

Asetik asitle oluşturulan deneysel kolit modelinde leflunomid'in etkinliğinin araştırılması*

Effects of leflunomide in acetic acid-induced acute colitis in rats

Nevin ORUÇ¹, Ufuk KUTLUANA², Murat SEZAK³, Çiğdem YENİSEY⁴, Derya GÜRSEL⁵, Şöhret AYDEMİR⁵, Müge TUNÇYÜREK³, Nadir YÖNETÇİ², Ömer ÖZÜTEMİZ¹

Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Gastroenteroloji Bilim Dalı¹, Patoloji Bilim Dalı³, Mikrobiyoloji Bilim Dalı⁵, İzmir

Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Gastroenteroloji Bilim Dalı², Denizli

Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Bilim Dalı⁴, Aydın

Giriş ve Amaç: Nükleer faktör kappa-B kolitte izlenen inflamasyonda anahtar rol oynamaktadır. Leflunomid nükleer faktör kappa-B aktivasyonunu inhibe eden etkili bir immünmodülatör ilaçtır. Leflunomid'in Crohn hastalığında kullanımına dair az sayıda veri vardır ancak kolitteki etkilerine dair çalışma mevcut değildir. Bu çalışmada sıçanlarda asetik asitle oluşturulan kolit modelinde leflunomid'in etkinliğinin araştırılması planlanmıştır. **Gereç ve Yöntem:** 40 adet Winstar albino sıçanlar randomize olarak dört gruba ayrılmıştır. Gruplar şu şekildedir: Grup1: Kolit, Grup2: Leflunomid tedavisi uygulanan kolit: Grup3: Leflunomid tedavisi ve intrarektal salin ve Grup 4: Kontrol grubu. Distal kolit %4 asetik asit'in intrarektal yolla uygulanması ile oluşturulmuştur. Leflunomid (10 mg/kg) intragastrik yolla işlemiden sekiz saat ve hemen önce verilmiştir. Kolon hasarı makroskopik ve mikrosopik skorlamalar yapılarak ve biyokimyasal parametrelerle incelenmiştir. Bakteri translokasyonu ayrıca incelenmiştir. **Bulgular:** Asetik asit ciddi kolit tablosuna yol açmış buna karşın leflunomid tedavisi kolitte iyileştirici bir etki göstermemiştir. Kolit grubu ve leflunomid uygulanan kolit grubunda makroskopik skor sırayla 2,2±1,1 ve 3±1, histolojik skorlama 3,2±1,3 ve 3,2±2,4, p>0,05 olarak saptanmıştır. Mortalite oranları ve bakteri translokasyonu oranları leflunomid alan ve almayan kolit gruplarında benzerlik göstermiştir. **Sonuç:** Deneysel akut kolit modelinde leflunomid tedavisi yararlı etki göstermemiştir.

Anahtar kelimeler: Asetik asit, kolit, leflunomid

GİRİŞ

İnflamatuvar barsak hastalığı kronik bir hastalık olup patogeneğinde mukozal dengede bozulma, bakteri aşırı çoğalması ve sitokin ve inflamatuvar mediatörlerin sentezinde değişiklikler sorumlu tutulmaktadır (1). Nükleer faktör kappa-B (NF-κB) nükleer transkripsiyon faktörü olup immünite ve inflamasyon ile ilişkili çok sayıda gen transkripsiyonunun regüle edilmesinde kritik rol oynamaktadır (2). Bu proinflamatuvar genler interlökinleri,

Background and Aims: Nuclear factor kappa-B (NF-κB) plays a key role in initiating inflammation associated with colitis. Leflunomide is a novel immunomodulating drug and a potent inhibitor of NF-κB activation. There are limited clinical data about the beneficial effects of leflunomide in Crohn's disease. The aim of this study was to investigate the effects of leflunomide pretreatment in acetic acid-induced colitis in rats. **Materials and Methods:** Forty rats were randomly assigned into groups as: group 1, colitis with no pretreatment; group 2, leflunomide-treated colitis; group 3, leflunomide-treated no colitis, and group 4, controls. Distal colitis was induced in rats by intracolonic instillation of 4% acetic acid. Leflunomide (10 mg/kg) was administered intragastrically as two doses with an 8-h interval prior to the experiment. Colonic damage was assessed by macroscopic and histological criteria as well as biochemical markers. Bacterial translocation was also evaluated. **Results and Conclusions:** Acetic acid induced severe colitis while leflunomide pretreatment did not affect the macroscopic or microscopic histological scores in colitis. Macroscopic score was 3±1 in the leflunomide-treated and 2.2±1.1 in the untreated colitis group while histological scores were 3.2±2.4 and 3.2±1.3, respectively. There was no difference in mortality rates or bacterial translocation between groups. Early inhibition of NF-κB via leflunomide does not improve inflammation in acute colitis.

Key words: Acetic acid, leflunomide, colitis

kemokinleri, adezyon moleküllerini, reseptörleri ve enzimleri içermektedir (3). NF-κB'nin inflamatuvar barsak hastalığı patogeneğinde önemini vurgulayan deneysel çalışmalar mevcuttur ve giderek artmaktadır (4, 5).

Leflunomid (HWA-486) antiinflamatuvar, antiproliferatif ve immünmodülatör etkileri olan bir ajandır (6). Hücre içine alındıktan sonra hızla aktif metaboliti olan A771726'ya dönüşür (7). Leflu-

*Bu çalışma IASGO 2008 İstanbul, Türkiye Kongresinde bildiri olarak sunulmuştur.

nomide romatoid artrit gibi otoimmün hastalıkların tedavisinde ve transplant rejeksiyonunun engellenmesinde kullanılmaktadır (8). Yapılan çalışmalar leflunomid'in aktif formu olan A77 17 26'nın inflamatuvar barsak hastalığı etyopatogenezinde de etkili olan NF-κB aktivasyonunun etkili bir inhibitörü olduğunu göstermiştir (3).

Leflunomid immunosüpresif tedaviye dirençli Crohn hastalığının tedavisinde daha önce denenmiştir (9). Crohn olgularında leflunomid tedavisi hastalık aktivitesini baskılamış, kortizon ihtiyacını azaltmış, serum inflamatuvar göstergelerini normale döndürmüştür. Ancak ülseratif kolitte yapılmış klinik veya deneysel bir çalışma mevcut değildir. NF-κB'nin inflamatuvar barsak hastalığında ve inflamasyondaki anahtar rolü göz önüne alınırsa güçlü NFκB inhibitörlerinin kolit tedavisinde bir tedavi alternatifi olabileceği düşünülebilir. Çalışmamızın amacı NF-κB aktivasyonunun potent bir inhibitörü olan leflunomide'in sıçanlarda asetik asitle oluşturulmuş deneysel kolit modelinde etkinliğinin araştırılmasıdır.

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) prensipleri doğrultusunda hareket edilmiştir.

Çalışmada 40 adet erkek Winstar albino sıçan (225–320 g) randomize olarak onar hayvanlık dört gruba ayrılmış ve deney sonuna kadar ayrı kafeslerde tutulmuştur. Deneyden önce sıçanlar normal gıda ve su ile beslenmişler, deneyden bir gün önce aç bırakılmışlardır. Sıçanlar standart koşullarda 12 saatlik gündüz gece siklusu korunarak 24 °C oda sıcaklığında barındırılmışlardır.

Asetik asit Erkim medikalden satın alınmıştır. Leflunomid Sanofi-Aventis firmasından satın alınmıştır (Arava, Aventis Pharmaceuticals). Leflunomid suda çözünmediği için 1% sodyum karboksimetil selüloz taşıyıcı ve çözücü ortam olarak kullanılmıştır.

Deneysel Akut Kolit Modeli

Çalışmamızda asetik asitle oluşturulan akut kolit modeli tercih edilmiştir. Hafif eter anestezisi altında olan sıçanlara yumuşak pediatrik sonda rektal yolla 6 cm ileriye ulaşacak şekilde yerleştirilmiş-

tir. Hayvanlar bu işlem sırasında trendelenburg pozisyonuna getirilmiştir. Asetik asit %4 çözeltisi (1 ml, pH:2,3) yavaş şekilde intrarektal kateterle rektuma uygulanmıştır. Sıçanlar 30 saniye trendelenburg pozisyonunda tutulduktan sonra aynı kateterden pH'sı 7 olan fosfat tampon 2 ml intrarektal olarak uygulanmıştır.

Leflunomid (10 mg/kg) intragastrik yolla kolit induksiyonundan sekiz saat önce ve işlemden hemen önce iki doz şeklinde uygulanmıştır. Uygulama dozu ve şekli literatürdeki örnekler göz önüne alınarak seçilmiştir (10, 11). Ayrıca farklı deneysel modelde bu dozun sıçanlarda etkili olduğu görülmüştür (12). Deney grupları aşağıdaki gibi düzenlenmiştir.

Grup 1 (n=10): Leflunomid (10 mg/kg, 1 ml) intragastrik kateter yoluyla kolit induksiyonundan sekiz saat ve hemen önce iki doz şeklinde verilmiştir. Asetik asit yukarıda anlatıldığı gibi uygulanarak kolit oluşturulmuştur.

Grup 2 (n=10): Sodyum karboksi-metil selüloz 1% (3 ml/kg) intragastrik yolla kolit induksiyonundan sekiz saat ve hemen önce iki doz şeklinde verilmiştir. Asetik asitle daha önce anlatıldığı şekilde kolit oluşturulmuştur.

Grup 3 (n=10): Leflunomid (10 mg/kg, 1 ml) intragastrik kateter yoluyla sekiz saat ara ile iki doz şeklinde verilmiştir. Sıçanlara daha sonra rektal yolla 1 ml salin verilmiştir. Bu grup leflunomidin normal kolon mukozasına olası etkilerini araştırmak için planlanmıştır.

Grup 4 (n=10): Sıçanlara intragastrik yolla sekiz saat ara ile iki kez 1 mm salin verilmiş daha sonra 1 ml salin rektal yolla uygulanmıştır.

İşlemler tamamlandıktan sonra sıçanlar kafeslerinde normal gıda ile beslenmiştir. Her gruptaki sıçanlar rektal asetik asit veya salin verilmesinden 48 saat sonra yüksek doz pentoparbitil enjeksiyonu ile sakrifiye edilmişlerdir. Bakteri translokasyonunu değerlendirmek üzere sıçanların karın bölgesi steril olarak orta hattın açılmış ve ileo-çekal bölgede yerleşmiş lenf nodlarından ve ayrıca peritondan örnekler alınarak hemen kültür ortamına aktarılmıştır.

Orta hat insizyonu pubise kadar uzatılarak mümkün olan en distal alandan rektum kesilerek çıkartılmıştır. Bu distal alandan itibaren 8 cm'lik kolon segmenti bütün olarak çıkartılmıştır. Kolon segmentleri serum fizyolojik ile temizlenerek makroskopik ve mikroskopik analiz için hazırlanmış-

tır. Distal 6 cm'lik kolon alanı makroskopik hasar açısından incelenmiştir. Bu skorlama sistemine göre: normal doku: skor 0; ülser veya erozyon içermeyen lokalize hiperemi skor 1; granüler mukoza, hiperemi ödem ve erozyon skor 2; şiddetli ödem ve hiperemi ile beraber linear 1 cm'den küçük ülserler skor 3; iki veya daha fazla alanda 1 cm'den uzun ülserasyon ve nekroz skor 4 olarak değerlendirilmiştir (13). Daha sonra bu segmentler formalin içine alınmış ve parafinle sabitlenmiştir. Kolon hasarı çalışma gruplarından habersiz patoloğ tarafından değerlendirilmiştir. Örnekler hemotoksilen eozin ile boyanarak kolit hasar skorlaması uygulanmıştır. Kolon inflamasyonu 0-11 arası skorlanmıştır. Bu skorlamada mukozal arşitektürde bozulma (0-3), inflamatuvar hücre infiltrasyonu (0-3), müsküler kalınlaşma (0-3), kript absesi (0-1) ve goblet hücre kaybı (0-1) olarak puanlanmış ve değerler toplanarak toplam skor belirlenmiştir.

Kalan kolon segmentleri myeloperoksidaz (MPO) ve inflamatuvar göstergelerin ölçümünde kullanılmıştır. Analiz gününe kadar bu örnekler -80 °C'da saklanmıştır. Örnekler proteaz inhibitörü, PMSF (100 µg/ml), aprotinin (1µg/ml), 0.001 EDTA, 0.01 M Tris-HCl, ve 0,1 M NaCl içeren lizis tamponu (pH 7,6) içinde çözülerek homojenize edilmişlerdir. MPO ve GSH için homojenizatın tamamı kullanılmıştır. Homojenizat daha sonra 14.000 rpm'de 4°C'de 10 dk santrifüj edilerek süpernatant NO, IL-6, TNF-alfa tayininde kullanılmıştır.

Myeloperoksidaz (MPO) tayini: Kolon dokusunda myeloperoksidaz aktivitesi (MPO) Suzuki ve ark.'nın önerdiği yöntem modifiye edilerek ölçülmüştür. Bu metod sentetik 3,3',5,5'-tetramethyl benzidine (TMB)'in MPO tarafından oksidasyonuna dayanmaktadır. MPO tarafından TMB oksidasyon hızı 655 nm'de absorbans değişimi ölçülerek belirlenmiştir. Reaksiyonun erken ve linear fazı göz önüne alınarak absorbans ölçümü 1. dakikada tekrarlanmıştır. MPO ünitesi; absorbansda bir dakikada bir değer değişikliğine yol açan enzim miktarı olarak tanımlanmıştır. MPO enzim aktivitesi U/mg yaş gram doku olarak verilmiştir (14).

TNF-alfa ve IL-6 tayini: Kolon dokusunda TNF-alfa ve IL-6 seviyesi hazır ELİSA kitleri kullanılarak ölçülmüştür (Bender MedSystem GmbH, Campus Vienna Biocenter 2, Vienna, Austria). Test sonuçları BİOelisa cihazı kullanılarak hesaplanmıştır. TNF-alfa pg/g yaş doku ve IL6 IL-6 pg/mg yaş doku olarak verilmiştir.

Malondialdehid (MDA) (TBARS) tayini: Doku da MDA ölçümü Ohkawa ve ark.'nın literatürde tanımladığı şekilde yapılmıştır (2). MDA thiobarbitürik asid (TBA) varlığında 90-100°C'de renk oluşumuna yol açar. On beş dakika sonra hızla soğutulan numunelerin absorbansları spektrofotometrik olarak 532 nm absorbansda Shimadzu UV-160 spektrofotometre kullanılarak yapılmıştır. Standart olarak 1,1',3,34 - Tetraethoxypropane kullanılmıştır. Sonuçlar nmol/g yaş doku olarak verilmiştir (15).

Glutathion (GSH) tayini: Dokudan elde edilen süpernatantta GSH miktarı Beutler ve ark.'nın tanımladığı yöntemle ölçülmüştür (8). Sonuçlar mg/g yaş doku olarak verilmiştir.

NO (nitrite+nitrate) tayini: NO (nitrite + nitrate) tayini Navarro-Gonzalves tarafından tanımlandığı şekilde kadmium-redüksiyon reaksiyonun modifikasyonu ile yapılmıştır (16). Sonuçlar mikro M/g yaş doku olarak verilmiştir.

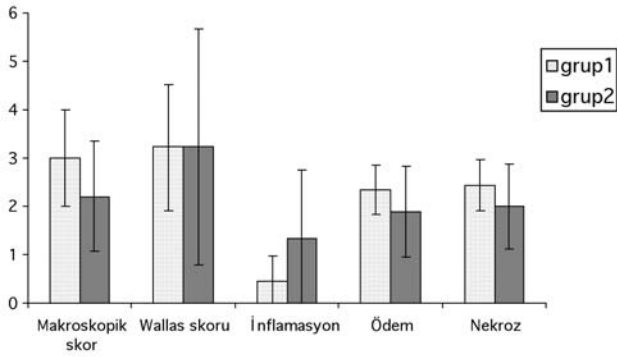
İstatistik analiz: Sonuçlar ortanca ve SD olarak verilmiştir. SPSS istatistik programı (SPSS software, PC versiyon 10.01; SPSS, Chicago IL) analizlerde kullanılmıştır. Gruplar one-way ANOVA varyans analizi ve gerektiğinde Mann-Whitney U test ve X² testi ile karşılaştırılmıştır. P < 0.05 istatistik olarak anlamlı kabul edilmiştir.

BULGULAR

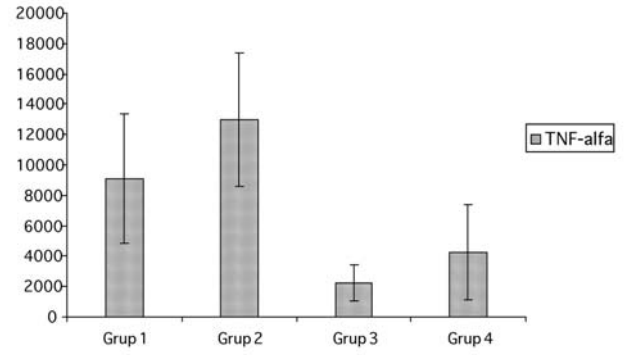
Sıçanlara rektal asetik asit uygulaması şiddetli distal kolitle sonuçlanmıştır. Makroskopik olarak Grup 2'de kolon segmentlerinde hiperemi, kanama, ödem ve ülserasyonların izlendiği şiddetli kolit tablosu mevcuttur. Histolojik olarak bu grupta inflamatuvar hücre infiltrasyonu, ödem, ülserasyonlar ve nekroz belirgindir (Şekil 1). Bu grupta makroskopik skor 2,2±1,1 ve histolojik skor 3,2±1,3 olarak hesaplanmıştır.

Asetik asitle oluşturulan kolit grubunda (Grup 2) inflamatuvar sitokinlerde ve oksidatif strese artış söz konusudur (Şekil 2-4). Bu grupta TNF-alfa seviyesi (12978+4431pg/ml) kontrol grubu 3 ve 4'ten ten anlamlı olarak yüksektir (Şekil 3). Doku MPO aktivitesi 1,51±1,47 U/mg doku saptanmıştır.

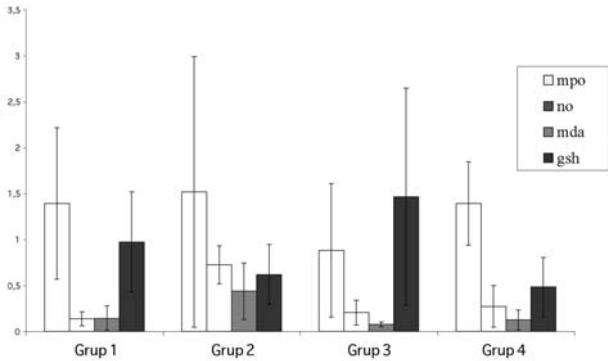
Leflunomid tedavisi Grup 1'de, makroskopik ve mikroskopik skorlarda anlamlı bir iyileşme sağlamamıştır. Makroskopik skor 3±1 histolojik skor ise 3,2±2,4 olarak belirlenmiştir (Şekil 1 ve Resim 1 a, b). Çalışmada gruplar arasında MPO seviyeleri kolit oluşturulan Grup 1 ve 2'de kontrol grupla-



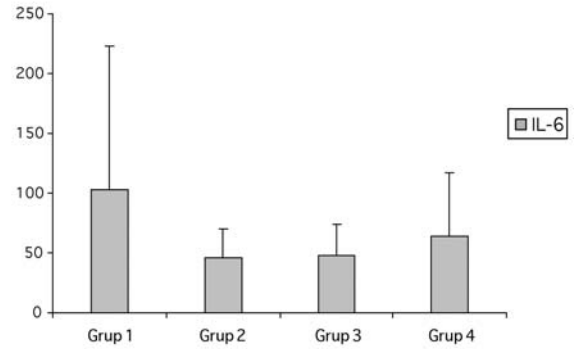
Şekil 1. TNBS kolitinde birinci ve 2. grubun makroskopik ve mikroskopik incelemesi. Makroskopik ve histolojik değerlendirme sonuçları tedavi alan grup 1 ve almayan grup 2'de benzerdir.



Şekil 3. Kolon dokusunda TNF alfa seviyesi leflunomid uygulanan grup 1'de azalmış ancak fark anlamlı bulunmamıştır.



Şekil 2. Deney gruplarında kolon dokusunda inflamatuvar göstergelerden MPO, NO, MDA, ve GSH sonuçları grafik olarak görülmektedir.



Şekil 4. Çalışma grupları arasında doku IL-6 seviyesi benzerlik göstermektedir.

rından yüksek bulunmuştur ancak gruplar arasındaki fark anlamlı değildir (Tablo 1 ve Şekil 2). Histopatolojik parametreler ayrı ayrı incelendiğinde leflunomid tedavisi kolitte doku inflamatuvar hücre infiltrasyonunu baskılamakta buna karşın bu grupta submukozal ödem daha belirgin izlenmektedir. Ancak istatistiksel olarak fark anlamlı bulunmamıştır.

Leflunomid tedavisi kolit grubunda kolon dokusundaki NO seviyesini anlamlı oranda baskılamıştır (0,13+0,07 karşın 0,72+0,20, $p>0,01$). Benzer şekilde dokuda lipid peroksidasyonun önemli bir göstergesi olan MDA seviyeleri leflunomid tedavisi alan ve almayan kolit grupları arasında anlamlı olarak farklı bulunmuştur. Leflunomid kolitte MDA oluşumunu azaltmaktadır (Tablo 1, $p<0,001$). Leflunomid tedavisi kolit modelinde dokuda TNF alfa seviyesini baskılamıştır. Tedavi alan Grup 1'de TNF-alfa 9110 + 4271, tedavi almayan Grup 2'de 12978+ 4431 pg/ml olarak sap-

tanmıştır. Ancak iki grup arasındaki fark anlamlı değildir (Tablo 1). Doku GSH ve IL6 seviyeleri gruplar arasında farklı saptanmamıştır (Şekil 4).

Çalışmada bakteri translokasyonu izlenen sıçan sayısı Grup 1'de %66, Grup 2'de ise %60 olarak izlenmiştir. Kültürlerde gram negatif bakteriler ve en fazla *E.coli* izole edilmiştir. Gruplar arasında bakteri translokasyonu açısından fark izlenmemiştir. Leflunomid verilen ve kolit oluşturulan Grup 1'de mortalite oranı %10 olarak izlenmiştir. Diğer gruplarda mortalite izlenmemiştir. Mortalite oranları arasında gruplar arasında fark saptanmamıştır.

TARTIŞMA

İnflamatuvar barsak hastalığı nedeni tam bilinmeyen, etkin tedavi seçenekleri halen araştırılan kronik inflamatuvar bir hastalıktır (17). Hastalığın başlangıç ve ilerlemesinde sinyal molekülleri-

Tablo 1. Deneysel grupların biyokimyasal analizleri. Dokuda MPO, MDH, GSH, IL-6 ve NO sonuçları görölmektedir. Tedavi almayan kolit grubunda MDA ve NO seviyesi anlamlı olarak yüksektir.

	Grup 1	Grup 2	Grup 3	Grup 4	P
MPO	1,39 ± 0,82	1,51±1,47	0,88± 0,72	0,68±0,45	AD
MDA	0,14±0,13	0,43±0,30*	0,07±0,02	0,12±0,10	<0,001
GSH	0,97±0,54	0,61±0,32	1,46±1,17	0,48±0,32	AD
NO	0,13±0,07	0,72±0,20*	0,20±,013	0,27±0,22	<0,001

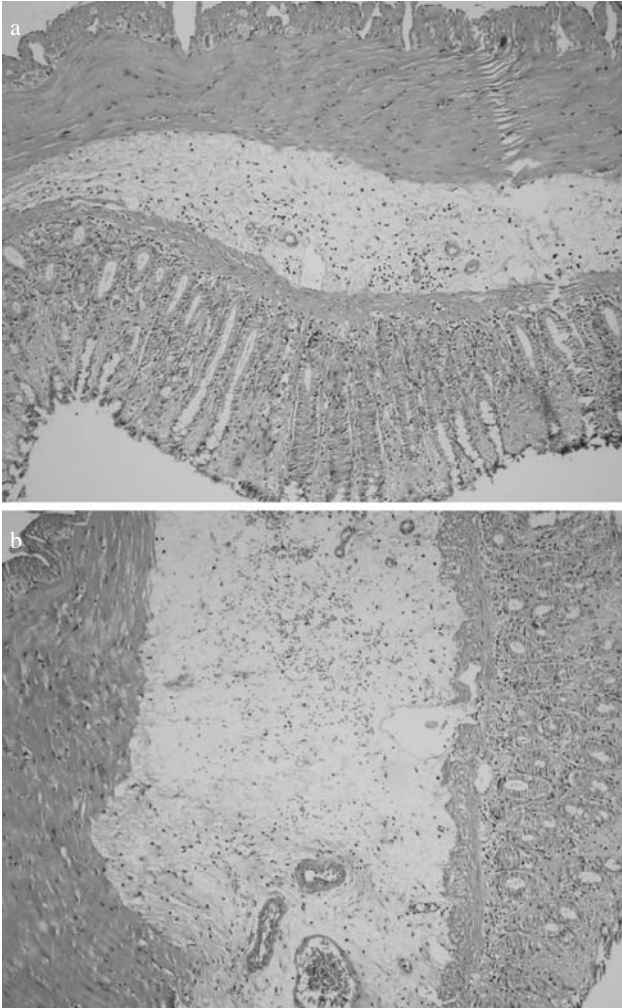
AD: Anlamlı deđil

nin ve yolaklarının sorumlu olduğuna dair güncel veriler giderek artmaktadır. Sitokinler, kemokinler, adezyon molekülleri gibi inflamatuvar mediatörlerin regülasyonundaki artışın hem insan hem de deneysel kolit modellerinde temel rol oynadığına dair veriler mevcuttur (18, 19).

NF-κB; tümör nekroz faktör-α (TNF-α), interlökin-6 (IL-6), ve nitrik oksid sentaz (iNOS) gibi infla-

matuvar mediatörlerin gen ekspresyon regülasyonundan sorumludur (5, 6). Nükleer faktör-κB aktivasyonu intestinal inflamasyonda anahtar rol oynayan bir moleküldür (20). Buradan yola çıkarak NF-κB inhibe ettiği bilinen farklı ajanlar deneysel kolit modellerinde denenmiştir. Leflunomid romatoid artrit tedavisinde yaygın kullanım kazanmış yeni bir immunomodölatör ilaçtır (6). Farklı deneysel çalışmalarda leflunomidin sitokinler tarafından indüklenen NFκB'yi inhibe ettiği gösterilmiştir (7). Buradan yola çıkarak leflunomid'in kolit tedavisinde yararlı olabileceği düşünölmüştür. Çalışmamızda asetik asitle oluşturulmuş kolit modelinde leflunomid etki göstermemiştir. Leflunomid bilindiği gibi öncü bir ilaçtır ve hücre içerisine alındıktan sonra aktif metabolitine dönüşmektedir (21). Asetik asitle akut hasara uğramış hücrelerde leflunomid'in hücre içerisine alınması ve aktivasyonu azalmış olabilir. Buna karşın ilacın çalışmamızda kolit indüksiyonundan 8 saat önce uygulanmaya başlanması bu teoriden uzaklaştırmaktadır. Bu çalışmada leflunomid dozu 10 mg/kg olarak seçilmiştir. Zira bu dozda ilacın farklı deneysel modellerde sıçanlarda etkili olduğu gösterilmiştir (10). Çalışmamızda dokuda NF-κB seviyesi bakılamamıştır. Ancak leflunomid'in etkin bir NF-κB inhibitörü olduğu zaten bilinmektedir. Leflunomid'in inflamasyonun bazı parametrelerinde etki göstermesi NF-κB'yi inhibe ettiğinin indirekt bir kanıtıdır. Ancak bu çalışmada leflunomid'in TNF-alfa'yı baskılaması, MDA oluşumunu dolayısı ile serbest radikal oluşumunu azaltması ve NO sentezini baskılaması histolojik hasarı azaltmaya yetmemiştir.

Asetik asit deneysel modeli, lezyonların özelliği ile insanlardaki ülseratif kolite önemli benzerlikler göstermektedir. Ayrıca bu model kolay ve tekrarlanabilir bir modeldir. Buna karşın bu modelin ülseratif kolitten önemli farkları da mevcuttur. Asetik asit koliti akut olarak gelişmektedir ve daha çabuk iyileşme eğilimi göstermektedir. Histopatolojik olarak tabloya inflamasyon hakimdir. Bizim çalışmamızda da makroskopik ve mikroskopik bulgular bunu desteklemektedir. Ayrıca



Resim 1. Leflunomid uygulanan grup (Resim 1-a) ve uygulanmayan kolit gruplarında (Resim 1-b) doku hasarı izlenmektedir. Ödem, inflamasyon, mukozada arşitektür kaybı ve yüzeyel nekroz her iki grupta da izlenmektedir.

barsak mukozasında IL-6, ve TNF-alfa gibi proinflatuvar sitokinlerin arttığı gösterilmiştir (8). İnsanlarda izlenen ülseratif kolit ise daha yavaş olarak ortaya çıkar ve akut ve kronik inflamasyonun tüm elemanlarını içerir. Bu nedenle benzer deneysel çalışmanın farklı kolit modellerinde denenmesi zorunludur. Zira leflunomid ülseratif kolit gibi kronik inflamasyonlarda farklı mediatör-

leri baskılayarak etki gösterebilir.

Sonuç olarak leflunomid tedavisi akut kolitte yararlı etki sağlamamıştır. Kolitte NF-κB'nin erken inhibisyonu tek başına inflamasyonu ve doku hasarını baskılamakta yetersiz kalmaktadır. Leflunomid'in doku inflamatuvar mediatörleri üzerine olası etkilerinin farklı kolit modellerinde araştırılması gereklidir.

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. Blackwell TS, Christman JW. The role of nuclear factor kappa B in cytokine gene regulation. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1997;17:3-9.
3. Manna SK., Bharat B, Agarwall A, et al. Immunosuppressive leflunomide metabolite (A77 1726) blocks TNF-dependent nuclear factor-kB activation and gene expression. *J Immunol* 1999;162:2095-102.
4. Schreiber S, Nikolaus S, Hampe J. Activation of nuclear factor kB in inflammatory bowel disease. *Gut* 1998;42:477-84.
5. Garc'ia-Mediavilla V, Crespo I, Collado PS, et al. The anti-inflammatory flavones quercetin and kaempferol cause inhibition of inducible nitric oxide synthase, cyclooxygenase-2 and reactive C-protein, and down-regulation of the nuclear factor kappaB pathway in Chang Liver cells. *Eur J Pharmacol* 2007;557:221-9.
6. Silva JH, Morris RE. Leflunomide and malononitrilamides. *Am J Med Sci* 1997;313:289-301.
7. Hamilton LC, Vojnovic I, Warner TD. A771726, the active metabolite of leflunomide, directly inhibits the activity of cyclo-oxygenase-2 in vitro and in vivo in a substrate-sensitive manner. *Br J Pharmacol* 1999;127:1589-96.
8. Mladenovic V, Domljan Z, Rozman B, et al. Safety and effectiveness of leflunomide in the treatment of patients with active rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1995;38:1595-603.
9. Holtmann MH, Gerts AL, Weinman A, et al. Treatment of Crohn's disease with leflunomide as second-line immunosuppression: a phase I open-label trial on efficacy, tolerability and safety. *Dig Dis Sci* 2008;53:1025-32.
10. Karaman A, Fadillioglu E, Turkmen E, et al. Protective effects of leflunomide against ischemia-reperfusion injury of the rat liver. *Pediatr Surg Int* 2006;22:428-34.
11. Yao HW, Li J, Chen JO, et al. Inhibitory effect of leflunomide on hepatic fibrosis induced by CCl4 in rats. *Acta Pharmacol Sin* 2004;25:915-20.
12. Kutluana U, Oruc N, Nart D, et al. Leflunomide is a new agent in treatment of acute pancreatitis. *IASGO, Istanbul, 2008.*
13. Myers KJ, Murthy S, Flanigan A, et al. Antisense oligonucleotide blockade of tumor necrosis factor-alpha in two murine models of colitis. *J Pharmacol Exp Ther* 2003;304:411-24.
14. Doğan L, Doğan A, Canpınar H, et al. Effect of fludarabine on leukocyte functions. *Chemotherapy* 2004;50:283-8.
15. H Ohkawa, N Ohishi, Y Yagi. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 1979;95:351-8.
16. Navarro-Gonzalves JA, Garcia-Benayas C, Arenas J. Semiautomated measurement of nitrate in biological fluids. *Clin Chem* 1998;44:679-81.
17. Rutgeerts P. Medical therapy of inflammatory bowel disease. *Digestion* 1998;59:453-69.
18. 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.
19. Rogler G, Andus T. Cytokines in inflammatory bowel disease. *World J Surg* 1998;22:382-9.
20. Elson CO, Sartor RB, Tennyson GS, et al. Experimental models of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 1995;109:1344-67.
21. Chong AS, Huang W, Liu W, et al. In vivo activity of leflunomide: pharmacokinetic analyses and mechanism of immunosuppression. *Transplantation* 1999;68:100-9.