

# Sıçanlarda geliştirilen akut ve kronik kolitte pentoksifilin'in etkisi

Effects of pentoxyphylline in acute and chronic colitis models in rats

Coşkun YILDIZ<sup>1</sup>, Nevin ORUÇ<sup>2</sup>, Filiz KURALAY<sup>3</sup>, Muhan ERKUŞ<sup>4</sup>, Figen ZİHNİOĞLU<sup>5</sup>, Ömer ÖZÜTEMİZ<sup>2</sup>

Tepecik Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Gastroenteroloji Kliniği<sup>1</sup>, İzmir

Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Gastroenteroloji Bilim Dalı<sup>2</sup>, İzmir

Dokuz Eylül Üniversitesi, Tıp Fakültesi Biyokimya Ana Bilim Dalı<sup>3</sup>, İzmir

Adnan Menderes Üniversitesi, Tıp Fakültesi Patoloji Ana Bilim Dalı<sup>4</sup>, Aydın

Ege Üniversitesi Fen Fakültesi, Kimya Bölümü<sup>5</sup>, İzmir

**Giriş ve Amaç:** Tümör nekroz faktör alfa, inflamatuvar barsak hastalığı patogeneğinde önemli rol oynayan proinflamatuvar bir sitokindir. Pentoksifilin tümör nekroz faktör alfa'nın makrofajlardan salınımını inhibe etmektedir. Bu çalışmada tümör nekroz faktör alfa inhibitörü pentoksifilin'in sıçanlarda asetik asit ile oluşturulmuş akut kolit ve trinitrobenzen sulfonik asit ile oluşturulmuş kronik kolit modelleri üzerine etkisi incelenmiştir. **Gereç ve Yöntem:** Çalışmada Swiss albino sıçanlar randomize olarak onarlı gruplara ayrılmıştır. Asetik asit ile akut kolit veya trinitrobenzen sulfonik asit ile kronik kolit oluşturulan sıçanlara grup protokollerine göre intraperitoneal veya intrarektal pentoksifilin (100 mg/kg) koruyucu ya da tedavi edici şekilde uygulanmıştır. Deney sonunda sıçanlarda serum tümör nekroz faktör alfa, kolon myeloperoksidaz aktivitesi ve kolonun makroskopik, histolojik hasar skorları incelenmiştir. **Bulgular:** Pentoksifilin, asetik asit ile oluşturulmuş akut deneysel kolit modelinde kontrol grubu ile karşılaştırıldığında makroskopik (1.33±0.28 kş 1.55±0.33) ve histolojik hasarda (3.11±0.20 kş 3.11±0.20) iyileşme sağlamamıştır. Ancak myeloperoksidaz aktivitesinde (0.689±0.021 kş. 1.358±0.121<0.0001) ve serum tümör nekroz faktör alfa seviyesinde (0.0344±0.020 kş. 13.03±3.278, <0.0001) belirgin düşüş gözlenmiştir. Trinitrobenzen sulfonik asite bağlı kronik kolit modelinde pentoksifilin'in sistemik uygulaması makroskopik hasarda iyileşme sağlamıştır (3.62±1.29 kş 6.90±.95, <0.05). Bu modelde tümör nekroz faktör alfa seviyeleri azalmakla birlikte fark anlamlı bulunmamıştır. **Sonuç:** Sonuç olarak akut ve kronik kolit modelinde koruyucu ya da tedavi edici şekilde pentoksifilin uygulamanın histopatolojik skorlar üzerine etkili olmadığını gördük. Kronik kolitte makroskopik hasardaki iyileşme tümör nekroz faktör alfa'dan bağımsızdır ve muhtemelen pentoksifilin'in mikrosirkulasyonu düzeltilmesi ile ilişkilidir.

**Anahtar kelimeler:** Asetik asit, kolit, pentoksifilin, TNBS, TNF-alfa

**Background and Aims:** Tumor necrosis factor-alpha is a proinflammatory cytokine that is also involved in the pathogenesis of colonic inflammation. Pentoxyphylline is a potent inhibitor of tumor necrosis factor-alpha released by macrophages. The aim of this study was to investigate the effects of pentoxyphylline treatment in acetic acid-induced acute colitis and trinitrobenzene sulfonic acid-induced chronic colitis models in rats. **Materials and Methods:** Female Swiss Albino rats were randomly assigned into groups with 10 rats in each. Distal acute colitis was induced in rats by intracolonic instillation of acetic acid. trinitrobenzene sulfonic acid was used to induce chronic colitis. Pentoxyphylline 100 mg/kg was applied as IP or IR in relevant groups as pretreatment or treatment. Colonic damage was assessed by macroscopic and histological criteria as well as biochemical markers, including tissue myeloperoxidase activity and serum tumor necrosis factor-alpha levels. **Results:** Pentoxyphylline pretreatment did not affect the macroscopic (1.33±0.28 vs. 1.55±0.33) or microscopic (3.11±0.20 vs 3.11±0.20) histological scores in acute colitis. However, pentoxyphylline suppressed colonic myeloperoxidase activity (0.689±0.021 vs. 1.358±0.121<0.0001) and serum tumor necrosis factor-alpha levels (0.0344±0.020 vs.13.03±3.278, p<0.0001) significantly. Administration of pentoxyphylline to trinitrobenzene sulfonic acid-treated rats improved trinitrobenzene sulfonic acid-induced changes in macroscopy (3.62±1.29 vs. 6.90±0.95, p<0.05). Tumor necrosis factor-alpha levels were similar between pentoxyphylline-treated or -untreated trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis. **Conclusions:** In conclusion, pentoxyphylline systemically or locally applied in acute and chronic colitis does not affect colonic histopathological damage. Amelioration of macroscopic damage in trinitrobenzene sulfonic acid colitis with systemic pentoxyphylline treatment was most likely the result of improvement in microcirculation rather than changes in tumor necrosis factor-alpha levels.

**Key words:** Acetic acid, colitis, pentoxyphylline, TNBS, TNF-alpha

## GİRİŞ

İnflamatuvar barsak hastalıkları etiopatogenezi tam olarak aydınlatılamamış, ekstraintestinal bulguları olabilen barsağın kronik, nonspesifik inflamatuvar hastalıklarıdır. Patogeneğinde mu-koza koruyucu faktörlerin dengesinde bozulma,

bakteri aşırı çoğalması, sitokin ve inflamatuvar mediatörlerin sentezinde değişiklikler sorumlu tutulmaktadır (1). İmmun sistemin regülasyonunda ve inflamatuvar cevapta en büyük rol sitokinlere aittir. Sitokinlerin bir kısmı inflamatuvar

hücreleri aktive ederken bir kısmı hemopoetik hücrelerin büyüme, farklılaşma ve aktivasyonunu sağlarlar (2).

İnflamatuvar barsak hastalığında proinflamatuvar sitokinlerin arttığı ve inflamasyonda rol oynadığı düşünülmektedir. Özellikle TNF- $\alpha$ , inflamatuvar barsak hastalığı patogenezinde mukozal immün yanıtın düzenlenmesinde önemli rol oynayan proinflamatuvar bir sitokindir (3). IL-1 ve TNF-alfa makrofajlar, polimorf nükleuslu lökositler, fibroblast ve endotel hücrelerini uyararak diğer sitokinlerin, araşidonik asit metabolitlerinin ve proteazların salınımını sağlarlar. Ayrıca, IL-1, TNF-alfa ve INF-gamma inflamatuvar hücrelerin damar duvarına yapışmasını ve damar duvarından migrasyonunu sağlayan adezyon moleküllerinin salgılanmasına neden olurlar.

Pentoksifilin (PTX) uzun zamandan beri serebral ve periferel vasküler hastalıkların tedavisinde kullanılan, nötrofil adezyonunu ve uyarılmış makrofajlarda TNF-alfa salınımını inhibe ettiği gösterilmiş, antiinflamatuvar ve antifibrotik özelliği olan (1-5-oxohexyl)-3,7 dimethyl xanthine (pentoxifylline) türevi bir ilaçtır (4-6). PTX, proinflamatuvar sitokinlerin sentezini önleyerek minimal immunosupressif aktivite de gösterir (7). PTX, nötrofillerin yıkımını ve süperoksit serbestleştirmesini fagositoz fonksiyonlarını etkilemeksizin engellemektedir (6).

Pentoksifilin'in farklı inflamasyon modellerinde yararlı etkilerini gösteren çok sayıda çalışma vardır (8, 9). Buna karşın, kolonun akut ve kronik inflamasyonunda pentoksifilin'in etkinliğini inceleyen detaylı çalışmalar sınırlıdır (10). Bu çalışmanın amacı, sıçanlarda geliştirilen akut ve kronik deneysel kolit modellerinde pentoksifilin'in etkinliğini araştırmaktır.

## GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmalar Deneysel Etik Komitesinin izniyle Ege ÜTF Deneysel Cerrahi laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. Çalışma süresince *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* ([www.nap.edu/catalog/5140.html](http://www.nap.edu/catalog/5140.html)) prensipleri doğrultusunda hareket edilmiştir.

Bu çalışmada ortalama 200 g (180-220 g) ağırlığında 160 adet Swiss Albino cinsi dişi sıçan kullanılmıştır. Sıçanlar Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Merkezinden temin edilmişlerdir. Çalışmada sıçanlar randomize olarak onar

hayvanlık gruplara ayrılmış ve deney sonuna kadar ayrı kafeslerde tutulmuştur. Deneyden önce sıçanlar standart sıçan yemi ve su ile beslenmişler, deneyden bir gün önce aç bırakılmışlardır. Sıçanlar standart koşullarda 12 saatlik gündüz gece siklusü korunarak 24 °C oda sıcaklığında barındırılmışlardır.

Asetik asit Erkim Medikalden, trinitro-benzen sülfonik asit (TNBS) Sigma'dan (Sigma, La Verpaille, Fransa) satın alınmıştır. PTX dozu 100 mg/kg olarak belirlenmiş, intrarektal (İR) veya intraperitoneal (İP) olarak, koruyucu veya tedavi edici şekilde uygulanmıştır. PTX'in doza bağımlı etkinliğinden bahsedildiği için bazı gruplara tekrarlayan dozlarda ilaç verilmiştir. İlacın uygulama sırasında oda ısısında olmasına dikkat edilmiştir. Kontrol gruplarında İR veya İP serum fizyolojik kullanımı oda ısısında ve 1 ml olacak şekilde belirlenmiştir. Tüm İP uygulamalar sıçanlar eter anestezisi altında iken insulin enjektörü ile karın sağ alt kadrından periton içine yavaşça yapılmıştır. Tüm İR uygulamalar, 7F yumuşak sonda ile, eter anestezisi altında anüsten 6 cm girilerek yapılmış, ardından 1 ml hava verilmiş ve sıçanlar uygulamadan sonra 30 saniye süre ile baş aşağı tutulmuşlardır. Çalışmanın başlangıcında sıçanlar kontrol, akut ve kronik kolit modelini oluşturmak üzere üç ana gruba ayrılmışlardır. Akut kolit modelinde 100, Kronik kolit modelinde 60 sıçan üzerinde çalışılmıştır.

## Akut kolit modeli

Çalışmamızda asetik asitle akut kolit modeli oluşturulmuştur. Hafif eter anestezisi altında olan sıçanlara yumuşak pediatrik sonda rektal yolla 6 cm ileriye ulaşacak şekilde yerleştirilmiştir. Hayvanlar bu işlem sırasında Trendelenburg pozisyonuna getirilmiştir. Asetik asit %4 çözeltisi (1 ml, pH:2,5) yavaş şekilde IR kateterle rektuma uygulanmıştır. Sıçanlar 30 saniye Trendelenburg pozisyonunda tutulmuştur. Deney grupları aşağıdaki gibi düzenlenmiştir (Şekil 1).

*Grup A:* (n=10) İP PTX (100 mg/kg) verildikten 1 saat sonra İR asetik asit verilmiştir. Bu işlemden 48 saat sonra sıçanlar sakrifiye edilmiştir.

*Grup AK:* (n=10) İP 1 ml salin verildikten 1 saat sonra İR asetik asit verilmiştir. Bu işlemden 48 saat sonra sıçanlar sakrifiye edilmiştir.

*Grup B:* (n=10) İP PTX 100 mg/kg 3 gün süreyle günde tek doz olacak şekilde verilmiştir. Üçüncü gün ayrıca PTX uygulamasından bir saat sonra

İR asetik asit verilmiştir. Bu işlemden 48 saat sonra sıçanlar sakrifiye edilmiştir.

**Grup BK:** (n=10) İP 1 ml salin 3 gün süreyle günde tek doz olacak şekilde verilmiştir. Üçüncü gün ayrıca salin uygulamasından bir saat sonra İR asetik asit verilmiştir. Bu işlemden 48 saat sonra sıçanlar sakrifiye edilmiştir.

**Grup C:** (n=10) İR asetik asit uygulamasından 12 saat sonra ve 12 saat aralarla 3 kez İP PTX verilmiş ve son uygulamadan 12 saat sonra sıçanlar sakrifiye edilmişlerdir.

**Grup CK:** (n=10) İR asetik asit uygulamasından 12 saat sonra ve 12 saat aralarla 3 kez İP 1 ml salin verilmiş ve son uygulamadan 12 saat sonra sıçanlar sakrifiye edilmişlerdir.

**Grup D:** (n=10) İR PTX (100 mg/kg) verildikten 1 saat sonra İR asetik asit verilmiştir. Bu işlemden 48 saat sonra sıçanlar sakrifiye edilmiştir.

**Grup DK:** (n=10) İR salin 1 ml verildikten 1 saat sonra İR asetik asit verilmiştir. Bu işlemden 48 saat sonra sıçanlar sakrifiye edilmiştir.

**Grup E:** (n=10) İR asetik asit uygulamasından 12 saat sonra ve 12 saat aralarla 3 kez İR PTX (100 mg/kg) verilmiş ve son uygulamadan 12 saat sonra sıçanlar sakrifiye edilmişlerdir.

**Grup EK:** (n=10) İR asetik asit uygulamasından 12 saat sonra ve 12 saat aralarla 3 kez İR salin 1 ml verilmiş ve son uygulamadan 12 saat sonra sıçanlar sakrifiye edilmişlerdir.

### Kronik kolit modeli

Bu gruplarda kolit oda ısısında %30'luk etanol içinde eritilmiş 0.25 ml'sinde 30 mg TNBS bulunan eriyikten 0.25 ml İR verilerek oluşturulmuştur. Gruplar şu şekilde oluşturulmuştur (Şekil 2).

**Grup X:** (n=10) İR uygulanan TNBS'den 24 saat sonra İP PTX 6 kez 24 saat aralarla günde bir doz olacak şekilde verilmiştir. Son uygulamadan 24 saat sonra sıçanlar sakrifiye edilmişlerdir.

**Grup XK:** (n=10) İR uygulanan TNBS'den 24 saat sonra İP salin 1 ml 6 kez 24 saat aralarla günde bir doz olacak şekilde verilmiştir. Son uygulamadan 24 saat sonra sıçanlar sakrifiye edilmişlerdir.

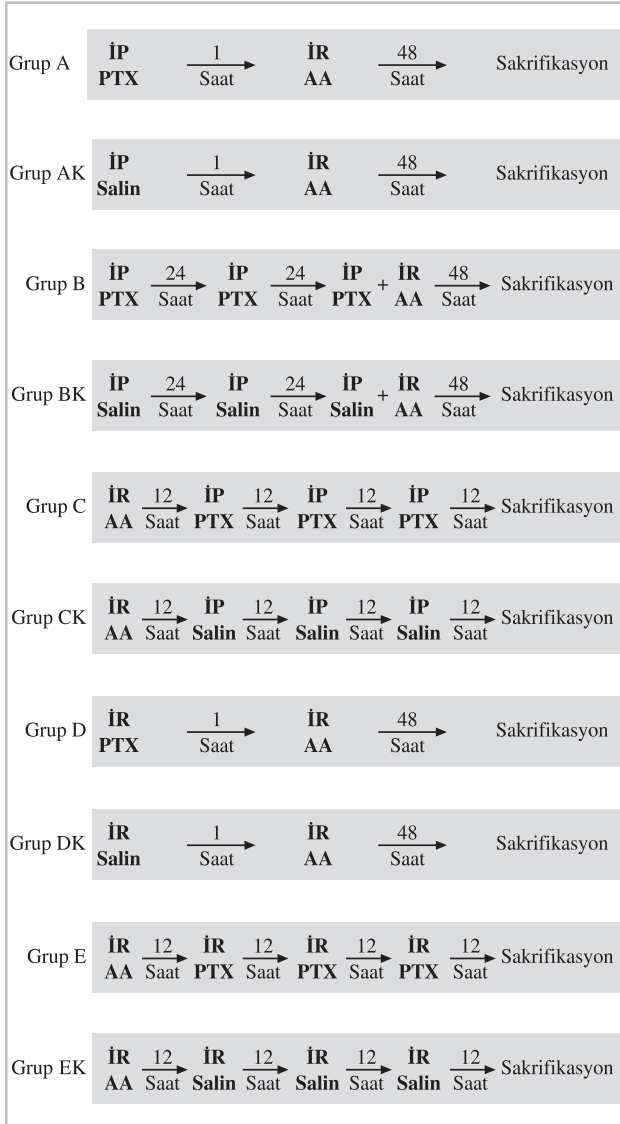
**Grup Y:** (n=10) İR uygulanan TNBS'den 24 saat sonra İR PTX 6 kez 24 saat aralarla günde bir doz olacak şekilde verilmiştir. Son uygulamadan 24 saat sonra sıçanlar sakrifiye edilmişlerdir.

**Grup YK:** (n=10) İR uygulanan TNBS'den 24 saat sonra İR salin 1 ml 6 kez 24 saat aralarla günde bir doz olacak şekilde verilmiştir. Son uygulamadan 24 saat sonra sıçanlar sakrifiye edilmişlerdir.

**Grup Z:** (n=10) İP PTX 24 saat aralarla 3 kez uygulandıktan 24 saat sonra İR TNBS verilmiştir. Bu son uygulamadan tam 7 gün sonra sıçanlar sakrifiye edilmişlerdir.

**Grup ZK:** (n=10) İP salin 1 ml 24 saat aralarla 3 kez uygulandıktan 24 saat sonra İR TNBS verilmiştir. Bu son uygulamadan tam 7 gün sonra sıçanlar sakrifiye edilmişlerdir.

Sıçanlar deney sonunda eter anestezisi altındayken servikal dislokasyon yapılarak sakrifiye edilmiştir. Akut ve kronik kolit modellerinde ve kontrol grubunda sakrifikasyondan hemen önce in-



Şekil 1. Akut kolit grubunda deneysel model ve gruplar

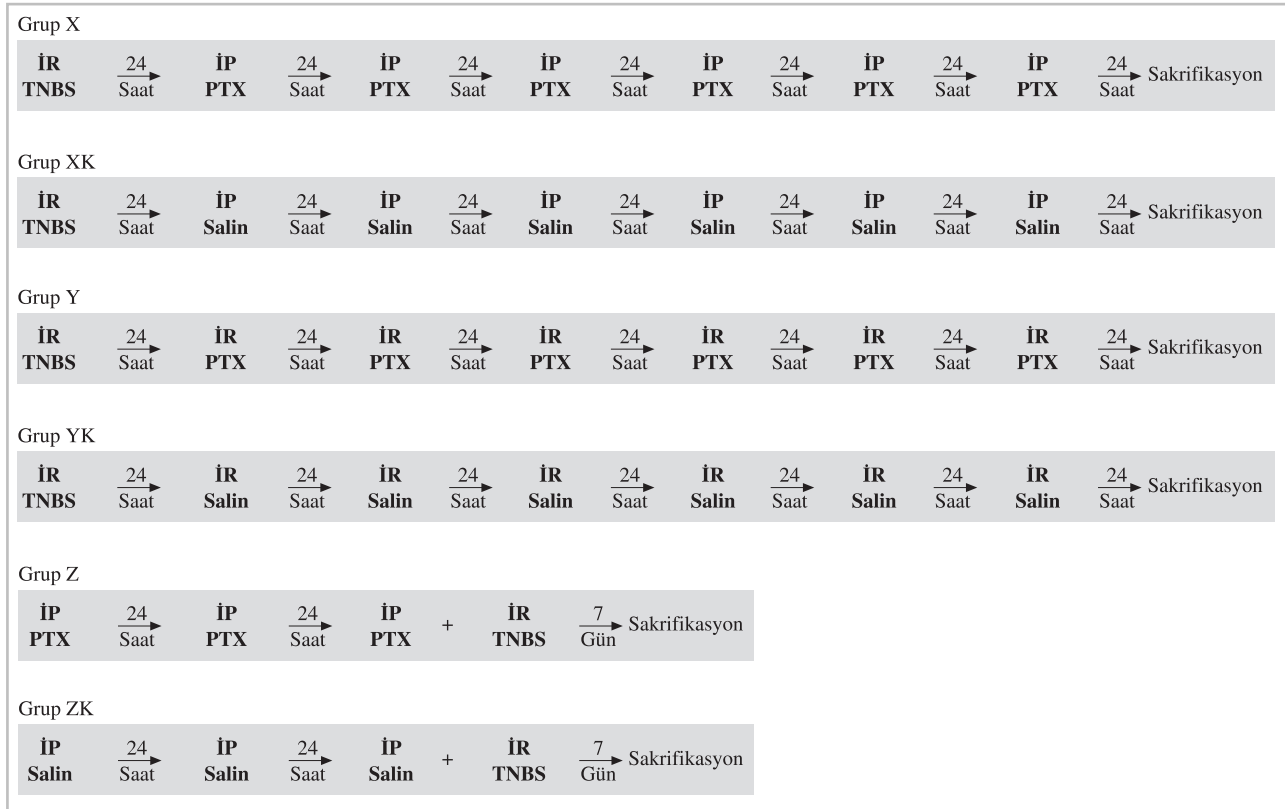
trakardiyak yoldan 2 cc'lik enjektör ile düz kan alınmıştır. Alınan kanlar derhal santrifüj edilerek serumları ayrılmıştır. Bu serumlar daha sonra çalışılmak üzere -80 C° derin dondurucuda (Sanyo MDF-U70V) saklanmıştır. Sıçanlar sakrifiye edildikten sonra batinları longitudinal bir kesi ile açılmış, kolon ortaya çıkarılmıştır. Kolon anüse en yakın yerden ve splenik fleksura düzeyinden kesilerek çıkarılmıştır. Daha sonra kolon mezenterik kenarı boyunca longitudinal olarak kesilerek açılmıştır. Mukoza serum fizyolojik ile yıkandıktan sonra lup ile bakılarak makroskopik skorlama yapılmıştır. Makroskopik skorlama "Akut Kolit Grubu"nda daha önce Wallace (11) ve arkadaşlarının tarif ettiği şekilde yapılmıştır. "Kronik Kolit Grubu"nda makroskopik skorlama Vilaseca (12) ve arkadaşlarının tarif ettiği şekilde yapılmıştır. Daha sonra bu segmentler formalin içine alınmış ve parafinle sabitlenmiştir. Kolon hasarı çalışma gruplarından habersiz patolog tarafından değerlendirilmiştir. Örnekler hemotoksilen eozin ile boyanarak kolit hasar skorlaması uygulanmıştır. "Akut Kolit Grubu"nda histopatolojik skorlama Noronha-Blob (13) ve arkadaşlarının tanımladığı şekilde yapılmıştır. "Kronik Kolit Grubu"

bu"nda histopatolojik skorlama Vilaseca (12) ve arkadaşlarının tarif ettiği şekilde yapılmıştır. Kolon segmentinin proksimal kısmından 1 cm'lik segment ayrılarak myeloperoksidaz (MPO) aktivitesinin ölçümünde kullanılmıştır. Bu örnekler işlem gününe kadar -80 C° derin dondurucuda (Sanyo MDF-U70V) saklanmıştır.

**MPO Tayini:** İki-üç mm kalınlığında kesilen kolon parçaları içerisinde 50 mM phosphate buffer bulunan 5 ml %0,5 hexadecyltrimethylammonium bromid'e eklenerek 30 saniye süre ile politron homojenizatörde 3 kez homojenize edilmiştir. Homojenizat 40000 g'de 20 dakika +4 C°'de santrifüje edilmiş ve süpernatantdan MPO enzim aktivitesi tayin edilerek U/g yaş doku olarak ölçülmüştür (14).

**TNF-alfa Tayini:** Serum örneklerinde Cytoscreen Immunoassay (Biosource-Rat TNF- $\alpha$ , Biosource International, Inc; California-USA) kiti ile ELISA yöntemi ile çalışılmıştır.

**İstatistik Analiz:** Sonuçlar verilere göre ortalama  $\pm$  SEM olarak verilmiştir. Analizler SPSS istatistik programı (SPSS software, PC versiyon 10.01; SPSS, Chicago IL) ile yapılmıştır. İstatistiksel farklılıkları



Şekil 2. Kronik kolit grubunda deneysel model ve gruplar

rı değerlendirilmede non-parametrik Mann-Whitney U testi veya Students t test kullanılmıştır.  $p < 0.05$  istatistik olarak anlamlı kabul edilmiştir.

## BULGULAR

### Akut kolit grubu

**Makroskopik skor:** Akut kolit modelinde, PTX uygulanan gruplar ile kontrol grupları karşılaştırıldığında makroskopik skorlar açısından istatistiksel anlamlı fark saptanmamıştır (Tablo-1).

**Histolojik skor:** Akut kolit modelinde, PTX uygulanan gruplar ve kontrol gruplarının histopatolojik skorları istatistiksel olarak benzer bulunmuştur (Resim 1).

**TNF-alfa düzeyleri:** Akut kolit grubunda, TNF-alfa düzeyleri A Grubunda,  $0,0344 \pm 0,02$  pg/ml, AK grubunda  $13,03 \pm 3,27$  pg/ml olarak bulunmuştur ( $p < 0,0001$ ). B grubunda,  $0,392 \pm 0,09$  pg/ml, BK grubunda  $8,123 \pm 2,14$  pg/ml olarak bulunmuştur. ( $p < 0,0001$ ) Grup C ve E'de TNF-alfa düzeyi PTX uygulaması ile kontrol gruplarına göre belirgin bir düşüş göstermesine rağmen istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır. D grubunda ise kontrol grubuna göre herhangi bir düşme izlenmemiştir (Tablo 1).

**MPO düzeyleri:** MPO düzeyleri, PTX uygulanan gruplarda kontrol gruplarından istatistiksel ola-

rak anlamlı düşük bulunmuştur. MPO düzeyleri A grubunda  $0,689 \pm 0,021$  U/gr doku, AK grubunda  $1,358 \pm 0,121$  U/gr doku ( $p < 0,0001$ ); B grubunda  $1,336 \pm 0,049$  U/gr doku, BK grubunda  $2,207 \pm 0,215$  U/gr doku ( $p < 0,0001$ ); C grubunda  $1,023 \pm 0,075$  U/gr doku, CK Grubunda  $1,762 \pm 0,143$  U/gr doku ( $p < 0,0001$ ); D grubunda  $0,699 \pm 0,056$  U/gr doku, DK grubunda  $1,286 \pm 0,149$  U/gr doku ( $p = 0,0021$ ) ve E grubunda  $1,146 \pm 0,109$  U/gr doku, EK Grubunda  $2,092 \pm 0,256$  U/gr doku olarak bulunmuştur ( $p = 0,0003$ ) (Tablo 1).

### Kronik kolit grubu

**Makroskopik skor:** Kronik kolit modelinde, makroskopik skorlar X grubunda  $3,62 \pm 1,29$ , XK grubunda  $6,90 \pm 0,95$  olarak bulunmuştur ( $p < 0,05$ ). Diğer gruplarda PTX uygulanan gruplar kontrol grupları ile karşılaştırıldığında makroskopik skorlar arasında istatistiksel anlamlı farklılık saptanmamıştır (Tablo 1).

**Histolojik skor:** Kronik kolit modelinde, tüm gruplarda PTX ile kontrol grupları karşılaştırıldığında histopatolojik skorlar açısından istatistiksel önemde farklılık saptanmamıştır (Resim 2).

**TNF-alfa düzeyleri:** Kronik kolit modelinde, tüm gruplarda PTX uygulaması kontrol gruplarına göre TNF-alfa düzeylerinde kısmi bir düşüş sağla-

**Tablo 1.** Tüm gruplarda toplu sonuçlar (ortalama  $\pm$  SEM)

Gruplar	Makroskopik skor	Histolojik skor	TNF- $\alpha$ pg/ml	MPO U/gr doku
A	$1.33 \pm 0.28$	$3.11 \pm 0.20$	$0.0344 \pm 0.02$	$0.689 \pm 0.021$
AK	$1.55 \pm 0.33$	$3.11 \pm 0.26$	$13.03 \pm 3.278$	$1.358 \pm 0.121$
<b>P değeri</b>	NS	NS	<b>&lt;0.0001</b>	<b>&lt;0.0001</b>
B	$1.8 \pm 0.29$	$3.90 \pm 0.10$	$0.392 \pm 0.09$	$1.336 \pm 0.049$
BK	$2.0 \pm 0.29$	$3.70 \pm 0.15$	$8.123 \pm 2.147$	$2.207 \pm 0.215$
<b>P değeri</b>	NS	NS	<b>&lt;0.0001</b>	<b>&lt;0.0001</b>
C	$1.0 \pm 0.21$	$2.10 \pm 0.18$	$10.82 \pm 0.84$	$1.023 \pm 0.075$
CK	$1.4 \pm 0.22$	$2.50 \pm 0.16$	$20.40 \pm 4.93$	$1.762 \pm 0.143$
<b>P değeri</b>	NS	NS	NS	<b>&lt;0.0001</b>
D	$0.8 \pm 0.29$	$1.80 \pm 0.29$	$0.208 \pm 0.069$	$0.699 \pm 0.056$
DK	$1.2 \pm 0.41$	$2.50 \pm 0.26$	$0.117 \pm 0.043$	$1.286 \pm 0.149$
<b>P değeri</b>	NS	NS	NS	<b>&lt;0.01</b>
E	$0.8 \pm 0.13$	$2.70 \pm 0.21$	$8.301 \pm 0.578$	$1.146 \pm 0.109$
EK	$1.5 \pm 0.30$	$3.30 \pm 0.21$	$11.26 \pm 2.344$	$2.092 \pm 0.256$
<b>P değeri</b>	NS	NS	NS	<b>&lt;0.001</b>
X	$3.62 \pm 1.29$	$4.87 \pm 0.89$	$15.09 \pm 2.743$	$0.528 \pm 0.087$
XK	$6.90 \pm 0.95$	$4.90 \pm 1.04$	$18.61 \pm 3.275$	$0.834 \pm 0.111$
<b>P değeri</b>	<b>&lt;0.05</b>	NS	NS	<b>&lt;0.05</b>
Y	$4.44 \pm 1.46$	$5.77 \pm 1.23$	$10.30 \pm 1.367$	$0.797 \pm 0.070$
YK	$5.0 \pm 1.48$	$7.28 \pm 1.40$	$12.54 \pm 3.47$	$3.372 \pm 0.232$
<b>P değeri</b>	NS	NS	NS	<b>&lt;0.001</b>
Z	$5.60 \pm 0.83$	$8.60 \pm 0.84$	$13.93 \pm 2.556$	$1.289 \pm 0.107$
ZK	$4.90 \pm 0.80$	$8.20 \pm 0.62$	$16.48 \pm 1.832$	$1.267 \pm 0.085$
<b>P değeri</b>	NS	NS	NS	NS

TNF- $\alpha$ : Tümör nekroz faktör-alfa, MPO: Myeloperoksidaz, NS: Non significant

masına karşın bu istatistik olarak anlamlı bulunmamıştır (Tablo-1).

**MPO düzeyleri:** MPO düzeyleri, X grubunda  $0,528 \pm 0,087$  U/gr doku, XK grubunda  $0,834 \pm 0,111$  U/gr doku ( $p < 0,05$ ), Y grubunda  $0,797 \pm 0,07$  U/gr doku, YK Grubunda  $3,372 \pm 0,232$  U/gr doku olarak bulunmuştur ( $p = 0,0002$ ) (Tablo-1).

## TARTIŞMA

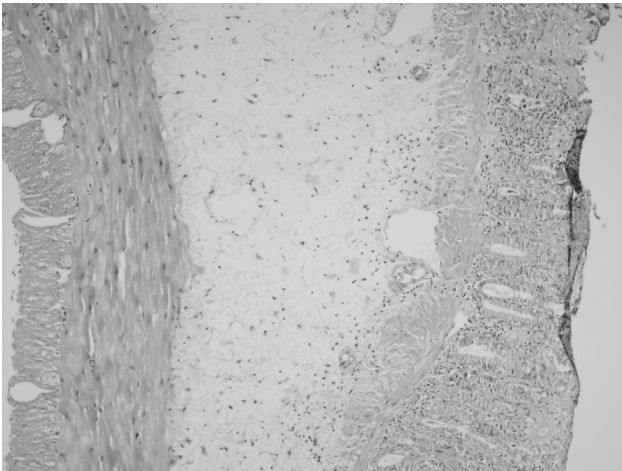
İnflamatuvar barsak hastalığı, nedeni tam bilinmeyen, etkin tedavi seçenekleri halen araştırılan kronik inflamatuvar bir hastalıktır (15). Hem insan hem de deneysel kolit modellerinde sitokinler, kemokinler, adezyon molekülleri gibi inflamatuvar mediatörlerin regülasyonundaki değişikliğin temel rol oynadığına dair veriler mevcuttur (16, 17). Hastalığın etiopatogenezinin aydınlatılmasında ve yeni tedavi seçeneklerinin incelenmesinde çeşitli deneysel modeller kullanılmaktadır. Asetik asit ve TNBS ile oluşturulan deneysel kolit modellerinin geçerliliği daha önceki çalışmalarda gösterilmiştir (18). Asetik asit koliti akut olarak gelişmektedir ve daha çabuk iyileşme eğilimi göstermektedir. Histopatolojik olarak tabloya inflamasyon hâkimdir. İnsanlarda izlenen ülseratif kolit ise daha yavaş olarak ortaya çıkar ve akut ve kronik inflamasyonun tüm elemanlarını içerir. Çalışmamızda hem akut hem kronik kolit modelleri seçilmiş ve PTX'in etkinliği her iki modelde incelenmiştir.

PTX'in, inflamasyon oluşturulmuş çeşitli hayvan modellerinde anti-inflamatuvar etkileri ortaya

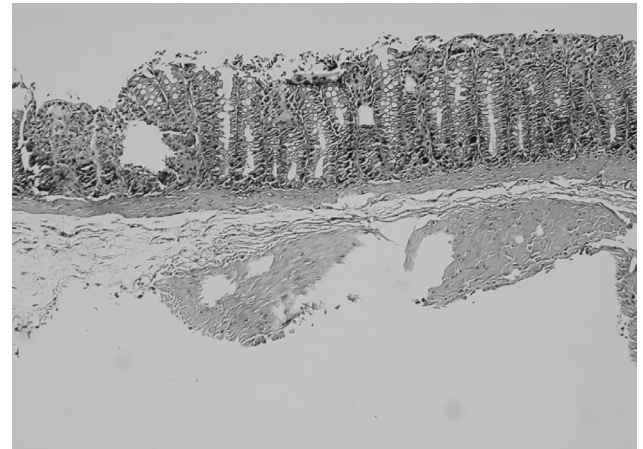
konmuştur (19). Buna ek olarak karaciğer hastalığı hayvan modellerinde pentoksifilin anti-fibrotik etki gösterdiği ve TNF-alfa ekspresyonunu azalttığı gösterilmiştir (8, 9). Bu güne kadar yapılmış PTX ile ilgili çalışmalarda  $100 \text{ mg/kg}$  ve  $200 \text{ mg/kg}$  gibi yüksek dozlar kullanılmış ve yararlı etkisinin doza bağımlı olarak arttığı gösterilmiştir (20). Ancak tedavide  $200 \text{ mg/kg}$  ve üzerindeki uygulamalarda toksik etkiler bildirilmiştir. PTX'in  $100 \text{ mg/kg}$  dozda uygulaması ile toksik etki bildirilmemiş ve çalışmamızda bu doz kullanılmıştır (21). Çalışmamızda PTX hem İR hem de İP yoldan, gerek koruyucu gerekse de tedavi edici şekillerde uygulanmış ve farklı doz ve uygulama şeklinin etkinliği araştırılmıştır.

Literatürde PTX'in sıçanlardaki asetik aside bağlı akut kolit modelinde etkisini inceleyen bir çalışma mevcut değildir. Çalışmamızda PTX'in asetik asit ile oluşturulmuş akut kolit modelinde makroskopik ve histopatolojik skorlar üzerine etkisi olmamıştır. Bu gruplarda İP uygulanan PTX TNF alfa seviyesinde özellikle koruyucu uygulamada ve tekrarlayan dozlarda anlamlı düşme sağlamıştır. İR uygulama ise asetik asite bağlı kolit modelinde TNF-alfa seviyelerini etkilememiştir. Ancak gerek lokal gerekse IP uygulanan PTX kolon dokusunda MPO aktivitesini anlamlı olarak baskılamıştır. Bu etki PTX'in inflamatuvar hücrelerin adezyon ve aktivitesini değiştirmesi ile açıklanabilir.

TNBS ile kolit geliştirilmiş sıçanlara 7 gün boyunca, tedavi şeklinde İP PTX uygulanması, makroskopik kolit skorunu anlamlı olarak iyileştirmiştir.



**Resim 1.** Asetik asitle oluşturulmuş akut kolit modelinde pentoksifilin histolojik hasarı azaltmamıştır. Mukoza hasarı ödem ve inflamasyon izlenmektedir (H ve E, x200).



**Resim 2.** TNBS kolonda kronik inflamasyona yol açmış, pentoksifilin ise hasarı azaltmakta etkili bulunmamış, histolojik hasarı azaltmamıştır. Kript yapılarında bozulma, mukoza hasarı, ödem dikkat çekmektedir (H ve E, x200)

İR PTX uygulaması TNBS koliti makroskopik skorunda hafif bir düzelmeye neden olmuştur; ancak bu istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır. İP PTX koruyucu olarak uygulandığında kronik kolit modelinde yeterli etkinlik gözlenmemiştir. Sonuçta kronik inflamasyonlarda uzun süre ve yüksek doz sistemik PTX uygulamasının tedavi etkinliği olacağı düşünülebilir. Peterson ve arkadaşları (22) İR PTX uyguladıkları TNBS kolitli sıçanlarla sadece TNBS koliti oluşturulmuş sıçanların makroskopik skorlarını kıyasladıklarında PTX grubunda hasar skorunu anlamlı oranda daha düşük bulmuşlardır. Ancak bu araştırmacılar TNBS ile kronik kolit oluşturdukları sıçanları 5. günde, biz ise 7. günde sakrifiye ederek makroskopik değerlendirmeye aldık. Zira Yamada ve arkadaşları TNBS ile oluşturulan kronik kolit modelinde maksimum hasarın 7-14 günde ortaya çıktığını bildirmişlerdir. Peterson ve arkadaşlarının (22) sonuçları ile aramızdaki farklılık buradan kaynaklanıyor olabilir. Murthy ve arkadaşları dextran sülfat ile oluşturulmuş kronik kolit modeli çalışmalarında; PTX (100 mg/kg) uyguladıkları grupta histolojik değerlendirmede kontrol grubuna göre ülser indeksinin %67.7, inflamasyon skorunun %71.67 azaldığını bildirmişlerdir (23). Bizim çalışmamızda ise TNBS ile oluşturulmuş kolit modeli kullanılmış ve histolojik parametrelerde değişiklik izlenmemiştir. TNBS kolit gruplarında İP pentoksifilin uygulaması MPO aktivitesini önemli oranda baskılamış ancak TNF-alfa seviyesini anlamlı oranda azaltamamıştır. Bulgular kronik inflamatuvar süreçlerde TNF-alfa salınmasını düzenleyen farklı yollar olması ile açıklanabilir.

İnflamatuvar barsak hastalığı patogeneğinde anahtar rol oynadığı düşünülen TNF-alfa'nın düzeylerinde pentoksifilin uygulaması ile belirgin düşüşler kaydetmemize karşın, akut kolit modelinde bunun makroskopik ve histolojik bulgulara yansımaması, akut kolonik inflamasyonda sade-

ce TNF-alfa'nın değil, daha farklı mediatörlerin de rol oynadığını düşündürmektedir. Proinflamatuar sitokinlerin düzenlenmesinde nükleer faktör-kappa B'nin (NF-κB) rol aldığı bilinmektedir (24). NF-κB, inflamasyon genlerinin kopyalanmasını kontrol ettiğinden inflamasyonun regülasyonunda merkezi rol oynadığı düşünülmektedir. İnflamatuvar barsak hastalıklı olguların intestinal lamina propria biyopsi örneklerinin nükleer ekstraktlarında NF-κB p65 subüni düzeyleri artmış olarak bulunmuştur. Steroidler p65 subünitinin translokasyonunu inhibe ederek fonksiyonel aktif NF-κB'nin etkisini azaltırlar (24). Benzer şekilde PTX'in de NF-κB aktivasyonunu azalttığı gösterilmiştir (25). Ancak kolit modelinde NF-κB inhibisyonunun yararlı etki göstermediği daha önceki çalışmalarımızda ortaya konmuştu (26). PTX intestinal mikrovasküler kan akımını artırmaktadır. Flynn ve arkadaşları (27) sıçanlarda asetik asit ile oluşturulan kolit modelinde, mukozal hasarın ağırlığında ve ilerleyişinde mukozal kan akımının önemli rolünün olduğunu göstermişlerdir. PTX eritrosit deformasyonunu düzeltmekte, trombosit agregasyonunu ve plazma fibrinojen konsantrasyonunu azaltarak kanın viskozitesini azaltmakta ve dokuların oksijenizasyonunu artırmaktadır. TNBS kolitinde izlenen makroskopik iyileşme kısmen mikrosirkulasyondaki iyileşme ile açıklanabilir.

Çalışmamızda, akut ve kronik kolit modelinde koruyucu ya da tedavi edici şekilde PTX uygulamanın histopatolojik skorlar üzerine etkili olmadığını gördük. PTX, asetik asit ile oluşturulmuş akut ve TNBS ile oluşturulmuş kronik deneysel kolit modellerinde MPO enzim aktivitesinde belirgin düşüş sağlamıştır. Bu etki sadece TNF-alfa düzeyleri ile açıklanamamaktadır. PTX etkisini ve inflamatuvar barsak hastalığı fizyopatolojisini araştıran daha ileri çalışmalara gereksinim vardır.

## KAYNAKLAR

1. Dieleman LA, Ridwan BU, Tennyson GS, et al. Dextran sulfate sodium-induced colitis occurs in severe combined immunodeficient mice. *Gastroenterology* 1994;107:1643-52.
2. Katz J. Inflammatory Bowel Disease. *The Medical Clinics of North America* 1994;78:1207-31.
3. Sandborn WJ, Hanauer SB. Antitumor necrosis factor therapy for inflammatory bowel disease: a review of agents, pharmacology, clinical results, and safety. *Inflamm Bowel Dis* 1999;5:119-33.
4. Novick JW, Sullivan G, Mandell G. New pharmacological studies with pentoxifylline. *Biorheology* 1990;27:449-54.
5. Stricter RM, Remick DG, Ward PA, et al. Cellular and molecular regulation of tumor necrosis factor-alpha production by pentoxifylline. *Biochem Biophys Res Comm* 1988;155:1230-6.
6. Sullivan GW, Carper HT, Novock JW, et al. Inhibition of inflammatory action of interleukin-1 and tumor necrose factor (alpha) on neutrophil function by pentoxifylline. *Infect and Imm* 1988;56:1722-9.

7. Noel C, Copin MC, Hazzan M, et al. Immunomodulatory effect of pentoxifylline during human allograft rejection: involvement of tumour necrosis factor- $\alpha$  and adhesion molecules. *Transplantation* 2000;69:1102-7.
8. Ward A, Clissold SP. Pentoxifylline. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties and its therapeutic efficacy. *Drugs* 1987;34:50-97.
9. Peterson TC. Pentoxifylline prevents fibrosis in an animal model and inhibits platelet derived growth factor driven proliferation of fibroblasts. *Hepatology* 1993;17:486-93.
10. Armstrong AM, Foulkes R, Jennings G, et al. Tumour necrosis factor inhibitors reduce the acute-phase response in hapten-induced colitis. *Br J Surg*. 2001;88:235-40.
11. Wallace JL, Whittle BJR, Boughton-Smith NK. Prostaglandin protection of rat colonic mucosa from damage induced by ethanol. *Dig Dis Sci* 1985;30:866-76.
12. Vilaseca J, Salas A, Guarner R, et al. Dietary fish oil reduces progression of chronic inflammatory lesions in a rat model of granulomatous colitis. *Gut* 1990;31:539-44.
13. Noronha-Blob L, Lowe VC, Mulhauser RO, et al. NPC 15669, an inhibitor of neutrophil recruitment, is efficacious in acetic acid-induced colitis in rats. *Gastroenterology* 1993;104:1021-9.
14. Krawisz JE, Sharon P, Stenson WF. Quantitative assay for acute intestinal inflammation based on myeloperoxidase activity. *Gastroenterology* 1984;87:1344-50.
15. Rutgeerts P. Medical therapy of inflammatory bowel disease. *Digestion* 1998;59:453-69.
16. Arai Y, Takanashi H, Kitagawa H, et al. Involvement of interleukin-1 in the development of ulcerative colitis induced by dextran sulfate sodium in mice. *Cytokine* 1998;10:890-6.
17. Rogler G, Andus T. Cytokines in inflammatory bowel disease. *World J Surg* 1998;22:382-9.
18. MacPherson BR, Pfeiffer CJ. Experimental production of diffuse colitis in rats. *Digestion* 1978;17:135-50.
19. Zhang J, Luo B, Tang L, et al. Pulmonary angiogenesis in rat experimental hepatopulmonary syndrome. *Gastroenterology* 2008 (e-pub).
20. Santucci L, Fiorucci S, Giansanti M, et al. Pentoxifylline prevents indomethacin induced acute gastric mucosal damage in rats; role of tumour necrosis factor  $\alpha$ . *Gut* 1994;35:909-15.
21. Yönetçi N, Köseklı MA, Özütemiz Ö, et al. Effects of pentoxifylline on alcohol-induced gastric injury and acid secretion in rats. *Dig Dis Sci* 2003;48:1392-6.
22. Peterson TC, Davey K. Effect of acute pentoxifylline treatment in an experimental model of colitis. *Aliment Pharmacol Ther* 1997;11:575-80.
23. Murthy S, Cooper SH, Yoshitake H, et al. Combination therapy of pentoxifylline and TNF- $\alpha$  monoclonal antibody in dextran sulphate-induced mouse colitis. *Aliment Pharmacol Ther* 1999;13:251-60.
24. Schreiber S, Nikolaus S, Hampe J. Activation of nuclear factor  $\kappa$ B in inflammatory bowel disease. *Gut* 1998;42:477-84.
25. Navarro J, Punzon MC, Pizarro A, et al. Pentoxifylline inhibits acute HIV-1 replication in human T cells by a mechanism not involving inhibition of tumour necrosis factor synthesis or nuclear factor- $\kappa$ B activation. *AIDS* 1996;10:469-75.
26. Oruç N, Kutluana U, Sezak M, et al. Asetik asitle oluşturulan deneysel kolit modelinde leflunomidin etkinliğinin araştırılması. *Akademik Gastroenteroloji*, 2008;7:67-72.
27. Flynn WJ, Cryer HG, Garrison RN. Pentoxifylline restores intestinal microvascular blood flow during resuscitated hemorrhagic shock. *Surgery* 1991;110:350-6.