak, ROS'un aşırı üretimi hücre ve doku hasarı ile enflamasyona sebep olmaktadır. Canlı organizmadaki ROS; süperoksit anyonu, hidroksil radikali (HO), nitrik oksit (NO), peroksil radikali (ROO) ve radikal olmayan hidrojen peroksit (H_2O_2) gibi serbest radikaller oksidatif stresin meydana gelmesindeki önemli nedenlerdendir (Wang ve ark., 2016).

Bu serbest radikaller (NO, HO vs.) DNA, proteinler, karbonhidratlar, lipitler ve hücre zarına olumsuz etkileri olan reaktiflerdir. Belirtilen reaktifler, canlıdaki sitoplazmik, mitokondriyel ve ekstrasellüler çeşitleri bulunan glutatyon S-transferaz (GST), GPx, glutatyon redüktaz (GR), SOD, katalaz (CAT) seruloplazmin, transferrin, indirgenmiş glutatyon (GSH), askorbik asit (vitamin C) ve alfa-tokoferol (vitamin E) gibi antioksidan enzim değerlerini etkilemektedir. (Valko ve ark., 2007).

Radikal moleküller vücutta az veya belirli bir seviyede ve antioksidan savunma gücünde dinamik bir denge içinde kaldığı sürece bu durumun organizma için yararına olduğu belirtilmiştir. Örneğin; lökositlerle mikroorganizmaların öldürülmesinin ana mekanizması serbest radikal oluşumudur. Serbest radikaller, apoptozisin tetikleyicisi, habercisi ve etkin faktörü olarak görev yaparlar. Bu mekanizmadan dolayı serbest radikallerin, aşırı hücre artışını önleyerek homeostaziste rol oynadığı ifade edilmiştir (Rajendran ve ark., 2014).

Antioksidan savunmanın çökmesi sonucunda apoptozis tetiklenmektedir. Yapılan çalışmalarda birçok hastalığın patogenezinde, hastalığın serbest oksijen radikalleri ile ilişkili olduğu görülmüştür. Yeni doğan bebeklerde, doğumun ilk günlerinde oksijen radikallerine karşı anti-oksidatif kapasitenin yeterli olmaması sonucunda doğumdan hemen sonra meydana gelen oksijen tedariğindeki ani artışın, ROS aşırı üretimine ve antioksidanların aşağı regülasyonuna yol açtığı da yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (Perrone ve ark., 2010). Oksidatif hasara karşı vücutta gelişen savunma sistemleri ve antioksidan mekanizma **Şekil 2.4.** gösterilmiştir (Ames ve ark., 1993).

Canlıların hayatlarını idame ettirebilmeleri amacıyla prooksidan ve antioksidan mekanizmalarla bağlantılı olarak daimi bir denge söz konusudur. Denge sisteminde prooksidanların artmasının oksidatif hasara neden olduğu bilinmektedir. Genellikle inflamasyonlu hücrelerdeki etkinliği ve infiltrasyona yol açılan kolon mukozası içindeki yangısal bozukluklarda reaktif oksijen ve azot grubu değerlerinde yükselişler gözlemlenmiştir. Kolon mukozasında aşırı üretilen hidrojen peroksitin bazal membran ve hücreler arası sistemlere verdiği hasara bağlı olarak submukozal tarafa bakteriyel antijenlerin geçişine sebebiyet verdiği belirtilmiştir. Burda oluşan antijenlere karşı verilen immun cevabın ÜK'e neden olduğu ifade edilmiştir (Özgün ve ark., 2013).



Şekil 2.4. Oksidatif hasara karşı savunma sistemleri ve antioksidan mekanizma (Ames ve ark., 1993).

2.5. Oksidatif Stres Değerlerini Belirleme Metodları

Oksidatif stres değerinin belirlenmesinde, lipid peroksidasyon sonrası oluşan MDA, oksidatif DNA hasarının belirlenmesinde 8-hidroksi-2'-deoksiguanozin (8-OHdG) ile SOD, katalaz, GPx, GR, GST gibi antioksidan enzimler ve vitamin E, glutatyon, askorbik asit gibi antioksidanların değerlerinden yararlanılır (**Tablo 2.2.**) (Kasai ve ark., 1986; Xu ve ark., 2004).

2.5.1. Malondialdehit (MDA)

Lipid peroksidasyonun en önemli göstergelerinden biri üç karbonlu bir dialdehid olan MDA'nın; deformasyon, iyon transportu, enzim aktivitesi ve hücre yüzey bileşenlerinin agregasyonu gibi zar özelliklerinin değişmesine yol açtığı belirtilmiştir (Cighetti ve ark., 2002).

MDA, lipid peroksidasyon sonucu oluşan, serbest radikallere (oksijen ve hidrojen serbest radikalleri) göre daha sabit olup ve büyük oranda reaktif elektrofilik molekül olarak hareket etme yeteneğine sahiptirler. MDA, molekül değeri küçük bir aldehittir. MDA, vücuttaki oksidatif stresin değerinin belirlenmesinde, oldukça sık telafüz edilen değerlerden biridir. Seviyesini ölçmede en çok kullanılan metod tiyobarbitürik asit aracılığıyla değerlendirilen analizdir. MDA değerleri lipid peroksidasyonun şiddetiyle orantılı olarak artmaktadır (Grotto ve ark., 2009; Yadav ve Ramana, 2013).

2.5.2. Süperoksit Dismutaz (SOD)

Serbest radikallere karşı vücuttaki öncelikli bariyer sistemi SOD enzimiyle oluşmaktadır. SOD, endojen olarak üretilen ve organizmayı oluşturan her hücre için esansiyel bir enzimdir. SOD'un peroksinitrit oluşumunu önleyici ve hücrede hasara

sebebiyet veren süperoksit radikalini, daha az zararlı hidrojen peroksit'e dönüştürdüğü bilinmektedir. Buna bağlı olarak moleküler oksijene dönüştürücü fonksiyonu sebebiyle canlı dokusunu oksidanların olumsuz etkilerinden koruduğu bildirilmiştir (Halliwell ve Gutteridge, 2015).

Tablo 2.2. Oksidatif stresin değerlendirme metotları (Kasai ve ark., 1986; Xu ve ark., 2004).

Radikallerin değerlendirilmesi	Elektron paramagnetik rezonans spektrometresi (EPR)
Oksidatif hasar biyobelirteçlerinin ölçülmesi	Lipit peroksidasyon ürünlerinin değerlendirilmesi Protein hasarının değerlendirilmesi DNA hasarının değerlendirilmesi
Antioksidan savunma sistemi ölçülmesi	Antioksidan enzimlerin belirlenmesi: SOD, GPx, CAT, GST, GR Total antioksidan seviyenin (TAS) değerlendirilmesi Düşük molekül ağırlıklı antioksidanların değerlendirilmesi (LMWA); vit E, vit C, Glutasyon ve Melatonin
Enzim kofaktörlerinin değerlendirilmesi	Fe, Cu, Zn, Se, Mn elementleri

Süper oksit dismutazın birkaç değişik türü bulunmaktadır. Belirtilen türler açısından kofaktör, alt ünite sayısı, aminoasit yapısı ve aktif metal gibi durumlarda birçok farklılıklar içerirler. Canlılarda çeşitli doku dağılımı ve lokalize olduğu spesifik bölge açısından 3 çeşit SOD türü gözlemlenmiştir. Bunlar sitozolik bakır çinko SOD (Cu Zn-SOD), mitokondriyal mangan SOD (Mn-SOD) ve hücre dışı SOD (EC-SOD)'dur. Bu izoformlar arasında tüm hücrelerde mitokondri içinde lokalize olan Mn-SOD, antitümör fonksiyonu dışında önemli antioksidan enzimlerden biri olarak kabul edilir (Amir Aslani ve Ghobadi, 2016; Birben ve ark., 1997).

2.5.3. Total Antioksidan Seviyesi (TAS)

TAS, organizmanın toplam antioksidan değerini belirlemek amacıyla kullanılır. Total oksidan seviyesinin (TOS), TAS'a oranı olan oksidatif stres indeksi (OSI), TAS ve TOS'un kapsamlı bir ölçümü olduğu için vücuttaki oksidatif stresin daha kesin bir indeksi olabilir. TOS, TAS ve OSI gibi belirtilen parametrelerin, canlıdaki oksidatif stres değerini belirlemek amacıyla kullanılan veriler olduğu gözlemlenmiştir (Erel, 2005).

2.5.4. Nitrik Oksit (NO)

NO, bir adet eşlenmemiş elektronu olan küçük bir moleküldür. NO muskarinik veya histamin reseptörleri gibi çeşitli reseptörlerin aktivasyonu sonucu L-arjinin ve oksijenden, nitrik oksit sentaz enzimi etkisiyle sentezlenmektedir. NO nörotransmisyon, kan basıncı regülasyonu, savunma mekanizmaları, düz kas gevşemesi ve immun regülasyon gibi süreçlerde biyolojik sinyal molekülü olarak ifade edilen fizyolojik ve patofizyolojik süreçlerde aktif rol oynayan serbest radikaldir. NO, superoksit radikalının reaksiyonu sonucu, dokulara oldukça zararı bulunan peroksinitrit'e dönüşür (Tunçtan ve Abacıoğlu, 1998).

2.5.5. TNF- α (Tümör Nekroz Faktörü)

TNF- α glikoprotein yapıda geniş biyolojik spektrumlu bir sitokindir (Maury ve Teppo, 1989). Öncelikli olarak 1975'te, Carswell tarafından, farelerin serumlarına endotoksin verilmesi sonrası, tümör dokusunda nekroza yol açmasına bağlı olarak ilk olarak ifade edilmiştir (Aggarwal ve ark., 1985).

TNF- α doku yaralanması veya akut yangıda üretilen, önemli bir proenflamatuvar sitokindir (Dossus ve ark., 2011). TNF- α çeşitli hücre türlerindeki

proenflamatuvar aksiyonuna bağlı olarak bakteriyel, viral ve parazitik hastalıklara karşı bariyer görevi yapmaktadır (Waters ve ark., 2013).

TNF- α , bağışıklık metabolizmasında, hücre regölasyonu, profilerasyonu, programlı hücre ölümünde, immün fonksiyon düzenlenmesinde, yangı, viral replikasyon, allerji, artrit, septik şok, insülin direnci ve diğer birçok hastalıkta etkileri olan bir sitokindir. TNF- α 'nın otoimmün hastalıklarda etkili olduğu bilinmektedir. Romatoid artrit, ankilozan spondilit, psöryatik artrit, İBH gibi hastalıkların tedavisinde TNF- α antagonistlerinin yüksek oranda etkin olduğu klinik çalışmalarda gösterilmiştir. TNF- α , fazlaca geniş fonksiyona sahip olmasına bağlı olarak hücrelerin büyük çoğunluğu TNF- α 'ya duyarlıdır. Normal şartlarda TNF- α , immün yanıtın oluşmasında, hücresel homeostaziste, canlı yaşamı, proliferasyonu, migrasyonu ve diferensiyasyonunda görev almaktadır (Haider ve Knöfler, 2009). Makrofajlar tarafından salgılanan TNF- α 'nın da enflamatuvar, sitotoksik ve anjiyogenik özellikleri bulunmaktadır (Waters ve ark., 2013).

TNF- α , ÜK'de büyük derecede öneme sahip proinflamatuvar sitokinlerden biridir. ÜK hastalığına sahip bireylerin intestinal numunelerinde TNF- α immünoaktivitesinin yükseldiği gözlemlenmiştir. ÜK'ye sahip bireylerde serum seviyelerinin artışı ile seyreden TNF- α 'nın hastalık aktivitesi ile korelasyon gösterdiği gözlemlenmiştir (Olsen ve ark., 2007).

ÜK'de CD4 T hücreleri mukozada, bunların sekrete ettikleri sitokin değerlerinin kanda yükseldiği gözlemlenmiştir. T helper (TH) 1 hücreleri IFN- γ , TH2 hücreleri IL-4, IL-5, IL-13 ve TH17 hücreleri de IL-17 üretirler. TH2 hücreleri ve natürel killer (NK) T hücreleri IL-13 salınımına neden olmaktadır. Bunun sonucunda ÜK ile bağlantılı olarak süperfisiyal mukozal inflamasyonu uyarır. TH17 hücreleri de nötrofil toplanmaları ile bağlantılıdır. Mukozal inflamasyon IL-12 aracılığıyla başlar. IL-4 ve IL-23, IL-6 ve TGF- β ile birlikte sırasıyla TH2 ve TH17'yi indükler. Bunlara bağlı olarak makrofajlarda TNF- α salgırlar. TNF- α 'da ÜK'nin nedenleri arasında büyük öneme sahiptir (Nakamura ve ark., 2004).

2.5.6. İnterlökün 6 (IL-6)

Akut yangılarda hemen uyarılan proinflamatuvar sitokindir. Makrofajlar tarafından bağırsaklardan salgılanmaktadır. Çözünebilen reseptörlerine bağlanarak proinflamatuvar etkilerini gösterdikleri belirtilmiştir (Roda ve ark., 2011). Monosit ve makrofajlardan köken alarak yangıyı başlatma ve organize etmede tetikleyici rolü olan IL-1'in İBH'nın gelişmesinde önemli rolü olduğu düşünülmektedir. IL-1 ailesinin bir üyesi olan IL-6'nın, ÜK hastalarında seviyesinin arttığı ve hastalığın patogenezinde önemli rolü olduğu açıklanmıştır (Lee ve ark., 2018).

2.5.7. Seruloplazmin

Akut faz proteini olan seruloplazmin, hemen hemen tüm evcil hayvanlarda serum bakırının büyük bir kısmını yapısında bulunduran ve bakır vericisi olduğu sanılan karaciğer kökenli bir glikoprotein olmakla birlikte seruloplazmin; organizma içinde antioksidan görevi görmektedir. Seruloplazminin bakırı bağlayarak serbest bakır iyonlarının oksidatif hasarı katalize etmesini önlediği bilinmektedir. Seruloplazmin seviyelerinin enfeksiyon, travma veya yangıyla seyreden enfeksiyonlarda yükseldiği, antioksidan gibi davrandığında değerinin düştüğü belirtilmiştir (Ceron ve ark., 2005).

2.5.8. Sialik Asit

Sialik asit, nörominik asitin glikoproteinlerinin ve glikolipitlerinin indirgenmemiş karbonhidrat zincir bölgelerine bağlanan asetilenmiş türevidir. Hayvan dokularında ve bakterilerde yaygın olarak bulunduğu belirtilmiştir. Serum sialik asit seviyelerinin, fazla düzeyde sialize olan akut faz glikoproteinlerinin artmış konsantrasyonunun sonucunda enfeksiyöz, tümöral ve metabolik hastalıklarda ÜK gibi yangısal bağırsak hastalıklarda önemli ölçüde arttığı yapılan çalışmalarda gözlemlenmiştir (Aksit ve ark., 2016).

2.5.9. Apoptozis

Apoptozis; canlı vücudunda hücreler aralarında bağlantılara bağlı olarak fonksiyonlarını yapmakta rolü kalmayan hücrelerin, çevreye herhangi bir zararı olmadan programlı ölüm mekanizmasıdır. Yaşamın ilk aşamalarından başlayarak bütün canlılık süresi boyunca apoptotik aktivite ve programlı hücre ölümü sürmektedir. Bazı hücrelerin bir kısmı sadece birkaç saat yaşarken diğer hücreler uzunca yıllar yaşayabilmektedir. Deri, gastrointestinal sistem ve immün sistemlerdeki dokuların devamlılığının apoptozis ve hücre yenilenmesine bağlı olduğu belirtilmektedir (Margaret ve ark., 2001).

Apoptozis kısaca yaşamsal sürecin devamı yani bir homeostatik mekanizma olarak karşımıza çıkabilmektedir. Bunun dışında enfeksiyon veya zararlı ajanlardan dolayı hücreler hasar aldığına ya da immün reaksiyonlar gibi bir savunma bariyeri olarak da gelişebilmektedir (Norbury ve Hickson, 2001). Apoptozisin vücutta belirlenmesi antiapoptop ve pro-apoptop düzenleyici proteinler aracılığıyla olmaktadır (**Tablo 2.3.**) (Kaya ve ark., 2012).

Tablo 2.3. Apoptozisi düzenleyici proteinler (Kaya ve ark., 2012).

Anti-apoptozis düzenleyiciler	Bcl-2, BclxL, Bcl-w, CED-9, Mcl-1, c-Abl, Rb gibi..
Pro-apoptozis düzenleyiciler	Bax, Bad, Bak, Bcl-xS, p 53, c-Fos, c-Jun gibi

Apoptoz, normal hücre döngüsü, immün sisteminin devamlılığı ve kimyasal kaynaklı hücre ölümü dahil olmak üzere çeşitli süreçlerin devamı olarak

tanımlanabilir. Apoptoz, antioksidan savunmanın bozulmasıyla tetiklenir. Aynı zamanda bağışıklık reaksiyonlarında hücrelerin zararlı ajanlar veya hastalıklardan zarar görmesi gibi bir savunma mekanizması olarak da ortaya çıkar. Apoptoz, karmaşık organizmalarda hücreler arası ilişkilerin gereği olarak işlevlerini kaybetmiş hücrelerin çevreye zarar vermeden programlı olarak yok edilmesidir. Nükleer faktör eritroid 2 (Nrf2), apoptozun bir inhibitörü olarak tanımlanmıştır. HP, Nrf2 sinyal yolunun aktivasyonu yoluyla anti-apoptotiktir (Kari ve ark., 2022).

Apoptozisin düzenlenmesi belirli genler tarafından olmaktadır. Bunlardan Bcl-2 geni bir apoptozis inhibitördür. Bir diğer gen ise Bcl-2'nin endojen antagonisti Bax genidir. Bax'ın Bcl-2'ye oranı (Bax/Bcl-2) uyarıcı tarafından uyarıldıktan sonra ki süreçte hücrenin hayatta kalmasını belirleyen belirteç olarak tanımlanabilir (Oltval ve ark., 1993).

2.6. Asetik Asitle Oluşturulan Deneysel Kolit Modeli

İBH'nın patogenezini net olarak açıklayan ideal bir hayvan modeli olmamasına rağmen, hastalığın patogenezinin daha iyi anlaşılabilmesi için deneysel olarak akut ve kronik inflamasyon modelleri geliştirilmiştir (Eberhart ve ark., 1995).

Deneysel kolit modellerinin genellikle; kimyasal ajanlarla geliştirilmiş kolit modelleri, adoptif transfer yöntemiyle ve canlı hayvan modellerini içine aldığı ifade edilmiştir (Goyal ve ark., 2014). Bunlar arasında en sık kullanılanı asetik asit gibi kimyasallarla geliştirilen akut kolit modelidir (Yamada ve ark., 1992). Dinitroklorobenzen ise gecikmiş tip hipersensitivite reaksiyonlarına sebep olan akut yangı oluşturmaktadır. Sensitivite edici allerjen bir madde olan trinitrobenzen sülfonik asit (TNBS), hem akut hemde kronik yangıya neden olduğu belirtilmiştir (Morris ve ark., 1989). Bunlar haricinde genetik mühendisliğindeki teknolojik ilerlemelerle beraber, HLA-B27, insan β -2 mikroglobulin transgenik sıçanlar ve IL-2 “knock out” ratlar kullanılarak deneysel kolit modellerinin geliştirildiği son yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (Sadlack ve ark., 1993).

Deney hayvanlarında kolit meydana getirmek için seyreltilmiş asetik asitin (%3-10) rektal yoldan enjekte edilmesi ile gerçekleşen bir yöntemdir (Qin ve ark.,

2011). MacPhersan ve Pfeiffer, 1978 yılında belirtilen yöntem ile ilk araştırmayı yapmıştır. İçme suyuna serbest erişim ile kolit indüksiyonundan önce ratlar en az 24 saat aç bırakılmıştır. Deney günü, işlemiden iki saat önce ratların su içmeleri sağlanmıştır. Hafif eter anestezisi altında kolon iltihabı, dış çapı 2 mm olan elastik bir silikon kateterle intrarektal olarak % 0,9 NaCl içinde 2 ml % 3'lük asetik asit uygulanarak indüklenmiştir. Kateter kolona 8 cm'ye kadar rektal olarak yerleştirilmiş, daha sonra ratlar asetik asitin geri çıkışını önlemek için 2 dakika boyunca düz bir şekilde tutulmuştur. Kateter çıkarılmadan önce asetik asitin kolonda tamamen dağılması için 2 ml hava enjekte edilmiştir. Kontrol hayvanları, asetik asit çözeltisi yerine aynı hacimde % 0.9 NaCl kullanılarak aynı işleme tabi tutulmuştur (Fatima ve ark., 2016). Asetik asit ile geliştirilen yöntemdeki gelişen hasarın, epitel dokudaki nekroz ve ödem şeklinde olduğu ifade edilmiştir. Epitel dokuda gelişen yangının, araziidonik asit yolaklarını etkilediği belirtilmiştir (Satoh ve ark., 1997).

Asetik asitle oluşturulan kolit uygulamasının en büyük avantajları ekonomik olması yanında uygulanabilirliğinin kolay olmasıdır. Belirtilen yöntemdeki gelişen hasarın asetik asit enjeksiyonundan sonraki 24 saatlik süreçte görüldüğü gözlemlenmiştir (Goyal ve ark., 2014).

2.7. *Harpagophytum Procumbens* Bitkisi Hakkında Bilgi

HP, Güney Afrika'da yetişen, yaygın tıbbi kullanımı olan çok yıllık otsu bir bitkidir (Lim, 2014). Bitkiye bilimsel isimlerini veren düzleştirilmiş odunsu kapsüller, kavisli dikenlerle süslenmiş iki sıra kavisli kol taşır (*Harpagophytum*, kelimenin tam anlamıyla kısıkaçlı kanca bitkisi anlamına gelmektedir) (Ernst ve ark., 1988). HP, *Harpagophyti radix* farmasötik adı altında ticari formu bilinmektedir. 1960'larda, kök ekstraktlarının farmakolojik olarak aktif bulunmasıyla birlikte birçok rahatsızlık için kullanıldığı belirtilmiştir (Chantre ve ark., 2000; Soulıman ve Younos, 1993).

Meyvesinin dış görüntüsü nedeniyle şeytan pençesi olarak adlandırılan HP yumrulu köklerinin, hazımsızlık tedavisi, kan hastalıkları ayrıca yaral, ülser, çıban ve hatta harici kanserli büyümeler dahil diğer cilt lezyonlarının tedavisi için yaygın olarak

kullanıldığı yapılan araştırmalarda gösterilmiştir. HP, infüzyon, kaynatma, tentür, toz ve öz şeklinde çok çeşitli sağlık koşulları için kullanılır. Bunların dışında özellikle geleneksel tıpta, artrit ve romatizmal bozukluklarda antienflamatuvar etkinliklerine bağlı olarak kullanıldığı belirtilmiştir (Serrano ve ark., 2018).

HP, 1820 yılında Avrupalı bilim adamları tarafından ilk defa bulunmuştur. Fakat G.H. Mehnert isimli bir bilim adamı tıbbi özelliklerini Namibya'daki San ve Nama halkından öğrenmiş ve kullanımının 1900' lü yılların başından itibaren bilinir hale geldiği açıklanmıştır (Stewart ve Cole, 2005). Şeytan pençesi yumrularının incelenmesi ilk olarak Almanya'daki araştırmacılar Watt ve Breyer-Brandwijk (1962) yapmış ve Van den Eynden ve ark. (1992) şeytan pençesi yumrularının Afrikadaki karışık kökenli kabileler ve bazı Avrupa ülkelerinde uzun zamandan beri ilaç olarak kullandıklarını belirtmişlerdir.

HP'in, genellikle Fransa ve Almanya'da bitkisel ilaç olarak; Birleşik Krallık, Hollanda, Amerika Birleşik Devletleri ve Uzak Doğuda da gıda takviyesi olarak tescil edilmiştir. Bunların dışında şeytan pençesinin, ilaç üretiminde kullanılan maddelerin kalitelerini garanti altına almak amacıyla bileşimi ve hazırlanması için ortak standartları tanımlayan Avrupa Farmakopesinde listelendiği ifade edilmiştir. HP, romatizma ve artrit tedavisi için bir süredir Avrupa Farmakopesi'nde listelenirken, Harpagophytum zeyheri, tüm şeytan pençesi ürünlerini kapsayacak şekilde Ocak 2003 tarihinde belirtilen farmakopelere eklenmiştir. HP'in Avrupa Fitoterapi Bilimsel Kooperatifi monograflarında da yer aldığı bildirilmiştir (Bradley, 2004).

2.7.1. *Harpagophytum Procumbens* Bitkisinin Genel Özellikleri

HP bitkisi ülkemizde bulunmamaktadır. Yüksek oranda yetiştirildiği bölge Güney Afrika olarak bilinmektedir. Özellikle bitkinin Botsvana ve Namibya bölgeleri arasında kalan yağış seviyelerinin az olduğu Kalahari Çölü'nde yetiştigi bildirilmiştir. Uzun şiddetli kurak dönemlerde hayatta kalabilmek için bitki, birincil yumrulardan yatay olarak ayrılan su depolayan ikincil yumrular oluşturur. Bitkinin hem bolluğu hem de görünurlüğü büyük ölçüde yağışa bağlıdır. Otlarla iyi rekabet etmediği ve

kümelenmiş bir dağılıma sahip olduğu için açık, aşırı otlatılan alanlarda çok miktarda bulunmaktadır (Stewart ve Cole, 2005).

HP, çok yıllık yetiştirme özelliği olan çalı görünümündedir. Genellikle boş dallara sahiptir. Bitkinin, yapışkan bir özsu yayıp salgı tüyleriyle çevrili olduğu gözlemlenmiştir. Bitkiye ait gövde sürünen yapı gösterir; kök yapısının çevresi dolgun bir yapıya sahiptir. 2 m uzunluğa kadar sürünen gövdeler, 2 m derinliğe kadar uzayabilen kalıcı birincil yumrulardan yıllık olarak filizlenir. Saplar, 6 cm çapında 25 cm'ye kadar olabilen birkaç ikincil depolama yumrularına yol açar. Tıbbi özellikleri için bu ikincil yumrular hasat edilir. Yapraklar büyük ve kalp şeklindedir. Çiçekler tübüler, derin leylak-pembe renkli, sarı ve beyaz boğazlıdır. Yapraklar ise mavi-yeşil ve genellikle düzensiz olarak birkaç loba bölünmüştür. Çiçekler ve yapraklar, aktif büyüme mevsimi boyunca ilk yağmurlardan sonra yerden çıkar, ancak kış aylarında veya kuraklık dönemlerinde ölür. Meyvesini yapısı itibarıyla çevresi dolgun olup dış yapısı sert bir kıvama sahiptir. Meyvelerin fiziki görünümü uzun (7-20 cm), üst yüzeyde iki düz dikenli olan, çıkıntılı ve kancalara sahip bir bitkidir. Bitki hemen hemen 50 adete yakın tohum bulundurmaktadır (Mncwangi ve ark., 2012).

HP en sık olarak çim örtüsünün % 25' in altında ve bitki örtüsünün % 20' nin altında olduğu bölgelerde bulunur; en çok açık, çiğnenmiş ve aşırı otlanmış alanlarda bol miktarda bulunur (Hachfeld ve Schippmann, 2002). Şeytan pençesi bitkisiyle ilgili görseller **Şekil 2.5.**'de gösterilmiştir (Stewart ve Cole, 2005).



Şekil 2.5. Şeytan pençesi bitkisi (Stewart ve Cole, 2005).

Günlük olarak alındığında HP'nin hafif bir müshil etkisi olmakla birlikte bitki özünün küçük dozları adet kramplarını hafifletmek için kullanıldığı ifade edilirken, daha yüksek dozlarının plasentanın atılmasına yardımcı olabileceği belirtilmiştir (Van Wyk ve Van Staden, 2002).

2.7.2. Farmakolojik Yapısı

HP'nin köklerinde temel kimyasal içerikler; iridoid glikozitleri, şekerler, triterpenoitler (oleanolik ve ursolik asit), fitosteroller, aromatik asitler ve flavonoidlerdir (luteolin ve kemferol). Bitkinin ana kimyasal içeriği iridoit glikozitleridir. Belirtilenler dışında kalanlar, harpagozit ve sayıca daha düşük seviyede harpagit ve prokumbittir. HP, yapısında %0,5-3,3 total iridoit glikoziti bulundurur. Bitkinin uluslararası standartlara göre en az % 1,2 harpagozit içermesi gerektiği belirtilmiştir (Anauate ve ark., 2010).

İridoidlerden seneler boyunca insektisit ve hipotansif özellikleri sebebiyle yararlanılmıştır. Bunun dışında iridoidlerin, sakinleştirici, antipiretik, mukolitik ve yara iyileştirici özellikleri de bulunmaktadır. İridoidal yapının, hem alkaloit hem de monoterpen molekülünde içerdiği belirtilmiştir. Bu yapıdaki bileşikler, hem alkaloitlerin fizyolojik özelliklerini, hem de monoterpenlerin fizyolojik özelliklerini içerirler. Bundan dolayı iridoid bileşiklerin öksürük kesici ve yara iyileştirici gibi çok çeşitli etkileri olduğu belirtilmiştir (Sticher, 1977).

Bitkinin ana kimyasal bileşenlerinin ikincil yumrulara bulunduğu açıklanmıştır. Çiçeklerin, sapların ve olgun meyvelerin harpagoside içermediği belirtilmiştir. Yapraklarda, tanımlanamayan bazı iridoid bileşiklerle birlikte harpagosid izleri bulunur. İkincil yumruların, birincil yumrulara göre yaklaşık olarak iki kat daha fazla harpagosit içerdiği belirtilmiştir (Czygan ve Krüger, 1977). İkincil yumrulardaki harpagosid yüzdesinin, mevsimsel olarak, bitki yaşına, belirli bir bölgedeki bitkiler arasında ve hatta aynı bitki üzerindeki yumrular arasında değiştiği belirtilmiştir. Yumruların ayrıca daha az miktarda procumbit, kumaroil-procumbide feniletil glikozitler içerdiği ifade edilmiştir. Yumruların ayrıca bir dizi küçük bileşik içerdiği de ifade edilmiştir. Avrupa Farmakopesi'ne göre, ilaç en az %1.2 harpagosid ve harpagosid olarak ifade edilen harpagit içermelidir. Harpagosidin, çeşitli in vitro ve in vivo modellerde antiinflamatuvar ve analjezik etkileri için kapsamlı bir şekilde araştırıldığı belirtilmiştir (Heinrich ve ark., 2004).

Çeşitli bileşenlerin kapsamlı izolasyonuna rağmen, kesin etki mekanizmaları belirsizliğini korumaktadır. Hali hazırda aktif bileşenlerin, özellikle de harpagosidin seviyesi, tedarik edilen kurutulmuş yumruların kalitesini belirlemek için kullanılmaktadır. Avrupa standardize edilmiş ürünlerde harpagosid içeriğinin en az % 1.2 olması gerekmektedir. İkincil yumrulardaki harpagoside yüzdesinin, belirli bir bölgedeki bitkiler arasında ve hatta aynı bitkinin yumruları arasında bitki yaşına göre mevsimsel olarak değiştiği belirtilmiştir (Kemper, 1999).

Yapılan çalışmalarda şeytan pençesi ekstraktlarının toksisitesinin çok düşük olduğu bulunmuş, ancak düşük toksisite insidansının küçük dozajlardan ve kısa çalışma süresinden kaynaklanabileceği ortaya konulmuştur. Sıçanlara uygulanan yüksek harpagosid dozlarının hiçbir klinik veya patolojik reaksiyon göstermediği

belirtilmiştir. Bununla birlikte, karaciğerde safra üretimini artırma eğilimi nedeniyle, safra taşı olan hastalarda mide asidi salgısını uyarabildiği mide veya duodenum ülseri durumlarında; kan sulandırıcı ilaç varfarinin etkilerini artırabileceği belirtilmiştir. Ayrıca ciltte morarmalara neden olabileceği kullanan hastalarda aşırı dozun kan basıncını ve kalp tedavisini engelleyebileceği belirtilmiştir (Whitehouse ve ark., 1983).

2.7.3. Biyolojik Etkileri

2.7.3.1. Antianflematuar Etki

HP'nin romatoid artrit, osteoartrit ile ilişkili ağrı ve inflamasyonu azaltmadaki etkinliğinin, PGE₂ gibi inflamatuvar mediatörlerin üretimini bloke etme yeteneği ile açıklanabileceği belirtilmiştir (Aberham ve ark., 2007).

Ahmed ve ark. (2005); HP sulu ekstraktının sıçanlarda hem akut hem de kronik inflamatuvar süreçler üzerindeki etkisini araştırmışlardır. 10 mg/kg dozunda referans ilaç olarak steroidal olmayan bir antienflematuar ilaç olan indometasin kullanılmış ve tek doz olarak intraperitoneal olarak HP sulu bir ekstresi (800 mg/kg) uygulanmıştır. Sıçanlarda Freund adjuvanının arka ayakta neden olduğu artrit (kronik model) kaynaklı ödem miktarında önemli bir artışa, serum kortizolünde ve serum albüminde oldukça önemli bir düşüşe; C-reaktif proteinde önemli bir artışa neden olduğunu belirtmişlerdir. Araştırmacılar HP ve indometasin uygulamasının ödem miktarında önemli derecede azalma meydana getirdiğini ifade etmişlerdir.

2.7.3.2. Antioksidan Etki

Doğal kaynaklardan elde edilen antioksidanlar, artrit ve kanser gibi oksidasyona bağlı hastalıkların yüksek insidansı nedeniyle son yıllarda popülerlik kazanmıştır (Betancor-Fernandez ve ark., 2010). İn vivo çalışmalar sırasında Bhattacharya ve Bhattacharya (1998); sıçan beyni frontal korteksi ve striatumunu kullanarak sıçanlarda HP ekstraktının önemli antioksidan etkisini göstermiştir. HP özütü (100 ve

200 mg/kg) 14 gün süreyle intraperitoneal olarak uygulanmış, her iki beyin bölgesinde doza bağlı olarak SOD, CAT ve GPx aktivitelerinde artış görülmüştür. Buna bağlı olarak lipid peroksidasyon aktivitesinde azalma görüldüğü belirtilmiştir.

HP ekstraktlarındaki antioksidan aktiviteden sorumlu bileşenlerin, serbest radikal olarak bilinen flavonoidler, hidrojen donörleri ve oksijen radikal nötürleştiricileri olarak işlev gören bitki fenollerinin olabileceği ifade edilmiştir (Sawa ve ark., 1999).

2.7.4. Biyofarmasötik Özellikleri

Son yıllarda araştırmacılar, HP'in biyofarmasötik yönlerini araştırmak için çalışmalar yapmıştır. Abdelouahab ve Heard (2008); HP yumru ekstresinin ana glikozitlerinin bir dizi farklı araçtan domuz kulak derisine dermal ve transkutanöz dağıtımını araştırmıştır. Çalışma sonucunda iridoid glikozitlerin hidrolize ürünleri, harpagit ve harpagosidin hidrolize edilmemiş bileşiklerle karşılaştırıldığında önemli anti-inflamatuar aktiviteye sahip olduğunu ifade etmişlerdir. Yine yakın tarihli bir çalışmada, hidrolize harpagit ve harpagosidin ürünlerinin önemli bir COX-2 inhibitör aktivitesine (2.5-100 mM) sahip olduğu, buna karşın hidrolize edilmemiş harpagit ve harpagosidin sahip olmadığı gösterilmiştir (Zhang ve ark., 2011) .

Yapılan literatür taraması sonucunda, HP ekstraktının deneysel olarak rat kolit modelinde antienflamatuar, antioksidan, apoptoz değerleri üzerine olan etkisine dair herhangi bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Bu çalışmada ratlarda deneysel olarak oluşturulan kolit modelinde HP ekstraktının oksidatif stres, proenflamatuar sitokinler, apoptozis, antioksidanlar ve histopatolojik parametreler üzerine etkileri araştırılmıştır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereç

3.1.1. Deney Hayvanı Materyali

Araştırmamızda 8-16 haftalık, 210-380 gram, 40 tane Wistar Albino erkek ratlardan yararlanıldı. Balıkesir Üniversitesi Deney Hayvanları Üretim, Bakım, Uygulama ve Araştırma Merkezinde (BAUN DEHAM) standart ışık ve ısıdaki (12 saat aydınlık/12 saat karanlık, 22°C) kafeslerde adlibitum beslenmeyle ratlar deney koşullarına hazırlandı. Araştırma, Balıkesir Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu (HADYEK)’ndan 02.01.2020 tarih ve 2020/1-4 sayılı karar ile alınan etik kurul iznindeki kurallara uyularak yapıldı.

3.1.2. Kullanılan Cihazlar

Araştırmada Balıkesir Üniversitesi Veteriner Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı laboratuvarında bulunan; spektrofotometre (Shimadzu UV-1800, Japan), ELISA okuyucusu (Thermo Multiskan FC, USA), santrifüj (Hettich Universal 320 R), pH metre (Hanna pH 211, USA), hassas terazi (Denver Instrument Germany SI-234), vortex (Stuard SA-7), otomatik pipetler (Brand 2-20µl, 20-200 µl, 5-50 µl, 100-1000 µl), manyetik karıştırıcı (IKA-CMAC HS7), -20°C’lik derin dondurucu (Ariston CF1A 300H), -80°C’lik derin dondurucu (Glacier Nuaire NU-99486E), benmari (Memmert Wnb14), etüv (Memmert UNB400), immunohistokimya seti, Balıkesir Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı laboratuvarında bulunan vakumlu mikrotom (Leica 2245, Nussloch, Germany) ve mikroskop (Nikon, Eclipse Ci, Tokyo, Japan) kullanılmıştır.

3.1.3. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Deneyde kullanılan çözeltiler NaCl (Sodyum klorür) (Merck, 6400), Asetik asit, Sülfasalazin, HP Ekstraktı (Şeytan Pençesi Ekstraktı, Dr. Ümit Aktaş), Formol (Merck, UN2209), İzofluran (Primal Critical Care, Lot. NDC 667994-017-25), Etil alkol (Smyras, 2050500), TAS kiti (Total Antioxidant Status Assay kit, Rel Assay Diagnostics, Turkey), Bcl-2 (Santa Cruz, E1904), Bax (Santa Cruz, G0104), N-butanol (Merck, 0988), Ksantin oksidaz (Sigma, X-1875), Ksantin (Sigma, X- 0626), Potasyum klorür (Merck, 4935), Tiyobarbutirik asit (Sigma, T-5500), Triklorasetik asit (Merck, 0810), Metanol (%96) (Merck, 106009), Ksilol (Carlo Erba, 492306), H₂O₂ (Merck, UN2014), Sekonder antikor (Dako Cytomation, E0431), Hemalum boyası (Hematoxylin) (Merck, 1043020025), p. dimetilaminobenzaldehit (Sigma Cas: 100-10-7), Faramount (Dako, 2972), Sodyum tartarat (Sigma Cas:6106-24-7), Etilendiamintetraasetik asit (EDTA) (Sigma, E-5513), Nitroblue tetrazolium (Serva, 30550), Bakır sülfat (Sigma Cas: 7758-98-7), Na₂HPO₄ (Disodyum hidrojen fosfat) (Merck, 159323), Bakır klorür (Merck, 2733), Folin-Fenol reaktifi (Sigma Mdl: MFCD00132625), KH₂PO₄ (Merck, 4871), Sodyum Azid (Sigma Cas: 26628-22-8), p. fenilendiamin (Sigma Cas:108-45-2), Sodyum hidroksit (Merck, 6462), Sodyum Asetat (Sigma Cas: 126-96-5), Perklorik Asit (Sigma Cas:19029-50-6), Hidroklorik Asit (Sigma Cas: 7647-01-0) kullanılmıştır.

3.2. Metot

3.2.1. Araştırmada Kullanılan Gruplar ve Analiz Prosedürleri

Deney koşullarına adaptasyonu için 14 gün önceden kafeslerine alınmış olan ratlara bu süreçte sınırsız yem ve su verildi. Araştırmada 5'li eşit gruplara 8'er tane rat dağıtıldı. Çalışmada asetik asit ve sülfasalazin, Soliman ve ark. (2019)'ın yaptığı çalışmadaki dozu referans alınarak kullanılmıştır. HP uygulamasında ise Lim ve ark. (2014)'ın uyguladığı metot dikkate alınmıştır.

Deney gruplarına yapılan işlemler aşağıdadır.

1. Kontrol grubu; 2 ml FTS 14 gün boyunca oral yolla uygulandı.
2. HP grubu; 14 gün süreyle HP 300 mg/kg dozda 2 ml FTS içinde oral yolla uygulandı.
3. Kolit grubu; 2 ml FTS 14 gün boyunca oral yolla uygulandı. 14. günün sonunda %3'lük asetik asitten 2 ml rektum içi yolla tatbik edildi.
4. Kolit + HP grubu; 14 gün süreyle HP 300 mg/kg dozda 2 ml FTS içinde oral yolla uygulandı. 14. günün sonunda %3'lük asetik asitten 2 ml rektum içi yolla tatbik edildi.
5. Kolit + SS grubu; 14 gün boyunca sülfasalazin 100 mg/kg dozda FTS içinde oral yolla uygulandı. 14. günün sonunda %3'lük asetik asitten 2 ml rektum içi yolla tatbik edildi.

3.2.2. Serum ve Doku Örneklerinin Hazırlanması ve Analizleri

Deney hayvanlarına yapılan son uygulamadan 24 saat sonra inhalasyon yoluyla izofluran anestezisi (anestezi bir haznede 3-5 dakika süreyle %3'lük izoflurandan, taşıyıcı olarak 0,8 L/dk hava ile %1-1,5 izofluranda sürdürüldü) altındaki ratlardan, kan numuneleri kalpten 4-5 ml alındı. Numuneler 2500×g'de 15 dk. santrifüj edildikten sonra serumu ayrılıp MDA, SOD, TAS, NO, TNF- α , IL-6, seruloplazmin ve sialik asit analizlerini yapmak için -80 °C'de yedi gün bekletildi. Servikal dislokasyondan sonra kolon doku örnekleri %10'luk formolde bekletildi. Bu işlem sonrası doku örneklerinden immunohistokimyasal olarak apoptozis ve histopatolojik inceleme için parafin bloklar hazırlandı.

3.2.3. Biyokimyasal Analizler

3.2.3.1. MDA Analizi

Lipid peroksidasyon sonrası gelişen MDA'nın, TBA (tiyobarbütirik asit) reaksiyonu sonrası sıcak ve alkali ortamda, 535 nm dalga boyunda maksimum absorban

veren kırmızı-pembe renkteki oluşumun spektrofometrede (Shimadzu UV-1800, Japonya) incelenmesi prensibine dayanır. Meydana gelen rengin okunan absorbansından faydalanılarak MDA seviyeleri belirlenmektedir.

Serum MDA değerlerinin tespiti Yoshioika ve ark. (1979) belirttiği prosedüre göre yapıldı.

Analiz prosedürü

1. Deney tüpüne önce 0.5 ml serum, sonra 2.5 ml trikloroasetik asit (TCAA) (%20) ve 1 ml tiyobarbitürik asit (TBA) (%0,67) çözeltisi eklenildi. Kör tüpe ise sadece 2.5 ml TCAA ve 1 ml TBA eklenip vorteksle karıştırıldı.
2. Su banyosuna alınan tüpler 95°C’de 30 dakika tutuldu.
3. Daha sonra soğuk sudan geçirilen tüpler, kör tüp ve test tüplerine 4 ml n-bütanol eklenildikten sonra 3000 rpm’ de 10 dakika süreyle santrifüj edildi.
4. Santrifüjün tamamlanmasıyla beraber en üstte kalan kısımlar ayrılarak absorbansları spektrofotometrede 535 nm’de belirlendi.
5. En son aşamada, MDA konsantrasyonu MDA-TBA kompleksinin absorbans katsayısı (absorbans katsayısı $\epsilon=1.56 \times 10^5/\text{M}/\text{cm}$) ile belirlendi.

3.2.3.2. SOD Analizi

Örnekler -80 °C’de bir hafta bekletildikten sonra deney günü çözündürüldü. SOD analizi Sun ve ark. (1988)’nın belirlediği yöntemle göre yapıldı. Yöntem; ksantin/ksantin oksidaz enzim sistemiyle gelişen süperoksitin nitroblue tetrazoliumu (NBT) indirgenmesinin örneklerdeki SOD aracılığıyla engellenmesi esasına dayanır. Süperoksit radikalleri NBT’yi indirgeyerek maksimum absorbansı 560 nm’de formazon oluşur. Enzim içermeyen ortamda indirgenme oluştuğundan sonra mavi-mor renk gelişmektedir. Ortamdaki radikallerde SOD ilavesi sonrası, dismutasyon meydana gelmektedir. Bunlara ilaveten NBT indirgenmesi olmayıp mavi-mor renk oluşmamakta, enzim aktivitesiyle birlikte açık renk meydana gelmekte ve spektrofotometredeki gösterge seviyesi azalmaktadır. Sonuçta; formazon gelişmesiyle inhibisyonunun belirlenmesiyle SOD değeri ortaya çıkmaktadır.

Analiz prosedürü

1. Her bir tüpe 2.45 ml reaktif çözeltisi, kör tüpe 0.5 ml distile su, test tüplerine ise 0.5 ml örnek (1 ml numune alındıktan sonra 0.3 ml kloroform, 0.5 ml etanol eklenilip 3000 rpm de 10 dakika santrifüjlendi ve üstteki kısımdan 0.5 ml ayrıldı) ilave edildi.
2. Üzerine 50 µl ksantin oksidaz solüsyonu ilave edilip vortexde karıştırıldı.
3. Benmari cihazında tüpler 25°C sıcaklıkta 20 dakika süreyle tutuldu.
4. Daha sonra 1 ml bakır klorür (CuCl_2) eklenip reaksiyon tamamlandı.
5. Oluşan renk 560 nm'de spektrofotometrede okundu. SOD değeri bu tepkimenin inhibisyon seviyesiyle belirlendi.

3.2.3.3. TAS Analizi

TAS 2,2'-azino-bis (3-etilbenzthiazoline- 6-sulfonik asid) (ABTS) çözeltisinin oluşturduğu spesifik rengin ortama ilave edilen örnekteki antioksidanlar ile açılması esasına dayanan otomatik ölçüm yöntemiyle belirlendi. Örnekteki antioksidanlar, ABTS radikalinin koyu mavi-yeşil rengini azaltması/indirgemesi esasına dayanır.

Serum TAS, Rel Assay (Total Antioxidant Status Assay Kit, rel Assay Diagnostics, Turkey) kitinden yararlanılarak Erel, (2005)'in belirlediği metoda göre uygulandı.

ABTS solüsyonu spesifik mavi-yeşil renkte bir çözeltidir. 600 nm'de spektrofotometrede absorbans değişimi, örneğin toplam antioksidan değeriyle ilişkilidir. TAS değerinin belirlenmesinde E vitamini analogu olan Trolox Eşdeğeri olarak ifade edilen spesifik bir antioksidan standart olarak değerlendirildi. Değerler serumda mmol trolox equiv./L olarak hesaplandı.

3.2.3.4. Nitrik oksit Analizi

NO analizi hazır ticari kit (Bioassay Technology Laboratory, BT Lab, E0703Ra, China) kullanılarak prosedürde belirtildiği şekilde ELISA (Multiskan FC Microplate Photometer, Thermo, Waltham, MA, ABD) cihazı kullanılarak yapılmıştır.

Analiz prosedürü

1. Analizde kullanılacak solüsyonlar oda sıcaklığı ısına getirildi.
2. Standart olarak belirlenen kuyucuklara 50 µl standart çözeltisi ilave edildi.
3. Örnek olarak belirlenen kuyucuklara ise 40 µl örnek eklendikten sonra, 10 µl anti-NO antikoruna ilave edilip sonra örnek ve standart kuyucuklarına 50 µl streptavidin-HRP eklenildi (Kör hariç). Karıştırıldıktan sonra 37°C' de 60 dakika inkübe edildi.
4. Daha sonra mikrolaka, yıkama tamponu ile 5 kez yıkandıktan sonra kağıt havlu ile kurulandı.
5. Tüm kuyucuklara 50 µl çözelti A'dan ilave edildikten sonra her kuyucuğa 50 µl substrat çözelti B ilave edildi. Daha sonra mikrolaka 37°C'de 10 dakika süreyle inkübe edildi.
6. 50 µl reaksiyonu durdurma solüsyonu eklendi, mavi rengin hemen sarıya döndüğü görüldü.
7. 10 dakika içinde 450 nm'ye getirilmiş bir mikrolaka okuyucu ile bütün kuyucukların optik yoğunluğu tespit edildi.

3.2.3.5. TNF-α Analizi

TNF-α analizi hazır ticari kit (Bioassay Technology Laboratory, BT Lab, E0764Ra, China) kullanılarak prosedürde belirtildiği şekilde ELISA cihazında yapılmıştır. Analizde kullanılan hazır ticari kitin pleyti, rat TNF-α antikoruyla önceden kaplanmıştır. Örnekte bulunan TNF-α ilavesinden sonra kuyucuklar üzerine kaplanmış

antikorlara bağlanır. Sonrasında Streptavidin-HRP ilave edilir. TNF- α antikoruna yapışır. İnkübasyon sonrası bağlanmamış Streptavidin-HRP yıkanarak atılır. Substrat çözeltisi ilavesi sonrası örnekteki TNF- α değeriyle orantılı olarak renk değişikliği meydana gelir. Tepkime, asidik durdurma çözeltisinin ilavesiyle bitirilir ve 450 nm'de absorbans değeri belirlenir.

Standart Prosedür

1. Bütün reaktifler, standart çözeltiler ve numuneler prosedür gereği hazır hale getirildi. Bütün solüsyonlar kullanılmadan oda ısısına ayarlandı.
2. Analiz oda ısısında yapıldı.
3. Standart kuyucuklarına 50 μ l standart çözeltisi eklendi.
4. Örnek kuyucuklarına 40 μ l örnek eklendikten sonra, 10 μ l TNF- α antikoruna ilave edildi. Sonrasında örnek kuyucuklarına ve standart kuyucuklara 50 μ l streptavidin-HRP eklenip iyice karıştırıldı. Plakanın üzeri kapatıldıktan sonra 37°C'de 60 dakika beklenildi.
5. Plaka 5 defa yıkandı. Plaka, kuru kağıt havluyla kurulandı.
6. Her kuyucuğa 50 μ l A ve B substrat solüsyonu eklendi. 37°C'de 10 dakika bekletildi.
7. Bütün kuyucuklara 50 μ l durdurma çözeltisi ilavesiyle, mavi renk sarı renge dönüştü.
8. 10 dakika içinde 450 nm mikropilaka okuyucu ile analiz sonuçları değerlendirildi.

3.2.3.6. IL-6 Analizi

Serum IL-6 seviyesi hazır ticari kit (Bioassay Technology Laboratory, BT Lab, E0135Ra, China) kullanılarak prosedürde belirtildiği şekilde ELISA cihazında okunmuştur.

Analiz Prosedürü

1. Bütün reaktifler, standart çözeltileri ve örnekler prosedüre uygun hazır hale getirildi. Test oda sıcaklığında gerçekleştirileceği için kullanmadan önce bütün reaktifler oda ısısına göre ayarlandı.
2. Analizde standart kuyucuklarına 50 µl standart çözeltisi ilave edildi.
3. Örnek kuyucuklarına 40 µl örnek ilavesiyle beraber 10 µl Rat IL6 antikor eklenildikten sonra örnek ve standart kuyucuklarına 50µl streptavidin-HRP eklenildi. Sonrasında mikrolaka iyice karıştırıldı.
4. Plaka 37°C'de 60 dakika süreyle bekletildi. Sonrasında plaka yıkama solüsyonuyla 5 defa yıkandı.
5. Pleytler havlularla kurulandıktan sonra her bir kuyucuğa 50 µl substrat A çözeltisi eklendi. Bütün kuyucuklara 50 µl substrat B çözeltisi eklendi.
6. Üzeri kapatılmış olan plaka karanlık bir ortamda 37°C'de 10 dakika bekletildi.
7. Bütün kuyucuklara 50 µl indikatör çözeltisi ilave edildi. Mavi rengin sarıya döndüğü görüldü.
8. Durdurma solüsyonunu ilavesiyle beraber 10 dakika içinde 450 nm'ye ayarlanmış bir mikrolaka okuyucu sayesinde her bir kuyucuğun optik yoğunluğu değerlendirildi.

3.2.3.7. Seruloplazmin Analizi

Çalışmamızda seruloplazmin analizinde Sunderman ve Nomoto, (1970) tarafından geliştirilen yöntem kullanıldı. Seruloplazmin analizinin prensibi, p-fenilendiaminin oksidasyonunu katalize ederek maviviyole renkli bir oksidasyon ürünü oluşturmaktır. Renkli ürünün meydana gelme oranı serum seruloplazmin konsantrasyonu ile doğru orantılıdır.

Standart Prosedür

1. N (numune) ve K (kör) işaretli test tüplerine substrattan 5'er ml eklendi.
2. K tüpüne 1 ml sodyum azid eklendi.

3. Daha sonra her bir tüpe 0.1 ml serum eklendi.
4. N ve K tüpleri 37°C'deki bir su banyosunda 15 dk inkübe edildi.
5. İnkubasyon sonrası N tüplerine 1 ml sodyum azid eklendi.
6. N ve K numuneleri spektrofotometre küvetlerine (ışık yolu, 1 cm) aktarılıp, spektrofotometre ile 546 nm'de distile suya karşı okundu.

3.2.3.8. Sialik Asit Analizi

Sialik asitlerin nöraminik asit omurgasının periyodat oksidasyonu, 1 ila 4 karbon atomlarından fl-formil piruvik asit oluşumu ile sonuçlanır. Sialik asit daha sonra 2-tiobarbitürik asit ile birleşerek 549 nm'de maksimum absorpsiyonlu kırmızı bir kromofor oluşturur. Analizde sadece serbest sialik asitler reaktif olduğundan, toplam sialik asitlerin ölçümü için sialik asit içeren materyalin hidrolizi gerçekleştirilmelidir. Analiz, sialidaz (nöraminidaz) tarafından bağlı sialik asit salınımını ölçmek için uygundur.

Sialik asit analizinde Warren, (1959) tarafından geliştirilen yöntem kullanıldı.

Standart Prosedür

1. 0,4 ml serum numunesi alınıp üzerine % 5'lik perklorik asitten 3 ml ilave edilir ve 100 °C 'de 5 dakika tutulur.
2. Sonra 2500 rpm'de 4 dakika santrifüj edildi.
3. 2 ml süpernatant alınır üzerine 0,4 ml erlich ayracı konuldu.
4. 100 °C'da 15 dakika ısıtılır ve sonra soğutuldu.
5. Soğuyan tüplere 2 ml distile su ilave edildi.
6. 525 nm' de okundu (Distile ile sıfırlanıp distiliye karşı okunur).

Not: Erlich Ayracı: 5 gr 4-dimetilaminobenzaldehit, 50 ml konsantre HCl, 50 ml distile su ile hazırlandı.

3.2.4. Histopatolojik Analizler

Kolon numuneleri %10'luk formaldehit çözeltisinde bekletilerek tespit işlemi yapıldı. Doku örnekleri alkol ve ksilen çözeltileriyle tespit ve takip aşamalarından sonra parafin bloklara yatırıldı. Hazır hale getirilen dokulardan mikrotom (Leica 2245, Nussloch, Almanya) aracılığıyla 5µm ölçüsünde kesitler alındı. Alınan kesitlerde histopatolojik olarak Hematoksilen ve Eozin (H&E) boyama işlemi yapıldı. Hazır hale getirilen preparatların incelenmesi ışık mikroskopunda yapıldı. İnceleme işleminden sonra kesitlerin fotoğrafları çekildi. Appleyard ve Wallace, (1995) tarafından bildirilen yöntemle göre kolon hasarının mikroskopik derecelendirilmesi yapılarak istatistiksel olarak değerlendirildi. Bu derecelendirme yönteminde kriter puanları; mukozal yapının kaybı (0-3), enflamatuar hücre infiltrasyonu (0-3), kript apse oluşumu (0-1), goblet hücre depleksyonu (0-1) olarak belirlendi.

3.2.5. İmmunohistokimyasal Analizler (Bcl-2 ve Bax)

Araştırmamızda apoptotik hücre ölümünün düzeyinin belirlenmesi amacıyla immunohistokimyasal olarak Bcl-2 ve Bax protein ekspresyonları değerlendirilmiştir. Bax geni, Bcl-2 gen ailesinin bir üyesi olup, Bax proteini yerleştiği hücrenin apoptoz sürecini artırır. Bcl-2 ise antiapoptotiktir.

Doku örnekleri formalin solüsyonunda 72 saat süreyle fikse edilmiştir. Doku kesitleri alkol ve ksilolden geçirilerek bloke edildikten sonra parafin bloklarla kaplandı. Takip ve bloklama işlemlerinin ardından polilizin kaplı lamlara 5 µm'lik kesitler alındı. Kolon örneklerinde Bcl-2 ve Bax ekspresyonları Avidin-Biotin peroksidaz metoduyla immunohistokimyasal olarak apoptoz değerleri incelendi.

İmmunohistokimyasal değerlendirme amacıyla alınan kesit örnekleri Bcl-2 ve Bax ile boyandı. İmmunohistokimyasal analizde bütün kesitlerin phosphate-buffered solution (PBS) ile yıkanmasıyla beraber hidrojen peroksit reseptör blokajı yapıldı. Örnekler sonrasında primer antikör (Bcl-2 veya Bax) (dilüsyon 1:200, Santa Cruz) ve

sekonder antikör (dilüsyon 1:200; Santa Cruz) ile inkübe edildi. Preparatların kahverengi kromojen (diaminobenzidin) ile boyanmasıyla beraber hematoxilenle karşı boyanma yapıldı. Bütün işlemlerden sonra ışık mikroskopunda (Nikon, Eclipse Ci, Tokyo, Japonya) incelenerek fotoğraf alındı.

3.2.6. İstatistiksel Değerlendirme

Tüm veriler her grupta ortalama ve standart hata (ortalama $\pm$ SE olarak) olarak ifade edildi. Gruplar arasındaki farklılıkların istatistiksel analizi ANOVA kullanılarak yapıldı. Post hoc çoklu karşılaştırmalar Duncan'ın testi kullanılarak yapıldı. Elde edilen veriler normal dağılmıyorsa (Histopatolojik inceleme), karşılaştırmalı test için parametrik olmayan Kruskal Wallis veri analizi uygulandı. Tüm çalışmalar SPSS (Versiyon 17.0, Chicago, IL, ABD) yazılımıyla yapıldı. İncelenen parametreler açısından gruplar arasındaki fark $p < 0.05$ düzeyinde önemli kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. Biyokimyasal Bulgular ve Oksidan/Antioksidan Parametreler

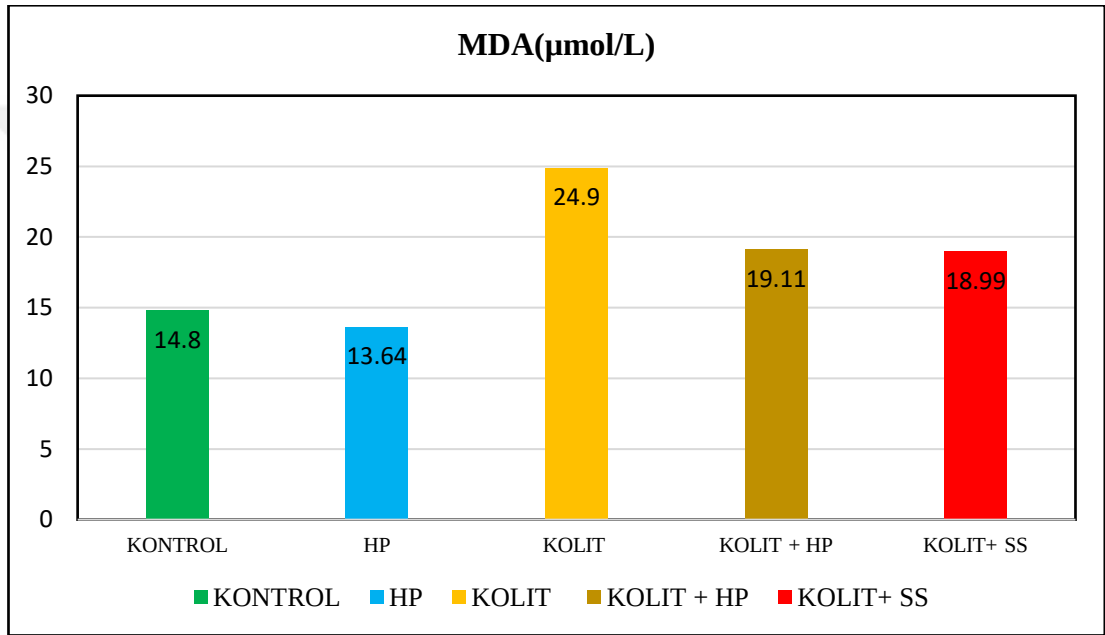
Araştırmamızda tüm gruplardaki ratlara ait serum numunelerindeki MDA, SOD, TAS, NO, TNF- α , IL-6, Seruplazmin ve Sialik asit değerleri aşağıdaki tablolar ve şekillerde değerlendirilmiştir.



Tablo 4.1. Serum MDA değerleri (Ortalama±SE)

Parametre	Kontrol n=8	HP n=8	Kolit n=8	Kolit+HP n=8	Kolit+SS n=8
Serum					
MDA (µmol/L)	14.80±0.96 ^c	13.64±0.75 ^c	24.90±1.19 ^a	19.11±0.47 ^b	18.99±0.49 ^b

a ,b, c: Aynı satırda farklı harf taşıyan gruplar arası istatistiki açıdan farklar anlamlıdır (p<0.05).



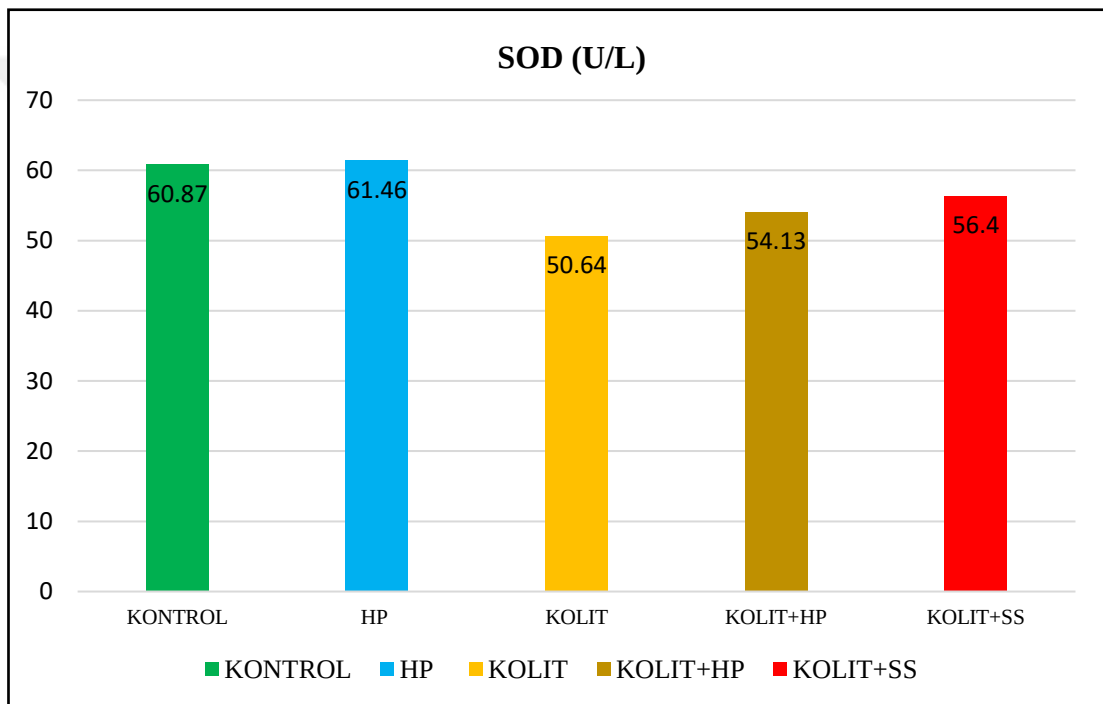
Şekil 4.1. MDA sonuçları grafiği

Tablo 4.1 ve **Şekil 4.1**'deki grafik değerlerine göre; Kontrol grubu ile HP grubu karşılaştırdığında istatistiki olarak bir fark olmayıp, Kolit grubu Kontrol ve HP grubu ile karşılaştırdığında ise artan MDA değerinin istatistiki olarak önemli olduğu g r lm şt r. Kolit+HP grubu ile Kolit+SS grubu karşılaştırdığında ise aralarında istatistiki olarak bir fark g r lmemişt r. Kolit+HP grubu, Kolit grubuyla karşılaştırdığında istatistiksel olarak önemli azalma g r lm şt r (p<0.05).

Tablo 4.2. Serum SOD değerleri (Ortalama±SE)

Parametre	Kontrol n=8	HP n=8	Kolit n=8	Kolit+HP n=8	Kolit+SS n=8
SOD (U/L)	60.87±1.14	61.46±0.93	50.64±0.50	54.13±0.56	56.40±0.74

a ,b, c: Aynı satırda farklı harf taşıyan gruplar arası istatistiki açıdan farklar anlamlıdır (p<0.05).



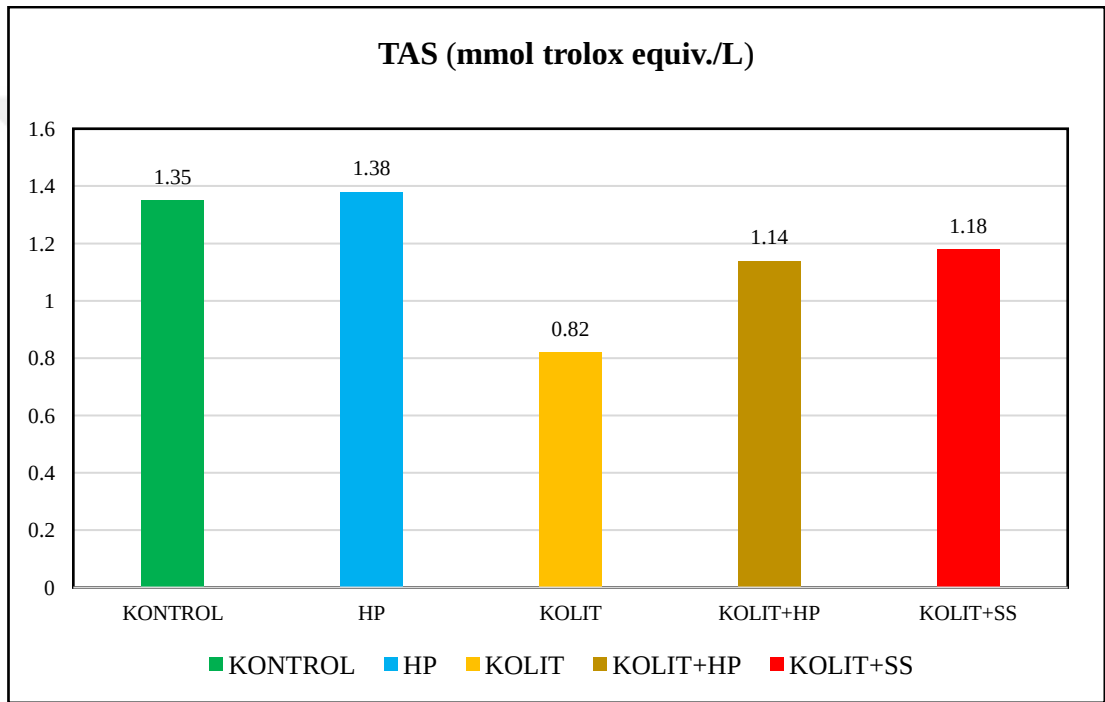
Şekil 4.2. SOD sonuçları grafiği

Tablo 4.2 ve **Şekil 4.2**'deki değerler incelendiğinde; Kontrol grubu ile HP grubu karşılaştırıldığında istatistiki olarak bir fark olmayıp; Kolit grubu, Kontrol ve HP grubu ile karşılaştırıldığında SOD değerinde istatistiki açıdan önemli azalış gözlenmiştir (p<0.05). Kolit+HP grubuyla Kolit+SS grubu karşılaştırıldığında ise aralarında istatistiki olarak bir fark görülmemiştir. Kolit+HP grubu Kolit grubuyla karşılaştırıldığında istatistiki açıdan önemli artış görölmüştür.

Tablo 4.3. Serum TAS değerleri (Ortalama±SE)

Parametre	Kontrol n=8	HP n=8	Kolit n=8	Kolit+HP n=8	Kolit+SS n=8
TAS (mmol trolox equiv./L)	1.35±0.02 ^a	1.38±0.02 ^a	0.82±0.04 ^c	1.14±0.03 ^b	1.18±0.03 ^b

a ,b, c: Aynı satırda farklı harf taşıyan gruplar arası istatistiki açıdan farklar anlamlıdır (p<0.05).



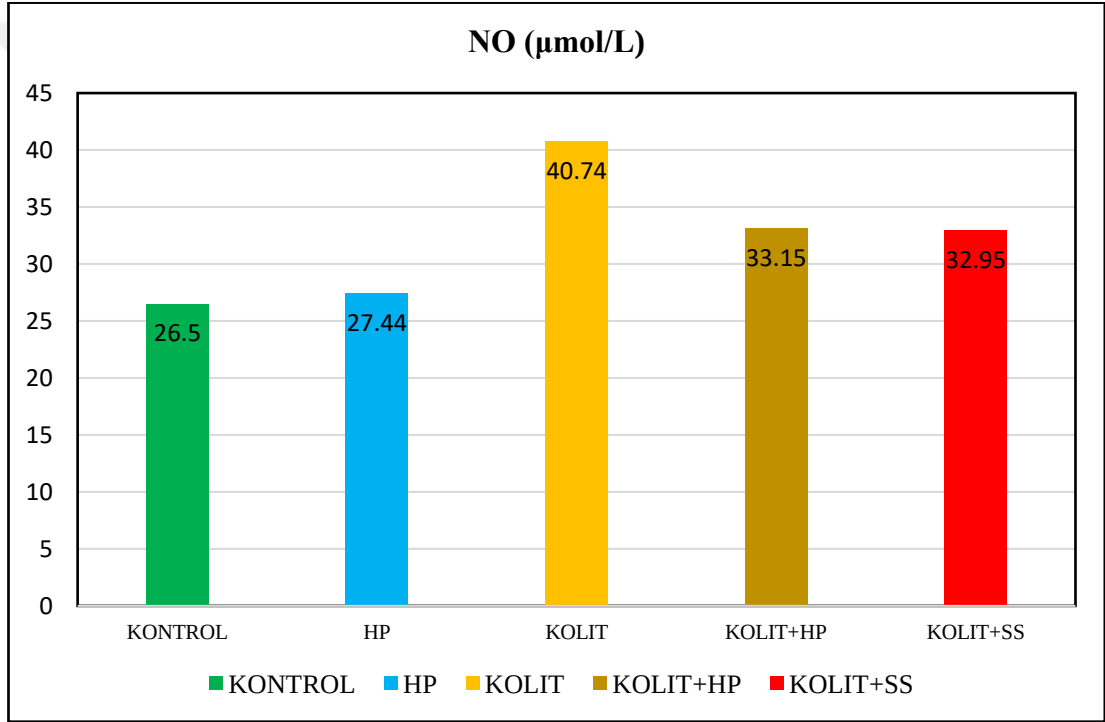
Şekil 4.3. TAS sonuçları grafiği

Tablo 4.3 ve **Şekil 4.3**'deki değerler incelendiğinde; Kontrol grubu ile HP grubu değerlendirildiğinde istatistiki olarak bir fark olmayıp; Kolit grubu Kontrol ve HP grubu ile karşılaştırıldığında TAS değerinde istatistiksel olarak anlamlı bir azalma gözlenmiştir. Kolit+HP grubu ile Kolit+SS grubu karşılaştırıldığında ise aralarında istatistiki olarak bir fark görülmemiştir. Kolit+HP grubu, Kolit grubuyla değerlendirildiğinde istatistiki açıdan önemli artış görülmüştür.

Tablo 4.4. Serum NO değerleri (Ortalama $\pm$ SE)

Parametre	Kontrol n=8	HP n=8	Kolit n=8	Kolit+HP n=8	Kolit+SS n=8
NO (μ mol/L)	26.50 $\pm$ 1.16 ^c	27.44 $\pm$ 1.11 ^c	40.74 $\pm$ 1.31 ^a	33.15 $\pm$ 0.67 ^b	32.95 $\pm$ 0.68 ^b

a ,b, c: Aynı satırda farklı harf taşıyan gruplar arası istatistiki açıdan farklar anlamlıdır (p<0.05).



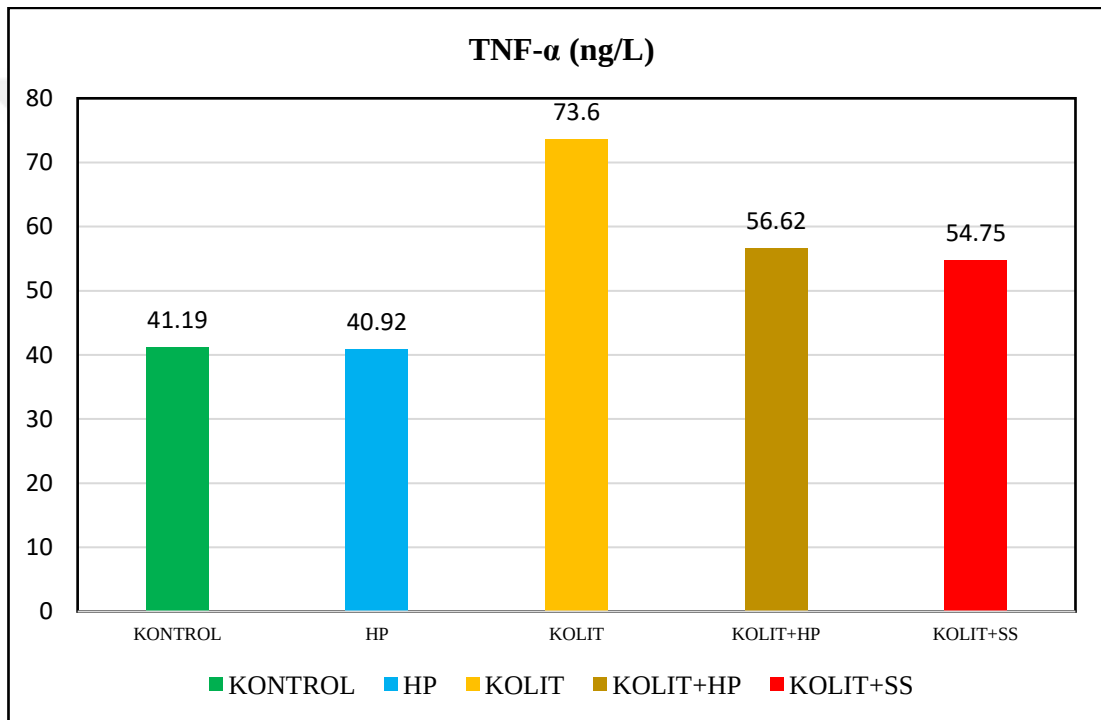
Sekil 4.4. NO sonuçları grafiği

Tablo 4.4 ve **Şekil 4.4**'deki değerler incelendiğinde; Kontrol grubu ile HP grubu değerlendirildiğinde istatistiki olarak bir fark olmayıp, Kolit grubu Kontrol ve HP grubu ile karşılaştırıldığında ise artan NO değerinin istatistiki olarak önemli olduğu görölmüşür. Kolit+HP grubu ile Kolit+SS grubu karşılaştırıldığında ise aralarında istatistiki olarak bir fark görölmemiştir. Kolit+HP grubu, Kolit grubuyla değerlendirildiğinde istatistiki açıdan önemli azalış görölmüşür.

Tablo 4.5. Serum TNF- α değerleri (Ortalama $\pm$ SE)

Parametre	Kontrol n=8	HP n=8	Kolit n=8	Kolit+HP n=8	Kolit+SS n=8
TNF- α (ng/L)	41.19 $\pm$ 0.56 ^c	40.92 $\pm$ 1.31 ^c	73.60 $\pm$ 1.29 ^a	56.62 $\pm$ 1.60 ^b	54.75 $\pm$ 1.74 ^b

a ,b, c: Aynı satırda farklı harf taşıyan gruplar arası istatistiki açıdan farklar anlamlıdır (p<0.05).



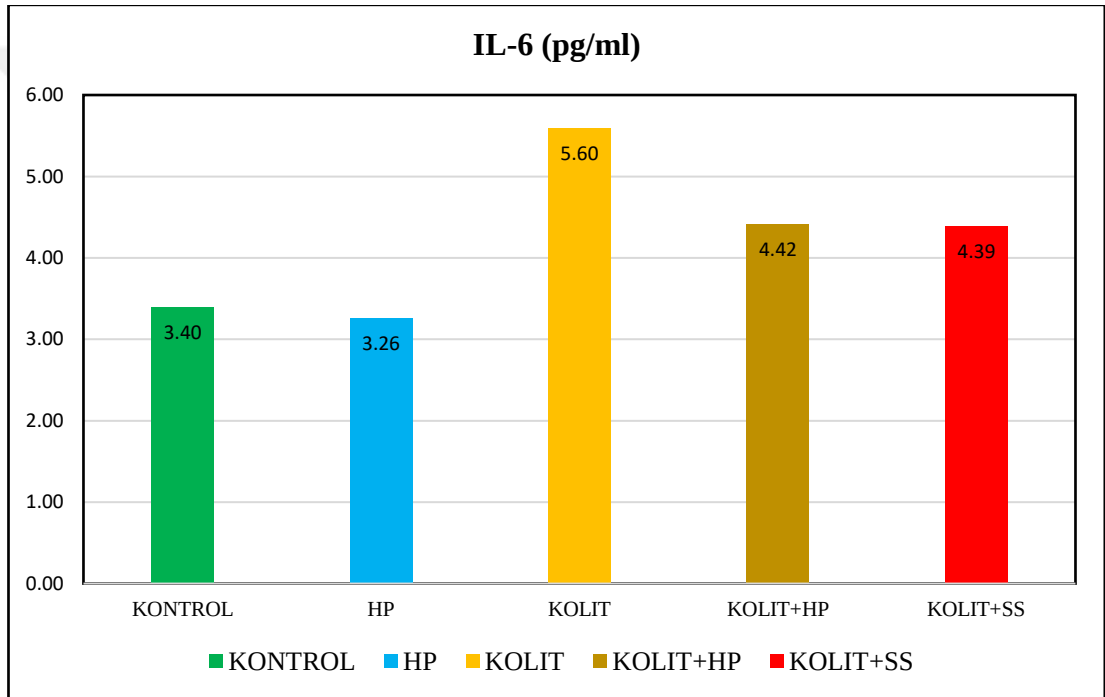
Şekil 4.5. TNF- α sonuçları grafiği

Tablo 4.5 ve **Şekil 4.5**'deki değerler incelendiğinde; Kontrol grubu ile HP grubu değerlendirildiğinde istatistiki olarak bir fark olmayıp, Kolit grubu Kontrol ve HP grubu ile karşılaştırıldığında ise artan TNF- α değerinin istatistiki olarak önemli olduğu görölmüşür. Kolit+HP grubu ile Kolit+SS grubu karşılaştırıldığında ise aralarında istatistiki olarak bir fark görölmemiştir. Kolit+HP grubu, Kolit grubuyla değerlendirildiğinde istatistiki açıdan önemli azalış görölmüşür.

Tablo 4.6. Serum IL- 6 değerleri (Ortalama $\pm$ SE)

Parametre	Kontrol n=8	HP n=8	Kolit n=8	Kolit+HP n=8	Kolit+SS n=8
IL-6 (pg/ml)	3.40 $\pm$ 0.14 ^c	3.26 $\pm$ 0.09 ^c	5.60 $\pm$ 0.10 ^a	4.42 $\pm$ 0.10 ^b	4.39 $\pm$ 0.08 ^b

a ,b, c: Aynı satırda farklı harf taşıyan gruplar arası istatistiki açıdan farklar anlamlıdır (p<0.05).



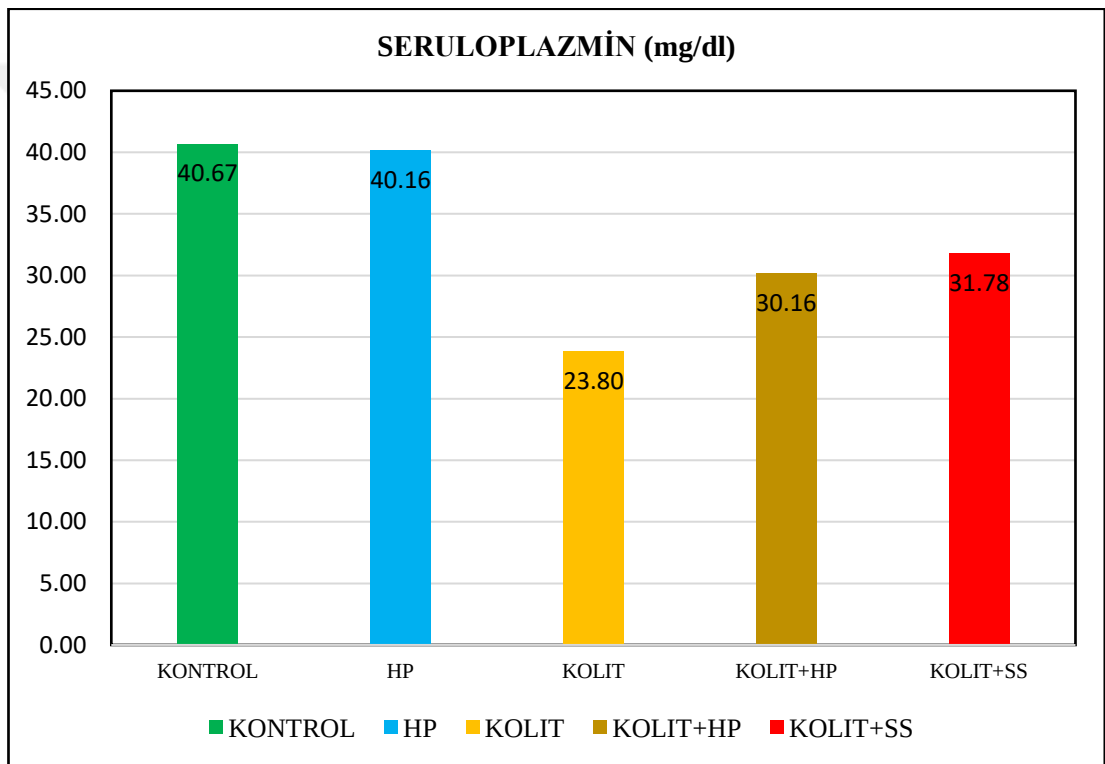
Sekil 4.6. IL-6 sonuçları grafiği

Tablo 4.6 ve **Şekil 4.6**'deki değerler incelendiğinde; Kontrol grubu, HP grubuyla değerlendirildiğinde istatistiki olarak bir fark olmayıp, Kolit grubu Kontrol ve HP grubu ile karşılaştırıldığında ise artan IL-6 değerinin istatistiki olarak önemli olduğu görölmüştür. Kolit+HP grubu ile Kolit+SS grubu karşılaştırıldığında ise aralarında istatistiki olarak bir fark görölmemiştir. Kolit+HP grubu, Kolit grubuyla değerlendirildiğinde istatistiki açıdan önemli azalış görölmüştür.

Tablo 4.7. Serum Seruloplazmin değerleri (Ortalama $\pm$ SE)

Parametre	Kontrol n=8	HP n=8	Kolit n=8	Kolit+HP n=8	Kolit+SS n=8
Seruloplazmin (mg/dl)	40.67 $\pm$ 1.16 ^a	40.16 $\pm$ 0.47 ^a	23.80 $\pm$ 0.95 ^c	30.16 $\pm$ 0.94 ^b	31.78 $\pm$ 0.93 ^b

a ,b, c: Aynı satırda farklı harf taşıyan gruplar arası istatistiki açıdan farklar anlamlıdır (p<0.05).



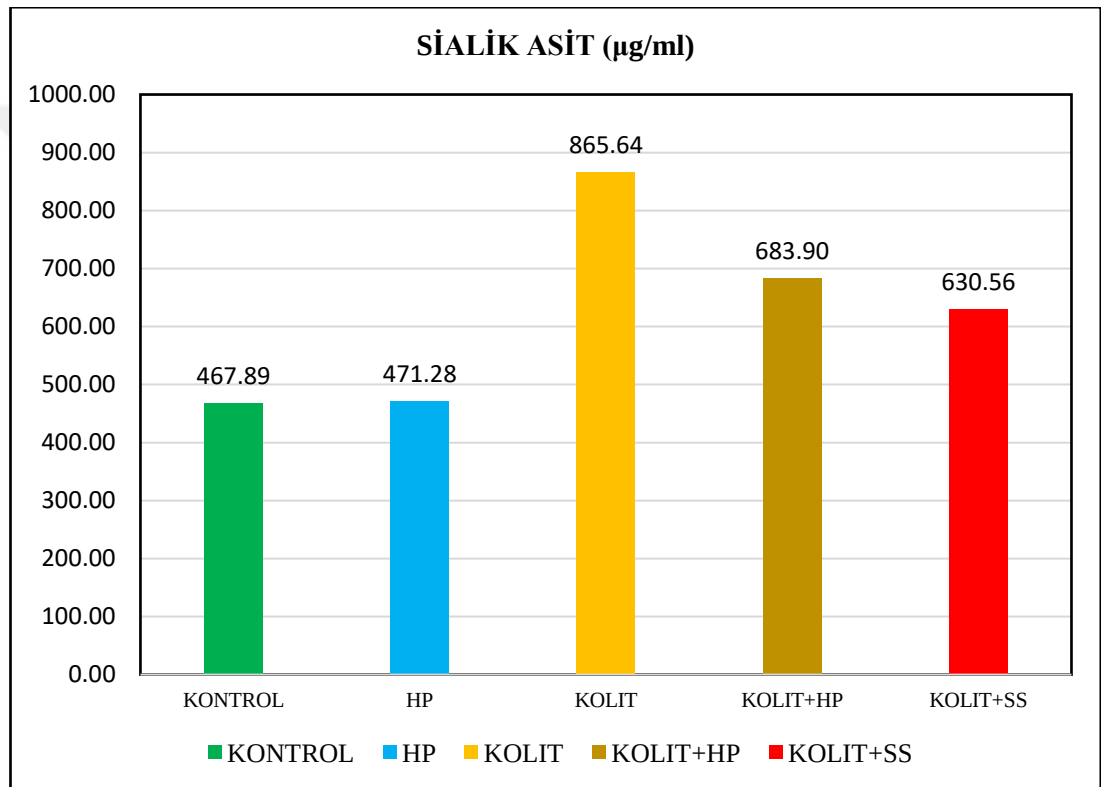
Sekil 4.7. Seruloplazmin sonuçları grafiği

Tablo 4.7 ve **Şekil 4.7**'deki değerler incelendiğinde; Kontrol grubu, HP grubuyla değerlendirildiğinde istatistiki olarak bir fark olmayıp, Kolit grubu Kontrol ve HP grubu ile karşılaştırıldığında Seruloplazmin değerinde istatistiki açıdan önemli azalış görölmüştür (P<0.05). Kolit+HP grubu, Kolit+SS grubuyla karşılaştırıldığında ise aralarında istatistiki olarak bir fark görölmemiştir. Kolit+HP grubu, Kolit grubuyla değerlendirildiğinde istatistiki açıdan önemli azalış görölmüştür.

Tablo 4.8. Serum Sialik asit değerleri (Ortalama±SE)

Parametre	Kontrol n=8	HP n=8	Kolit n=8	Kolit+HP n=8	Kolit+SS n=8
Sialik Asit (µg/ml)	467.89±15.79 ^d	471.28±14.98 ^d	865.64±19.80 ^a	683.90±14.90 ^b	630.56±10.68 ^c

a ,b, c: Aynı satırda farklı harf taşıyan gruplar arası istatistiki açıdan farklar anlamlıdır (p<0.05).



Şekil 4.8. Sialik asit sonuçları grafiği

Tablo 4.8. ve **Şekil 4.8.**'deki değerler incelendiğinde; Kontrol grubu, HP grubuyla değerlendirildiğinde istatistiki olarak bir fark olmayıp, Kolit grubu, Kontrol ve HP grubu ile karşılaştırıldığında ise artan Sialik asit değerinin istatistiki olarak önemli olduğu görölmüşür. Kolit+HP grubu ile Kolit+SS grubu karşılaştırıldığında ise aralarında istatistiki olarak bir fark görölmemiştir. Kolit+HP grubu, Kolit grubuyla değerlendirildiğinde istatistiki açıdan önemli azalış görölmüşür.

4.2. Histopatolojik Bulgular

Araştırmadaki ratlara ait kolon doku örneklerinin histopatolojik değerleri

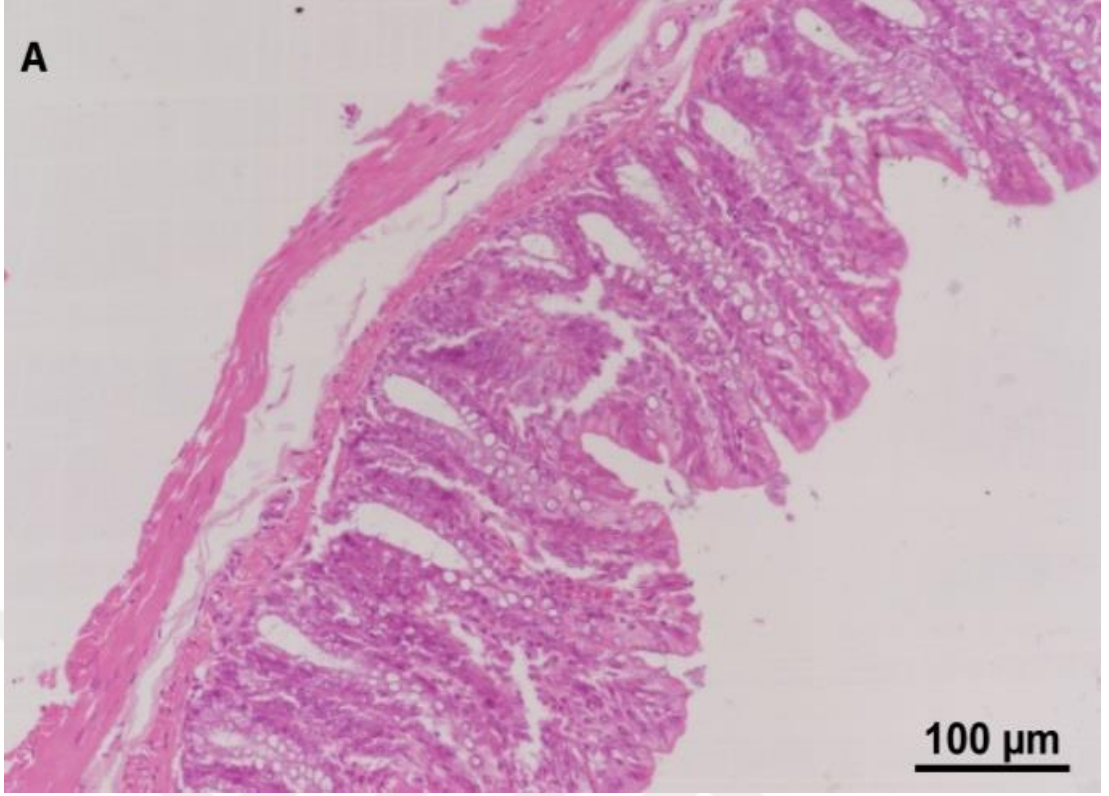
Tablo 4.9. ve **Şekil 4.9.-13'**de verilmiştir.

Tablo 4.9. Kolon dokusuna ait histopatolojik parametreler (Ortalama $\pm$ SE) (H&E)

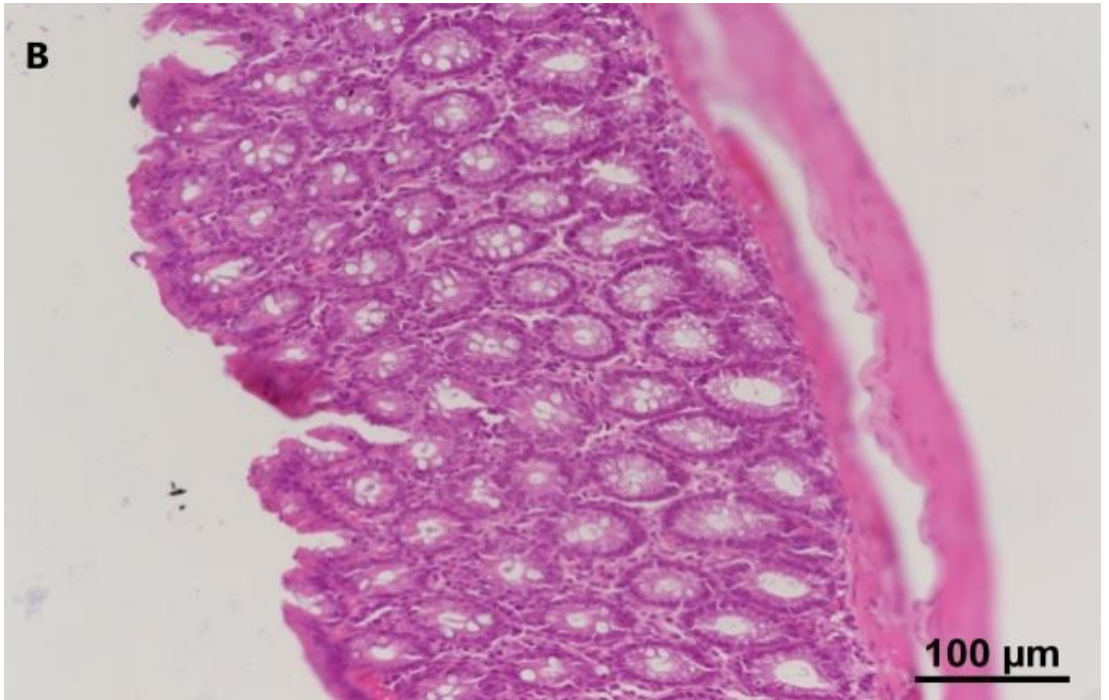
Parametreler	Kontrol (n=8)	HP (n=8)	Kolit (n=8)	Kolit+HP (n=8)	Kolit+SS (n=8)	Asimp. Sig. Kruskal -Wallis testi (P Değeri)
Mukozal yapının kaybı	0.12 $\pm$ 0.12 ^c	0.25 $\pm$ 0.16 ^c	2.62 $\pm$ 0.18 ^a	2.37 $\pm$ 0.18 ^a	1.75 $\pm$ 0.31 ^b	0.000
Enflamatuar hücre infiltrasyonu	0.50 $\pm$ 0.27 ^c	1.00 $\pm$ 0.38 ^{b,c}	2.37 $\pm$ 0.18 ^a	2.00 $\pm$ 0.33 ^a	1.50 $\pm$ 0.27 ^{a,b}	0.002
Kript apse oluşumu, ödem, konjesyon	0.00 $\pm$ 0.00 ^b	0.12 $\pm$ 0.12 ^b	0.87 $\pm$ 0.12 ^a	0.75 $\pm$ 0.16 ^a	0.62 $\pm$ 0.18 ^a	0.001
Goblet hücre deplesyonu	0.00 $\pm$ 0.00 ^b	0.00 $\pm$ 0.00 ^b	0.87 $\pm$ 0.12 ^a	0.75 $\pm$ 0.16 ^a	0.62 $\pm$ 0.18 ^a	0.000

a ,b, c: Aynı satırda farklı harf taşıyan gruplar arası istatistiki açıdan farklar anlamlıdır (p<0.05).

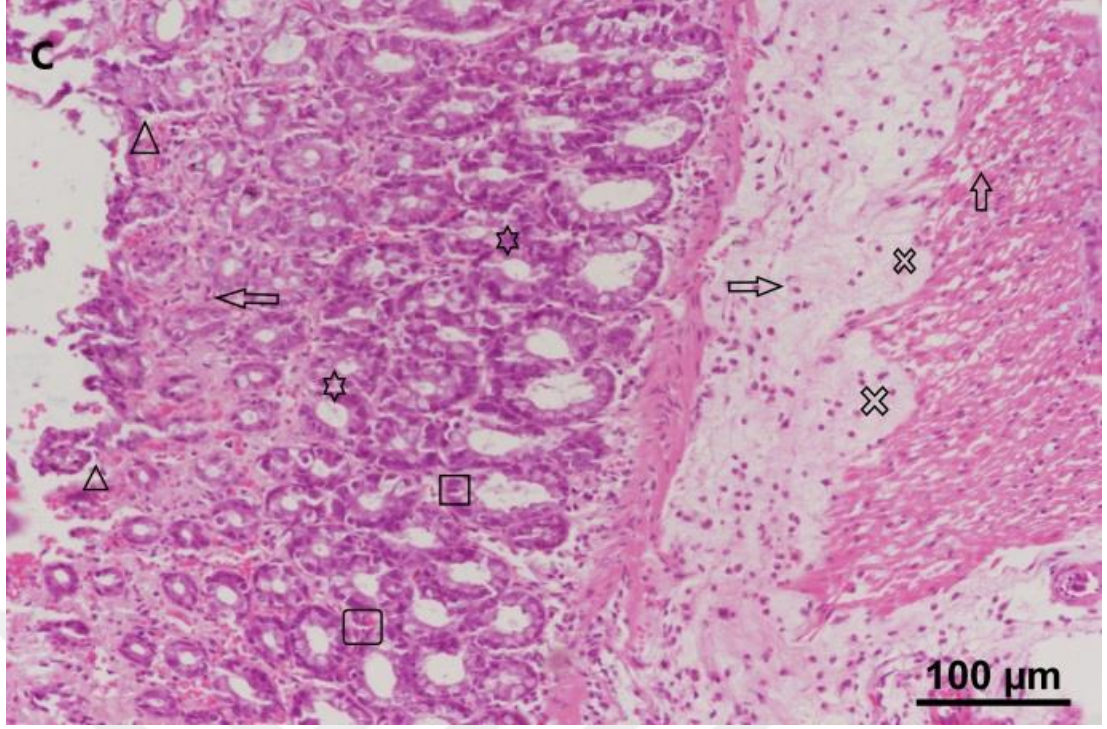
Kolon dokusunun histopatolojik incelemesinde; Kolit grubu, Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında; mukozal yapının kaybı, enflamatuar hücre infiltrasyonu, kript apse oluşumu, ödem, konjesyon ve goblet hücre deplesyonunda artış, Kolit+HP grubunda ise Kolit grubuna göre ılımlı bir düzelme tespit edildi. Kontrol ve HP gruplarının kolon dokusunda normal mukozal epitel, mukoza ve submukozada sağlıklı kolon morfolojisi gözlemlendi (**Tablo 4.9.** ve **Şekil 4.9-13**).



Şekil 4.9. Kontrol grubu kolon dokusu (X20).
Normal mukozal epitelyuma sahip sıçanın kolon görüntüsü.

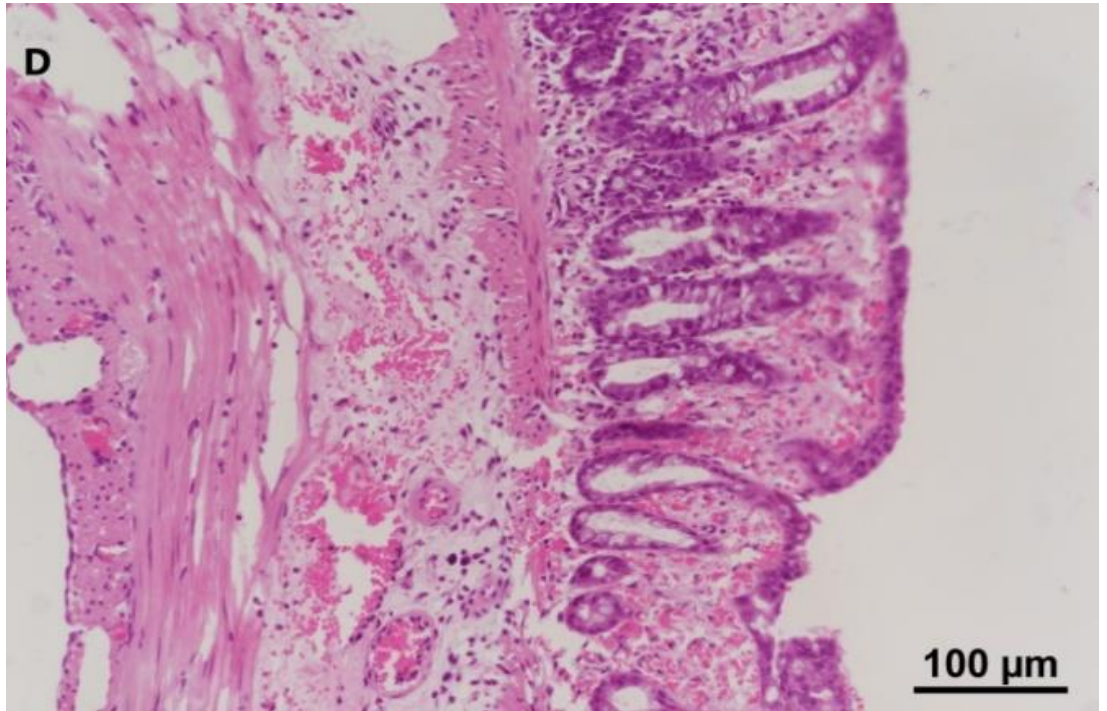


Şekil 4.10. HP grubu kolon dokusu (X20).
Submukoza ve mukozada sağlıklı kolon morfolojisi.



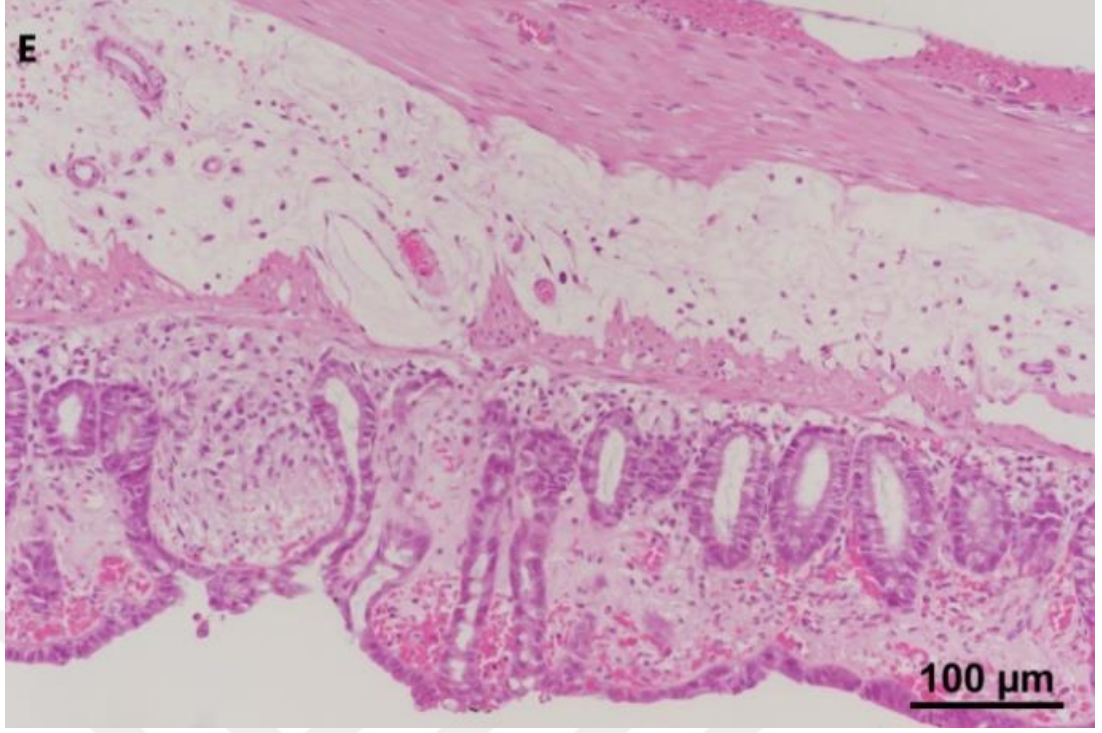
Şekil 4.11. Kolit grubu kolon dokusu (X20).

Kolitli sıçanlarda inflamatuvar hücre infiltrasyonu (oklar), kript abse oluşumu (yıldızlar), ödem (çarpılar), konjesyon (üçgenler), goblet hücresi deplesyonu (kare).



Şekil 4.12. Kolit+HP grubu kolon dokusu (X20).

Kolit+HP grubunda ılımlı düzeyde iyileşme.

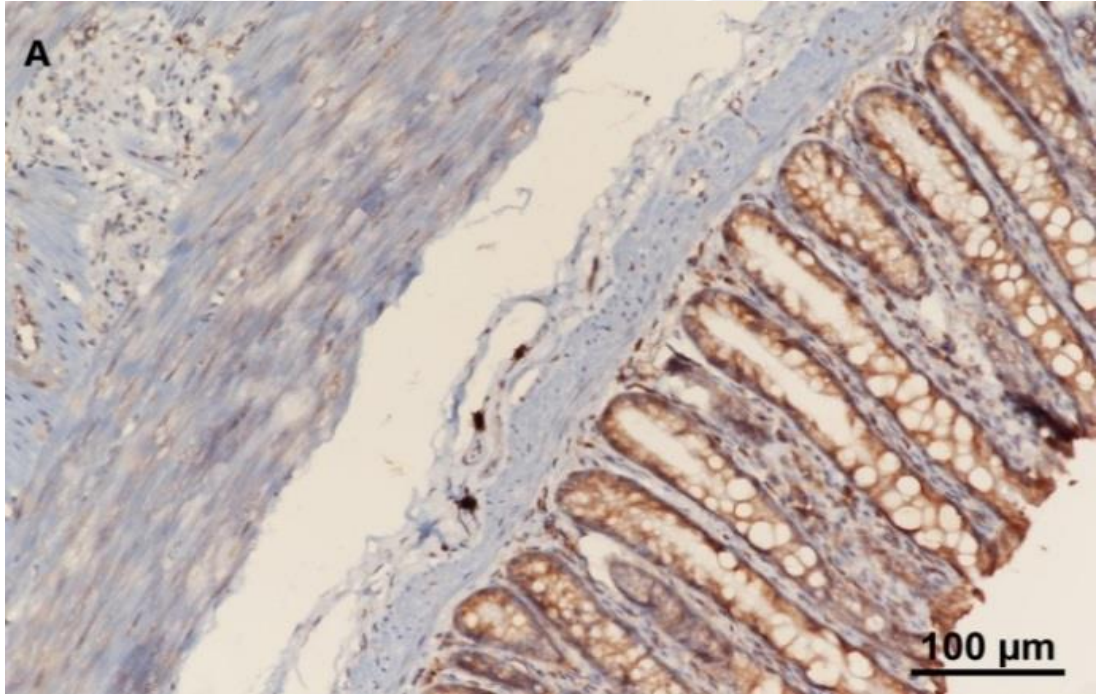


Şekil 4.13. Kilit+SS grubu kolon dokusu (X20).

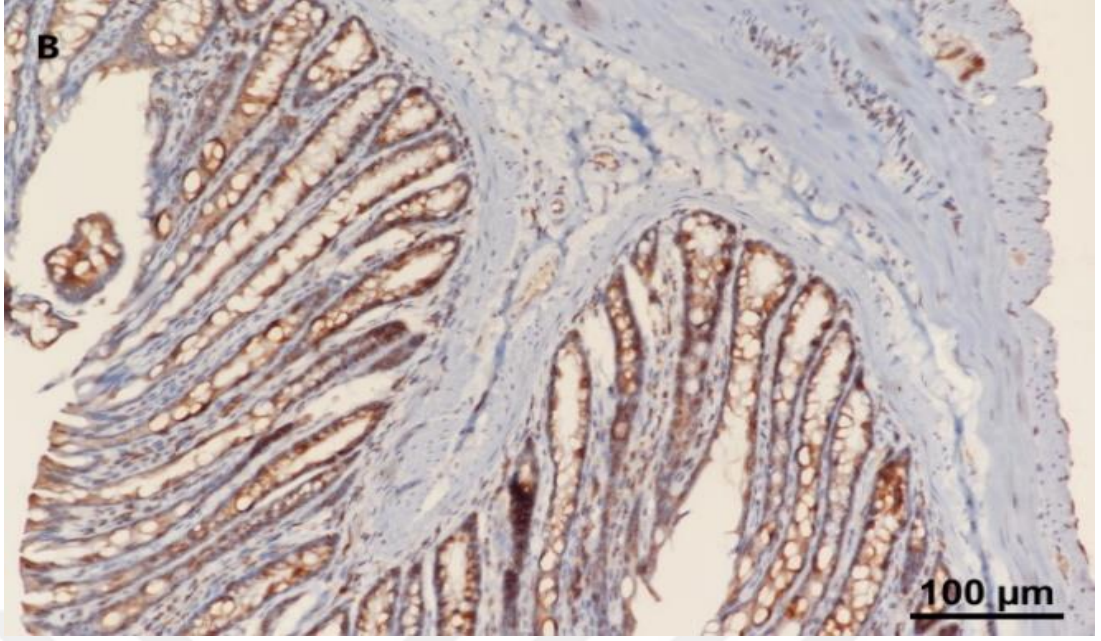
Kilit+SS grubunda orta düzeyde iyileşme
(Hematoksilen-eozin boyama: HXE).

4.3. İmmunohistokimyasal Bulgular (Bcl-2 ve Bax)

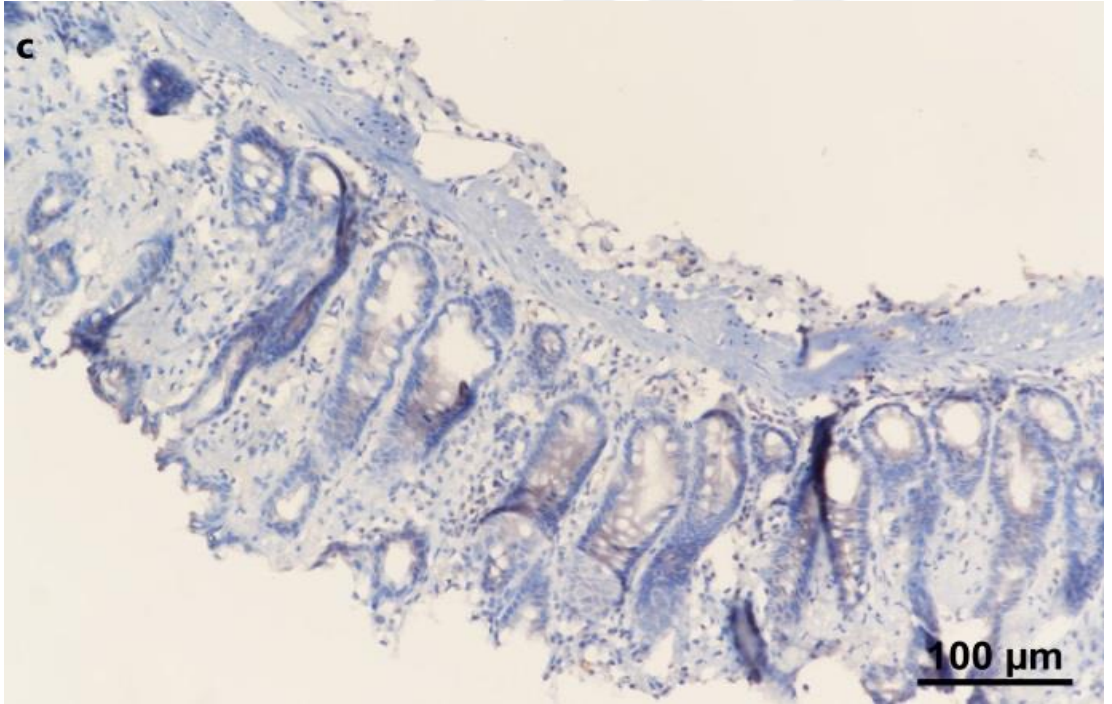
Kontrol ve HP grubuna ait kolon dokularının immunohistokimyasal olarak incelenmesi sonucunda bu iki grup arasında Bcl-2 pozitif hücrelerin sayısında önemli fark görülmedi. Kolit grubu ile Kontrol grubu karşılaştırıldığında Bcl-2 pozitif hücrelerin sayısında azalma olduğu belirlendi. Kolit grubunda zayıf Bcl-2 immünreaktivitesi görüldü. Ancak HP uygulanmasıyla birlikte Bcl-2 ekspresyonunun artışı görüldü. Kolit+HP ve Kolit+SS grubu, Kolit grubu ile karşılaştırıldığında Bcl-2 pozitif hücrelerin sayısının arttığı tespit edildi (Şekil 4.14-18).



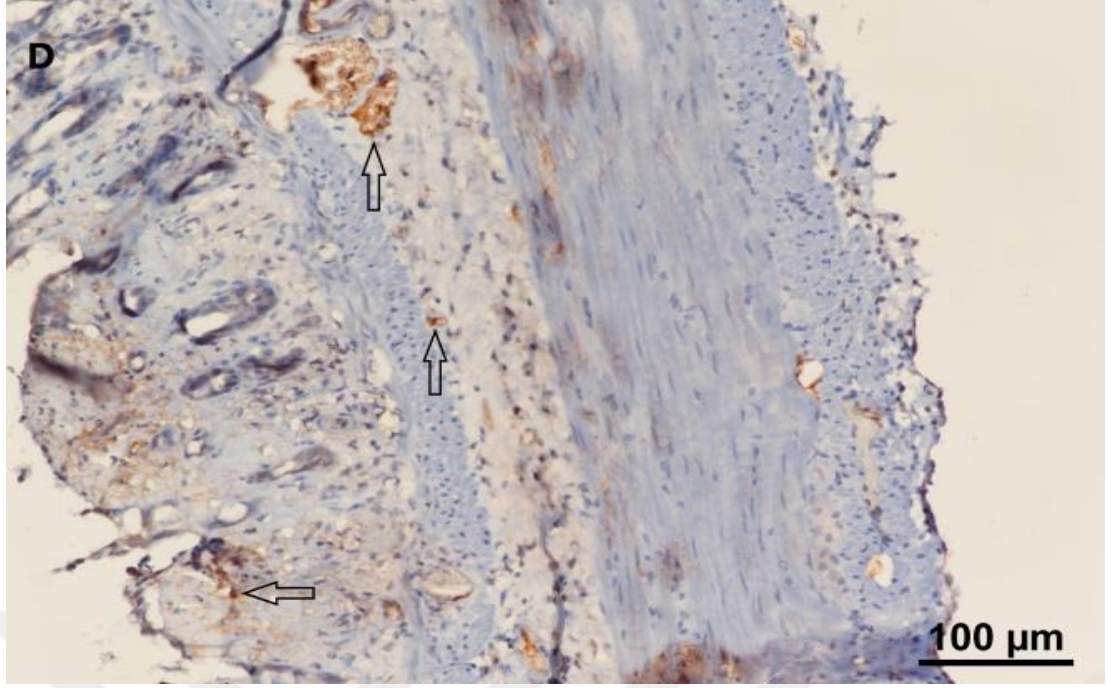
Şekil 4.14. Kontrol grubu kolon dokusuna ait Bcl-2 görüntüsü (X20)



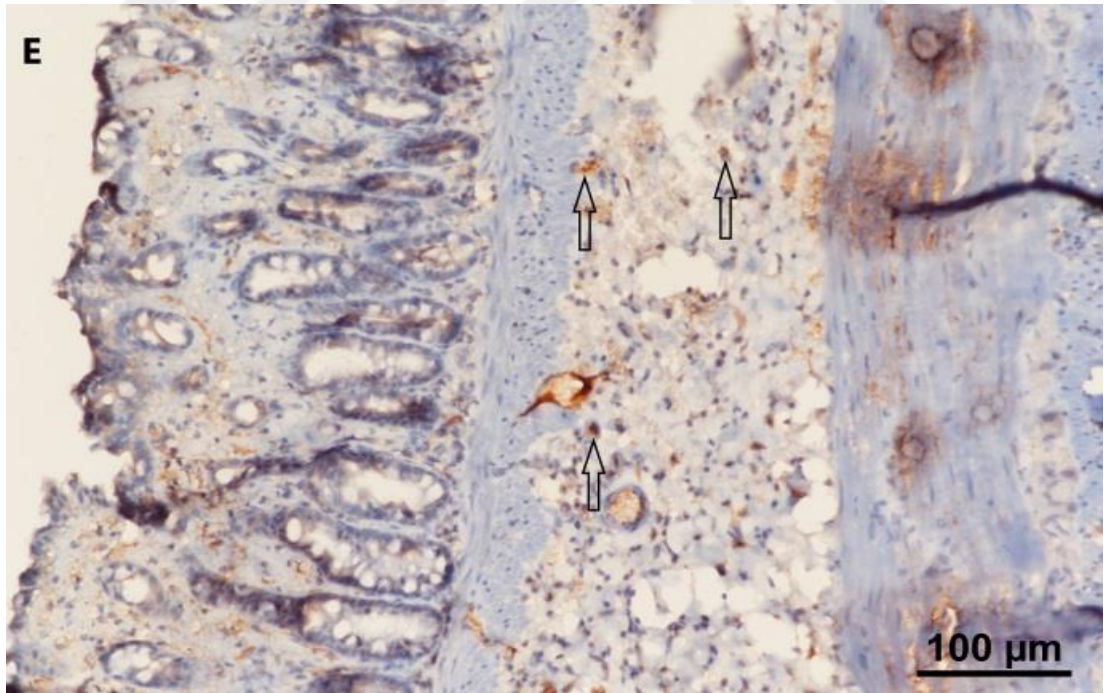
Şekil 4.15. HP grubu kolon dokusuna ait Bcl-2 görüntüsü (X20)



Şekil 4.16. Kilit grubu kolon dokusuna ait Bcl-2 görüntüsü (X20)



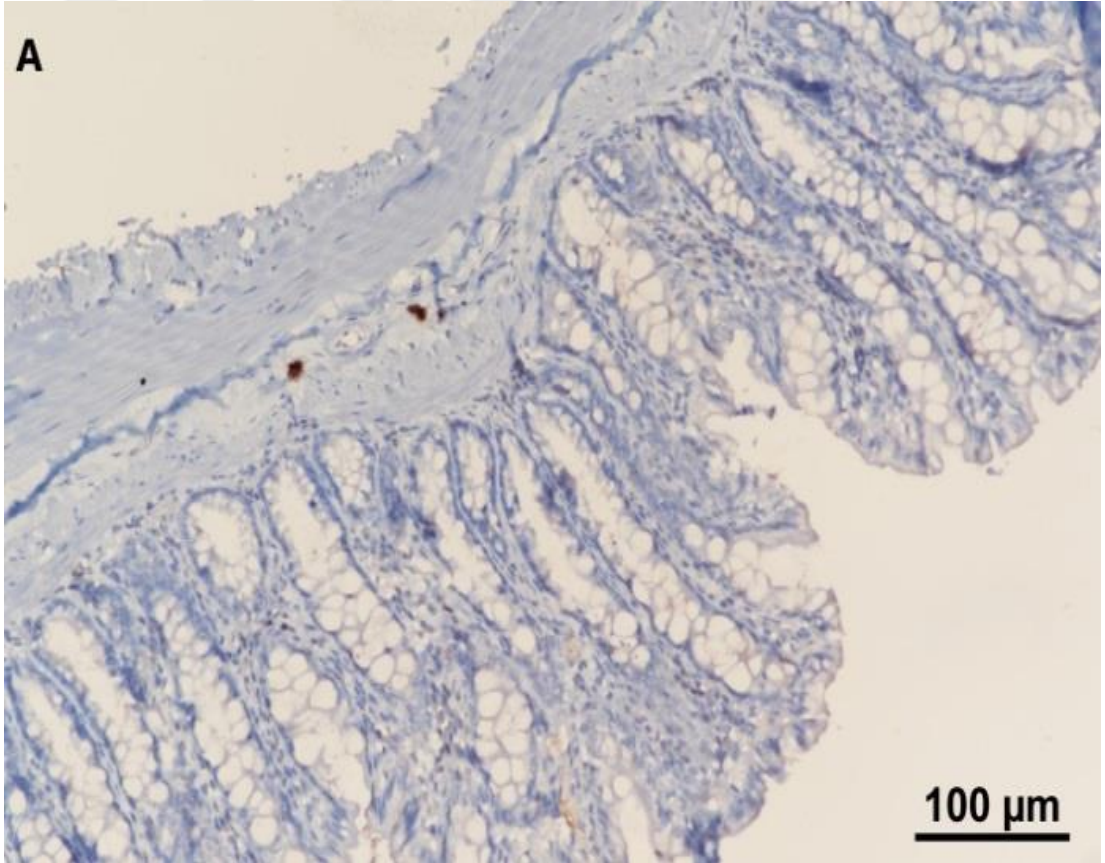
Şekil 4.17. Kolit+HP grubu kolon dokusuna ait Bcl-2 görüntüsü (X20)
Kolit+HP gruplarında Bcl-2 pozitif hücreler (oklar)



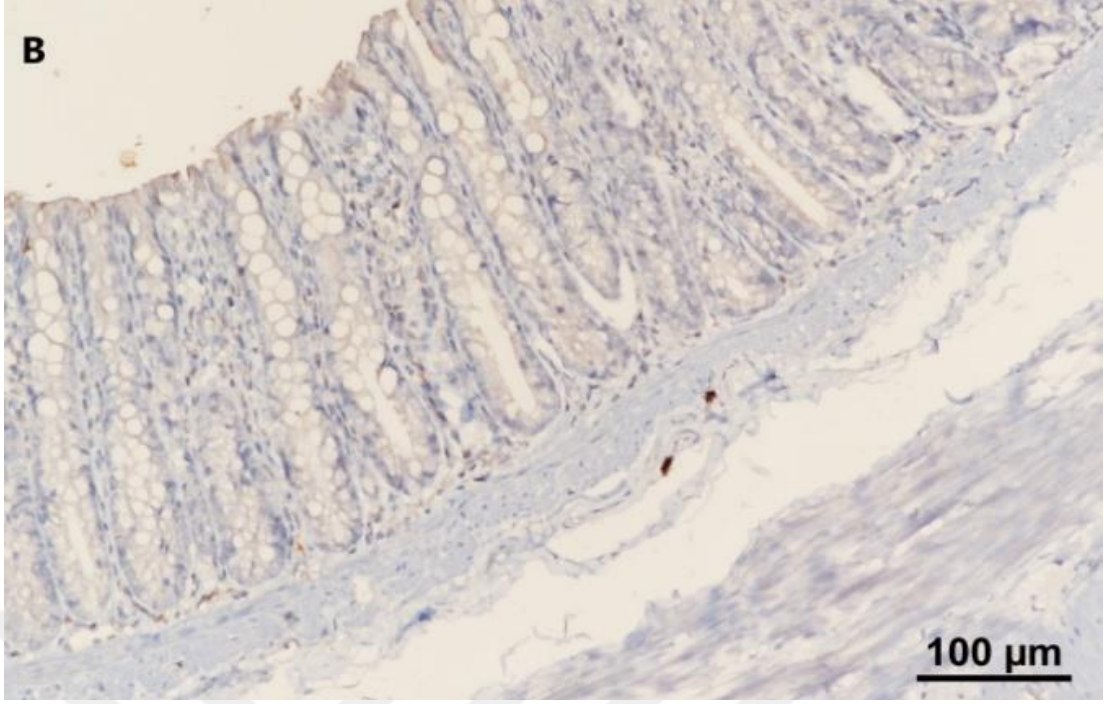
Şekil 4.18. Kolit+SS grubu kolon dokusuna ait Bcl-2 görüntüsü (X20)
Kolit+SS gruplarında Bcl-2 pozitif hücreler (oklar)

İmmunohistokimyasal bulgulara diğ er parametre olan Bax değerinin; Kontrol ve HP grubuna ait kolon dokularının incelenmesi sonucunda Bax pozitif hücrelerin sayısında anlamlı bir farklılığın olmadığı belirlendi. Kolit grubu ile Kontrol grubu karşılaştırıldığında Bax pozitif hücrelerin sayısında artış olduğu tespit edildi. Kolit+HP ve Kolit+Sülfasalazin grubu, Kolit grubu ile karşılaştırıldığında Bax pozitif hücrelerin sayısında azalma olduğu belirlenmiştir (şekil 4.19-23).

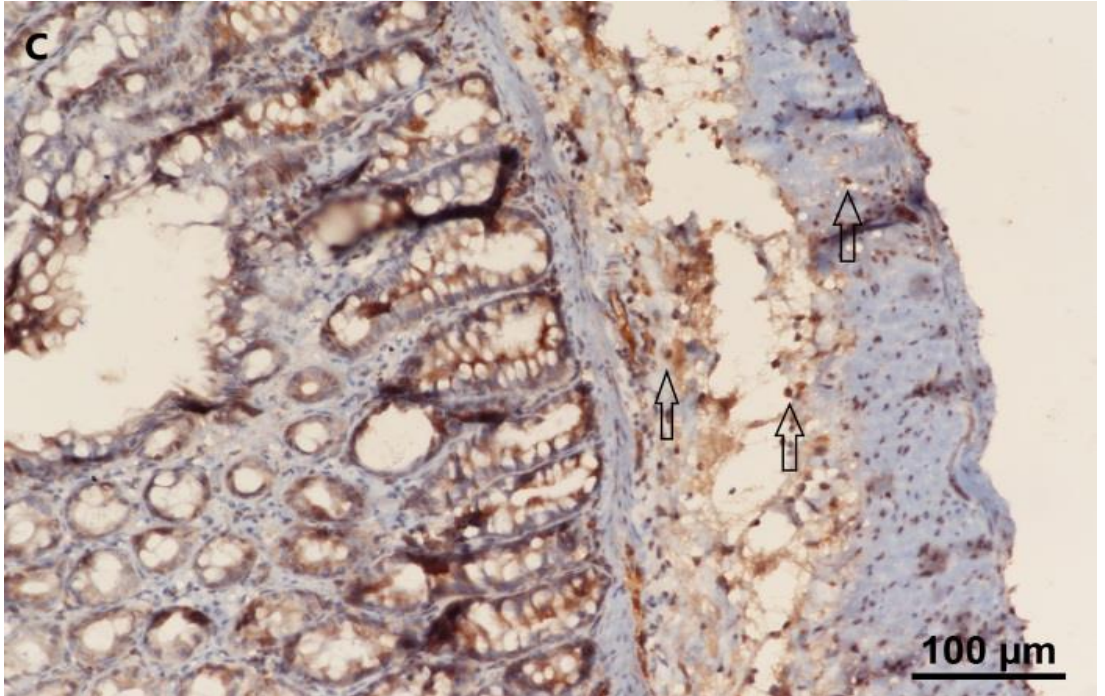
İmmunohistokimyasal verilere göre Kolit grubundaki apoptoz değerinin Kontrol grubuna göre yükseldiği (Bcl-2 değerinde düşme, Bax değerinde yükselme), Kolit+HP grubunda ise Kolit grubuna göre azaldığı gözlendi.



şekil 4.19. Kontrol grubu normal kolon dokusuna ait Bax görüntüsü (X20)

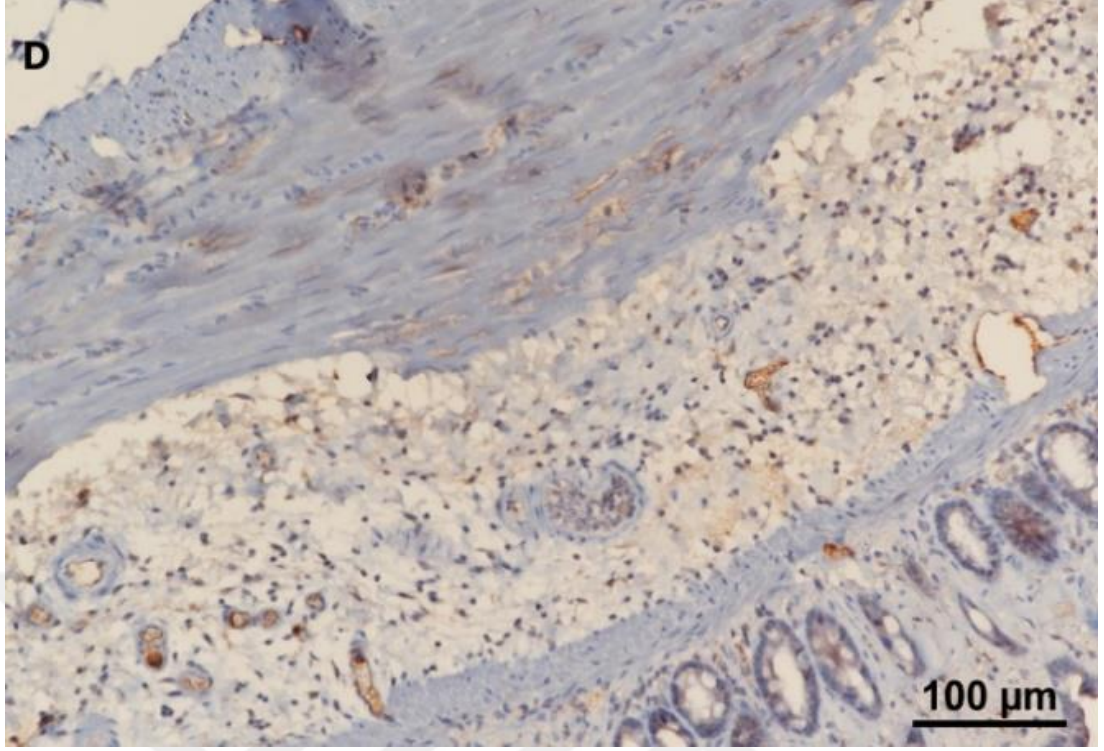


Şekil 4.20. HP grubu normal kolon dokusuna ait Bax görüntüsü (X20)

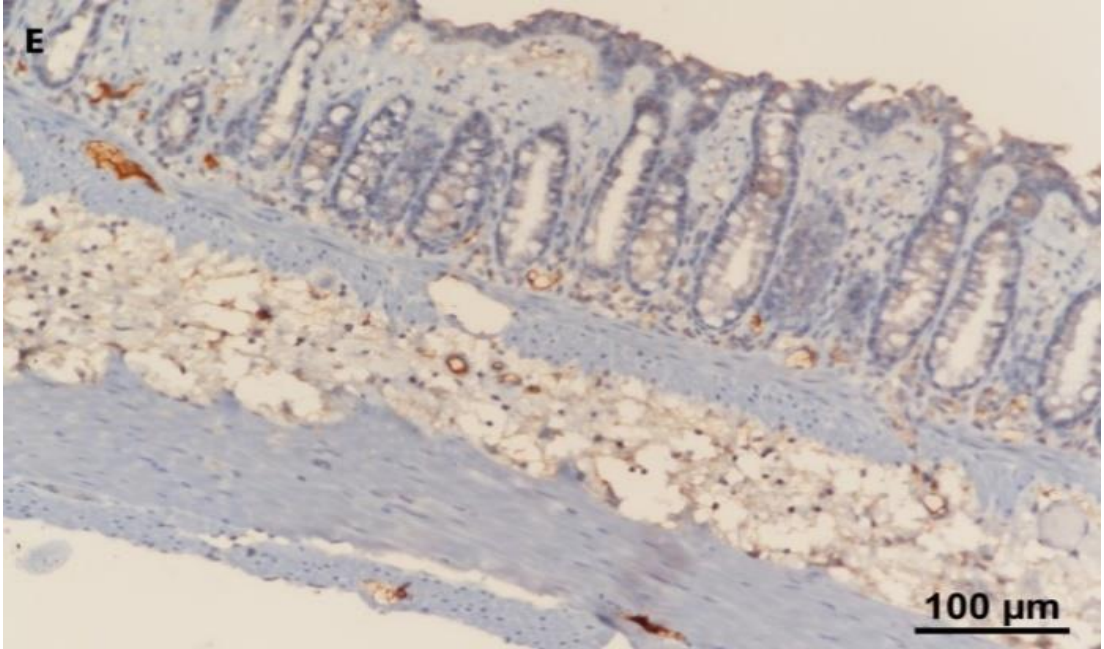


Şekil 4.21. Kolit grubu kolon dokusuna ait Bax görüntüsü (X20)

Kolit gruplarında Bax pozitif hücreler (oklar)



Şekil 4.22. Kilit+HP grubu kolon dokusuna ait Bax görüntüsü (X20)



Şekil 4.23. Kilit+SS grubu kolon dokusuna ait Bax görüntüsü (X20)

5. TARTIŞMA

Meyvesinin görünüşü nedeniyle şeytan pençesi olarak adlandırılan HP, Afrika'da Kalahari Çölü'nde yetişen, tıbbi tedavi için yoğun bir şekilde tercih edilen bitki türüdür (Lim ve ark., 2014).

Köklerin içerdiği temel bileşenler; iridoid glikozitleri, şekerler, triterpenoitler (oleanolik ve ursolik asit), fitosteroller, aromatik asitler (kafeik, sinnamik ve klorojenik asitler) ve flavonoidlerdir (luteolin ve kemferol) (Foundational Medicine Review, 2019).

HP, tıp alanında artrit ve romatizmal hastalıklarda antienflamatuvar etkilerinden dolayı yaygın kullanım alanı bulmaktadır (Serrano ve ark., 2018). Günümüzde HP'nin en sık kullanım alanı osteoartritir (Sanders ve ark., 2011). Genellikle; analjezik olarak kullanılan ilaçların, merkezi sinir sistemi ya da periferik ağrı mekanizmaları üzerine etki ederek ağrıyı hafiflettiği bilinmektedir. Ağrının tedavisi için kullanılan ilaçların güvenliği ve etkinliği sınırlı düzeydedir. NSAİİ'nin; gastrointestinal lezyonlar, böbrek ve karaciğer yetmezliği bulunanlarda sık sık tercih edilmesi kullananlarda yan tesirlere yol açabilmektedir (Lim ve ark., 2014). HP'nin geleneksel NSAİİ kıyasla önemli ölçüde daha az olumsuz etkilere sahip olduğu ve bu nedenle alternatif bir tedavi olabileceği gösterilmiştir (Chrubasik ve ark., 2002).

ÜK, yalnızca kolon mukozasının ve submukozasının yüzeysel bölümüyle sınırlı kalıp, inflamasyon ve ülserasyonla seyreden, tekrarlayabilen uzun süreli hastalıktır. Lezyonlar spesifik rektumdan başlamakla birlikte, yayılımı distalden proksimale doğrudur (Bassaganya Riera ve ark., 2012). Hastalığın nedenleri tam olarak bilinmemekle birlikte genetik faktörler antioksidan kapasitenin azalmasına etki etmektedir. Hastalıkta nötrofil ve makrofajların epitel bütünlüğünü bozarak kolon hasarına neden olabileceği bilinmektedir (Tahan ve ark., 2011). Hastalığın tedavisi esas olarak spesifik değildir ve öncelikle semptomların giderilmesine yöneliktir. Tüm bu nedenlere bağlı olarak yeni terapötik yaklaşımlara ihtiyaç vardır (Travis ve ark., 1996).

Oksidatif stres, serbest radikal zincir reaksiyonları ve lipid peroksidasyonu intestinal mukozal bariyeri bozmaktadır. İnflamatuvar mediatörlerin etkinleşmesiyle birlikte, lipid peroksidasyon değerini belirten MDA'nın kolonik seviyelerinde artma görülmektedir (Verspaget ve ark., 1988; Girgin ve ark., 2000). Çetinkaya ve ark. (2005); Mahgoub, (2003); yaptıkları araştırmalarında lipid peroksidasyon göstergesi olan MDA düzeyinin, kolit modeli çalışmalarında değerinin artış gösterdiğini gözlemlemişlerdir. Araştırmacılar çalışmalarında N-asetil sistein uygulaması ile MDA seviyesinde, anlamlı azalmanın olduğunu ifade etmişlerdir. Benzer olarak çalışmamızda da MDA düzeyinin, HP uygulanmasıyla birlikte lipid peroksidasyonun önlenmesi sonucu, kolit grubuna göre Kolit+HP grubunda anlamlı olarak azaldığı gözlemlendi.

Üçüncü ve ark. (2015); romatoid artrit üzerine yaptıkları çalışmalarında, HP ekstresi ile kombine bromelain ekstresi, glukozamin hidroklorür, kondroitin sülfat ve metilsülfonilmetan hayvanlara oral olarak 30 gün süreyle kombine halde uygulamışlardır. %3 harpagozit içeren ekstrenin bu kombinasyonla kıkırdak yıkımını önlediğini belirtmişlerdir. Yapılan analizler neticesinde MDA, NO, 8-hidroksiguanin değerlerini ve proenflamatuvar sitokin gen değerlerini azaltarak ortaya çıkan oksidatif stresle birlikte oluşan yangıyı baskıladıklarını bildirmişlerdir. Çalışmamızda yaptığımız analizlerde kolit oluşturulmasıyla artan MDA ve NO değerlerinin, HP ekstraktı uygulanmasıyla azaldığı ve bunun sonucunda artan oksidatif stres değerlerinin bu çalışmaya benzer sonuçlar ortaya çıkardığı gözlemlenmiştir. MDA seviyelerindeki yüksekliğin nedeni, gelişen hasar neticesinde serbest radikal üretiminin yükselmesine bağlı olarak lipid peroksidasyonun tetiklenmesiyle ilgili olabilir.

Oksidan ve antioksidan sistem arasındaki denge ÜK'nin etyopatogenezinde ve doku hasarı gelişiminde oldukça önemlidir. Süperoksit dismutaz, katalaz, glutatyon peroksidaz gibi enzimler ile birlikte glutatyon gibi antioksidanlar hücreleri oksidatif hasara karşı korumaktadır. Dong ve ark. (2003); yaptıkları kolit modeli çalışmalarında; kolit grubunda SOD enzimi aktivasyonunun azaldığını ancak tedavi alan grupta ise SOD aktivasyonunda kolit grubuna göre artış olduğunu gözlemlemişlerdir. Liu ve ark. (2003); yaptığı diğer bir çalışmada ise trinitrobenzen sülfonik asit (TNBS) ve etanol ile oluşturulmuş kolit modelinde SOD değerlerinin kolit grubunda azaldığını belirlemişlerdir. Çalışmamızda da kolit grubunda SOD enzim aktivasyonunun

azaldığı, HP uygulamasıyla birlikte SOD enzim aktivasyon seviyelerinin yükseldiği görülmüştür. Yapılan analiz sonucunda elde edilen değerler, Dong ve ark. (2003); Liu ve ark. (2003); yaptıkları çalışmalar ile paralellik göstermektedir.

Rajendiran ve ark. (2018); yaptıkları araştırmalarında kolitli sıçanlarda kontrol grubu ile karşılaştırıldığında enzimatik olmayan antioksidan SOD, GPX ve GST gibi enzimatik antioksidanların seviyelerinde önemli bir azalma olduğunu gözlemlemişlerdir. Kontrol grubuna *Alpinia officinarum* hance uygulanmasıyla, kolit grubuna göre kontrol grubunda bu antioksidanların düzeylerinin önemli ölçüde arttığını tespit etmişlerdir. Çalışmamızda da HP uygulanmasıyla birlikte SOD enzim aktivasyon değerlerinin yükseldiğini gözlemledik. Yapılan analizler sonucunda elde edilen veriler, Rajendiran ve ark. (2018); buldukları değerler ile benzerlik göstermektedir.

Akşit ve ark. (2016); yaptıkları çalışmalarında kolit grubunda lipid peroksidasyon neticesinde yükselen MDA düzeylerinin, 2-APB uygulanması ile hem serum hem de doku MDA seviyelerinin azaldığını belirtmişlerdir. Araştırmacılar kolit grubunda seviyeleri düşen SOD, TAS değerlerinin, 2-APB uygulanmasıyla SOD aktiviteleri ve TAS düzeylerinin arttığını analiz sonuçlarında belirtmişlerdir. Araştırmamızda da HP uygulaması ile bulunan MDA, SOD, TAS değerleri, Akşit ve ark. (2016), yaptıkları çalışma sonuçlarıyla benzerlik göstermektedir.

Sitokinler, aktive edilmiş hücreler tarafından üretilen hücreler arası sinyal polipeptitleridir. İnflamasyon sırasında üretilen sitokinler, akut faz proteinlerinin üretiminin başlıca uyarıcılarıdır. İnflamasyonla ilişkili sitokinler arasında başlıca IL-6, IL-1 β , TNF- α , IFN- β , IL-8 ve muhtemelen IL-10 bulunduğu bildirilmiştir (Gabay ve Kushner, 1999). TNF- α , kronik inflamasyona veya doku hasarına yanıt olarak üretilen güçlü bir proinflamatuvar sitokindir (Dossus ve ark., 2011). Akut inflamasyonda doğrudan indüklenen bir proinflamatuvar sitokin olan IL-6'nın ÜK'de yükseldiği ve hastalığın patogenezinde önemli bir role sahip olduğu ifade edilmiştir (Lee ve ark., 2018). Deneysel kolit modeli geliştirilmiş birçok çalışmada araştırmacılar, kolit grubunun hasta olmayan gruba göre artmış oranda TNF- α ve IL-6 değeri içerdiğini belirtmişlerdir (Egger ve ark., 2000; Mueller, 2002). Inaba ve ark. (2010); farelerin makrofaj hücrelerindeki araştırmalarında şeytan pençesi ekstresinin, lipopolisakkarit (LPS) kaynaklı IL1 β , IL-6 ve TNF- α üretimi üzerine

etkilerini incelemişler ve HP'nin enflamatuvar sitokinlerin üretimini engellediğini bildirmişlerdir. Mevcut çalışmamızda asetik asit ile oluşturulan kolit grubunda artan IL-6 ve TNF- α değerinin HP ekstraktı uygulanması ile anlamlı şekilde düştüğü görülmüştür. Araştırmamızda elde edilen verilerin daha önce yapılan çalışmalara benzerlik gösterdiği görülmüştür.

Guimbaud ve ark. (1998); yaptıkları çalışmada ÜK'de dört proinflammatuvar sitokin (IL-1 β , TNF- α , IL-6 ve IL-8) üretiminde artma olduğunu tespit etmişlerdir. Araştırmamızda da IL-6 ve TNF- α değerleri kontrol grubuyla karşılaştırıldığında kolit grubunda bu değerlerin arttığı tespit edilmiştir. Diğer bir çalışmada Funakoshi ve ark. (1998); araştırmalarında ÜK'li hastaların kontrol grubuyla karşılaştırıldığında, IL-1, IL-6, IL-8 ve TNF- α seviyelerinin arttığını gözlemlemişlerdir. Bizim çalışmamızda da kolitli grupta TNF- α ve IL-6 değerleri benzer sonuçlar gösterdi. Çalışmamızda bulunan değerler Guimbaud ve ark. (1998); ve Funakoshi ve ark. (1998); yaptıkları çalışmalar ile paralellik göstermektedir.

Huang ve ark. (2006); harpagosidin makrofaj kaynaklı NO salınımı üzerine etkisini inceledikleri çalışmalarında, tedavi edilmeyen gruba kıyasla NO değerlerinin yaklaşık 12 kat arttığını tespit etmişlerdir. Harpagosid uygulaması ile, uyarılmış hücrelerde NO değerlerinin doza bağımlı bir şekilde azaldığını tespit etmişlerdir. Araştırmamızda NO değerlerinin HP uygulamasıyla kolit grubuna göre önemli derecede azaldığı görülmüş olup, literatür açısından daha önceki yapılan çalışmalarla benzer sonuçlar içermektedir.

Oksidan ve antioksidan sistemlerdeki ilişki ÜK patogeneziyle beraber doku hasarı derecesinin artması açısından önem arz etmektedir. Kuralay ve ark. (2003), asetik asit ile geliştirilmiş kolit modelinde; kolit grubunda artan SOD ve myeloperoksidaz enzim aktivitelerinin, NO düzeylerinin ve dokudaki hasar şiddetinin Trimetazidine tedavisi ile azaldığını, azalmış olan TNF- α seviyelerinin ise arttığını bildirmişlerdir. Çalışmamızda NO düzeyleri bu araştırmaya benzer çıkmıştır. Analiz sonuçlarımıza göre Kolit grubunda azalan SOD değerlerinin HP ekstraktı uygulamasıyla arttığı; TNF- α değerinde ise Kolit grubunda artmış olan değerin HP uygulamasıyla birlikte azaldığı görülmüştür.

Seruloplazmin, aktive edilmiş monositler ve makrofajlar tarafından üretilen bir akut faz plazma proteinidir (Vassiliev ve ark., 2005; Yang ve ark., 1988). Enflamasyon, travma veya enfeksiyona yanıt olarak seruloplazmin plazma düzeyinin yükseldiği ifade edilmiştir (Gitlin, 1988). Seruloplazminin ferroksidaz aktivitesi, demir iyonu aracılı reaktif oksijen türlerinin üretimini inhibe ettiği ve dolayısıyla seruloplazmin, güçlü bir antioksidan aktiviteye sahip olduğu belirtilmiştir (Klebanoff, 1992). Bakhautdin ve ark., (2013); yaptıkları çalışmalarında deneysel olarak oluşturulan kolitte seruloplazminin koruyucu bir rol oynadığını ve inflamasyon bölgesine toplanan makrofajların birincil kolon seruloplazmin kaynağı olduğunu belirtmişlerdir. Araştırmacılar elde ettikleri verilerinde makrofajdan türetilen seruloplazminin antioksidan aktivitesinin, kimyasal olarak indüklenen deneysel kolitten korunmaya katkıda bulunduğunu ifade etmişlerdir. Yaptığımız seruloplazmin analizi sonucunda elde ettiğimiz verilerimiz Bakhautdin ve ark., (2013); yaptıkları çalışmayı destekler niteliktedir.

ÜK ile ilgili yapılan literatür taramalarında serum sialik asit değerlerinde artış olduğu bildirilmiştir (Ricci ve ark., 1995; Baba ve ark., 1992). Yaptığımız çalışma sonuçları Ricci ve ark., 1995; Baba ve ark., (1992), çalışmaları sonucu buldukları değerlerle benzer çıkmıştır. Deneysel olarak oluşturduğumuz kolit modelinde sialik asit değerinin yükseldiği, HP uygulamasıyla birlikte kolit grubuna göre serum sialik asit düzeylerinin azaldığı saptandı.

Çalışmamız, HP uygulamasının antioksidan düzeylerini önemli ölçüde artırabildiğini göstermiştir. Uygulamanın sonucunda antioksidan seviyelerinin artışının kolon üzerinde olumlu etkili olduğu kanısına varılmıştır. Çalışmanın histopatolojik değerlendirmesinde, kolit grubunda mukozal yapı kaybı, inflamatuvar hücre infiltrasyonu, kript abse oluşumu, ödem, konjesyon ve goblet hücre kaybı gibi değişikliklerin HP uygulandıktan sonra hafif rejenerasyon gösterdiği ortaya konuldu. Daha önce yapılan çalışmalarda çeşitli antioksidan ilaçların kullanımının histopatolojik bulgularda azalma gösterdiği belirtilmiştir (Menghini ve ark., 2019; Rajendiran ve ark., 2018).

Apoptoz, vücuttaki bazı dokuların ve birbirleriyle reaksiyona giren bazı immünolojik hücrelerin yok edilmesinde önemli bir rol oynayan, morfolojik olarak

programlanmış bir hücre ölümü şeklidir (Shayan ve ark., 2023). Fengge ve ark., (2016), yaptıkları çalışmalarında DSS ile indüklenen grupta bölünmüş Bax, kaspaz-3, kaspaz-8 seviyelerinin, kontrol grubundakilerden önemli ölçüde yüksek olduğunu gözlemlemişlerdir ($p<0.05$). Uyguladıkları tedavi ile, kolit farelerinde bölünmüş Bax, kaspaz-3, kaspaz-8 seviyelerinin belirgin şekilde azaldığını ifade etmişlerdir. Çalışmamızın sonucunda bulunan değerler, Fengge ve ark., (2016), yaptıkları araştırmalarında bulunan sonuçlarla paralellik göstermektedir.



6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Araştırmamızda kolit oluşturmak için asetik asitten faydalanılmıştır. Çalışmamız sonucu topladığımız veriler asetik asit uygulamasından sonra kalın bağırsaklarda kolitin meydana geldiğini ve bunun oksidatif strese neden olduğunu desteklemektedir. Asetik asit ile indüklenen kolit modeli araştırmalarında antioksidan ve antienflamatuar etkisi olduğu bilinen birçok kimyasal ajanların kullanıldığı bilinmektedir. Ancak yapılan araştırmalarda kolit modelinde HP ekstraktlarıyla ilgili herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır.

HP'ye benzer tıpta faydalanılan bitkilerin, yan etkilerinin az olması nedeniyle her geçen gün kullanımlarının arttığı görülmektedir. ÜK'de tamamlayıcı tedavi açısından etkili bitkisel ilaçların değerlendirilmesi günümüzde karmaşıklığını hala korumaktadır.

Araştırmamızda deneysel olarak kolit modelinde; kolon dokusunda serbest radikallerin seviyelerinin artışıyla birlikte lipid peroksidasyona bağlı olarak MDA, NO, IL-6, TNF- α parametrelerinin yükseldiği tespit edilmiştir. Antiinflatuar özellikleri bilinen HP'nin uygulanmasıyla lipid peroksidasyon ve buna bağlı olarak oksidatif stresin engellendiği gözlemlenmiştir. Lipid peroksidasyon sonucu antioksidan parametreler olan SOD, TAS, Seruloplazmin seviyelerinin düştüğü belirlenmiştir. Kolit grubunda seviyeleri düşen antioksidan parametrelerin HP uygulanmasıyla birlikte yükseldiği görülmüştür. Aynı zamanda kolitli grupta gelişen mukozal yapının kaybı, inflammatuar hücre infiltrasyonu, ödem, konjesyon gibi histopatolojik bulguların HP uygulamasıyla birlikte hafif rejenarasyon gösterdiği belirlenmiştir.

Sonuç olarak; araştırmamızda deneysel olarak kolit oluşturularak oksidatif stres, proinflammatuar sitokinler, apoptozis, antioksidanlar ve kolonun histopatolojik yapısı üzerine HP'nin rolü incelenmiştir. Kolitle indüklenen oksidatif stres, lipid peroksidasyonu ile apoptozis üzerine HP uygulamasının koruyucu etkili olduğu; aynı zamanda histopatolojik bozukluklarda ılımlı düzeyde etkisi olduğu gözlemlenmiştir.

Araştırmamızda elde edilen verilerin daha fazla moleküler düzeyde çalışma ile desteklenmesi gerektiği ve bundan sonra yapılacak çalışmalara ışık tutacağı kanısına varılmıştır.



7. KAYNAKLAR

- Abdallah, D. M. and Ismael, N.R. (2011). Resveratrol abrogates adhesion molecules and protects against TNBS-induced ulcerative colitis in rats, *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 89, 811-818.
- Abdelouahab, N. and Heard, C.M. (2008). Effect of the major glycosides of *Harpagophytum procumbens* (Devil's Claw) on epidermal cyclooxygenase-2 (COX-2) in vitro. *Journal of Natural Products*, 71, 746–749.
- Aberham, A., Schwaiger, S., Stuppner, H. and Ganzera, M. (2007). Quantitative analysis of iridoids, secoiridoids, xanthenes and xanthone glycosides in *Gentiana lutea* L. roots by RP-HPLC and LC-MS. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 45(3), 437–442.
- Aggarwal, B. B., Kohr, W. J., Hass, P. E., Moffat, B., Spencer, S. A., Henzel, W. J. and Harkins, R. N. (1985). Human tumor necrosis factor production, purification, and characterization. *Journal of Biological Chemistry*, 260(4), 2345–2354.
- Ahmed, M. I., Afifi, M. I. and Younos, I. H. (2005). *Harpagophytum procumbens* (Devil ' s Claw): A Possible Natural Anti-Inflammatory Agent (An Experimental Study). *Iranian Journal of Pharmacology and Therapeutics*, 4(1), 54–63.
- Aksit, D., Aksit, H., Yildiz, O., Dogru, M. S., Yay, A. H., Baykalir B. G., Seyrek K. ve Atessahin, A. (2016). Protective effect of 2-aminoethyl diphenylborinate in rat colitis model induced by acetic acid. *Int J Clin Exp Med.*; 9(3):, 6219-6227.
- Ames, B. N., Shigenaga, M. K. and Hagen, T. M. (1993). Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90(17), 7915–7922.
- Amir Aslani, B. and Ghobadi, S. (2016). Studies on oxidants and antioxidants with a brief glance at their relevance to the immune system. *Life Sciences*, 146, 163–173.
- Anauate, M. C., Torres, L. M. and De Mello, S. B. V. (2010). Effect of isolated fractions of *Harpagophytum procumbens* D.C. (devil's claw) on COX-1, COX-2 activity and nitric oxide production on whole-blood assay. *Phytotherapy Research*, 24(9), 1365–1369.
- Appleyard, C.B. and Wallace, J. L. (1995). Reactivation of hapten-induced colitis and its prevention by anti-inflammatory drugs. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 269-(1):, G119–G125.
- Arai, Y., Takanashi, H. and Kitagawa, H. (1998). Involvement of interleukin-1 in the development of ulcerative colitis induced by dextran sulfatesodium in mice. *Cytokine*; 10:890-6., Rogler G, Andus; T. Cytokines in inflammatory bowel disease. *World J Surg*, 22,: 382-9.
- Bakhautdin, B., Febbraio, M., Goksoy, E., de la Motte, C. A., Gulen, M. F., Childers, E. P. and Fox, P. L. (2013). Protective role of macrophage-derived ceruloplasmin in inflammatory bowel disease. *Gut*, 62(2), 209-219.
- Bassaganya, J., Viladomiu, M., Pedragosa, M., Simone, C., Carbo, A., Shaykhutdinov, R., Jobin, C., Arthur, C., Corl, A., Vogel, H., Storr, M. and Hontecillas, R. (2012). Probiotic bacteria produce conjugated linoleic acid locally in the gut that targets macrophage PPAR γ to suppress colitis. *Plos ONE*, 7(2):, e31238.
- Baykal, Y. N. (2005). İnflamatuvar bağırsak hastalığı. *Sendrom*.;17(4):61-84.
- Berg, D. J., Zhang, J., Weinstock, J. V, Ismail, H. F., Earle, K. A., Alila, H. and Lynch, R. G. (2002). Rapid development of Colitis in nasis-treated IL-10- deficient mice. *Gastroenterology*, 123, 1527–1542.

Bergamaschi, G., Di Sabatino, A., Albertini, R., Ardizzone, S., Biancheri, P., Bonetti, E., and Corazza, G. R. (2010). Prevalence and pathogenesis of anemia in inflammatory bowel disease. Influence of anti-tumor necrosis factor- α treatment. *Haematologica*, 95(2), 199-205.

Betancor-Fernandez, A., Perez-Galvez, A., Sies, H. and Stahl, W. (2010). Screening pharmaceutical preparations containing extracts of turmeric rhizome, artichoke leaf, devil's claw root and garlic or salmon oil for antioxidant capacity. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 55(7), 981–986.

Bhattacharya, A. and Bhattacharya, S. (1998). Anti-oxidant activity of *Harpagophytum procumbens*. *British Journal of Phytotherapy*, 5, 68-71.

Birben, E., Sahiner, U., Sackesen, C., Erzurum, S. ve Kalayci, O. (1997). Oxidative stress and Antioxidant Defense Mechanism in. *Science*, 22(96), 161–168.

Bitiren, M., Karakilcik, A. Z., Zerim, M., Ozardali, I., Selek, S., Nazlıgöl, Y., ve Uzunkoy, A. (2010). Protective effects of selenium and vitamin E combination on experimental colitis in blood plasma and colon of rats. *Biological Trace Element Research*, 136, 87-95.

Boyko, E. J., Perera, D. R., Koepsell, T. D., Keane, E. M. and Inui, T. S. (1988). Effects of cigarette smoking on the clinical course of ulcerative colitis. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 23(9), 1147–1152.

Bradley, P.R. (2004). "Addendum to the ESCOP monograph on *Harpagophytum procumbens*: reply from ESCOP." *Phytomedicine: International Journal of Phytotherapy & Phytopharmacology*, 11., 7-8.

Cabre, E., Manosa, M. and Gassull M. (2012). Omega-3 fatty acids and inflammatory bowel diseases-a systematic review. *Br J Nutr.*, 107 2): 240-52.

Ceron, J., Eckersal, P. and Martinez-Subiela, S. (2005). Acute phase proteins in dogs and cats: current knowledge and future perspective. *Vet Clin Path*, 34, 85-99 DOI: 10.1111/j.1939-165X.2005.tb00019.x.

Chantre, P., Cappelaere, A., Leblan, D., Guedon, D., Vandermader, J. and Fournie, B. (2000). Efficacy and tolerance of *Harpagophytum procumbens* versus diacerhein in treatment of osteoarthritis. *Phytomedicine*, 7(3), 177–183.

Chen P., Tang Y., He W., Yang R., Lan Z., Chen R. and Zhang, P. (2022). Potential pathophysiological mechanisms underlying multiple organ dysfunction in cytokine release syndrome. *Hindawi Mediators Inflamm.* 1-17.

Chrubasik, S., Thanner, J. and Kunzel, O. (2002). Comparison of outcome measures during treatment with the proprietary *Harpagophytum* extract doloteffin in patients with pain in the lower back, knee or hip. *Phytomedicine*; 9:181–194.

Cighetti, G., Duca, L., Bortone, L., Sala, S., Nava, I., Fiorelli, G., and Cappellini, M. D. (2002). Oxidative status and malondialdehyde in β -thalassaemia patients. *European journal of clinical investigation*, 32, 55-60.

Collins, P. and Rhodes, J. (2006). Ulcerative colitis: Diagnosis and management. *British Medical Journal*, 333(7563), 340–343. doi:10.1136/bmj.333.7563.340.

Cuzzocrea, S., Chatterjee, P.K., Mazzon, E., Dugo, L., Serraino, I., Britti, D., Mazzullo, G., Caputi, A.P. and Thiemermann, C. (2002). Pyrrolidine dithiocarbamate attenuates the development of acute and chronic inflammation. *Br. J. Pharmacol.* 135, 496–510.

Czygan, F.C. and Kruger, A. (1977). On the distribution of the iridoid glycoside harpagoside in the individual organs of *Harpagophytum procumbens* and *Harpagophytum zeyheri*. *Planta Medica* 31, 305–307.

Cetinkaya, A., Bulbuloglu, E., Kurutas, E. B., Ciralik, H., Kantarceken, B., ve Buyukbese, M. A. (2005). Beneficial effects of N-acetylcysteine on acetic acid-induced colitis in rats. *The Tohoku journal of experimental medicine*, 206(2), 131-139.

- Çetinkaya, A., Bulbuloglu, E. ve Kantarceken, B. (2006). Effects of L-carnitine on oxidant/antioxidant status in acetic acid-induced colitis. *Dig Dis Sci*; 51:488-94.
- Doddola, S., Pasupulati, H., Koganti, B. and Prasad, K.V. (2008). Evaluation of *Sesbania grandiflora* for antiulcerogenic and antioxidant properties. *Journal of Natural Medicines*, 62, 300-307.
- Dossus, L., Becker, S., Rinaldi, S., Lukanova, A., Tjonneland, A., Olsen, A. and Kaaks, R. (2011). Tumor necrosis factor (TNF)- α , soluble TNF receptors and endometrial cancer risk: The EPIC study. *International Journal of Cancer*, 129(8), 2032–2037.
- Eberhart, C. E. and Dubois, R. N. (1995). Eicosanoids in the gastrointestinal tract. *Gastroenterology*, 107(109), 285–301.
- El-Meligy, R. M., Awaad, S. A. and Soliman, G. A. (2013). Natural products in treatment of ulcerative colitis and peptic ulcer. *Journal of Saudi Chemical Society*, 17, 101-124.
- Ercan, N. ve Fidancı, U. R. (2012). Piyodermalı köpeklerde idrarda 8-hidroksi-2'-deoksiguanozin (8-OHdG) düzeyleri, *Ankara Üniv Vet Fak Derg*, 59, 163-168.
- Erel, O. (2005). A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. *Clinical Biochemistry*, 38(12), 1103–1111.
- Ernst, W. H. O., Tietema, T., Veenendaal, E. M. and Masene, R. (1988). Dormancy, germination and seedling growth of two kalaharian perennials of the genus *harpagophytum* (pedaliaceae). *Journal of Tropical Ecology*, 4(2), 185–198.
- Fatima, D., Shaza, A., Laham and Ahmad, A.-M. (2016). Ameliorative effect of olmesartan medoxomil on acetic acid- induced colitis in rats. *Research Article*, 14(5), 391–399.
- Fengge, S., Jiaxuan, F., Xinhui, W., Zhimin, Q., Xiaochen, S., Yanan, A. and Lu, Y. (2016). Vinegar treatment prevents the development of murine experimental colitis via inhibition of inflammation and apoptosis. *J. Agric. Food Chem* 64, 5, 1111–1121.
- Foundational Medicine Review (2019, 26 March). <https://www.foundationalmedicinereview.com/blog/resource/harpagophytum-procumbens>.
- Furst, D.E., and Hillson, J. (2001). Aspirin and other nonsteroidal anti-inflammatory drugs. In: Koopman, W.J. (Ed.), arthritis and allied conditions: *A Textbook of Rheumatology*, 14, Lippincott Williams 665-704.
- Gabay, C. and Kushner I. (1999). Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. *N Engl J Med*; 340: 448-454 PMID: 9971870.
- Gautam, M., Goel, S. and Ghatule, R. (2013). Curative effect of terminalia chebula extract on acetic acid-induced experimental colitis: Role of antioxidants, free radicals and acute inflammatory marker. *Inflammopharmacology*; 21: 377-383.
- Girgin, F., Karaoğlu, O., Erkus, M., Tüzün, S., Özütemiz, O., Dinçer, C., Batur, Y. Ve Tanyalçın, T. (2000). Effects of trimetazidine on oxidant / antioxidant status in trinitrobenzenesulfonik acid-induced chronic colitis. *Journal of Toxicology Environmental Health Part A*; 59: 641-652.
- Gitlin, J.D. (1988). Transcriptional regulation of ceruloplasmin gene expression during inflammation. *J Biol Chem*; 263:6281e7.
- Goyal, N., Rana, A., Ahlawat, A., Bijjem, K. R. V. and Kumar, P. (2014). Animal models of inflammatory bowel disease: A review. *Inflammopharmacology*, 22(4), 219–233.
- Grotto, D., Santa Maria, L., Valentini, J., Paniz, C., Schmitt, G., Garcia, S. C. and Farina, M. (2009). Importance of the lipid peroxidation biomarkers and methodological aspects for malondialdehyde quantification. *Quimica Nova*, 32(1), 169–174.

- Hachfeld, B., and Schippmann, U. (2002). Occurrence and density of *Harpagophytum procumbens* in Namibia and South Africa. In *Proceedings of the Regional Devil's Claw Conference* (pp. 157-163).
- Haider, S. and Knöfler, M. (2009). Human Tumour Necrosis Factor: Physiological and Pathological Roles in Placenta and Endometrium. *Placenta*, 30(2), 111–123.
- Halliwell, B., and Gutteridge, J. M. (2015). *Free radicals in biology and medicine*. Oxford university press, USA.
- Hanauer, S. B. (2006). Inflammatory bowel disease: Epidemiology, pathogenesis, and therapeutic opportunities. *Inflammatory Bowel Diseases*, 12(5 SUPPL. 1), 3–9.
- Head KA and Jurenka JS. (2003). Inflammatory bowel disease Part 1: ulcerative colitis-pathophysiology and conventional and alternative treatment options. *Altern Med Rev*, 2003; 8(3): 247-283.
- Heinrich, M., Barnes, J., Gibbons, S. and Williamson, E., (2004). Fundamentals of pharmacognosy and phytotherapy. Churchill Livingstone Press, Edinburgh.
- Huang, T. H. W., Tran, V. H., Duke, R. K., Tan, S., Chrubasik, S., Roufogalis, B. D., and Duke, C. C. (2006). Harpagoside suppresses lipopolysaccharide-induced iNOS and COX-2 expression through inhibition of NF- κ B activation. *Journal of ethnopharmacology*, 104(1-2), 149-155
- Inaba, K., Murata, K., Naruto, S. and Matsuda, H. (2010). Inhibitory effects of Devil's claw (secondary root of *Harpagophytum procumbens*) extract and harpagoside on cytokine production in mouse macrophages. *Journal of Natural Medicines*, 64(2), 219-222.
- Jungbauer, A. and Medjakovic, S. (2012). Anti-inflammatory properties of culinary herbs and spices that ameliorate the effects of metabolic syndrome. *Maturitas*, 71, 227-239.
- Kari S., Subramanian K., Altomonte I.A. and Murugesan A. (2022). Programmed cell death detection methods: a systematic review and a categorical comparison. *Apoptosis*, 27(7-8), 482–508.
- Karlinger, K., Györke, T., Makö, E., Mester, A. and Tarjan, Z. (2000). The epidemiology and the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *European Journal of Radiology*, 35(3), 154–167.
- Kasai, H., Crain, P.F., Kuchino, Y., Nishimura, S., Ootsuyama, A., and Tanooka, H., (1986). Formation of 8-hydroxyguanine moiety in cellular DNA by agents producing oxygen radicals and evidence for its repair. *Carcinogenesis* 7, 1849e1851
- Kaya, C., Çalışkan, Y., ve Yönden, Z. (2012). Apoptozis. *The Medical Journal of Mustafa Kemal University*, 3(11), 26-37.
- Kemper, K. J. (2008). Devil's claw (*Harpagophytum procumbens*). *Longwood Herb Task Force*, 13(3), 1-11.
- Klebanoff, SJ. (1992). Bactericidal effect of Fe²⁺, ceruloplasmin, and phosphate. *Arch Biochem Biophys* 295:302e8
- Kuralay, F., Yildiz, C., Ozutemiz, O., Islekel, H., Caliskan, S., Bingol, B. ve Ozkal, S. (2003). The effects of trimetazidine on acetic acid induced colitis in female swiss rats. *Journal of Toxicology and Environmental Health*, 66: 169-79.
- Lanthers, M., Fleurentin, J., Mortier, F., Vinche, A. and Younos C. (1992). Anti-inflammatory and analgesic effects of an aqueous extract of *Harpagophytum procumbens*. *Planta Med* 58: 117– 123
- Lee, S. H., Kwon, J. and Cho, M. La. (2018). Immunological pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Intestinal Research*, 16(1), 26–42.
- Lewis, J. D., Gary, J. J. D. and Lichtenstein, R. (2004). Cancer Risk In Patients With Inflammatory Bowel Disease. *Cancer*, 100(5), 1026–1034.

- Lim, D.W., Kim, J.G., Han, D. and Kim Y.T. (2014). Analgesic effect of *Harpagophytum procumbens* on postoperative and neuropathic pain in rats. *Molecules*, 19(1), 1060-1068.
- Low, D., Nguyen, D. D. and Mizoguchi, E. (2013). Animal models of ulcerative colitis and their application in drug research. *Drug Design, Development and Therapy*, 7, 1341-1356.
- Mahgoub, A. (2003). Evaluating the prophylactic potential of zafirlukast against the toxic effects of acetic acid on the rat colon. *Toxicol. Lett.*
- Mahomed, M. and Ojewole, J. (2006). Anticonvulsant activity of *Harpagophytum procumbens* DC Pedaliaceae secondary root aqueous extract in mice. *Brain Res Bull* 69: 57-62
- Manez, S., Alcaraz, M., Paya, M., Rios, J. and Hancke J. (1990). Selected extracts from medicinal plants as anti-inflammatory agents. *Planta Med* 56: 656.
- Margaret, K. T., Squier, J. and Cohen, J. (2001). Standard Quantitative Assays for Apoptosis, 19.
- Masaki, T., Kishiki, T., Kojima, K., Asou, N., Beniya, A. and Matsuoka, H. (2018). Recent trends (2016-2017) in the treatment of inflammatory bowel disease. *Annals of Gastroenterological Surgery*, 2(4), 282-288.
- Maury, C. P. J. and Teppo, A. M. (1989). Circulating tumour necrosis factor- α (cachectin) in myocardial infarction. *Journal of Internal Medicine*, 225(5), 333-336.
- Mehrabani, D. and A, Almasi-Hashiani. (2012). Evaluation of the 5-year survival rate and demographic factors in colorectal cancer patients J. Zanzan Univ Med. Sci. *Health Services.*, 20: 12-21. [In Persian].)
- Menghini L., Recinella L., Leone S., Chiavaroli A., Cicala C., Brunetti L., Vladimir-Knezevic S., Orlando G. and Ferrante C. (2019). Devil's claw (*Harpagophytum procumbens*) and chronic inflammatory diseases: A concise overview on preclinical and clinical data. *Phytother. Res.* 33, 2152-2162
- Mncwangi, N., Chen, W., Vermaak, I., Viljoen, A. M. and Gericke, N. (2012). Devil's Claw - A review of the ethnobotany, phytochemistry and biological activity of *Harpagophytum procumbens*. *Journal of Ethnopharmacology*, 143(3), 755-771.
- Molodecky, N. A., and Kaplan, G. G. (2010). Environmental risk factors for inflammatory bowel disease. *Gastroenterology and hepatology*, 6(5), 339.
- Molodecky, N. A., Soon, I. S., Rabi, D. M., Ghali, W. A., Ferris, M., Chernoff, G. and Kaplan, G. G. (2012). Increasing incidence and prevalence of the inflammatory bowel diseases with time, based on systematic review. *Gastroenterology*, 142(1), 46-54.e42.
- Morris, G. P., Beck, P. L., Herridge, M. S., Depew, W. T., Szewczuk, M. R. and Wallace, J. L. (1989). Hapten-induced model of chronic inflammation and ulceration in the rat colon. *Gastroenterology*, 96(2), 795-803.
- Nakamura, K., Kitani, A., Fuss, I., Pedersen, A., Harada, N., Nawata, H., and Strober, W. (2004). TGF- β 1 plays an important role in the mechanism of CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cell activity in both humans and mice. *The Journal of Immunology*, 172(2), 834-842.
- Niu X, Zhang H, Li W, Wang Y, Mu Q. and Wang X. (2015). Protective effect of cavidine on acetic acid-induced murine colitis via regulating antioxidant, cytokine profile and NF- κ B signal transduction pathways. *Chem Biol Interact*; 239:34-45.
- Norbury, C. J., and Hickson, I. D. (2001). Cellular responses to DNA damage. *Annual review of pharmacology and toxicology*, 41(1), 367-401.

- Olsen, T., Goll, R., Cui, G., Husebekk, A., Vonen, B., Birketvedt, G. S., and Florholmen, J. (2007). Tissue levels of tumor necrosis factor- α correlates with grade of inflammation in untreated ulcerative colitis. *Scandinavian journal of gastroenterology*, 42(11), 1312-1320.
- Oltval, Z. N., Milliman, C. L. and Korsmeyer, S. J. (1993). Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell*, 74(4), 609–619.
- Özgün, E., Özgün, G. S., Eskiocak, S., Yalçın, Ö. ve Gökmen, S. S. (2013). Deneyisel kolitte L-karnitin serum paraoksonaz, arilesteraz ve laktonaz aktivitelerine ve oksidatif duruma etkisi. *Turkish Journal of Biochemistry*, 38(2), 145–153.
- Öztürk, C., Genel, F., Aksu, G., Bakiler, A.R. ve Kütükçüler, N. (2002). Jüvenil ankilozan spondilit ve enflamatuvar bağırsak hastalığı olan bir hastada anti-tümör nekrozis faktör-alfa monoklonal antikor tedavisi. *Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi*, 46, 203-206.
- Papadakis, K. A., and Targan, S. R. (2000). Role of cytokines in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Annual review of medicine*, 51(1), 289-298.
- Parenti, C., Arico, G., Pennisi, M., Venditti, A. and Scoto, G.M. (2016). Harpagophytum procumbens extract potentiates morphine antinociception in neuropathic rats. *Natural Product Research*, 30(11), 1248-1255.
- Patil, M., Kandhare, A. D., and Bhise, S. D. (2012). Effect of aqueous extract of Cucumis sativus Linn. fruit in ulcerative colitis in laboratory animals. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 2(2), S962-S969.
- Perrone, S., Tataranno, M. L., Negro, S., Longini, M., Marzocchi, B., Proietti, F. and Giuseppe, G. (2010). Early identification of the risk for free radical-related diseases in preterm newborns. *Early Human Development*, 86(4), 241–244.
- Pravda, J. (2005). Radical induction theory of ulcerative colitis. *World J Gastroenterol*; 11(16):2371-84.
- Qin, H. Y., Wu, J. C. Y., Tong, X. D., Sung, J. J. Y., Xu, H. X. and Bian, Z. X. (2011). Systematic review of animal models of post-infectious/post-inflammatory irritable bowel syndrome. *Journal of Gastroenterology*, 46(2), 164–174.
- Rachmilewitz, D., Barbier, F., Defrance, P., De Reuck, M., Devis, G., DeVos, M. and Labayle, D. (1989). Coated mesalazine (5-aminosalicylic acid) versus sulphasalazine in the treatment of active ulcerative colitis: A randomised trial. *British Medical Journal*, 298(6666), 82–86.
- Rajendran, P., Nandakumar, N., Rengarajan, T., Palaniswami, R., Gnanadhas, E. N., Lakshminarasiah, U. and Nishigaki, I. (2014). Antioxidants and human diseases. *Clinica Chimica Acta*, 436, 332–347.
- Rajendran, V., Natarajan, V., and Devaraj, S. N. (2018). Anti-inflammatory activity of Alpinia officinarum hance on rat colon inflammation and tissue damage in DSS induced acute and chronic colitis models. *Food Science and Human Wellness*, 7(4), 273-281.
- Ray, G., (2016). Inflammatory bowel disease in India Past, present and future. *World Journal of Gastroenterology* 22, 8123-8136.
- Roda, G., Marocchi, M., Sartini, A. and Roda, E. (2011). Cytokine networks in ulcerative colitis. *Ulcers*, 2011, 1–5.
- Rutgeerts, P. (1998). Medical therapy of inflammatory bowel disease. *Digestion*; 59:453-69.
- Sachar, D. B. (1995). Maintenance therapy in ulcerative colitis and Crohn's disease. *Journal of clinical gastroenterology*, 20(2), 117-122.

- Sadlack, B., Merz, H., Schorle, H., Schimpl, A., Feller, A. C. and Horak, I. (1993). Ulcerative colitis-like disease in mice with a disrupted interleukin-2 gene. *Cell Press*, 75(2), 253–261.
- Safarpour, A.R., Hosseini, S.V. and Mehrabani D. (2013). Epidemiology of inflammatory bowel diseases in Iran and Asia; A mini review. *Iran J. Med. Sci.*, 38: 140-149.
- Sanchez-Fidalgo, S., Villegas, I., Aparicio-Soto, M., Cardeno, A., Rosillo, M. and Gonzalez, A. (2015). Effects of dietary virgin olive oil polyphenols: Hydroxytyrosyl acetate and 3, 4-dihydroxyphenylglycol on DSS-induced acute colitis in mice. *J Nutr Biochem*; 26:513-20.
- Sanders, M. and Grundmann, O. (2011). The use of glucosamine, devil's claw (*Harpagophytum procumbens*), and acupuncture as complementary and alternative treatments for osteoarthritis. *Alternative Medicine Review*, 16(3), 228.
- Sanders, M. and Grundmann, O. (2015). Diabet the use of glucosamine , devil's claw (*Harpagophytum procumbens*), and acupuncture as complementary and alternative treatments for *PubMed Commons*, 16(3), 21951024.
- Sartor, R. B. (2006). Mechanisms of disease: Pathogenesis of Crohn's disease and ulcerative colitis. *Nature Clinical Practice Gastroenterology and Hepatology*, 3(7), 390–407.
- Satoh, H., Sato, F., Takami, K. and Szabo, S. (1997). New ulcerative colitis model induced by sulfhydryl blockers in rats and the effects of antiinflammatory drugs on the colitis. *Japanese Journal of Pharmacology*, 73(4), 299–309.
- Sawa, T., Nakao, M., Akaike, T., Ono, K. and Maeda, H. (1999). Alkylperoxyl radical-scavenging activity of various flavonoids and other phenolic compounds. Implications for the anti-tumor-promoter effect of vegetables. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(2), 397–402.
- Schreck, R., Meier, B., Mannel, D.N., Droge, W. and Baeuerle, P.A., (1992). Dithiocarbamates as potent inhibitors of nuclear factor- κ B activation in intact cells. *J. Exp. Med.* 175, 1181–1194.
- Schwartz, A., Targan, R., Saxon, A. and Weinstein W. (1982). Sulfasalazineinduced exacerbation of ulcerative colitis. *N Engl J Med*; 306:409.
- Sedghi, S., Fields J.Z., Klamut, M., Urban, G., Durkin, M., Winship, D., Fretland, D., Olyaei, M. and Keshavarzian A. (1993). Increased production of luminol enhanced chemiluminescence by the inflamed colonic mucosa in patients with ulcerative colitis. *Gut*; 34: 1191 7.
- Serrano, A., Ros, G. and Nieto, G. (2018). Bioactive compounds and extracts from traditional herbs and their potential anti-inflammatory health effects. *Medicines*, 5(3), 76.
- Seyedian, S., Nokhostin, F. and Malamir, M (2019). A review of the diagnosis, prevention, and treatment methods of inflammatory bowel disease. *Journal of Medicine and Life*, 12(2): 113-122.
- Soliman, N. A., Keshk, W. A., Rizk, F. H., and Ibrahim, M. A. (2019). The possible ameliorative effect of simvastatin versus sulfasalazine on acetic acid induced ulcerative colitis in adult rats. *Chemico-biological interactions*, 298, 57-65.
- Soulamani, R., Younos, C., Mortier, F., and Derrieu, C. (1994). The role of stomachal digestion on the pharmacological activity of plant extracts, using as an example extracts of *Harpagophytum procumbens*. *Canadian journal of physiology and pharmacology*, 72(12), 1532-1536.
- Sunderman, F. W. and Nomoto, S. (1970). Measurement of human serum ceruloplasmin by its p-phenylenediamine oxidase activity. *Clinical chemistry*, 16(11), 903-910.
- Shayan, M., Barangi, S., Hosseinzadeh, H. and Mehri S. (2023): The protective effect of natural or chemical compounds against arsenic-induced neurotoxicity: Cellular and molecular mechanisms. *Food Chem.Toxicol.*, 175, 113691.

Stewart, K. M. and Cole, D. (2005). The commercial harvest of devil's claw (*Harpagophytum* spp.) in southern Africa: The devil's in the details. *Journal of Ethnopharmacology*, 100(3), 225–236. doi:10.1016/j.jep.2005.07.004

Sticher, O. (1977). Plant mono and sesquiterpenoids with pharmacological or therapeutical activity. In *New Natural Products and Plant Drugs with Pharmacological, Biological or Therapeutical Activity: Proceedings of the First International Congress on Medicinal Plant Research, Section A, held at the University of Munich, Germany, September 6–10, 1976* (pp. 137-176). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.

Sun, Y. I., Oberley, L. W. and Li, Y. (1988). A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clinical Chemistry*, 34(3), 497-500.

Tahan, G., Aytac, E., Aytekin, H., Gunduz, F., Dogusoy, G., Aydin, S., and Uzun, H. (2011). Vitamin E has a dual effect of anti-inflammatory and antioxidant activities in acetic acid-induced ulcerative colitis in rats. *Canadian journal of Surgery*, 54(5), 333.

Thippeswamy, B.S., Mahendran, S., Biradar, M.I., Raj, P., Srivastava, K., Badami, S. and Veerapur, V.P. (2011). Protective effect of embelin against acetic acid induced ulcerative colitis in rats. *European Journal of Pharmacology*, 654 (1), 100-105.

Tözün, N., Atuş, O., İmeryüz, N., Hamzaoglu, H. O., Tiftikçi, A., Parlak, E. ve Tuncer, İ. (2009). Clinical characteristics of inflammatory bowel disease in Turkey: A multicenter epidemiologic survey. *Journal of Clinical Gastroenterology*, 43(1), 51–57. doi:10.1097/MCG.0b013e3181574636

Travis, S., Farrant, M. and Ricketts C. (1996). Predicting outcome in severe ulcerative colitis. *Gut*; 38: 905

Tunçtan, B. ve Abacioğlu, N. (1998). Biyolojik örneklerde nitrik oksit ölçümü : *Diazotizasyon Yöntemi*, 161–170.

Üçüncü, Y., Çelik, N., Öztürk, C., Türkoğlu, M., Çetin, N., Kockara, N., Şener, E., Dundar, C., Arslan, A., Dogan, H., Kurt, N. ve Süleyman, H. (2015). Chondroprotective effects of a new glucosamine combination in rats: gene expression, biochemical and histopathological evaluation. *Life Sciences*, 130, 31-37.

Ungaro, R., Mehandru, S., Allen, P. B., Peyrin-Biroulet, L. and Colombel, J. F. (2017). Ulcerative colitis. *The Lancet*, 389(10080), 1756–1770.

Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T. D., Mazur, M. and Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 39(1), 44–84.

Van den Eynden V, Vernemmen P, and Van Damme P (1992). The Ethnobotany of the Topnaar. *Universite of Gent*, Gent

Van, W. and Van, Staden, J. (2002). A review of ethnobotanical research in southern Africa. *South African Journal of Botany*, 68(1), 1–13.

Vassiliev, V., Harris, Z. L., and Zatta, P. (2005). Ceruloplasmin in neurodegenerative diseases. *Brain Research Reviews*, 49(3), 633-640.

Verspaget, H. W., Pena, A. S., Weterman, I. T., and Lamers, C. B. (1988). Diminished neutrophil function in Crohn's disease and ulcerative colitis identified by decreased oxidative metabolism and low superoxide dismutase content. *Gut*, 29(2), 223-228.

Wang, Z., Li, S., Cao, Y., Tian, X., Zeng, R., Liao, D. F. and Cao, D. (2016). Oxidative stress and carbonyl lesions in ulcerative colitis and associated colorectal cancer. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016.

- Warren, L. (1959). The thiobarbituric acid assay of sialic acids. *J Biol Chem*; 234: 1971-1975.
- Waters, J. P., Pober, J. S. and Bradley, J. R. (2013). Tumour necrosis factor in infectious disease. *Journal of Pathology*, 230(2), 132–147.
- Watt, J.M., and Breyer-Brandwijk, M.G. (1962). The Medicinal and Poisonous Plants of Southern and Eastern Africa being an Account of their Medicinal and other Uses, Chemical Composition, Pharmacological Effects and Toxicology in Man and Animal. *The Medicinal and Poisonous Plants of Southern and Eastern Africa being an Account of their Medicinal and other Uses, Chemical Composition, Pharmacological Effects and Toxicology in Man and Animal.*, (Edn 2).
- Whitehouse, L. W., Znamirowska, M. and Paul, C. J. (1983). Devil's Claw (*Harpagophytum procumbens*): No evidence for anti-inflammatory activity in the treatment of arthritic disease. *Canadian Medical Association Journal*, 129(3), 249–251.
- Wilks, S. and Moxon, W. (1875). Lectures on Pathological Anatomy. Ed. *Churchill, Ed.*
- Xavier, R. J., and Podolsky, D. K. (2007). Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature*, 448(7152), 427-434.
- Xia, B., Guo, H. J., Crusius, J. B. A., Deng, C. S., Meuwissen, S. G. M., and Pena, A. S. (1998). In vitro production of TNF α , IL-6 and sIL-2R in Chinese patients with ulcerative colitis. *World Journal of Gastroenterology*, 4(3), 252.
- Xu, G. W., Yao, Q. H., Weng, Q. F., Su, B. L., Zhang, X., and Xiong, J. H. (2004). Study of urinary 8 hydroxydeoxyguanosine as a biomarker of oxidative DNA damage in diabetic nephropathy patients. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 36(1), 101-104.
- Yadav, U. C. and Ramana, K. V. (2013). Regulation of NF- κ B-induced inflammatory signaling by lipid peroxidation-derived aldehydes. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2013.
- Yamada, T., Marshall, S., Specian, R. D. and Grisham, M. B. (1992). A comparative analysis of two models of colitis in rats. *Gastroenterology*, 102(5), 1524–1534.
- Yamada, T., Alpers, D. H., Kalloo, A. N., Kaplowitz, N., Owyang, C., and Powell, D. W. (2011). *Textbook of gastroenterology*. John Wiley & Sons.
- Yang, F., Naylor, S. L., Lum, J. B., Cutshaw, S., McCombs, J. L., Naberhaus, K. H., and Barnett, D. R. (1986). Characterization, mapping, and expression of the human ceruloplasmin gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 83(10), 3257-3261.
- Yoshioka, T., Kawada, K., Shimada, T., and Mori, M. (1979). Lipid peroxidation in maternal and cord blood and protective mechanism against activated-oxygen toxicity in the blood. *American journal of obstetrics and gynecology*, 135(3), 372-376.
- Zhang, L., Feng, L., Jia, Q., Xu, J., Wang, R., Wang, Z. and Li, Y. (2011). Effects of β -glucosidase hydrolyzed products of harpagide and harpagoside on cyclooxygenase-2 (COX-2) in vitro. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 19(16), 4882–4886.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı	Mustafa ERKEK
Eğitim	
Lise	Şarkikaraağaç Veteriner Sağlık Meslek Lisesi (2004)
Lisans	Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi (2010-2016)
Yüksek Lisans	
Doktora	Balıkesir Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı (2018-)
Yabancı Dil Bilgisi	
İngilizce	Orta derecede
Üye Olunan Mesleki Kuruluşlar	
Kuruluş Adı	Farmakoloji ve Toksikoloji Derneği



T.C.
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU
Çağış Yerleşkesi, (Bigadiç yolu üzeri 17. km) 10145, BALIKESİR-TÜRKİYE
ARAŞTIRMA BAŞVURUSU DEĞERLENDİRME FORMU

BAŞVURU BİLGİLERİ	ARAŞTIRMANIN ADI	"Harpagophytum procumbens Ekstraktı'nın Deneysel Rat Kolit Modelinde Koruyucu Etkilerinin Araştırılması"
	PROJE YÜRÜTÜCÜSÜ KURUMU	Doç. Dr. Dilek AKŞİT BAÜN Veteriner Fakültesi
	YARDIMCI ARAŞTIRICILAR	Vet. Hek. Mustafa ERKEK Tarım ve Orman Bakanlığı Kepsut İlçe Müd.
	ARAŞTIRMANIN NİTELİĞİ	Doktora
	ARAŞTIRMANIN SÜRESİ	15.06.2021 - 15.06.2023
	KULLANILACAK HAYVAN TÜRÜ VE SAYISI	SIÇAN – 40 adet

DEĞERLENDİRİLEN İLGİLİ BELGELER	Belge Adı	Tarihi
	HADYEK BAŞVURU FORMU	15/02/2021

KARAR BİLGİLERİ	Karar No : 2021/2-4	Tarih : 04.03.2021
	Yukarıda başvuru bilgileri verilen araştırma projesi gerekçe, amaç ve yöntemler dikkate alınarak görüşüldü ve ilgili belgeler incelendi. Projenin etik açıdan uygun olduğuna, çalışmanın aşağıdaki hususlar dikkate alınarak yürütülmesine ve sorumlu araştırmacıya iletilmesine oy birliği ile karar verildi. 1) Projede herhangi bir değişiklik gerektiğinde kurulumuzdan onay alınması, 2) Projede çalışacağı bildirilen araştırmacılar da değişiklik olduğunda kurulumuzdan onay alınması, 3) Çalışma süresinde tamamlanamaz ise ek süre talebinde bulunulması, 4) Çalışma tamamlandığında sonuç raporunun gönderilmesi.	

ETİK KURUL BİLGİLERİ

ÜYELER				
Unvanı / Adı / Soyadı EK Üyeliği	Uzmanlık Dalı	Kurumu	İlişki (*)	İmza
Dr. Öğr. Üyesi Elif AKSÖZ Başkan	Tıbbi-Farmakoloji	Tıp Fakültesi	☐ E ☒ H	
Prof. Dr. Gülten ERKEN Başkan Yardımcısı	Tıbbi- Fizyoloji	Tıp Fakültesi	☐ E ☒ H	
Prof. Dr. Ziya İLHAN Üye	Veteriner - Mikrobiyoloji	Veteriner Fakültesi	☐ E ☒ H	
Doç. Dr. Hatice YILDIRIM Üye	Moleküler Biyoloji ve Genetik	Fen Edebiyat Fakültesi	☐ E ☒ H	
Doç. Dr. Muharrem EROL Üye	Veteriner Cerrahi	Veteriner Fakültesi	☐ E ☒ H	
Dr. Öğr. Üyesi Fatih UĞUN Üye	Tıp-Anesteziyoloji ve Reanimasyon	Tıp Fakültesi	☐ E ☒ H	
Hacer ERDEN Üye	Sivil Toplum Kuruluş Üyesi	Ev Hanımı	☐ E ☒ H	
Mehmet UÇAR Üye	Sivil Üye	Emekli	☐ E ☒ H	
Vet. Hek. Mustafa H. YARANOĞLU Üye	Veteriner Hekim	BAUNDEHAM	☐ E ☒ H	

(*) Başvurulan Projelerde Proje Sahibi veya Yardımcı Araştırmacıların birinin Yerel Etik Kurul Üyesi veya 1. Derece Akrabası olması halinde ilgili üye proje kurur görüşmesine katılamaz.

EK-2. Bap Sözleşmesi



T.C.
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ BİRİMİ
SÖZLEŞMESİ

PROJE NO: 2021/008

MADDE 1: Balıkesir Üniversitesi tarafından desteklenmesine karar verilen **2021/008** no' lu, "**Harpagophytum procumbens Ekstraktı'nın Deneysel Rat Kolit Modelinde Koruyucu Etkilerinin Araştırılması**" isimli projenin, Bilimsel Araştırma Projeler Yönergesiyle belirlenen esaslar dahilinde yürütülmesi ve sonuçlandırılması amacıyla Balıkesir Üniversitesi Rektör Yardımcısı **Prof. Dr. Cevdet AVCIKURT** ile proje yürütücüsü **Doç. Dr. Dilek AKŞİT** arasında aşağıda belirlenen koşullarla işbu sözleşme imzalanmıştır.

MADDE 2: Proje yürütücüsü, projenin Balıkesir Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönergesi ve bu sözleşme hükümlerinde öngörülen amaç, kapsam, süre ve diğer hususlara uygun olarak yürütülmesi ve sonuçlandırılmasından sorumludur.

MADDE 3: Desteklenmesi kabul edilen projenin amaç, kapsam, süre, program, yardımcı araştırmacılar ve bütçesinde yapılacak değişiklikler, Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonunun kararıyla mümkündür.

MADDE 4: Bilimsel Araştırma Projeleri kapsamında alınan demirbaşlar bölüm ayniyat mutemetlerine zimmetlenir. Adı geçen demirbaş ürününün proje bitim tarihinden itibaren 1 (bir) ay içerisinde iade edilmesinden proje yürütücüsü sorumlu olup, iade işleminin belirlenen süre içerisinde yapılmamasının sonucunda proje yürütücüsü ürün bedelini karşılayacağını kabul eder.

MADDE 5: Proje yürütücüsü, aşağıdaki tarihlerde ara ve sonuç raporlarını istenilmeden teslim etmek zorundadır :

1.Ara Rapor - 27-04-2021 - 26-10-2021

2.Ara Rapor - 27-10-2021 - 26-04-2022

3.Ara Rapor - 27-04-2022 - 26-10-2022

Sonuç Raporu - 27-10-2022 - 17-11-2023

Ayrıca istenildiğinde proje ile ilgili ayrıntılı bilgileri ve kayıtları Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonuna vermekle yükümlüdür. Ara Raporlarının, kabul edilebilir mazeret bildirmeksizin bu sözleşme ile belirlenen tarihlerde teslim edilmemesi halinde proje yürütücüsüne ödeme yapılmaz bu durumda Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu projeyi iptal edebileceği gibi proje yürütücüsünün değiştirilmesine de karar verebilir.

Bilimsel Araştırmalar Birimi tarafından desteklenen projeler Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonunun ve / veya bu komisyonun belirleyeceği proje izleyicileri tarafından yerinde incelenebilir; proje yürütücüsü izleyicilere istenilen her türlü belgeyi vermekle yükümlüdür.

MADDE 6: Proje yürütücüsü, sonuçlanan projenin tüm yönlerini ve sonuçlarını kapsayan Kesin raporunu sözleşme tarihinin sona ermesinden itibaren dört ay içinde Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'nce hazırlanmış olan "**Kesin Raporu**" formatına uygun olarak Bilimsel Araştırma Projeleri Birimine vermekle yükümlüdür. **Kesin Raporun kabul edilen sürede sunulmaması veya kabul edilebilir bir mazeret bildirilmemesi halinde proje iptal edilir.**

Bilimsel Araştırmalar ciltlenmiş olarak sunulan "**Kesin Raporu**" Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından incelendikten sonra kabul edilebilir veya gerekli düzeltmelerin yapılması istenebilir. Yapılan değişikliklerden sonra **Kesin Raporu** yeniden değerlendirilir. Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından Kesin Raporda yapılması istenilen değişiklikler için tanınan süre azami proje süresinin kullanılmış olması halinde 2 ayı geçemez.

MADDE 7: Proje yürütücüsünün gerçekçi gerekçeler sunması koşuluyla, projeye en fazla toplam bütçesinin %50'si kadar ek ödenek ve / veya 1 yıla kadar ek süre verilmesi konusu Komisyon tarafından değerlendirilebilir.

MADDE 8: Proje yürütücüsü, tamamlanan proje ile ilgili veri, kayıt ve dokümanları en az 10 yıl saklamak zorundadır.

MADDE 9: Proje yürütücüsü, proje ile ilgili verileri ve bulguları, yayınladığı her türlü yazı, makale ve sunduğu bildirilerde "Balıkesir Üniversitesi tarafından desteklenmiştir." ibaresini belirtmek zorundadır.

MADDE 10: Proje ile ilgili çalışmaların sürdürülmesinde, işyeri ve proje personeli yönünden çalışmanın gerektirdiği her türlü güvenlik önlemlerinin alınmasından proje yürütücüsü sorumludur.

MADDE 11: Bilimsel Araştırma Birimi Komisyonunca desteklenmek suretiyle ele alınan bu projenin sonucunda 17.7.1963 tarih ve 278 sayılı Kanunun 2/a maddesine göre bir ihtira meydana gelirse bu ihtira aynı kanunun 21. maddesi uyarınca Bilimsel Araştırma Birimi Komisyonuna ait olacaktır. Ancak Bilimsel Araştırma Birimi Komisyonunun bu ihtiradan dolayı usulüne uygun olarak istihsal edeceği patenti satma yahut kiralama yolu ile elde edeceği bedel veya kiranın %30'u ihtirayı yapan veya yapanlara verilecektir.

MADDE 12: Projeden elde edilen bilimsel sonuçların telif hakkı Balıkesir Üniversitesine aittir.

MADDE 13: Proje kapsamında alınan araç-gereç vb. Üniversitemiz Öğretim Elemanlarının kullanımına açıktır.

MADDE 14: Bu sözleşme ile öngörülen toplam maddi destek miktarı ve ödeme planı bilimsel araştırma projeleri ödeneklerinin nakit akışında meydana gelebilecek kısıntıların neden olacağı aksamalar mücbir sebep olarak kabul edilir ve bu nedenle taraflar sorumlu tutulamazlar.

MADDE 15: Lisansüstü Öğrenim Araştırma projelerinden tez basımı dışında, bir (1) yıl içinde yayın yapılmadığı takdirde, tez yürütücüsü tezi yapanında adının geçmesi koşuluyla tezden yayın hazırlamak hakkına da sahiptir.

MADDE 16- Projeler kapsamında alınan makine ve teçhizat için ayrıca oda, derslik, laboratuvar vb. gibi yerler talep edilmeyecektir.

MADDE 17- Projeyi desteklemek amacıyla Balıkesir Üniversitesi tarafından 2021 yılı için; **TÜKETİME YÖNELİK MAL VE MALZEME ALIMLARI** : 28.444,80 TL, olmak üzere toplamda **28.444,80 TL** ödenek sağlanacaktır.

MADDE 18- .../.../2020 tarihinde taraflarca imzalanan bu sözleşmenin yürürlük süresi 24 aydır. Proje yürütücüsüne ek süre verilmesi halinde bu sözleşme ek sürede de geçerli olup, ayrı bir sözleşme imzalanmaz.

MADDE 19- Proje kapsamındaki yazışmalar, ara rapor, sonuç raporu, harcama işlemleri ve takibinde tüm sorumluluk proje yürütücüsüne ait olup, bu işlemlerden doğabilecek hata ve zararlar proje yürütücüsü tarafından karşılanır.

MADDE 20- Sözleşme giderleri Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından ödenir.

MADDE 21- Anlaşmazlık halinde yetkili merci Balıkesir Mahkeme ve İcra Daireleridir.

BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ
adına
Prof. Dr. Cevdet AVCIKURT
Rektör Yardımcısı

PROJE YÜRÜTÜCÜSÜ
Doç. Dr. Dilek AKŞİT
Öğretim Üyesi



Eğitimde, bilimde, sanatta çağdaş...

