

# Asetik asitle Kolit Geliştirilen Sıçanlarda N-asetilsisteinin Protein Oksidasyonuna Etkisi

## The Effect of N-acetylcysteine on Protein Oxidation of Acetic Acid-Induced Colitis in Rats

Aylin Yılmaz\*

Sevgi Eskiocak\*

Şemsi Altaner\*\*

Nesrin Turan\*\*\*\*

Trakya Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Edirne

\*Biyokimya Anabilim Dalı, \*\*Patoloji Anabilim Dalı, \*\*\*Biyoistatistik Anabilim Dalı

### ÖZET

**Amaç:** İnflamatuvar barsak hastalıklarının patogeneğinde oksidatif stresin önemli rol oynadığı ileri sürülmektedir. İnflamatuvar barsak hastalıklarından olan ülseratif kolitte oksidatif hasar sonucu protein oksidasyonu olduğu bildirilmektedir. Çalışmamızda; antioksidan etkinliği olan N-asetilsisteinin (NAC), ülseratif kolitin neden olduğu protein oksidasyonu üzerine etkisini araştırmayı amaçladık.

**Gereç ve Yöntem:** Bu çalışmada, ağırlıkları 200-250 g arasında değişen 40 adet erkek Wistar rat kontrol (n=10), kolit (n=10), NAC<sub>1</sub> tedavi (n=10) ve NAC<sub>2</sub> tedavi (n=10) olmak üzere rastgele 4 gruba ayrıldı. Kolit ve NAC tedavi gruplarına 1 mL asetik asit (pH 2.4, %4), kontrol grubundaki sıçanlara da serum fizyolojik intrarektal yoldan uygulandı. Asetik asit uygulamasının ardından 24. saatte, NAC<sub>1</sub> grubundaki sıçanlara 100 mg/kg dozunda, NAC<sub>2</sub> grubundakilere ise 500 mg/kg dozunda N-asetilsistein, kolit ve kontrol gruplarına ise serum fizyolojik (pH 7, %0.9'luk sodyum klorür) intraperitoneal olarak enjekte edildi. Rat tam kan örneklerinde; tam kan glutatyon, plazma tiyol, nitrotirozin, kolon doku örneklerinde total tiyol, non-protein tiyol, protein tiyol ve ileri oksidasyon protein ürün düzeyleri değerlendirildi.

**Bulgular:** Kolit grubu kolon dokusunda ileri oksidasyon protein ürün düzeyleri ve plazma nitrotirozin seviyeleri kontrol grubuna göre artmıştı (p<0.01). Kolon dokusu total tiyol düzeyleri kolit grubunda kontrol grubuna göre düşüktü (p<0.01). N-asetilsistein uygulaması, NAC<sub>1</sub> grubunda ileri oksidasyon protein ürün düzeylerini kontrol ve kolit grubuna göre azaltmıştı (sırasıyla; p<0.05, p<0.001).

**Sonuç:** Sonuç olarak N-asetilsistein kullanımı kolon dokusunda ülseratif kolitin neden olduğu protein oksidasyonunu kısmen önlemektedir.

**Anahtar Sözcükler:** Asetik asit, ülseratif kolit, N-asetilsistein, protein oksidasyonu

### ABSTRACT

**Objective:** Oxidative stress is suggested to play key role in the pathogenesis of inflammatory bowel diseases. Protein oxidation resulting from oxidative damage is notified in ulcerative colitis which is the one of the inflammatory bowel diseases. The aim of the study was to determine if N-acetylcysteine (NAC) was effective on protein oxidation resulting from ulcerative colitis.

**Materials and Methods:** During work, 40 male Wistar rats weighing 200 to 250 g were divided randomly into four groups: control (n=10), colitis (n=10), NAC<sub>1</sub> treatment (n=10) and NAC<sub>2</sub> treatment (n=10). 1 ml acetic acid (pH 2.4, 4%) was administered by intrarectal route to colitis and NAC treatment groups, whereas serum physiologically was administered to control group. N-acetylcysteine was injected to NAC<sub>1</sub> group (100 mg/kg) and NAC<sub>2</sub> group (500 mg/kg) intraperitoneally, while colitis and control groups were injected with serum physiologically (pH 7, %0.9 sodium chloride) at 24th hours after the acetic acid administration. In whole blood samples; whole blood glutathione, plasma thiol, nitrotyrosine, colon tissue samples total thiol, non-protein thiol, protein thiol, and advanced oxidation protein products were measured.

**Results:** Advanced oxidation protein products in colonic tissues, and plasma nitrotyrosine levels of colitis group were elevated in comparison with control group (both; p<0.01). A decrease was observed colonic tissue total-SH levels of colitis group as compared with control group (p<0.01). In NAC<sub>1</sub> group administration of N-acetylcysteine decreased the advanced oxidation protein products levels compared to control and colitis groups. (p<0.05, p<0.001; respectively).

**Conclusion:** As a result, administration of N-acetylcysteine partially prevents colonic tissue protein oxidation results from ulcerative colitis.

**Key Words:** Acetic acid, ulcerative colitis, N-acetylcysteine, protein oxidation

## GİRİŞ

İnflamatuvar barsak has talıkları (İBH) önemli bir sağlık sorunu olarak karşımıza çıkmaktadır. Son yıllarda bu hastalıkların görülme sıklığında belirgin bir artış dikkati çekmektedir. İnflamatuvar barsak hastalıkları ülseratif kolit (ÜK) ve Crohn hastalığı olarak ikiye ayrılır. Ülseratif kolitin lipid ve protein oksidasyonuna yol açtığı ileri sürülmektedir. Protein oksidasyonu; reaktif oksijen metabolitleri ile direkt veya oksidatif stresin sekonder ürünleri ile reaksiyonu sonucu indirekt olarak proteinlerin kovalent modifikasyonu olarak tanımlanır. Aminoasit yan zincirlerinin hidroksil veya karbonil türevlerine modifikasyonu, protein-protein çapraz bağlarının oluşumu ve polipeptid zincirlerinin parçalara ayrılması proteinlerin oksidatif reaksiyonlarının sonuçlarıdır. Protein oksidasyonunun biyokimyasal sonuçları ise enzim aktivitesinde azalma, protein fonksiyonlarının kaybı, proteaz inhibitör aktivitenin kaybı, protein agregasyonu, proteolize artmış/azalmış yakınlık, reseptör aracılıklı endositozun bozulması, gen transkripsiyonundaki değişimler, immünojen aktivitedeki artış olarak sıralanabilir (1).

Ekzojen bir antioksidan olan N-asetilsistein (NAC), L-sistein aminoasidinin N-asetil türevidir. N-asetilsistein, sahip olduğu tiyol (-SH) grupları nedeniyle süperoksit radikali, hidroksil

radikali, hipokloröz asit (HOCl) ve hidrojen peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) gibi oksidanlar ile direkt olarak etkileşerek radikal toplayıcı etki gösterir. Radikal toplayıcı etkisi in vitro oldukça hızlı olmasına rağmen in vivo hızlı parçalandığı için antioksidan etkisinin indirekt olduğu bildirilmektedir (2). N-asetilsistein deasetilasyona uğrayarak sistein oluşmasına yol açmaktadır. Sistein hücresel glutatyon sentezinde kullanılmaktadır. N-asetilsisteinin antioksidan rolünün glutatyon öncülü olması, glutatyon sentezinde yer alan enzimleri stimüle ederek hücresel glutatyon (GSH) azalmasını engellemesinden kaynaklandığı ileri sürülmektedir (3,4). N-asetilsistein, apoptozu önleyebilmekte, çeşitli proteinlerin aktivitelerini düzenleyerek hücrenin yaşam sürecini uzatmaktadır. Ayrıca, endotelial disfonksiyonunu azaltmakta, inflamasyon, fibroz, invazyon, kartilaj erozyonu, asetaminofen detoksifikasyonunun geciktirilmesini sağlamaktadır (5). Asetik asit ile oluşturulmuş deneysel kolit modellerinde NAC'in etkilerini inceleyen araştırmalara rastlanmıştır. Çetinkaya ve ark. (6) kolit grubunda lipid peroksidasyonunun arttığını, antioksidan enzim aktivitelerinde değişiklik olduğunu, NAC uygulaması ile lipid peroksidasyonunun önlendiğini ve dokudaki hasar şiddetinin azaldığını bildirmişlerdir. Akgün ve ark. (7) uzun süre NAC kullanımının oksidatif ve nitroztatif stres

parametresi olan nitrik oksit (NO<sup>\*</sup>) düzeyleri üzerinde etkinliği olduğunu bildirmişlerdir. Nosál'ová ve ark. (8) NAC tedavisinin oksidatif hasardan korunmada başarılı bir antioksidan etki gösterdiğini bildirmişlerdir. Kuralay ve ark. (9) asetik asit ile geliştirilmiş kolit modelinde kolit grubunda artan süperoksit dismutaz ve myeloperoksidaz enzim aktivitelerinin, NO<sup>\*</sup> düzeylerinin ve dokudaki hasar şiddetinin Trimetazidine tedavisi ile azaldığını, azalmış olan tümör nekroz faktörü alfa seviyelerinin ise arttırıldığını bildirmişlerdir.

Proteinlerde yapısal değişikliğe yol açan moleküler mekanizmalar, protein tiyol (P-SH) gruplarının oksidasyonu, nitrotirozin (NT), ileri oksidasyon protein ürünlerinin (AOPP) ve protein karbonil oluşumu olarak sıralanabilir (1). Literatürdeki kolit olgularında NAC kullanımının, lipid peroksidasyonuna karşı yararlı etkisi bulunduğunun gösterildiği ancak protein oksidasyonu konusunda araştırma yapılmadığı dikkati çekmektedir. Ayrıca, olgularda sınırlı sayıda oksidan parametrenin çalışıldığı görülmektedir. Nitrotirozin ve AOPP düzeylerinin ise değerlendirildiği hiçbir çalışmaya rastlanmamıştır. Çalışmamızın amacı asetik asit ile kolit oluşturulmuş sıçanlarda iki farklı dozda uygulanan N-asetilsisteinin tam kan, plazma ve kolon dokusunda protein oksidasyonu üzerine etkisini araştırmaktır. Çalışmamızda kan ve dokudaki redoks değişimini göstermek için plazmada tiyol ile kolon dokusunda total tiyol (T-SH), redoks değişimine karşı savunmayı göstermek için tam kanda GSH ve dokuda non protein tiyol (Np-SH) ölçümleri yapıldı. Proteinlerin oksidatif stresten etkilenme düzeyinin göstergesi olarak da plazmada NT, dokuda ise P-SH ve AOPP seviyeleri tespit edildi.

## GEREÇ VE YÖNTEM

Üniversitemiz yerel etik kurulu onayı alındıktan sonra standart koşullarda yetiştirilen, ağırlıkları 200-250 g arasında değişen, 40 adet erkek Wistar cinsi sıçan Deney Hayvanları

Birimi'nden temin edildi. Sıçanlar, %50-60 nem oranı, 22 ± 1 °C oda ısısı, ışık düzeni 12 saat gündüz/12 saat gece olan ortamda tutuldu ve araştırma süresince bazal diyet ile beslendi. Denekler kontrol (n=10), kolit (n=10), NAC<sub>1</sub> tedavi (n=10) ve NAC<sub>2</sub> tedavi (n=10) olmak üzere rastgele 4 gruba ayrıldı.

Kolon dokularında dışkı bulunmaması için deneyden 24 saat öncesinde aç bırakılan sıçanların suya serbest erişimleri sağlandı. Ketalar (50 mg/kg) ve rompun (10 mg/kg) anestezisi altında 30° trendelenburg pozisyonuna getirilen sıçanlara 8 mm'lik kateter, rektal yoldan 8 cm ileriye uzanacak şekilde yerleştirildi. Kolit, NAC<sub>1</sub> ve NAC<sub>2</sub> grubundaki sıçanlara pH 2.4, %4'lük asetik asitten 1 mL, kontrol grubundakilere ise 1 mL, serum fizyolojik intrarektal (ir) olarak uygulandı. Asetik asit veya serum fizyolojik uygulamasının ardından 24. saatte, NAC<sub>1</sub> grubundaki sıçanlara 100 mg/kg dozunda, NAC<sub>2</sub> grubundakilere 500 mg/kg dozunda NAC, kontrol ve kolit grubundakilere ise serum fizyolojik intraperitoneal (ip) olarak verildi. Tüm gruplardaki denekler intrarektal uygulamadan 48 saat sonra anestezi altında intrakardiyak ponksiyonla kan örnekleri ve ardından kolon doku materyalleri alınarak sakri fiye edildi.

Tam kanda GSH analizi Beutler ve ark. (10), plazma tiyol tayini Hu'nun (11) tanımladığı metodlara göre aynı gün içinde yapıldı. Tam kanda GSH sonuçları µmol/dl eritrosit, plazma tiyol sonuçları ise µmol/L olarak ifade edildi. Plazma ve doku örnekleri diğer protein oksidasyon göstergeleri çalışılmak üzere analiz gününe kadar -80°C'de saklandı.

Plazma örneklerinde NT analizi ticari kit (Hbt Hycult 501) kullanılarak ELISA yöntemi ile yapıldı. Sonuçlar nmol/L olarak ifade edildi.

Kolon dokuları Heidolph DIAX 900 marka homojenizatör kullanılarak, 1/10 (w/v) oranında 0.15 M KCl ile homojenize edildi. Homojenatların 2000xg ve ardından 4500xg'de santrifüj (Hettich Universal 30RF) edilmesiyle

sağlanan berrak süpernatantlarda T-SH, bu süpernatantlar deproteinize edildikten sonra Np-SH düzeyleri Sedlak ve Lindsay'in (12) tanımladıkları yöntemle göre analiz edildi. T-SH değerlerinden Np-SH değerleri çıkarılarak P-SH düzeyleri bulundu. Kolon dokusu AOPP düzeylerinin ölçümünde Witko-Sarsat ve ark.'nın (13) tanımladıkları metod kullanıldı. Doku protein tayini Lowry ve ark.'nın (14) tanımladıkları metodla spektrofotometrik (Shimadzu UV-1700A) olarak yapıldı. Tüm sonuçlar doku protein değeri ile oranlanarak nmol/mg protein olarak ifade edildi.

Kolon dokusunda makroskopik kolon hasarının derecesi 0'dan 4'e kadar skorlandı (7). Bu skorlama sisteminde 0: normal görünümlü mukozal tabaka, 1: hafif hiperemili mukozal tabaka, 2: belirsiz inflamasyonlu lineer ülserasyonlar, 3: kolon uzunluğu boyunca 5 mm'den küçük hemorojik lezyonlar ve granülomatoz lezyonlar, 4: iki veya daha fazla bölgede ülserasyonlar ve 5 mm'den büyük hemorojik lezyonlar ve/veya perforasyonu ifade etmektedir.

%10'luk formol solüsyonunda fiske edilen 0.5 cm çapındaki kolon segmentleri parafinle bloklanarak mikroskopik kesitler elde edildi. Hemotoksilen ve Eozin ile boyanan kesitler epitelyal hücre kaybı, kript absesi, goblet hücre hasarı ve inflamatuvar hücre infiltrasyonu açısından ışık mikroskopisi ile değerlendirildi. Mikroskopik hasarın derecesi 0'dan 3'e kadar skorlandı (7). Kolon dokusunda epitelyal hücre kaybı için; 0: yok, 1: <%5, 2: %5-10, 3: >%10, kript absesi için; 0: yok, 1: <%10, 2: %10-20, 3: >%20, goblet hücre hasarı için; 0: yok 1: var, inflamatuvar hücre infiltrasyonu için; 0: yok 1: az, 2: orta, 3: belirgin hasarlanmayı ifade etmektedir.

### İstatistiksel Analiz

Her bir grupta verilerin parametrik varsayımları yerine getirip getirmediğini incelemek için normal dağılıma uygunluk ve varyansların homojenliği testleri uygulandı. Tam

kanda GSH, plazmada NT ve dokudaki T-SH, Np-SH ile AOPP parametrelerinin değerlendirilmesinde bağımsız gruplar arasındaki istatistiksel farklılıkların belirlenmesi için Kruskal-Wallis varyans analizi ve ardından grupların karşılaştırılması için Bonferroni düzeltmeli Mann-Whitney U testi kullanılırken; plazma tiyol ile dokudaki P-SH parametrelerinin değerlendirilmesinde bağımsız gruplar arasındaki istatistiksel farklılıkların belirlenmesi için tek yönlü varyans analizi yöntemi ve sonrasında grupların karşılaştırılması için sırasıyla Tamhane T2 ve Bonferroni t post-hoc testleri kullanıldı. Elde edilen değerler ortalama±standart sapma olarak ifade edildi ve  $p<0.05$ 'in altındaki farklılıklar anlamlı olarak değerlendirildi. Dokularının histopatolojik değerlendirme sonuçları ise frekans tablosu şeklinde sunulmuştur.

### BULGULAR

Tam kan GSH, plazma NT ve plazma tiyol düzeyleri Tablo 1'de verilmiştir. Tam kan GSH düzeyinde gruplar arasında farklılık gözlenmezken kolit ile NAC<sub>1</sub> ve NAC<sub>2</sub> tedavi gruplarının plazma NT düzeyleri kontrol grubuna göre artmıştı (sırasıyla;  $p<0.01$ ,  $p<0.001$  ve  $p<0.001$ ). Her iki tedavi grubunun plazma NT düzeylerinin kolit grubuna göre arttığı (sırasıyla;  $p<0.05$  ve  $p<0.001$ ) ve NAC<sub>2</sub> grubundaki artışın NAC<sub>1</sub> grubuna göre de yüksek ( $p<0.001$ ) olduğu gözlemlendi. Plazma tiyol düzeyleri kolit ve NAC<sub>1</sub> tedavi gruplarında kontrol grubuna göre değişmemişken; NAC<sub>2</sub> tedavi grubunda ise kontrol ve NAC<sub>1</sub> gruplarına göre azalmıştı (ikisi;  $p<0.05$ ).

Grupların kolon dokusu T-SH, Np-SH, P-SH ve AOPP düzeyleri Tablo 2'de sunulmuştur. Kolit grubu ile her iki tedavi grubunun kolon dokusu T-SH düzeyleri kontrol grubuna göre anlamlı derecede azalırken (her biri için;  $p<0.01$ ) kolit grubu ile tedavi grupları arasında anlamlı bir fark gözlenmedi. Kolit grubunun Np-SH ve P-SH düzeyleri kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmedi. Ancak her iki

**Tablo 1.** Kontrol, kolit, NAC<sub>1</sub> tedavi ve NAC<sub>2</sub> tedavi gruplarının tam kan GSH ve plazma NT ve plazma tiyol değerleri (Ort ± SS).

Gruplar	Tam Kan GSH µmol/dl Erit <sup>§</sup>	Plazma NT nmol/L <sup>§</sup>	Plazma Tiyol µmol/L <sup>††</sup>
Kontrol (n=10)	13.25 ± 2.11	2.51 ± 0.43	339.61 ± 35.66
Kolit (n=10)	13.05 ± 1.75	3.11 ± 0.38 a**	327.06 ± 69.57
NAC <sub>1</sub> (n=10)	10.72 ± 2.52	3.49 ± 0.26 a*** b*	392.64 ± 97.39
NAC <sub>2</sub> (n=10)	12.46 ± 1.00	4.26 ± 0.30 a*** b*** c***	286.17 ± 31.50 a* c*
p	> 0.05 <sup>#</sup>	< 0.001 <sup>#</sup>	< 0.05 <sup>†</sup>

#: Kruskal wallis varyans analizi ile değerlendirildi, §: Mann-Whitney U testi ile değerlendirmede; †: Tek yönlü varyans analizi ile değerlendirildi. ††: Tamhane T2 post-hoc testi ile değerlendirilmedi; a: Kontrol grubu ile, b: Kolit grubu ile, c: NAC<sub>1</sub> grubu ile, \*: p<0.05, \*\*: p<0.01, \*\*\*: p<0.001, NAC<sub>1</sub>: N-asetilsistein 100 mg/kg dozunda, NAC<sub>2</sub>: N-asetilsistein 500 mg/kg dozunda, GSH: Glutasyon, NT: Nitrotirozin

**Tablo 2.** Kontrol, kolit, NAC<sub>1</sub> tedavi ve NAC<sub>2</sub> tedavi gruplarının kolon dokusu T-SH, Np-SH, P-SH ve AOPP değerleri (Ort ± SS).

Gruplar	T-SH <sup>§</sup> nmol/mg protein	Np-SH <sup>§</sup> nmol/mg protein	P-SH <sup>‡</sup> nmol/mg protein	AOPP <sup>§</sup> nmol/mg protein
Kontrol (n=10)	86.47 ± 13.30	15.39 ± 4.95	70.72 ± 14.62	69.84 ± 14.61
Kolit (n=10)	65.66 ± 11.52 a**	11.59 ± 4.21	53.03 ± 9.97	97.76 ± 32.44 a**
NAC <sub>1</sub> (n=10)	57.93 ± 16.99 a**	29.72 ± 6.51 a*** b***	28.21 ± 16.27 a*** b**	58.02 ± 10.39 a* b***
NAC <sub>2</sub> (n=10)	68.54 ± 12.44 a**	25.12 ± 5.77 a** b***	44.99 ± 16.60 a**	70.73 ± 25.09
p	< 0.01 <sup>#</sup>	< 0.001 <sup>#</sup>	< 0.05 <sup>†</sup>	< 0.01 <sup>#</sup>

#: Kruskal wallis varyans analizi ile değerlendirildi, §: Mann-Whitney U testi ile değerlendirmede; †: Tek yönlü varyans analizi ile değerlendirildi, ‡: Bonferroni t post-hoc testi ile değerlendirilmedi; a: Kontrol grubu ile, b: Kolit grubu ile, \*: p<0.05, \*\*: p<0.01, \*\*\*: p<0.001, NAC<sub>1</sub>: N-asetilsistein 100 mg/kg dozunda, NAC<sub>2</sub>: N-asetilsistein 500 mg/kg dozunda, T-SH: Total tiyol, Np-SH: Non protein tiyol, P-SH: Protein tiyol, AOPP: İleri oksidasyon protein ürünleri

tedavi grubunun Np-SH düzeyleri kontrol grubuna (sırasıyla; p<0.001 ve p<0.01) ve kolit grubuna göre (ikisi; p<0.001) artmıştı. Tedavi grupları arasında anlamlı bir fark gözlenmedi.

Her iki tedavi grubunun P-SH değerlerinin kontrol grubuna göre anlamlı derecede azaldığı (sırasıyla; p<0.001, p<0.01) saptandı. Kolit grubuna göre NAC<sub>2</sub> tedavi grubunda kolon dokusu P-SH düzeyi farklı değilken; NAC<sub>1</sub> tedavi grubunda ise azaldığı (p<0.01) görüldü.

Kolit grubunun kolon dokusu AOPP düzeyi kontrol grubuna göre anlamlı derecede art-

mıştı (p<0.01). NAC<sub>2</sub> tedavi grubundaki AOPP düzeyinin kontrol grubundan farklı olmadığı fakat NAC<sub>1</sub> tedavi grubunda azaldığı (p<0.05) görüldü. NAC<sub>1</sub> tedavi grubunun AOPP düzeyi kolit grubuna göre de anlamlı derecede azalmıştı (p<0.001).

Tablo 3'de kolon dokusunun makroskopik değerlendirme sonuçları verilmiştir. Resim 1'de kontrol (A), kolit (B), NAC<sub>1</sub> tedavi (C) ve NAC<sub>2</sub> (D) tedavi gruplarının kolon dokusu makroskopik görünümü gösterilmektedir. Kontrol grubundaki deneklerin %80'inde kolon dokusunun makroskopik görünümü normal ve sadece 2'sinde hafif hiperemi tespit edilmişken; kolit grubunun tümünde

**Tablo 3.** Kolon dokusunun makroskopik değerlendirilmesi (%).

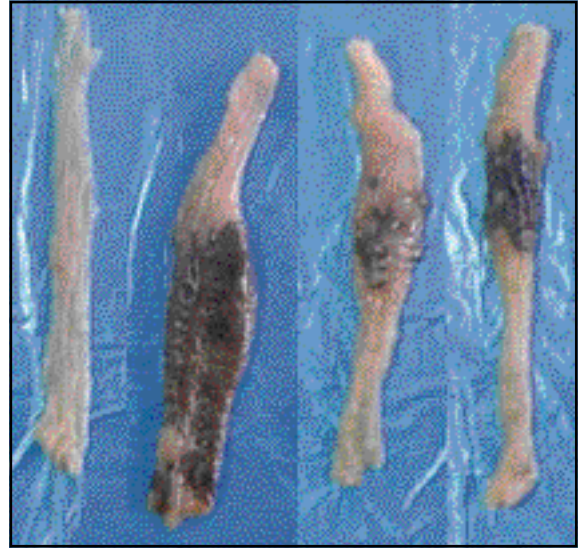
Skor	Kontrol (n=10)	Kolit (n=10)	NAC <sub>1</sub> (n=10)	NAC <sub>2</sub> (n=10)
0	80	-	10	10
1	20	-	30	10
2	-	10	20	-
3	-	20	20	10
4	-	70	20	70

NAC<sub>1</sub>: N-asetilsistein 100 mg/kg dozunda

NAC<sub>2</sub>: N-asetilsistein 500 mg/kg dozunda

makroskopik hasar bulguları görüldü. Kolit grubundaki deneklerin %70'inde makroskopik hasar skoru en büyük hasar derecesi olan 4 idi. Her iki NAC tedavi gruplarında sadece birer deneğin kolon dokusu normal görünümlü mukozal tabakaya sahip iken; diğer deneklerin kolon dokusunda makroskopik düzeyde hasar görüldü. NAC<sub>1</sub> tedavi grubunda kolon dokusundaki makroskopik hasar skoru değerlendirmesi 1 olan 3 denek varken; hasar skoru 2, 3 ve 4 olan ikişer denek vardı. NAC<sub>2</sub> tedavi grubundaki deneklerin %70'inde makroskopik hasar skoru en büyük hasar şiddeti olan 4 idi.

Tablo 4'de kolon mukozasının mikroskopik değerlendirme sonuçları sunulmuştur. Resim



**Resim 1 .**

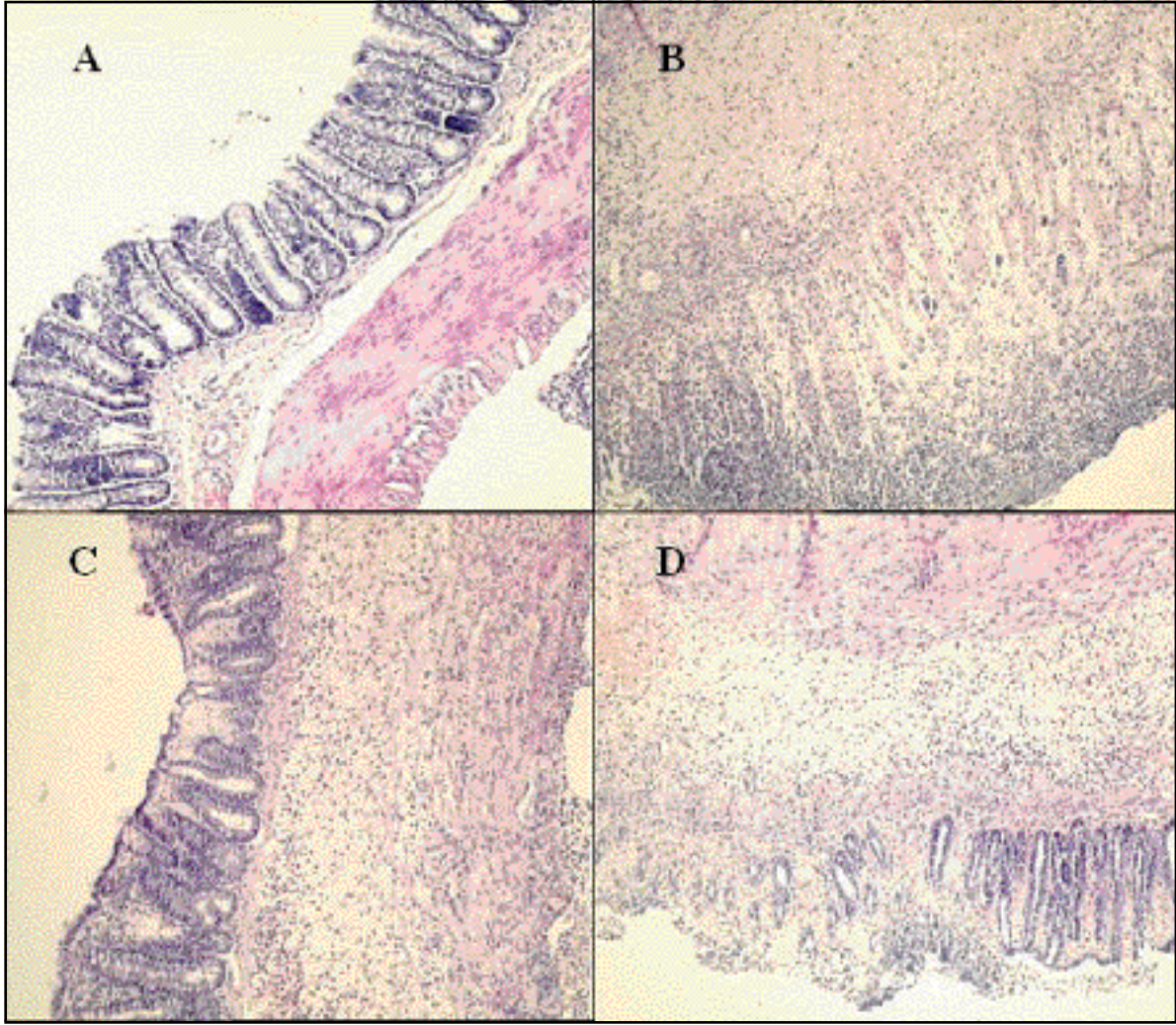
2'de kontrol (A), kolit (B), NAC<sub>1</sub> tedavi (C) ve NAC<sub>2</sub> tedavi (D) gruplarında oluşan histopatolojik değişiklikler gösterilmiştir. Kontrol grubunun hiç birinde kolon dokusunda epitelyal hücre kaybı görülmezken, en şiddetli hasar derecesi olan 3 skoruna sahip denek oranı kolit grubunda %90, NAC<sub>1</sub> tedavi grubunda %70, NAC<sub>2</sub> tedavi grubunda %60 idi. Kontrol grubundaki deneklerin hiç birinin kolon dokusunda kript absesi görülmezken, en şiddetli hasar derecesi olan 3 skoruna sahip denek oranı kolit grubunda %80,

**Tablo 4.** Kolon mukozasının mikroskopik değerlendirmesi (%).

Bulgular	Skor	Kontrol (n=10)	Kolit (n=10)	NAC <sub>1</sub> (n=10)	NAC <sub>2</sub> (n=10)
Epitelyal hücre kaybı	0	100	-	-	10
	1	-	10	10	20
	2	-	-	20	10
	3	-	90	70	60
Kript absesi	0	100	-	10	10
	1	-	10	10	30
	2	-	10	10	-
	3	-	80	70	60
Goblet hücre hasarı	0	100	10	10	30
	1	-	90	90	70
İnflamatuvar hücre infiltrasyonu	0	50	-	-	-
	1	50	-	10	20
	2	-	-	10	20
	3	-	100	80	60

NAC<sub>1</sub>: N-asetilsistein 100 mg/kg dozunda

NAC<sub>2</sub>: N-asetilsistein 500 mg/kg dozunda



Resim 2 .

NAC<sub>1</sub> tedavi grubunda %70, NAC<sub>2</sub> tedavi grubunda ise %60 idi. Goblet hücre hasarı kontrol grubunun hiç birinde görülmezken, kolit ve NAC<sub>1</sub> tedavi gruplarındaki deneklerin %90'ında, NAC<sub>2</sub> tedavi grubundakilerin %70'inde goblet hücre hasarı vardı. Kontrol grubundaki deneklerin yarısında inflamatuvar hücre infiltrasyonu yok iken; geri kalan yarısında ise az miktarda idi. Kontrol grubundaki deneklerin hepsinde belirgin hücre infiltrasyonu görülürken bu bulgu NAC<sub>1</sub> grubundakilerin %80'inde, NAC<sub>2</sub> tedavi grubundakilerin %60'ında gözlemlendi.

#### TARTIŞMA

Çalışmamızda deneysel kolit geliştirmek için %4'lük asetik asit modeli seçildi. Kolit grubun-

daki sıçanların hepsinde makroskobik hasar gözlemlendi. Ayrıca mikroskobik hasarlanma bulguları olan epitelyal hücre kaybı, kript absesi ve inflamatuvar hücre infiltrasyonu oluşmayan denek yok iken, deneklerin sadece birinde goblet hücre hasarı oluşmamıştı. Bulgularımız kolit modelinin başarı ile gerçekleştirildiğini göstermektedir. Kolit gelişiminin ardından bir günlük tedavi süresinin sonunda NAC tedavi gruplarındaki makroskobik hasar bulgularımız NAC uygulamasının hasar derecesini azalttığını, ancak tamamen düzeltmediğini ve en uygun dozun 100 mg/kg olduğunu, mikroskobik bulgularımız ise her iki doz NAC uygulamasının etkisinin zayıf olduğunu gösterdi. Asetik asit ile oluşturulan kolit modelinde kolon doku-

sunda makroskobik ve mikroskobik hasar geliştiği (6-9), doku kalınlığında, kolonun yaş doku ağırlığında ve vasküler geçirgenlikte artış olduğu (8) ve deneysel kolit modellerinde nötrofil infiltrasyonunun kantitatif göstergesi olarak myeloperoksidaz aktivitesinde de artış olduğu bildirilmiştir (7-9,15). N-asetilsistein uygulamasının makroskobik ve mikroskobik hasar düzeyinde azalmaya yol açtığı ancak kontrol grubunda görülen normal yapıya ulaştıramadığı (6), kısa dönem NAC kullanımının hasar skorlarında düzelmeye sağlamamasına rağmen bir hafta uygulamasında düzelmeye görüldüğü (7), en iyi düzelenin 100 mg/kg dozunda olduğu daha yüksek dozda ise hasar derecesinin arttığı bildirilmiştir. Makroskobik hasar bulgularımız literatürdeki çalışmalarla uyumlu iken mikroskobik bulgularımız farklılık göstermektedir. Bu farklılık çalışmamızdaki mikroskobik değerlendirmenin literatürdeki çalışmalardan daha ayrıntılı yapılmasından veya tedavi süresinin kısa oluşundan kaynaklanmış olabilir. Akgün ve ark. (7) uzun süre NAC tedavisinin daha etkin olduğunu bildirmişlerdir.

Tam kanda GSH, kolit grubunda kontrol grubuna göre azalmış olmasına rağmen bu azalış istatistiksel olarak anlamlı değildi. Literatürdeki deneysel kolit modellerinde tam kanda GSH düzeyinin incelendiği bir çalışmaya rastlamadık. Erichsen ve ark. (16) Crohn hastalarının plazma total GSH, GSH ve GSSG düzeylerinin, Sido ve ark. (17) ise İBH görülen bireylerde periferik kan mono-nükleer hücre total GSH seviyesinin kontrol grubuna göre değişmediğini bildirmişlerdir. Literatürdeki bu çalışmalar tam kan GSH düzeyini yansıtmamakla birlikte bulgularımızla uyumludur.

Kolit grubu plazma NT seviyesinin kontrol grubuna göre anlamlı derecede arttığını ( $p<0.01$ ) saptadık. İnflamatuvar barsak hastalarında ve deneysel kolit modellerindeki deneklerde NT düzeyine bakılmış çalışmaya rastlamadık. Bununla beraber, Akgün ve ark.

(7) ile Ebrahimi ve ark. (18) kolit grubunun kolon dokusunda NO<sup>+</sup> seviyesinin kontrol grubuna göre arttığını bildirerek nitrozatif stres oluşumuna dikkat çekmişlerdir. Literatürdeki bulgular sonuçlarımızı desteklemektedir. Çalışmamız kolit modelinde artan nitrozatif stresin dolaşımdaki proteinleri etkilediğini gösteren ilk çalışmadır.

Çalışmamızda kolit grubunun plazma tiyol düzeyinde kontrol grubuna göre farklılık gözlenmedi. Bulgumuz dolaşımdaki redoks durumunun değişmediğini göstermektedir. Baskol ve ark. (19) ÜK olgularında plazma tiyol seviyesinin kontrollere göre arttığını bildirmiştir. Deneysel kolit modellerinin İBH'lı bire bir yansıtmayışının ve farklı türlerdeki proteinlerin -SH gruplarının oksidatif strese dayanıklılık farklılığının bu bulgu farklılığında faktör olabileceği düşünmekteyiz.

Doku T-SH düzeyinin kolit grubu kolon dokusunda kontrol grubuna göre azaldığını ( $p<0.01$ ) saptadık. Deneysel kolit modellerinde yapılan çalışmalar (6,15,18) ve İBH'lı bireylerin incelendiği çalışmada (17) kolon dokusu T-SH düzeylerinin azaldığı bildirilmiştir. Araştırmalar sonuçlarımızı destekler niteliktedir.

Kolit grubu kolon dokusundaki Np-SH düzeyi kontrol grubuna göre azalış göstermesine rağmen gruplar arasındaki farkın anlamlı olmadığı saptadık. Akgün ve ark.(7) kolit grubundaki deneklerin, Holmes ve ark. (20) da ÜK hastalarının kolonik mukozasındaki Np-SH düzeylerinde kontrollere göre değişiklik olmadığını bildirmişlerdir. Sido ve ark. (17) Crohn hastalarının kolonik mukozalarında total GSH düzeyi ve GSH sentezinde yer alan enzim aktivitelerinin azalma gösterdiğini, azalmanın inflame bölgede daha belirgin olduğunu ve GSH/GSSG oranının azaldığını bildirmişlerdir. Bulgularımız literatür ile uyumludur.

McKenzie ve ark. (21) İBH olgularının inflame kolon mukozasında bulunan 37 kDa ağırlığındaki bir proteinin miktarının azalmadığını ancak tiyol gruplarının oksi de olduğunu



ve bu proteinin N-terminalindeki aminoasit dizisinin glukoz 6 fosfat dehidrojenaz (GAPDH) enzimi ile homoloji gösterdiğini saptamışlardır. Bu bulgudan yola çıkarak in vitro ortamda GAPDH'ın aktif bölgesindeki tiyol gruplarının tüm oksidanlar özellikle de  $OCI^-$  ve  $H_2O_2$  ile okside olduğunu böylece enzim aktivitesinin azaldığını tespit ederek İBH olgularının kolonik mukozasındaki -SH grupları okside olmuş 37 kDa ağırlığındaki proteinin gerçekte GAPDH olduğunu bildirmişlerdir. Protein tiyol gruplarının oksidasyonu proteinlerin fonksiyon kaybına yol açar. İnflamatuvar barsak hastalarının kolonik mukozasında GAPDH enziminin aktif bölgesindeki tiyol gruplarının oksidasyonu enzimin aktivasyonunu kaybetmesine ve üç boyutlu yapısının bozulmasına neden olur. Enzimin aktivitesi azaldığında doku NADPH üretimi düşmekte ve glutatyon peroksidaz reaksiyonu ile GSSG'un GSH'a dönme süreci aksamaktadır. Glukoz 6 fosfat dehidrojenaz enziminin yanı sıra dokuda glutatyon sentezinde yer alan enzimlerin aktivite seviyeleri de düştüğünden ve glutatyonun rejenerasyonu bozulduğundan yeniden sentez reaksiyonları aksamakta ve doku P-SH düzeyi kolit olgularında azalmaktadır. Çalışmamızda da kolit grubunun kolon dokusunda P-SH düzeyinin kontrol grubuna göre azaldığını, ancak gruplar arasındaki farkın istatistiki olarak anlamlı olmadığını saptadık.

Çalışmamızda kolit grubunda kolon dokusu AOPP düzeyinin kontrollere göre anlamlı derecede arttığını ( $p < 0.01$ ) saptadık. Doku düzeyinde AOPP seviyesine bakılmış çalışmalar olmamakla birlikte, Baskol ve ark. (19) ÜK olgularında, Krzystek-Korpacka ve ark. (22) ÜK olgularında hastalığın aktif ve inaktif dönemlerde ve Crohn hastalarının yalnızca aktif döneminde plazma AOPP düzeyinin kontrollere göre arttığını bildirmişlerdir. Araştırma bulguları sonuçlarımızla uyumludur. Çalışmamız doku düzeyinde proteinlerin oksidatif stresten etkilenme belirteçlerinden olan AOPP parametresi incelenmiş ilk çalışmadır.

N-asetilsistein uygulaması ile tam kan GSH düzeyinde kolit grubuna göre anlamlı bir fark gözlenmedi. Literatürde kolit modeli veya olgularında NAC tedavisinin tam kan GSH düzeyine etkisini inceleyen çalışmaya rastlamadık.

Plazma NT düzeyinin NAC<sub>1</sub> grubunda kontrol ve kolit grubuna göre yüksek olduğu (sırasıyla;  $p < 0.001$ ,  $p < 0.05$ ), NAC<sub>2</sub> grubunda ise kontrol, kolit ve NAC<sub>1</sub> grubundakilere göre arttığı (hepsi;  $p < 0.001$ ) görüldü. Akgün ve ark. (7), doku NO<sup>\*</sup> düzeyinin 2 gün süreli NAC (20 mg/kg/gün) uygulaması ile artarken, 7 günlük uzun dönem NAC (100 mg/kg/gün) kullanımı ile azaldığını bildirmiştir. Ebrahimi ve ark. (18) 4 gün süreyle uygulanan 160 mg/kg/gün ve 240 mg/kg/gün NAC dozlarının doku NO<sup>\*</sup> seviyesini azalttığını belirtmiştir. Akgün ve ark.'nın (7) kısa süreli NAC kullanımı ile nitrozatif stresi artışı engelleyemediğini bildirdikleri gibi, bizde çalışmamızda tek günlük 100 mg/kg ve 500 mg/kg NAC dozları uygulaması ile proteinlerin nitrozatif stresten etkilenmesini önleyemedik. Hatta 500 mg/kg NAC dozunda proteinlerin nitrozatif stresten etkilenmesinin arttığını saptadık.

NAC<sub>1</sub> grubundaki plazma tiyol düzeyinde kolit grubuna göre değişiklik gözlenmezken, NAC<sub>2</sub> grubunun plazma tiyol seviyesi kontrol ve NAC<sub>1</sub> grubuna göre anlamlı azalma (hepsi;  $p < 0.05$ ) göstermişti. Bulgularımız düşük doz NAC'in plazma redoks değişiminde etkili olmadığını yüksek doz NAC'in ise total tiyol miktarında azalmaya yol açtığını göstermektedir.

NAC tedavi gruplarının kolon dokusu T-SH düzeylerinde kontrol grubuna göre anlamlı azalma ( $p < 0.01$ ) gözlemlendi. Ebrahimi ve ark. (18) 160 mg/kg/gün ve 240 mg/kg/gün NAC dozlarının 4 gün boyunca kullanımının, Çetinkaya ve ark. (6) tek gün süreyle 500 mg/kg NAC dozu kullandıkları çalışmalarında rektal yoldan NAC uygulamasının, tedavi gruplarındaki T-SH seviyelerini kolit grubuna göre arttırdığını bildirmişlerdir. Çalışma-

mızda ise tek gün süreyle ip olarak her iki doz NAC uygulaması kolit grubu T-SH düzeyinde görülen azalmayı düzeltmede etkili olmamıştır. Bulgu farkının, NAC'ın uygulama yolu ve kullanım süresindeki farklılıktan kaynaklanabileceğini söyleyebiliriz.

NAC<sub>1</sub> ve NAC<sub>2</sub> gruplarının kolon dokusu Np-SH düzeylerinin kontrol ve kolit gruplarına göre anlamlı derecede arttığı saptandı. Akgün ve ark. (7) 500 mg/kg NAC kullanımının Np-SH düzeyini arttırdığını bildirmişlerdir. Bulgularımız literatür ile uyumludur.

Doku P-SH değerinin NAC<sub>1</sub> tedavi grubunda kontrol ve kolit gruplarına göre, NAC<sub>2</sub> grubunda ise kontrollere göre azaldığı görüldü. Bu bulgumuz; NAC uygulamasının proteinlerin -SH gruplarındaki oksidasyonu engellemeye yarar olduğunu işaret etmektedir.

NAC uygulaması ile NAC<sub>1</sub> grubunun AOPP düzeyinde kontrol ve kolit gruplarına göre azalış (p<0.001) gözlenmiş iken, NAC<sub>2</sub> grubundaki deneklerde kolit grubuna göre farklılık görülmedi.

Çalışmamızda NAC'ın çift etkisi dikkati çekmektedir. 100 mg/kg NAC dozu uygulaması AOPP oluşumunu önleyerek proteinler üzerinde antioksidant etki oluştururken; 500 mg/kg NAC dozunun oksidan etkiyi önlemediği ve/veya arttırdığı görülmektedir. Bayır ve ark. (23) kolesterolden zengin diyetle beslenen sıçanlarda NAC'ın antioksidan ve pro-oksidan etkilerini araştırdıkları çalışmalarında bulgularımıza benzer sonuçlara ulaşmıştır. Çalışmalarında 8 hafta boyunca 50 mg/kg NAC dozu lipid peroksidasyonunu önleyebilmesine karşın, 100 mg/kg NAC dozunda lipid peroksidasyonunun artış gösterdiğini bildirmişlerdir. Çalışmamızda NAC<sub>2</sub> grubunda saptadığımız bulgular ve literatür ışığı altında yüksek doz NAC (500 mg/kg) kullanımının geçiş metallerinin indirgenmesinde rol alarak serbest radikal üretimine ve oksidatif hasara yol açabileceğini söyleyebiliriz.

Sonuç olarak asetik asit ile oluşturulmuş kolit modelinde 100 mg/kg ve 500 mg/kg NAC dozlarının tek gün süresince uygulamasının proteinleri oksidatif hasardan korumakta kısmen başarılı olduğunu, redoks değişimlerinden etkilenmesini ise engelleyemediğini söyleyebiliriz. Farklı dozlarda ve daha uzun sürelerde NAC uygulamasının kolit grubunda protein oksidasyonuna etkisini gösteren yeni çalışmalara ihtiyaç olduğunu ve ayrıca proteinlerde tam bir koruma sağlanabilmesi için mutlaka redoks değişimine etkili başka bir ilaçla beraber kullanımının araştırılması gerektiğini söyleyebiliriz.

## TEŞEKKÜR

Bu çalışma Trakya Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından desteklenmiştir (TÜBAP-2009/1)

## KAYNAKLAR

1. Çakatay U, Kayalı R. Protein oksidasyonunun klinik önemi. Cerrahpaşa J Med 2004; 35: 140-9.
2. Kelly GS. Clinical applications of N-acetylcysteine. Altern Med Rev 1998; 3: 114-27.
3. Fishbane S. N-acetylcysteine in the prevention of contrast-induced nephropathy. Clin J Am Soc Nephrol 2008; 3(1): 281-7.
4. Banaclocha MM. Therapeutic potential of N-acetylcysteine in age-related mitochondrial neurodegenerative diseases. Med Hypotheses 2001; 56: 472-7.
5. Zafarullah M, Li WQ, Sylvester J, Ahmad M. Molecular mechanisms of N-acetylcysteine actions. Cell Mol Life Sci 2003; 80(1) :6-20.
6. Cetinkaya A, Bulbuloglu E, Kurutas EB, Ciralik H, Kantarceken B, Buyukbese MA. Beneficial effects of N-acetylcysteine on acetic acid-induced colitis in rats. Tohoku J Exp Med 2005; 206: 131-9.
7. Akgün E, Caliskan C, Celik HA, Ozutemiz AO, Tunçyurek M, Aydın HH. Effects of N-acetylcysteine treatment on oxidative stress in acetic acid-induced experimental colitis in rats. J Int Med Res 2005; 33: 196-206.
8. Nosál'ová V, Cerná S, Bauer V. Effect of N-acetylcysteine on colitis induced by acetic acid in rats. Gen Pharmacol 2000; 35: 77-81.
9. Kuralay F, Yıldız C, Ozutemiz O, Islekel H, Caliskan S, Bingol B, Ozkal S. The Effects of Trimetazidine on Acetic Acid Induced Colitis in Female Swiss Rats. J of Toxicology and Environmental Health 2003; 66: 169-79.

10. Beutler E, Duron O, Kelly BM. Improved method for the determination of blood glutathione. *J Lab Clin Med* 1963; 61: 882-8.
11. Hu ML. Measurement of protein thiol groups and glutathione in plasma. *Methods Enzymol* 1994; 233: 380-5.
12. Sedlak J, Lindsay RH. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Anal Biochem* 1968; 25: 192-205.
13. Witko-Sarsat V, Friedlander M, Capeillere-Blandin C, Nguyen-Khoa T, Nguyen AT, Zingraff J, et al. Advanced oxidation protein products as a novel marker of oxidative stress in uremia. *Kidney Int* 1996; 49: 1304-13.
14. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193: 265-75.
15. Blackburn AC, Doe WF, Buffinton GD. Colonic anti-oxidant status in dextran sulfate-induced colitis in mice. *Inflamm Bowel Dis* 1997; 3: 198-203.
16. Erichsen K, Hausken T, Ulvik RJ, Svardal A, Berstad A, Berge RK. Ferrous fumarate deteriorated plasma antioxidant status in patients with Crohn disease. *Scand J Gastroenterol* 2003; 38: 543-8.
17. Sido B, Hack V, Hochlehnert A, Lipps H, Herfarth C, Dröge W. Impairment of intestinal glutathione synthesis in patients with inflammatory bowel disease. *Gut* 1998; 42: 485-92.
18. Ebrahimi F, Esmaily H, Baeeri M, Mohammadirad A, Fallah S, Abdollahi M. Molecular evidences on the benefit of N-acetylcysteine in experimental colitis. *Cent Eur J Biol* 2008; 3: 135-42.
19. Baskol M, Baskol G, Koçer D, Ozbakir O, Yucesoy M. Advanced oxidation protein products: a novel marker of oxidative stress in ulcerative colitis. *J Clin Gastroenterol* 2008; 42: 687-91.
20. Holmes EW, Yong SL, Eiznhamer D, Keshavarzian A. Glutathione content of colonic mucosa: evidence for oxidative damage in active ulcerative colitis. *Dig Dis Sci* 1998; 43: 1088-95.
21. McKenzie SJ, Baker MS, Buffinton GD, Doe WF. Evidence of oxidant-induced injury to epithelial cells during inflammatory bowel disease. *J Clin Invest* 1996; 98: 136-41.
22. Krzystek-Korpaczka M, Neubauer K, Berdowska I, Boehm D, Zielinski B, Petryszyn P, et al. Enhanced formation of advanced oxidation protein products in IBD. *Inflamm Bowel Dis* 2008; 14: 794-802.
23. Bayır S, Eskiocak S, Altaner Ş, Çakır E. Kolesterol-den zengin diyetle beslenen ratlarda N-asetilsisteinin anti-oksidan/pro-oksidan etkileri. *Türk Klinik Biyokimya Derg* 2006; 4: 15-23.

---

**Yazışma adresi:**

Dr. Aylin Yılmaz  
Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi,  
Biyokimya Anabilim Dalı, Edirne  
Tel. : 0 284 235 76 41  
Faks : 0 284 235 76 52  
E-posta: aynil1982@hotmail.com

---