

DENEYSEL AKUT ÜLSERATİF KOLİT MODELİNDE infiximab ve allopurinol'ün ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

Fatih Mehmet AVŞAR¹, Oğuz Uğur AYDIN², Mustafa ŞAHİN³, Sezai AYDIN⁴, Hatice PAŞAOĞLU⁵, Ünsal HAN⁶,

¹S.B. ANH 6. Cerrahi Klinik Şefi, Ankara

²S.B. Polatlı Devlet Hastanesi Genel Cerrahi Uzmanı, Polatlı Ankara

³Selçuk Üniversitesi Selçuklu Tıp Fakültesi Genel Cerrahi Kliniği, Konya

⁴Güven Hastanesi Genel Cerrahi Uzmanı, Ankara

⁵Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya ABD, Ankara

⁶S.B. Yıldırım Beyazıt Eğitim Araştırma Hastanesi, Patoloji Kliniği, Ankara

ÖZET

Amaç: Bu çalışmadaki amacımız infiximab ve allopurinol'ün ülseratif kolitteki ayrı ayrı ve birlikte kullanıldıklarındaki etkilerini araştırmaktır. **Materyal ve Metod:** Çalışmaya 30 adet wistar albino rat alındı ve 5 gruba ayrıldılar. Grup I'e 1 cc %4'lük asetik asid rektal yolla verildi, Grup II'ye aynı miktarda SF verildi, Grup III'e asetik asid ve infiximab verildi, Grup IV'e asetik asid ve allopurinol verildi, Grup V'e asetik asid ve infiximab + allopurinol verildi. Asetik asid ile SF denekler eter anestezisi altındayken rektal yolla sokulan bir kateter aracılığıyla verildi. İlaçlar periton içine enjekte edildiler. Ratlar işlemden 48 saat sonra sakrifiye edildiler. **Bulgular:** Makroskopik ve mikroskopik inceleme sonucu elde edilen skorlar ilaç kullanılan gruplarda anlamlı olarak daha iyi idiler. En iyi sonuç kombine ilaç grubunda bulundu. Miyeloperoksidaz (MPO) değerleri de ilaç kullanılan gruplarda kontrol ve deney grubuna göre anlamlı olarak daha yüksek bulundu. Malondialdehit (MDA) değerleri ise gruplar arasında anlamlı farklılık göstermedi. **Sonuç:** Mikroskopik ve makroskopik skorlar dikkate alındığı zaman infiximab ve allopurinol'ün deneysel akut ülseratif kolitte düzelleme sağladığı ve sonuçların birbirine yakın olduğu gözlemlendi. Kombine ilaç kullanımının daha etkin bir düzelleme sağladığı ve bu yöntemin ülseratif kolit'in tedavisinde kullanılabileceği kanaatine varıldı.

Anahtar kelimeler: Kolit, irritabl barsak hastalığı, infiximab ve allopurinol.

Selçuk Tıp Derg 2009; 7-16

SUMMARY

INVESTIGATION OF THE EFFICACY OF infiximab and allopurinol IN EXPERIMENTAL ACUTE ULCERATIVE COLITIS MODEL

Purpose: In this study, our purpose was to compare the efficacy of infiximab and allopurinol separately and in combined usage in ulcerative colitis.

Material and Methods: 30 Wistar albino rats were used and divided into 5 groups. GROUP I: 1 cc of 4% acetic acid was applied. GROUP II: Similarly, SF solution was applied, GROUP III: After acetic acid application, intraperitoneal infiximab was used, GROUP IV: After acetic acid application, intraperitoneal

Haberleşme adresi: **Dr. Fatih Mehmet Avşar**

Meşrutiyet Cad. 28/6, 06640, Kocatepe, ANKARA

e-posta: fatihmehmetavsar@yahoo.com

Geliş Tarihi: 30.04.2009

Yayına Kabul Tarihi: 21.05.2009

Allopurinol was used, GROUP V: After acetic acid application, intraperitoneal infliximab+Allopurinol were used. When the rats were under a slight ether anesthesia, a 6-milimetre catheter was placed through anus and 1 cc of 4% acetic acid and SF was applied. The rats in all these groups were sacrificed 48 hours after the procedure. **Results:** Significant difference ($p<0,001$) among the groups in terms of their macroscopic and microscopic evaluation was observed. Myeloperoxidase (MPO) scores in infliximab, allopurinol, and combined medicine use groups were close to each other and that they were higher in sham and colitis groups. Malondialdehyde (MDA) scores did not show any important difference among the groups. **Conclusion:** When we consider the macroscopic and microscopic scoring, we believe that the efficiency of allopurinol and infliximab in experimental acute colitis model are close to each other, but lower than the combined medicine use group. Therefore, we suppose that the decrease in macroscopic and microscopic scores caused by combined medicine use in creases the anti-inflammatory efficacy and that this treatment can be used in the future.

Key words: Colitis, irritabl bowel disease, infliximab, allopurinol,

GİRİŞ

İnflamatuvar barsak hastalığı (İBH) terimi etiyolojisi henüz bilinmeyen ancak muhtemelen genetik, çevresel ve immünolojik etmenlerin etkileşerek rol oynayabileceği multifaktöryel, nonspesifik barsak hastalıklarından ülseratif kolit (ÜK) ve Crohn hastalığı (CH) için kullanılır.

Ülseratif kolit; özellikle rektumu ve kalın barsağın proksimalini etkileyen, intestinal ve extraintestinal manifestasyonları olan, hastaların %75’de remisyon ve alevlenmelerle seyreden nonspesifik bir inflamatuvar barsak hastalığıdır (1,2). Patogenezinin tam olarak bilinmemesine rağmen, bu hastalıkta doku hasarının neden olan pek çok mediatörün varlığı gösterilmiştir (3,4).

TNF- α (Tümör nekrosis faktör); akut inflamasyonun başlamasından sorumlu olan sitokinlerin başında gelir. TNF- α vasküler hücrelerde fosfolipaz A, PAF (Platelet Aktive Edici Faktör) ve serbest radikal oluşumunu artırır. TNF, hem doğal hem de kazanılmış immünitenin bir mediatörüdür. Böylece spesifik immun cevap ve akut inflamasyon arasında önemli bir halkadır. İnfliximab ise şimerik bir anti TNF- α antikordur (1,3).

Son zamanlarda reaktif oksijen metabolitlerinin (ROM) de inflamatuvar barsak hastalığının patogenezinde yer aldığı söylenmektedir (5). Antioksidan özellikleri bilinen terapötik ajanların İBH’da yararlı etkileri mevcuttur (6,7).

Biz çalışmamızda inflamasyonun akut döneminde etkili olan ve tüm bu gelişen kaskadda ana rolü olan sitokinlerden TNF- α reseptör blokörü olan infliksimab ile yine akut inflamasyonda reaktif oksijen metabolitlerinin oluşumunu engelleyen bir ksantin oksidaz inhibitörü olan allopürinol’ün ÜK’deki etkilerini karşılaştırmak ve farklı yollar üzerinden etkili olmaları nedeniyle kombine kullanımlarının akut dönemdeki etkinliklerini araştırmayı amaçladık.

MATERYAL VE METOD

Bu çalışma S.B.Ankara Eğitim ve Araştırma Hastanesi Etik Kurulu onayı alınarak (29.08.2007 tarih ve 0243 toplantı numarası) Ankara Eğitim ve Araştırma Hastanesi Deney Hayvan Laboratuvarında gerçekleştirildi. Ratlar hafif eter anestezisi altında iken yumuşak 6 mm’lik pediatrik beslenme kateteri anüsten sokularak 8 cm ileriye uzatılacak şekilde yerleştirilmişlerdir. Hayvanlar bu işlem sırasında Trendelenburg pozisyonuna getirilerek %4’lük asetik asit çözeltisinden 1 cc. yavaş bir şekilde transrektal olarak uygulanmıştır. Asitin dışarı kaçmaması için ratlar başaşağı pozisyonda 30 sn kadar süreyle tutulmuş ve verilen asetik asit çözeltisinin kalan kısmı aynı kateterle aspire edilmiştir. Bu işlemin ardından pH: 7 olan fosfat tampon çözeltisinden 2 cc. transrektal olarak uygulanmıştır.

Tüm gruptaki ratlar transrektal asetik asit veya serum fizyolojik uygulamasından 48 saat sonra eter anestezisi altında sakrifiye edilmiş

ve bu 48 saatlik dönemde normal yemlerini yemelerine izin verilmiştir.

Sakrifikasyon sonrası ratların karınları pubisten göbük hizasına kadar makasla kesilerek rektum mümkün olan en distal kısmından kesilip çıkarılmıştır. Daha sonra buradan proksimale kadar olan yaklaşık 10 cm'lik kolon segmenti total olarak çıkartılmıştır. Çıkarılma sırasında kolon içerisindeki feçes temizlenmiş ve kolon segmenti serum fizyolojikle yıkanmıştır. Rektuma en yakın 5 cm'lik kısım , makroskopik skorlamayı takiben, formol solusyonu içerisinde alınarak mikroskopik inceleme için patologa gönderilmiştir. Sonraki 5 cm'lik kolon segmenti ise biyokimyasal inceleme için soğuk zincire alınmıştır.

DENEKLER VE DENEYSEL KOLİT MODELİ

Erişkin erkek 250-300 gr ağırlığındaki Wistar ratları deneyden önceki 1 hafta boyunca laboratuvar şartlarına alıştırıldı. Ratlar 22°C'de ayrı kafeslere kondu ve gece gündüz 12 saat beslenmesi serbest bırakıldı. Ratların günlük bakımları yapıldı ve gaitalarını yememeleri için kafes altına delikli tel sistemi yerleştirildi. Tüm gruplar standart yem ile beslendi. Rektal yolla asetik asit (8) veya serum fizyolojik verilmesinden 12 saat önce yemleme işlemi durduruldu ve sadece su içmelerine izin verildi. Toplam 30 rat kullanıldı. Ratlar randomize olarak 5 gruba ayrıldı.

GRUP 1: KONTROL KOLİT GRUBU; Deneklere %4'lük asetik asit çözeltisinden 1 cc. ve bu işlemin ardından pH: 7 olan fosfat tampon çözeltisinden 2 cc. Transrektal olarak uygulanmıştır.

GRUP 2: SHAM GRUBU; Ratlara aynı şekilde transrektal olarak nötr pH'da SF çözeltisi uygulanmıştır.

GRUP 3: PREOPERATİF İNFLİXİMAB GRUBU; Deneyisel kolit oluşturulan ve intraperitoneal olarak infliximab kullanılan grup

GRUP 4: PREOPERATİF ALLOPÜRİNOL GRUBU; Deneyisel kolit oluşturulan ve intraperitoneal Allopürinol kullanılan grup

GRUP 5: PREOPERATİF İNFLİXİMAB VE ALLOPÜRİNOL GRUBU; Deneyisel kolit oluşturulan ve intraperitoneal İnfliximab + Allopürinol kullanılan grup

KOLİTİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Makroskopik Skorlama: Makroskopik olarak kolon mukozal yüzeyinin değerlendirilmesinde, Fedorak et al.'in çalışmalarında kullanılan skorlama ile mukozal yüzeyde oluşan lezyonların derinlik, genişlik ve dağılımına göre yapıldı (Grade 0: Normal mukoza patterni, Grade 1: Dağınık erozyonlar, Grade 2: Lineer ülserasyonlar, Grade 3: Diffüz iltihaplı doku yanında 5 mm.'den küçük lezyonlar, Grade 4: Diffüz ülserasyonlar, geniş lezyonlar) (9).

Mikroskopik Skorlama ve Histoloji: Materyaller örnekleme takiben %10' luk formalin ile fikse edildi. Fiksasyonu takiben lümen açılarak makroskopik skorlama yapıldı. Makroskopide tanımlanan patolojik alanlara uygun ve normal alanlardan multipl örnekleme yapıldı. Tüm örnekler rutin parafin takip aşamalarından geçirildikten sonra 5 µ kalınlığında kesildi ve H&E ile boyandı. Mikroskopide aynı spesmende gözlenen farklı şiddetteki alanlar da dikkate alınarak kör olarak tüm gruplara ait örnekler aşağıdaki skalaya göre skorlanarak değerlendirildi (Grade 0: Normal mukoza, Grade 1: Ödem, Grade 2: Konjesyon, Grade 3: Fokal erozyon, Grade 4: Ülserasyon) (10).

BİYOKİMYASAL ANALİZ

Ratlardan elde edilen spesmenlerin 5 cm'lik kısmı da Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı Laboratuvarları'nda analiz edildi. İncelenen spesmenlere MDA ve MPO analizleri uygulandı.

Doku Malondialdehit (MDA) Analizi

Doku MDA düzeyleri Ohkawa ve arkadaşlarının tarif ettiği yöntemle göre tayin edildi. Bu yöntemin ilkesi; homojenattaki proteinlerin sodyum dodesil sülfat (SDS) ile bağlanmasından sonra örnekte bulunan MDA'nın ortam pH'sı 3,5 olduğu koşullarda tiobarbitürik asit (TBA) ile oluşturduğu komplekse bağlı kırmızı rengin

spektrofotometrik ölçümüne dayanır (11).

Doku Miyeloperoksidaz (MPO) Aktivitesi Ölçümü

H₂O₂'nin homogenat tarafından oksitlenerek O-dianisidinin redüklenmesi ve redükte O-dianisidinin 410 nm'de ölçülmesi esasına dayanır (12).

İSTATİSTİKSEL ANALİZ

Verilerin analizi SPSS 11.5 paket programında yapıldı. Tanımlayıcı istatistikler sürekli ve sıralanabilir değişkenler için ortanca (minimum-maksimum) şeklinde gösterildi. Gruplar arasında makroskopik değerlendirme, mikroskopik değerlendirme, MDA ve MPO düzeyleri yönünden istatistiksel olarak anlamlı farkın olup olmadığı Kruskal Wallis testiyle incelendi. Kruskal Wallis test istatistiğinin anlamlı görüldüğü yerlerde farka neden olan grubu belirlemek amacıyla Kruskal Wallis çoklu karşılaştırma testi

kullanıldı. Sıralanabilir değişkenlerin birbiriyle ve sürekli değişkenlerle aralarında istatistiksel olarak doğrusal ilişkinin olup olmadığı Spearman korelasyon testiyle, sürekli değişkenlerin birbiriyle aralarında istatistiksel olarak doğrusal ilişkinin olup olmadığı ise Pearson korelasyon testiyle araştırıldı. p<0,05 için sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

BULGULAR

Makroskopik değerlendirmede gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık görüldü (p<0,001). Asetik asit grubunun değeri sham, infiximab ve kombine ilaç grubuna göre anlamlı olarak yüksek idi (p değerleri sırasıyla; 0,001 ; 0,028 ve 0,001). Sham grubuna göre infiximab, allopürinol ve kombine ilaç gruplarının değerlendirme skoru anlamlı olarak daha yüksek idi (p değerleri sırasıyla; 0,001 ; 0,001 ve 0,019). Ayrıca kombine ilaç verilen grubun hem infiximab hem de allopürinol grubuna

Tablo 1. Makroskopik ve Mikroskopik Değerlendirme Sonuçları

	Asetik Asit	Sham	Infiximab	Allopürinol	Infiximab + Allopürinol	p
Makroskopik	4 (2 – 4)	0 (0 – 0) [†]	2,5 (1 – 5) ^{†,‡}	2,5 (2 – 4) [‡]	1 (1 – 2) ^{†,‡,¶,§}	<0,001
Mikroskopik	15 (10 – 29)	0 (0 – 0) [†]	6 (6 – 10) ^{†,‡}	6 (3 – 10) ^{†,‡}	4,5 (2 – 5) ^{†,‡,¶,§}	<0,001

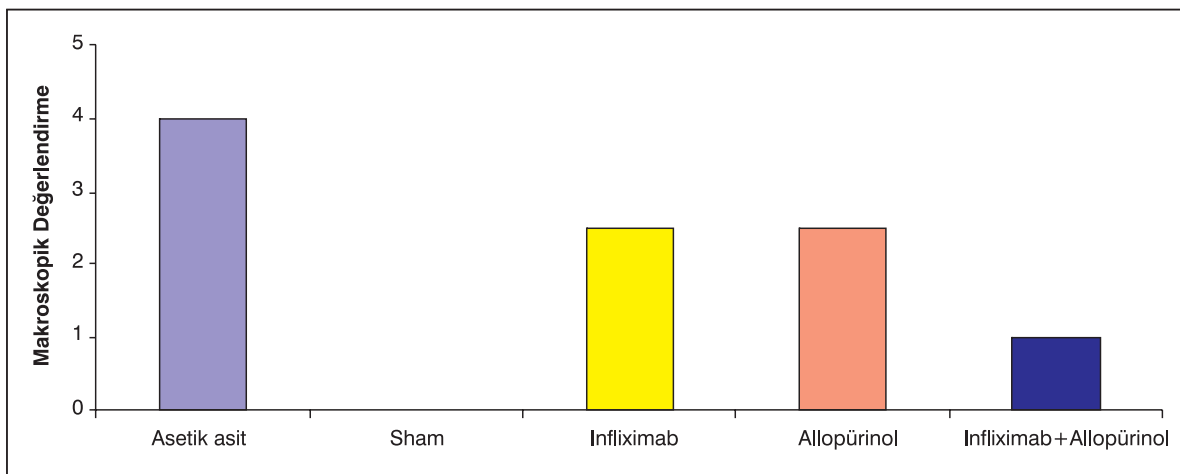
[†] Asetik Asit grubu ile arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı (p<0,05).

[‡] Sham grubu ile arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı (p<0,05).

[¶] Infiximab grubu ile arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı (p<0,01).

[§] Allopürinol grubu ile arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı (p<0,05).

Şekil 1. Gruplar Arasında Makroskopik Değerlendirme Sonuçlarının Dağılımı



göre anlamlı olarak daha düşük makroskopik değerlendirme düzeyine sahip olduğu görüldü (p değerleri sırasıyla; 0,009 ve 0,003 idi), (Tablo 1, Şekil 1).

Mikroskopik olarak gruplar arasında anlamlı farklılık görüldü ($p < 0,001$). Asetik asit grubunun değerlendirme skoru sham, infiximab, allopürinol ve kombine ilaç grubuna göre istatistiksel olarak daha yüksek idi (p değerleri sırasıyla; 0,001 ; 0,007 ; 0,002 ve 0,001). Sham grubuna göre infiximab, allopürinol ve kombine ilaç gruplarının değerlendirme skoru anlamlı olarak daha yüksek idi (p değerleri sırasıyla; 0,001 ; 0,001 ve 0,024). Ayrıca kombine ilaç verilen grubun hem infiximab hem de allopürinol grubuna göre istatistiksel olarak daha düşük mikroskopik değerlendirme düzeyine sahip olduğu görüldü (p değerleri sırasıyla; 0,005 ve 0,017 idi), (Tablo 1, Şekil 2).

Gruplar arasında MDA düzeyleri yönünden istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık görülmedi ($p = 0,807$), (Şekil 3).. Buna karşın, en az bir grubun MPO düzeyinin istatistiksel olarak anlamlı farka neden olduğu görüldü ($p = 0,005$). Asetik asit grubuna göre sırasıyla, infiximab, allopürinol ve kombine ilaç grubunun MPO düzeyi istatistiksel olarak daha yüksek idi ($p = 0,001$). Ayrıca, Sham grubuna göre de sırasıyla, infiximab, allopürinol ve kombine ilaç grubunun MPO düzeyi istatistiksel olarak daha yüksek idi ($p = 0,001$), (Tablo 2, Şekil 4).

Asetik asit, infiximab ve allopürinol grupları içerisinde MDA ölçümleri ile sırasıyla; MPO, mikroskopik ve makroskopik değerlendirme düzeyleri arasında, MPO ölçümleri ile sırasıyla; mikroskopik ve makroskopik değerlendirme düzeyleri arasında, ayrıca mikroskopik ve makroskopik değerlendirme düzeyleri arasında

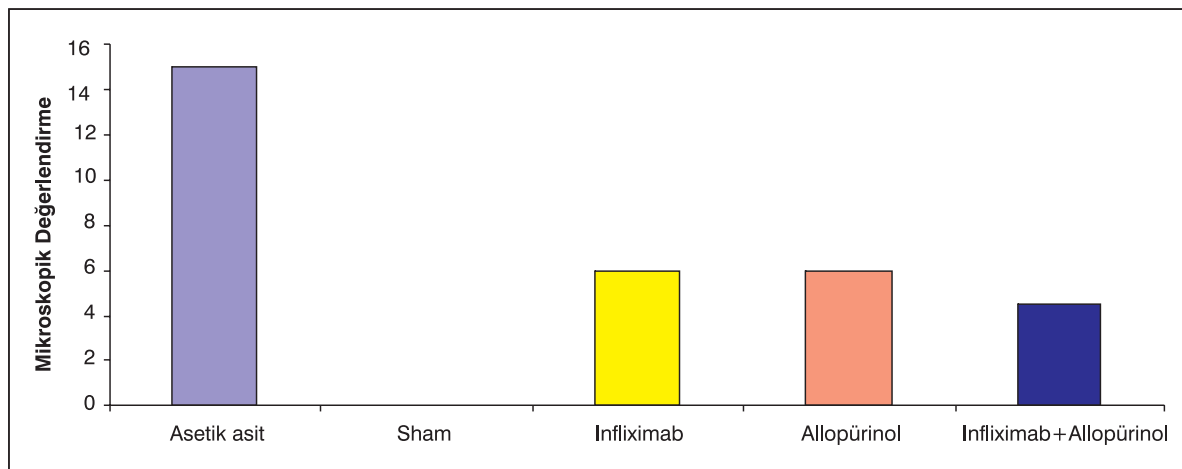
Tablo 2. MDA ve MPO Ölçümleri

	Asetik Asit	Sham	Infiximab	Allopürinol	Infiximab + Allopürinol	p
MDA	35,7 (22,4 – 40,6)	30,1 (21 – 39,2)	33,6 (22,4 – 44,6)	39,9 (22,4 – 46,2)	30,8 (28 – 42)	0,807
MPO	0,20 (0,19 – 0,26)	0,21 (0,13 – 0,34)	0,38 (0,29 – 0,51)†,‡	0,40 (0,19 – 0,56)†,‡	0,38 (0,23 – 0,51)†,‡	0,005

† Asetik Asit grubu ile arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0,001$).

‡ Sham grubu ile arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0,001$).

Şekil 2. Gruplar Arasında Mikroskopik Değerlendirme Sonuçlarının Dağılımı



istatistiksel olarak anlamlı bir doğrusal ilişki görülmedi ($p>0,05$). Sham grubu içerisinde MDA ile MPO arasında da istatistiksel olarak anlamlı bir doğrusal ilişki görülmedi ($p>0,05$), (Tablo 3).

Kombine ilaç grubu içerisinde ise makroskopik değerlendirme düzeyleri ile sırasıyla; MDA, MPO ve mikroskopik değerlendirme düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı doğrusal birliktelik görülmezken ($p>0,05$), mikroskopik değerler büyüdükçe MPO'nun doğrusal anlamlı olarak azaldığı ($\rho=-0,880$ ve $p=0,021$), MDA'nın ise doğrusal anlamlı olarak arttığı ($\rho=0,832$ ve $p=0,040$) gözlemlendi. Ayrıca MDA ve MPO ölçümleri arasında istatistiksel olarak anlamlı negatif yönlü doğrusal ilişki tespit edildi ($r=-0,926$ ve $p=0,008$), (Tablo 3).

TARTIŞMA

Ülseratif kolite bağlı ölümlerin birçoğu alevlenme döneminde meydana gelir ve hastaların bir kısmı hastalığın bu döneminde acil kolek-

tomiye ihtiyaç duyar, bir kısmı da steroidle bağımlı hale gelir (13,14). Dolayısıyla bu hastalar için dramatik sonuçlara neden olabilecek akut dönemdeki tüm komplikasyonlardan kurtarabilecek, kolondaki inflamasyonunun azaltılmasına yönelik yeni tedavi seçeneklerinin ortaya çıkarılması ÜK'de çok önemli olacaktır.

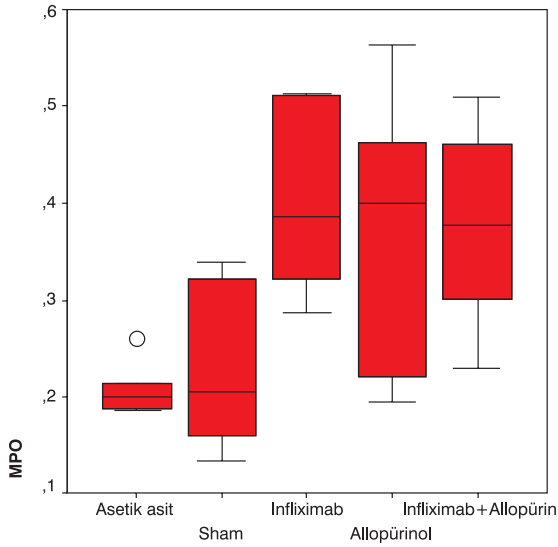
ÜK'de etiyolojik çalışmalar ve tedavide kullanılacak yeni ajanların denenebilmesi için kolay oluşturulabilir, hastalığın yeterince devam ettiği, tekrarlanabilir ve istenilen ölçüde ciddi hasarın meydana gelebileceği modellere ihtiyaç duyulmaktadır (15). Asetik asit modelinde intrakolonik uygulamayı takiben 24 saat içinde histolojik hasar oluşmakta ve 48 saat içinde maksimum seviyeye ulaşmaktadır(8,16). Asetik asit ile oluşturulan akut kolit modelinde sıçanlarda gelişen lezyonlar insanlardaki ülseratif kolitte görülen histopatolojik değişikliklere oldukça benzemektedir (17).

İmmunohistokimyasal olarak hem Crohn hastalığı hem de ülseratif kolit mukozal hücreleri

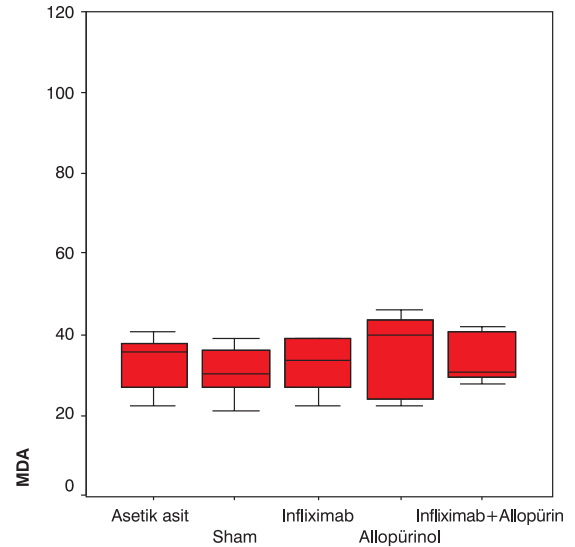
Tablo 3. Gruplarda Değişkenler Arası İlişki Düzeyleri ve Anlamlılık Seviyeleri

		Makroskopik		Mikroskopik		MPO	
		rho	p	rho	p	r	p
Asetik Asit	Makroskopik						
	Mikroskopik	0,674	0,142				
	MPO	0,393	0,441	-0,088	0,868		
	MDA	0,393	0,441	0,677	0,140	-0,509	0,302
Sham	Makroskopik						
	Mikroskopik						
	MPO					0,176	0,738
Infiximab	Makroskopik						
	Mikroskopik	-0,270	0,605				
	MPO	0,235	0,653	0,393	0,441		
	MDA	-0,500	0,312	0,655	0,158	0,637	0,173
Allopürinol	Makroskopik						
	Mikroskopik	-0,730	0,099				
	MPO	-0,463	0,355	0,507	0,305		
	MDA	0,548	0,260	-0,514	0,296	-0,590	0,218
Infiximab + Allopürinol	Makroskopik						
	Mikroskopik	0,417	0,410				
	MPO	-0,393	0,441	-0,880	0,021		
	MDA	0,399	0,434	0,832	0,040	-0,926	0,008

Şekil 4. Gruplar Arasında MPO Ölçümlerinin Dağılımı



Şekil 3. Gruplar Arasında MDA Ölçümlerinin Dağılımı



TNF pozitifliğine sahip olduğu gözlenmiştir (18). Steroide refrakter Crohn hastalarında yapılan çalışmalar TNF(+)’liğinin hastalık için majör patogeneze olabileceğini düşündürmektedir. Endotel hücreleri üzerinde birtakım spesifik adezyon moleküllerinin ekspresyonunu engelleyerek inflamatuvar hücrelerin barsak mukozasında toplanmasını önlediği düşünülen anti-TNF; Crohn hastalığında birkaç ay gibi uzun bir süre ile remisyon sağlayabilmektedir(19). İnfliximab insan fc kısmına ve kemirgenlerin değişken bölgesine taşıyan şimerik bir antikordur. İnfliximabın akut ya da refrakter ÜK’de klinik olarak etkinliğini göstermek için yapılmış bir çok çalışma mevcuttur (20-26). Yapılan tüm bu klinik çalışmalar inlfiximabın ÜK’in akut ve kronik aktif dönemindeki inflamasyon ve buna bağlı gelişen komplikasyonların önlenmesinde etkin ve ilk sırada kullanılabilir bir ajan olduğunu ortaya koymaktadır.

Farklı ajanlarla kolit oluşturulan kolon segmenti üzerinde yapılan makroskopik ve mikroskopik skorlama; inflamatuvar barsak hastalığı deneylerinde çok çeşitli ajanlar için yapılan araştırmalar sırasında kullanılmış ve kolonda gelişen hasarın ve tedaviye yanıtın bir göstergesi olarak sunulmuştur (27-30).

Çalışmamızda tek başına inlfiximab kullanımının

akut gelişen kolit modelinde kolon histolojisini değerlendiren parametrelerden makroskopik skor ve mikroskopik değerlendirme skorları üzerine olumlu etkisi olduğu belirlendi.

İBH hastalarının kolonik mukoza biyopsilerinde oksidatif stresin artmış ve antioksidan savunmaların azalmış olduğu gösterilmiştir. İnflame mukozal lezyonlarda reaktif oksijen metabolitleri ve onların aracılık ettiği protein oksidasyonu ürünlerinin arttığı gösterilmiştir (31). Serbest radikal oluşumunu katabolize eden en önemli enzim ksantin oksidaz olup, endotel hücrelerinde ve beyin parankim hücrelerinde bu enzimin varlığı gösterilmiştir(32). Allopürinol, hipoksantin analogu olup, kendi substrat aktivitesi ile ksantin oksidaz enzimine kompetitif inhibitör etki yaparak enzim ile stabil bir kompleks oluşturur. Bu reaksiyonun ürünü olarak oksipürin meydana gelirken, serbest oksijen radikallerinin oluşumu engellenmiş olur (33).

Allopürinolün xanthine oksidaz yolağıyla oluşan ROM’i üzerinde etkinliği deneysel kolit modelleri üzerinde araştırılmış ve ÜK’de etkin bir tedavi seçeneği olarak sunulmuştur (34,35). Yine allopürinolün inflamatuvar barsak hastalıklarındaki klinik etkinliğini ortaya koymak için yapılan tek başına 50 mg/kg dozunda(36)

ya da farklı antiinflamatuvar ajanlarla kombine kullanımının(37) hastalık aktivitesini olumlu yönde etkilediği ile ilgili çalışmalar mevcut olduğu gibi Reynolds ve ark. tarafından ÜK'li hastaların kolonik mukoza biyopsilerinde yüksek performanslı likit kromatografi ile urat ve ksantin ölçümleri yapılmış ve ÜK'de Xanthine oksidaz yolunun süperoksit oluşumu için major bir kaynak olmayabileceği söylenmiştir (38). Keshavarzian ve ark tarafından deneysel kolitte reaktif oksijen metabolitlerinin rolüyle ilgili bir çalışmada ;ROM'nin deneysel kolitte önemli bir rol oynadığı, Xanthine oksidaz yolunun kolitteki ROM üretimi için majör kaynak olmadığı ve deneysel kolitteki doku hasarının hidroksil radikali oluşumu ile olmadığı ortaya konmuştur(39). Biz çalışmamızda allopürinolün ÜK'de kullanımına uygun olarak 50 mg/kg tek doz şeklinde kullandık

Çalışmamızda tek başına allopürinol kullanılan gruptaki makroskopik skorun ve mikroskopik skorun tek başına infliksimab kullanılan grup ile aynı, kolit oluşturulan gruptan belirgin olarak daha düşük ve kombine ilaç kullanımının olduğu gruba göre daha düşük olduğu gözlemlendi. Dolayısıyla tek başına allopürinol kullanımının makroskopik skor parametreleri üzerine olumlu etkisi olduğu belirlendi.

MPO, dokularda nötrofil infiltrasyonunu gösteren, inflamasyonun indirekt göstergesi olup, özellikle akut dönemde hızla yanıt veren bir enzim olup, gerçekleştirdiğimiz akut kolit modelinde PML ve granülositlerin infiltrasyonu ile birlikte artış göstermesi beklenmektedir.Farklı kolit modellerinde farklı antiinflamatuvar ajanlarla yapılan deneysel çalışmalarda MPO aktivite ölçümleri nötrofil infiltrasyonunu gösteren bir parametre olarak değerlendirilmiştir (27-30).

Çalışmamızda infliksimab, allopürinol ve kombine ilaç kullanımının olduğu gruptaki ortanca MPO değerlerinin birbirine yakın, sahm ve kolit oluşturulan grupla karşılaştırıldığında daha yüksek olarak bulundu. En az bir grubun MPO düzeyinin istatistiksel olarak anlamlı farka neden olduğu görüldü. Ancak akut inflamasyonda ortaya çıkan mediatörlerden MPO'nun tek başına ya da kombine ilaç

kullanımının olduğu gruba göre daha yüksek median değerlere sahip olması beklentilerimizle örtüşmemektedir.

MDA ise daha geç dönemde gelişen hücrel ve hücre içi hasarı gösteren lipid peroksidasyonunun son ürünüdür. Proteinlerin aminoasit gruplarına, fosfolipidlere ve nükleik asitlere bağlanarak etkisini gösterir. Yine MDA; membran iyon transportunu, akışkanlığını, enzim aktivasyonunu, deformasyon yeteneğini bozar (40).

Bizim çalışmamızda MDA değerleri gruplar arasında anlamlı fark göstermedi. İnfliksimab grubundaki ortanca değerler allopürinol ve asetik asit grubundan düşük sham ve kombine ilaç kullanılan gruptan yüksek olmasına rağmen istatistiksel olarak bu ilişkilerin hiçbirisi anlamlı bulunmadı. Bu sonucun modelimizin akut kolit modeli olması ve de asetik asit ile oluşturulan kolit modelinde kolit tablosunun hızla iyileşmesi nedeniyle ortaya çıktığını düşünmekteyiz..

Bu çalışmanın temel amaçlarından olan ve daha önce literatürde karşılaşılmayan bir tedavi modalitesi olan infliksimab ve allopürinolün birlikte kullanımı sonucu makroskopik skor parametreleri karşılaştırıldığında; kontrol grubu, tek başına allopürinol ve tek başına infliksimab kullanılan gruba göre daha düşük değerler elde edilmiş olup kombine ilaç kullanımının bu çalışmadaki tek tek kullanıma göre skorları anlamlı olarak düşürdüğü ortaya çıkmıştır.

Mikroskopik skor parametreleri karşılaştırıldığında infliksimab ve allopürinolün kombine kullanıldığı gruptaki skorların tek tek ilaç kullanılan ve kontrol grubuna göre daha düşük olduğu ve kombine ilaç kullanımının mikroskopik skorları anlamlı olarak düşürdüğü ortaya çıkmıştır.

Tüm bu sonuçların ışığında; ÜK'de yeni tedavi modaliteleri arasında daha geniş çaplı araştırmalar gerektiren ajanlardan infliksimabın ve allopürinolün tek başına kullanımında, oluşturulan kolit modeli üzerinde makroskopik ve mikroskopik skorlarda neden olduğu anlamlı düşüş ve gözlenen histolojik kes-

itlerin de katkısıyla etkin ajanlar olabileceğini düşünmekteyiz.

Çalışmanın en önemli amaçlarından olan infliximab ile allopürinolün kombine kullanımının bu ajanların tek başlarına kullanımıyla karşılaştırıldığı sonuçlar ortaya konduğunda; kombine kullanımın hem makroskopik, hem de

mikroskopik skorlarda neden olduğu anlamlı düşüşün, inflamasyonu azaltmadaki etkinliği artırdığını ve bu tedavi şeklinin gelecekte uygulanabilir olacağını, gerçekleştirdiğimiz çalışmanın da bu alandaki diğer çalışmalara ışık tutabileceğini düşünmekteyiz.

KAYNAKLAR

1. Jewell DP. Ulcerative colitis. Feldman M, Scharshmidt BF, Sleisenger MH. Sleisenger and Fordtran's Gastrointestinal and liver diseases. 5th ed. Volum 2. Philadelphia, 1993: 1305-1330
2. Lashner BA. Epidemiology of inflammatory bowel disease. Gastroenterol. Clin. North Am. 1995; 24(3): 467-74.
3. Kirsner JB, Shorter RG. Recent development in "non-specific" inflammatory bowel disease. N Engl J Med 1982; 306: 775-784.
4. Donaldson RM. Crohn's disease. In: Sleisenger MH, Fordtran JS, eds. Gastrointestinal disease. 4th ed. Philadelphia : Saunders, 1989: 1327-1358.
5. Wright JP, Mee S., Parfitt A., Marks I.N., et al.: Vitamin A therapy in patients with Crohn's disease. Gastroenterology, 88(2): 512-514,1985.
6. Ahnfelt-Ronne I, Nielson O.H.: The antiinflammatory moiety of sulfasalazine, 5-ASA, is a radical scavenger. Agents Actions, 21(1-2):191-194,1987.
7. Ahnfelt-Ronne I., Haagen Nielsen O., Christensen A., Langholz E., Binder V., Riis P.: Clinical evidence supporting the scavenger mechanism of 5-aminosalicylic acid. Gastroenterology, 98: 1162-1169,1990
8. Fedorak RN,Empey LR,Mc Arthur C,Jevell LD:Misoprostol provides colonic mucosal protective effect during acetic acid induced colitis in rats.Gastroenterology J.98;615-625,1990
9. Dhawan V, Mohamed A, Fedorak RN. Exercise and inflammatory bowel disease. Can J Gastroenterol. 2009 Jan;23(1):19-22. Review.
10. Fedorak RW,Empey LR,Walker K. Verapamil alters eicosanoid synthesis and accelerates healing during experimental colitis in rats.Gastroenterology 1992;102:1229-35
11. Okhawa H.,Ohishi N.,Yagi K.:assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. Analytical Biochemistry,95,351-358 (1979).
12. Tianhong Zhang et al;The prophylactic and therapeutic effects of cholinolytics on perfluoroisobutylene inhalation induced acute lung injury.J Occup Health 2005;47(4):277-285
13. Barkin JS, Green JA.Inflammatory bowel disease: medical management. In: Berk JE. Haubrich WS, Kalser MH, Roth JLA, Shaffner F.eds. Bockus gastroenterology. Vol 2.5thed. Philadelphia: J.B.Lippincott, 1994; 1374-81.
14. Farmer RG, Easley KA, Farmer JM. Assessing quality of life for patients with inflammatory bowel disease. Cleve Clin J Med 1992;58;7-15.
15. Gerald P., Beck PL, Wallace JL, Fallone CA.: Animal models and pathogenesis of inflammatory bowel disease. Ed: Szabo S, Tache Y, Neuroendocrinology of Gastrointestinal- Ulceration. Vol 2, 73- 92, Plenum Press, New York, 1995.
16. Watss JN,Dombal FT,Watkinson G;Golghe JC:Early course of ulcerative colitis.Gut 7:16-31,1966
17. Fabia R, Willen R, Ar'Rajab A, Anderson R, Ahren B, Bengmark S.: Acetic acid induced colitis in rat:a reproducible xperimental model for acute ulcerative colitis.Eur surg Res. 1992;24(4):211-25
18. Hommes DW, Radema S, Jansen J, Smit F, Zhao YC, Fockens P: Production and cellular source of interleukin-8 in inflammatory bowel disease. Inflammatory Bowel Diseases, 1:108-16, 1995.
19. Armuzzi A,De Pascalis B,Iupascu A,Fedeli p,leo D,Mentella MC,Vincenti F,Melina D,Gasbarrini G,Pola ,Gasbarrini A.:Infliximab in treatment of steroid-dependent ulerative colits.Eur Rev Med Pharnmacol Sci.2004 Sep-Oct;8(5):231-3
20. Lee KM, Kim JS, Shin DH, Cheong JY, Yoo BM, Kim JK, Lee KJ, Hahm KB, Kim JH, Cho SW.: Effect of infliximab in the treatment of refractory inflamatory bowel disease with complication.Korean J Gastroenterol .2004 Nov;44(5):259-66

21. Oschenkühn T, Sackman M, Göke B.: Influximab for acute, nonsteroid-refractory ulcerative colitis: a randomized pilot study. *eur J Gastroenterol hepatol.* 2004 Nov; 16(11):1167-71.
22. Tilg H, Feichtenschlager T, Knoflach P, Petritsch W, Schöfl R, Vogelsang H, Reinisch W.: Use of influximab in ulcerative colitis. *Z Gastroneterol.* 2007 Aug; 45(8): 907-11.
23. Kohn A, Daperno M, Armuzzi A, Capello M, Biancone L, Orlando A, Viscido A, Annese V, Riegler G, Meucci G, Marollo M, Sostegni R, Gasbarrini A, Peralta S, Prantera C.: Influximab in severe ulcerative colitis: short-term results of different infusion regimens and long-term follow-up. *Aliment Pharmacol Ther.* 2007 Sep 1; 26(5):747-56.
24. Hassan C, Ierardi E, Burattini O, De Francesco V, Zullo A, Stoppino G, Panella C, Morini S: Tumour necrosis factor alpha down-regulation parallels inflammatory regression in ulcerative colitis patients treated with influximab. *Dig Liver Dis.* 2007 Sep; 39(9):811-7
25. Feagan BG, Reinisch W, Rutgeerts P, Sandborn WJ, Yan S, Eisenberg D, Bala M, Hanauer SB.: The effects of influximab therapy on health-related quality of life in ulcerative colitis patients. *Am J Gastroenterol* 2007 Apr; 102(4):794-802.
26. Jamerot G, Hertervig E, Friis-Liby I, Blomquist L, Karlen P, Grannö C, Villien M, Ström M, Danielsson A, Verbaan H, Hellström PM, Magnuson A, Curman B. Influximab as rescue therapy in severe to moderately severe ulcerative colitis: a randomized, placebo-controlled study. *Gastroenterology.* 2005 Jun; 128(79):1805-11.
27. Sener G, Aksoy H, Sehirli O, Yüksel M, Aral C, Gedik N, Cetinel S, Yeğen BC.: Erdosteine prevents colonic inflammation through its antioxidant and free radical scavenging activities. *Dig Dis Sci.* 2007 Sep; 52(9): 2122-32.
28. Cakir B, Bozkurt A, Ercan F, Yeğen BC.: The anti-inflammatory effect of leptin on experimental colitis: involvement of endogenous glucocorticoids. *Peptides.* 2004 Jan; 25(1):95-104.
29. Bozkurt A, Cakir B, Ercan F, Yeğen BC.: Anti-inflammatory effects of leptin and cholecystokinin on acetic acid-induced colitis in rats: role of capsaicin-sensitive vagal afferent fibers. *Regul Pept.* 2003 Nov 15; 116(1-3):109-18.
30. Jahovic N, Gedik N, Ercan F, Sivanci S, Yüksel M, Sener G, Alican I.: Effects of statins on experimental colitis in normocholesterolemic rats. *Scand J Gastroenterol.* 2006 Aug; 41(8): 954-62
31. Granger DN, Hollwarth E, Parks DA: Ischemia-reperfusion injury: role of oxygen-derived free radicals. *Açta Physiol Scand (Suppl)* 548:47-63, 1986.
32. Pokorny AT, Bright DA, Cummings CW: The effects of allopurinol and superoxide dismutase in a rat model of skin flap necrosis. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 115:207-212, 1989
33. Lansek R, Packham D, Aspey BS, Harrison MJG: An assesment of the possible protective effect of allopurinol in acute stroke. *J Neurol Neurosurg Psychi* 49:585-587, 1986. meyabolites in experimental colitis. *Gut.* 1990 Jul, 31(7):786-90.
34. Millar AD, Rampton Ds, Chander CI, Claxson Aw, Blades S, Coumbe A, Panetta J, Morris CJ, Blake Dr.: evaluating the antioxidant potential of new treatments for inflammatory bowel disease using a rat model of colitis. *Gut.* 1996 Sep; 39(3):407-15
35. Dinda PK, Kossev P, Beck IT, Buell MG. Role of xanthine oxidase-derived oxidants and leucocytes in ethanol-induced jejunal mucosal injury. *Dig Dis Sci.* 1996 dec, 41(12):2462-70
36. Klein AS, Joh JW, Rangan U, Wang D, Bulkley GB. Allopurinol: discrimination of antioxidant from enzyme inhibitory activities. *Free Radic Biol Med.* 1996; 21(5):713-7
37. Sparrow MP, Hande SA, Fiedman S, Cao D, Hanauer SB. Effect of allopurinol on clinical outcomes in inflammatory bowel disease nonresponders to azathiopurine or mercaptopurine. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2007 Feb; 5(2):209-14
38. Reynolds PD, Rheinius ST, Hunter JO. Xanthine oxidase activity is not increased in the colonic mucosa of ulcerative colitis. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics.* 10(5):737-41, October 1996
39. Keshavarzian A, Morgan G, Sedghi S, Gordon JH, Doria M. Role of reactive oxygen metabolites in experimental colitis. *Gut.* 1990 Jul, 31(7):786-90
40. Pacifici RE, Davies KJ. Protein, lipid and DNA repair system in oxidative stress: The free radical-theory of aging revisited. *Gerontology* 1991; 31:166