

48578

Türkiye Cumhuriyeti  
Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi  
Genel Cerrahi Anabilim Dalı

**SİÇANLARDA OLUŞTURULAN DENEYSEL KOLİT MODELİNDEKİ  
HASAR MEKANİZMASINDA ENDOTELİNİN ROLÜ**

Uzmanlık Tezi

**Dr.Bahadır M.GÜLLÜOĞLU**

İstanbul 1996

## İÇİNDEKİLER

<b>GİRİŞ.....</b>	<b>3</b>
<b>GENEL BİLGİLER.....</b>	<b>5</b>
<b>GEREÇ ve YÖNTEM.....</b>	<b>18</b>
<b>BULGULAR.....</b>	<b>24</b>
<b>TARTIŞMA.....</b>	<b>32</b>
<b>BULGULARIN ÖZETİ.....</b>	<b>37</b>
<b>ÖZET.....</b>	<b>38</b>
<b>İNGİLİZCE ÖZET (SUMMARY).....</b>	<b>40</b>
<b>KAYNAKLAR.....</b>	<b>42</b>

## GİRİŞ

İnflamatuvar bağırsak hastalıkları (İBH), Crohn hastalığı ve ülseratif koliti de içeren nonspesifik bağırsak hastalıkları grubudur. Genel olarak ağızdan anüse kadar tüm sindirim sistemini tutabilen ve önemli ölçüde mortalite ve morbiditeye neden olabilen hastalıklardır. Crohn hastalığı ve ülseratif kolit, tuttukları bağırsak segmentleri ve histopatolojik özellikleri farklı olmasına karşın çoğu kez belirti ve bulguları ile seyirleri açısından birbirlerine benzerlikler gösterirler. Ülseratif kolitin cerrahi tedavisi dışında hastalara bugün uygulanan tedavilerin hemen hepsi, geçici iyileşmeler sağlamaktadır ve henüz tam iyileşme sağlayabilecek bir tedavi yöntemi geliştirilememiştir<sup>1</sup>. İdeal İBH tedavisi ancak hastalığın etyopatogenezinin açıklığa kavuşturulabilmesi ile mümkün olabilecektir.

İBH'nin etyopatogenezi günümüzde tam olarak açıklığa kavuşmamıştır. Bugüne kadar çeşitli infeksiyöz ajanlar ile bozulmuş hücresel bağışıklık ve monosit-makrofaj fonksiyon bozukluğu gibi çeşitli immün mekanizmaların hastalığın etyopatogenezinde rol oynadığı öne sürülmüştür<sup>2,3</sup>. İBH'ında oluşan hasara yanıt olarak bağırsak duvarını çeşitli fagositik hücrelerin infiltre ettiği bilinmektedir<sup>4,5</sup>. Bu hücrelerin ortama saldırdığı reaktif oksijen metabolitlerinin (ROM) dokuda oksidatif hasara, bağırsak geçirgenliğinde artışa ve dokuda birtakım displastik değişikliklere neden olduğu gösterilmiştir<sup>6-9</sup>. Bugüne kadar yapılan çalışmalarda, başta araşidonik asit kaskadının siklooksijenaz ve lipoksijenaz yollarının çeşitli ürünleri ve nitrik oksit (NO) olmak üzere, endotoksin, interlökin (IL)-1, IL-6, tümör nekroz faktörü (TNF),  $\delta$ -interferon gibi sitokinlerin de hasar mekanizmasında rollerinin olabileceği öne sürülmüştür<sup>10-14</sup>.

İBH'lı hastalarda uzun süreli yüksek amplitüdümlü kontraksiyonların saptanması, bu hastalarda görülen ishal ve sık aralıklarla dışkılama hissi gibi belirtilerin sekreteruar kaynaklı olmaktan

çok motor tipte olduğuna işaret etmiştir<sup>15</sup>. Hayvanlarda oluşturulan deneysel kolit modellerinde de buna paralel sonuçlar elde edilmiştir<sup>16</sup>.

Endotelinlerin (ET), birçok organın fizyolojik yanıtı veya çeşitli hastalıklarının mekanizmasında özgün reseptörleri aracılığı ile rol oynadıkları gerek deneysel olarak hayvan modellerinde gerekse klinik olarak gösterilmiştir<sup>17</sup>. ET'lerin İBH'nda gözlenen nonspesifik inflamatuvar yanıt ve motilite değişikliklerinden sorumlu olabileceğine dair birtakım ipuçları mevcuttur. Örneğin İBH'lı hastaların hastalıklı bağırsak dokularında ET düzeyleri yüksek bulunmuştur<sup>18</sup>. Bunun yanı sıra normal insan kalın bağırsağında özellikle lamina propria da ET'in çeşitli bağlanma yerleri saptanmıştır<sup>19</sup>. Çeşitli inflamatuvar hücrelerden ve vasküler endotel gibi subepitelyal dokudan serbestlenen ET'in fagositik hücreler için kemotaktik bir ajan olmasının<sup>20</sup> yanı sıra polimorf nüveli lökositlerden (PNL) ROM'lerinin salınımını da aktive ettiği bilinmektedir<sup>21,22</sup>. ET'in bağırsak mikrodolaşımındaki düzenleyici rolünün<sup>23,24</sup> yanı sıra, bağırsak düz kasının kasılma mekanizması üzerinde de birtakım etkileri olduğu ortaya konulmuştur<sup>25,26</sup>. Ancak, bugüne kadar ET'in İBH'nın etyopatogenezindeki rolü tam olarak ortaya konulamamıştır.

Bu çalışmada, sıçanlarda intrakolonik olarak trinitrobenzen sülfonik asit ve etanol karışımının (TNBS-E) verilmesi ile oluşturulan deneysel kolit modelinde, akut ve kronik dönemlerde gelişen hasarın mekanizmasında ve motilite değişikliklerinde ET'in olası rolünün ortaya konulması amaçlanmıştır. Bu amaçla TNBS-E'un sıçanlara uygulanmasından hemen önce ve bunu takip eden deney süresince verilen bir nonspesifik endotelin reseptör blokörü olan Bosentan'ın kolit oluşum sürecine iyileştirici ve/veya önleyici etkileri araştırılmıştır.

## GENEL BİLGİLER

### 1. İnflamatuvar Bağırsak Hastalığı (İBH):

İBH, ince ve kalın bağırsağın çeşitli katmanlarını tutan bir hastalık grubudur. Bazı yazarlar yalnızca Crohn hastalığı ile ülseratif koliti İBH olarak tanımlarken, bir kısmı da bakteriyel, viral, fungal ve parazitik infeksiyonlar ve ilaç (antibiyotik) ile oluşturulan veya irradasyon ile gelişen inflamasyonları da bu grup hastalık içerisinde tanımlamaktadırlar. Crohn hastalığı ve ülseratif kolit, süresi ve şiddeti değişken alevlenmeler ve remisyonlar ile karakterizedirler. Genel olarak klinik seyirlerini tahmin edebilmek oldukça güçtür. Crohn hastalığı primer olarak ince bağırsağı, özellikle de ileumu tutarken, ülseratif kolit ise kolon hastalığı olarak ortaya çıkar. Her iki hastalık da gerek belirti ve bulguları, gerekse seyirleri açısından genel olarak birbirlerine benzerler. Her ikisi de, bağırsak dışı birçok organda oluşturabildikleri komplikasyonlar ve malignite potansiyelleri nedeniyle, kolon ve rektum hastalıkları arasında önemli yer tutmaktadırlar<sup>27</sup>.

Crohn hastalığı, ağızdan anüse kadar sindirim sisteminin herhangi bir kısmını tutabilen kronik granümatöz inflamatuvar bir hastalıktır. En sık olarak ileum ve kolonun birlikte tutulması görülmektedir. İnflamasyon, bağırsak duvarının tamamını ve çevredeki mezenter ve lenf bezlerini de içine alabilmektedir. Hastalığın bir özelliği de lezyonların transmural olarak bağırsağı tutması ve lezyonlar arasında sağlam segmentlerin bulunmasıdır. Uzun dönemde bu lezyonlar bağırsakta kısalmalara ve striktür oluşmasına yol açabilmektedir. Crohn hastalığı ülseratif kolitten daha az sıklıkla ve kadınlarda erkeklerden biraz daha sık olarak görülür. Hastaların yaklaşık %56'sında hastalık 22 yaşından önce başlar. Crohn hastalığındaki temel bulgular karın ağrısı, diyare, iştahsızlık ve sıklıkla ateştir. Rektal kanama, ülseratif kolitte olduğu kadar sıklıkla görülmez. Mesane, üreter, bağırsak segmentleri gibi diğer karın içi organlar ile hastalıklı bağırsak segmenti arasında fistüller oluşması ve perianal hastalıkların

sıklıkla görülmesi hastalığın özellikleri arasındadır<sup>2</sup>. Mikroskopik olarak granülomların görülmesi, akut ve kronik inflamatuvar hücrelerin infiltrasyonu ile birlikte transmural lezyonların olması tanı koymaya yardımcı olmaktadır<sup>1</sup>.

Ülseratif kolit ise, adından da anlaşılacağı gibi rektum başta olmak üzere kolonun herhangi bir segmentinin veya tümünün hastalığıdır. Daha sıklıkla erkeklerde ve en çok 15-40 yaş grubunda görülmektedir. Hastalık, akut ve ağır hastalık durumları dışında yalnızca mukoza ile sınırlıdır. Hastalıklı dokuların histopatolojik incelemelerinde akut ve kronik inflamatuvar hücrelerin mukozayı infiltre ettikleri, goblet hücrelerinin azaldığı ve çok sayıda kript abselerinin bulunduğu görülmektedir. Ancak ağır durumlarda ülserler transmural olabilmekte ve Crohn hastalığında görülen lezyonlardan ayrılabilmesi güçleşmektedir. Uzun süreli hastalıkta kolon mukozasında displastik değişiklikler görülebilmektedir<sup>1</sup>. En önemli bulgular diyare, karın ağrısı, ateş ve iştahsızlıktır. Burada görülen diyare, daha çok kanlı olmaktadır. Ülseratif kolitin önemli komplikasyonları arasında yer alan kolon kanseri, özellikle hastalık 10 yıldan uzun süreli olarak mevcut ise görülmektedir. Ülseratif kolitte görülen kanser riski Crohn hastalığında görülenden 4 misli daha fazladır<sup>3</sup>.

Her iki hastalığın etyoloji ve gelişme mekanizmaları bugüne kadar açıklığa kavuşturulamamıştır. Bu nedenle bu hastalık grubu daha çok idiyopatik olarak tanımlanmaktadır. Hastalıkların etyoloji ve seyirlerinde rol oynadığı düşünülen önemli faktörler arasında genetik yatkınlık, infeksiyon ajanları (bakteriler, özellikle “mycobacteria” ve virüsler), organizmadaki otoimmün değişiklikler (bozulmuş hücresel bağışıklık, bozulmuş nötrofil ve T hücresi supresör aktivitesi ve monosit-makrofaj disfonksiyonu) bulunmaktadır<sup>2,3</sup>. Her iki hastalığın tedavisinde de öncelik ilaç tedavisine verildiği halde, hastalık tam olarak iyileşmemekte, ancak remisyonlar olabilmektedir. Ülseratif kolitin cerrahi tedavisi hastalığı ortadan kaldırmaktadır. Ancak Crohn hastalığının cerrahi tedavisi yeterli olmayıp, yalnız komplikasyonları giderici tipte palyatif girişimlerle sınırlı kalmaktadır<sup>1,27</sup>.

### **DeneySEL Olarak Oluşturulan Kolit Modelleri:**

İBH'nın hastalık mekanizması tam olarak açıklığa kavuşturulamamasına rağmen immün sistem, genetik yatkınlık ve özellikle bakteriyel flora olmak üzere çeşitli çevre etkenlerinin bu mekanizma içerisinde rolü olduğuna dair kanıtlar mevcuttur. Bütün bunları ortaya çıkarmak için hastalıklı insan dokularının incelenmesi dışında, bugüne kadar çeşitli hayvanlarda çeşitli ajanların sistemik veya topikal olarak verilmesi yoluyla bir çok deneysel kolit modeli geliştirilmiştir. Genel olarak İBH mekanizmasında yer alan çeşitli faktörler altı temel grupta incelenmektedir. Bunlar, genetik yatkınlık, çevresel faktörler, kazanılmış bağışıklık, doğal bağışıklık, nonspesifik inflamasyon ve yara iyileşmesi olarak adlandırılmışlardır. İlk üç faktörün daha çok hastalığın erken dönemlerinde, diğerlerinin ise inflamasyon ve tamirin son ortak yolu içerisinde etken olduğu düşünölmektedir<sup>28</sup>. Yapılacak olan bir çalışmada uygulanacak metod, hasarın sorgulanan aşamasına uygun olarak seçilmektedir. Bugüne kadar nonspesifik inflamasyon, doğal bağışıklık ve yara iyileşmesini ön planda irdelemek amacıyla asetik asit<sup>29</sup>, TNBS<sup>30</sup>, indometazin<sup>31</sup>, immün kompleks-formalin<sup>32</sup> gibi ajanlar kullanılmıştır. Bunun yanısıra genetik, çevre faktörleri ve özđün bağışıklığı irdelemek amacıyla "IL-2 'knockout' fare"<sup>33</sup> ve HLA-B27/β2m transgenik sıçan<sup>34</sup> modelleri gibi deneysel kolit yöntemleri geliştirilmiştir.

### ***TNBS -E kombinasyonu ile sıçanda oluşturulan deneysel kolit modeli:***

Morris ve arkadaşları tarafından ortaya konulan bu modelde sensitize edici allerjen bir madde olan TNBS'in etanol içinde hazırlanmış solüsyonunun (TNBS-E) sıçanlara lavman şeklinde uygulanması sonucu kolit geliştirilmiştir<sup>30</sup>. Bu modelde insanlarda oluşan Crohn hastalığının birçok histopatolojik ve klinik özellikleri gözlenmekte ve oluşan kronik inflamatuvar yanıtın süresi 8 haftaya kadar uzamaktadır. Etanol, mukoza bariyerini ortadan kaldırmak ve bu yolla TNBS'in bağışsak duvarına penetre olmasına yardımcı olmak amacı ile verilmektedir. Lavman şeklinde uygulanan TNBS, kovalen reaktif bir bileşik (hapten) olduğu için bağışsakta oksidatif hasara ve buna bağlı olarak genellikle transmural akut nekroza yol açmaktadır. Sıçanlarda

TNBS-E'nin oluşturduğu kolitin patogenezi tam olarak açıklık kazanmamasına rağmen immunolojik mekanizmaları içerdiği düşünülmektedir. Etanol yardımı ile bağırsak duvarına penetre olan TNBS, dokunun kendi yüksek moleküler ağırlıklı protein molekülleri ile kovalen bağlarla birleşerek "hapten modifiye antijenler" oluşturmakta ve T hücreleri aracılığı ile bu moleküllere immün yanıt oluşmaktadır<sup>28</sup>. Burada oluşan hasar sonucunda makroskopik olarak kolon duvarında belirgin kalınlaşma, derin soliter veya multipl ülserler ve mikroskopik olarak PNL infiltrasyonu ve granülomlarla seyreden transmural inflamasyon gözlenmektedir<sup>30</sup>. TNBS-E'nin lavman ile verilmesini takip eden ilk birkaç günde fokal bazal kriptitlerin de yer aldığı akut nekroz ve inflamasyon alanları göze çarpmaktadır. Bu safhayı takip eden kronik süreçte ise mononükleer hücre infiltrasyonu ön plana çıkmakta ve daha çok submukozaya sınırlı kronik inflamasyon görüntüsü saptanmaktadır<sup>28</sup>. Bu model, basit ve ucuz bir yöntem olmanın dışında özellikle nonspesifik inflamatuvar yanıt ve yara iyileşmesi ile kolonik motilite değişiklikleri üzerinde çeşitli ilaç ve medyatörlerin etkilerini araştırmak amacıyla da kullanılmaktadır<sup>35-37</sup>.

#### **İnflamatuvar Bağırsak Hastalığının Patogenezi:**

İBH'larının hastalık mekanizmasını tetikleyen etkenler halen bilinmezliğini koruduğu halde hastalığın ilerlemesinde yer alan olası mekanizmalar ve medyatörler konusunda giderek daha fazla teoriler geliştirilmektedir. Altta yatan neden ne olursa olsun, ortaya çıkan kolonik hasarda organın yanıtı hemen hemen aynı şekilde olmaktadır. Çeşitli derecelerde mukoza ülserasyon ve erozyonu, kolon bezlerinin distorsiyonu, goblet hücrelerinin tükenmesi, mukoza ve submukoza ödemi ile mukoza ve submukozada inflamatuvar hücre infiltrasyonu birçok modelde nonspesifik inflamatuvar kolitin akut döneminde görülen ortak bulgulardır<sup>28</sup>. İBH'da inflamasyonun olduğu bağırsak duvarında fagositik hücreler yoğun olarak bulunmaktadır<sup>4,5</sup>. Bazı araştırmacılar nötrofil veya PNL'lerin kolonik hasar oluşmasında önemli rol oynadıklarını öne sürmüşlerdir. Birçok deneysel kolit modelinde ve nonspesifik kolitli hastaların kolonunda nötrofillerin ve makrofajların sayıca artmış olduğu gözlenmiştir<sup>5,30</sup>. PNL'lerden ortama salınan



ROM'lerinin<sup>38</sup> birçok deneysel gastrointestinal hasarda rolleri olduğu<sup>6</sup> ve ROM'lerinin dokudaki artışları ile ülseratif kolit hastalığının şiddeti arasında yakın bir ilişki olduğu gösterilmiştir<sup>7</sup>. Yine başka bir çalışmada TNBS-E ile oluşturulan kolitte mukozal geçirgenlik üzerinde PNL'lerin rolü ortaya konulmuştur<sup>8</sup>. Buna karşılık, inflamasyon alanlarında PNL ve makrofajların bölgeye toplanmasının hastalığın nedeni değil sonucu olduğu ileri sürülmüştür<sup>39,40</sup>. Hatta ortamdaki PNL'lerin ortadan kaldırılmaları halinde kolitte görülen doku hasarının azalmadığı gösterilmiştir.

İskemik kolon hasarının oluşmasında süperoksid, hidrojen peroksid, hidroksil radikalleri ve hipohalöz asitleri gibi ROM'lerinin rolü olduğu gösterilmiştir<sup>41</sup>. Ülseratif kolitte ve Crohn hastalığında artmış olan ROM'lerinin dolaşımdaki monositlerden kaynaklandığı saptanmıştır<sup>38</sup>. Gastrointestinal sistemdeki ROM kaynakları arasında lamina propria içerisinde yer alan ve ksantin oksidaz, amin oksidaz, aldehid oksidaz ve NADPH oksidaz gibi mukozal oksidazları içeren makrofaj, nötrofil, eozinofil gibi fagositik lökositler ile mikrovasküler endotel ve mukozal epitel yer almaktadır<sup>42</sup>. Hidroksil radikalleri ( $\cdot\text{OH}$ ) hücrelerdeki sülfidril (SH) bileşiklerini okside ederek esansiyel enzimlerin veya membran transport proteinlerinin inaktivasyonuna yol açmaktadır<sup>43</sup>. Ayrıca, membranlarda bulunan uzun zincirli yağ asitlerinin  $\cdot\text{OH}$  ile reaksiyona girmeleri sonucu lipid peroksidasyonu gerçekleşmektedir. Bu olayı hedef hücrelerin yıkımı veya membran lipid peroksidlerinin (LOOH) membran bütünlüğü veya geçirgenliğinde oluşturduğu değişiklikler izlemektedir. Ayrıca lipid peroksidasyonunun artmış protein yıkımı ve mutajenitesi ile ilişkili olduğu gösterilmiştir<sup>9</sup>.

Grisham ve Granger<sup>42</sup>, yaptıkları çalışmalar ışığında İBH'nın başlangıç patogenezinde iskeminin potansiyel rolü üzerinde alternatif bir hipotez öne sürmüşlerdir. Buna göre, stres ile sempatik sinir sistemi aktive olup kolonik kan akımı azalınca, ksantin dehidrojenaz ve aldehid dehidrojenaz gibi  $\text{NAD}^+$ -indirgeyici enzimler oksidasyon veya sınırlı proteoliz ile  $\text{O}_2$  indirgeyici enzimlere (ksantin oksidaz, aldehid oksidaz) çevrilmektedir. Bu "oksidaz aktivasyonu", geçici iskemik safha ortadan kalkınca kolon epitel ve endotel tarafından ROM üretimine yol

açmaktadır. ROM üretimindeki bu artış ise kapiler ve mukozal membran geçirgenliğindeki artışa neden olmaktadır. Kolon epitelinin apikal kesiminde oluşan ROM'leri koruyucu mûsin tabakasını yıkarak mukozal bariyeri ortadan kaldırmakta ve bunun sonucunda çeşitli bakteriyel ürünler lamina propriyaya difüze olarak burada fagositik lökositlerin infiltrasyonuna ve aktive olmalarına neden olmaktadır. Reperfüzyon esnasında süperoksida bağlı kemotaktik ajanlar lamina propriyaya daha fazla lökosit akümülyasyonuna neden olmaktadır. Lökosit infiltrasyonu ve aktivasyonu, ROM'lerin üretimini daha da artırarak fagositik hücrelerin granülleri içerisinde bulunan katyonik protein, elastaz, kollajenaz gibi nonoksidatif toksinlerin de ortama salınmalarına yol açmaktadır. En son olarak, bu ürünlerin lipid peroksidasyonu ise hyalüronik asid ve kollajen yıkımı yaparak mukozada ülserler oluşturmaktadır. Benzer şekilde, erken dönemde gelişen mikrovasküler hasar ile hemen sonrasında gelişen ödem oluşumundan bölgeye ulaşan nötrofil ve makrofajların sorumlu oldukları ortaya konulmuştur<sup>44</sup>. Bu hücrelerin kolonik hasarın etyopatogenezinde bizzat rol oynamamalarına rağmen, bloke edilmelerinin daha ileri hasarı önleyebilecekleri düşünülmüştür<sup>39</sup>. Bunun da PNL tarafından ortama salınan ROM'lerinin engellenmesi ile oluştuğu sanılmaktadır. Benzer çalışmalarda ROM'lerinin ortamdan kaldırılmaları ile deneysel kolitte doku hasarının hafifletildiği gösterilmiştir<sup>45</sup>.

İBH ve deneysel kolit modellerinin patogenezinde yer alan medyatörler arasında araziidonik asid kaskadının siklooksijenaz ve lipoksijenaz yollarının çeşitli ürünleri (ökozanoidler) de bulunmaktadır. İBH'lı hastaların rektal diyalizatlarında veya kolorektal mukoza biyopsi örneklerinde birçok ökozanoid ürünlerinin artmış olduğu saptanmıştır. Prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), tromboksan B<sub>2</sub> (TxB<sub>2</sub>), prostasiklin (PGI<sub>2</sub>)<sup>46</sup>, lökotriyen B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>) ve lökotriyen C<sub>4</sub> (LTC<sub>4</sub>)<sup>47</sup> düzeylerinin inflame dokularda sağlıklı olanlara oranla artmış olduğu saptanmıştır. Daha da ötesi bu ürünlerin düzeyi ile inflamasyonun şiddeti arasında pozitif bir korelasyon saptanmıştır<sup>10</sup>. Bu maddeler biyolojik aktif ajanlar olarak inflamasyon ile ilişkili bir takım parakrin etkilere sahiptirler. Örneğin, nötrofiller için kuvvetli bir kemotaktik ajan olan ve nötrofil degranülyasyonunu stimüle eden LTB<sub>4</sub> seviyesi bu hastalarda yüksek bulunmakta ve

yine nötrofil infiltrasyonun bir göstergesi olan myeloperoksidazın aktivasyonu ile korelasyon göstermektedir<sup>48,49</sup>. LTB<sub>4</sub>'ün in vitro olarak insan mononükleer hücrelerinde TNF, IL-2 ve δ-interferon gibi maddelerin üretimini artırma gibi proinflamatuvar özelliklerinin mevcut olduğu saptanmıştır<sup>50</sup>. Lipoksijenaz yolunun ürünlerinin proinflamatuvar özelliklere sahip olmasının yanında siklooksijenaz yolunun ürünleri olan prostaglandinlerin ise antiinflamatuvar özelliklere sahip olduğu yolunda bir takım veriler elde edilmiştir. PGE<sub>2</sub>'nin birçok deneysel in vivo kolit modelinde inflamasyonu azalttığı gösterilmiştir<sup>51</sup>. Ökozanoidlerin kolit gelişim mekanizmasındaki rollerini ortaya koyan bir başka kanıt ise sülfasalazin, mezalamin ve glukokortikoidlerin bu maddelerin ortamda azalmalarına yol açarak İBH tedavisinde kullanılıyor olmasıdır<sup>51-53</sup>. Nonsteroid antiinflamatuvar ilaçların (NSAİİ) dokulardaki ökozanoid miktarını azaltmasına rağmen İBH'lı hastalarda hastalığın alevlenmesine yol açtığı bilinmektedir<sup>54</sup>. Bu da, NSAİİ'lerin proinflamatuvar özellikleri olan ökozanoidleri oluşturan lipoksijenaz yolunu etkilemeyerek yalnızca siklooksijenaz yolunu inhibe ettiği ve tüm substratın lipoksijenaz yolunda kullanılması sonucu inflamasyonda artışa neden olduğu şeklinde açıklanabilmektedir.

Deneysel olarak ideal bir kolit modeli oluşturulamamasına rağmen kolorektal inflamasyonda araşidonik asid metabolizmasının manüplasyonunda çeşitli etmenleri in vivo olarak ortaya çıkarması açısından TNBS-E ile oluşturulan model en iyi yöntem olarak kullanılmaktadır<sup>55</sup>. TNBS-E ile oluşturulan kolitte LTB<sub>4</sub>, PGE<sub>2</sub><sup>11</sup> ve TxB<sub>2</sub><sup>56</sup> artmaktadır. LTB<sub>4</sub> oluşmasını engelleyen ajanlar uygulandığında ise oluşan inflamasyonda azalma olduğu saptanmıştır<sup>57</sup>. TNBS-E ile oluşturulan kolit modelinde PGE analoglarının intraluminal olarak uygulanması sonucunda hasarın şiddetinde azalma olduğu gösterilmiştir<sup>58</sup>. Yine NSAİİ verilmesi ile kolitte herhangi bir iyileşme değil daha çok hasarda artış saptanmıştır<sup>59</sup>. Genel olarak düşünüldüğünde bütün bu çalışmalar, araşidonik asid metabolizmasının manüplasyonunun inflamatuvar yanıtı etkilediğini göstermekte ve daha da önemlisi potansiyel tedavi yöntemleri hakkında değerli bilgiler vermektedir.

İBH'nin hasar mekanizmasında üzerinde durulan olası ajanlardan bir tanesi de NO'tir. L-arginin, NO'in biyosentetik prekürsörüdür ve nitrik oksit sentaz (NOS) enzimi aracılığı ile madde, NO'e dönüşür<sup>60</sup>. NO, aktive nötrofiller, makrofajlar ve T-lenfositleri tarafından ortama bolca salınabilmektedir<sup>61-63</sup>. NO, aktif olarak ortama salındığında süperoksit anyonları ile reaksiyona girerek peroksinitrit oluşturmakta ve bu madde aracılığı ile doku hasarı oluşturabilmektedir<sup>14</sup>. TNBS-E ile indüklenen kolit modelinde dolaşımdaki endotoksin miktarı ve sitokinlerin üretiminde artış saptanmış<sup>12</sup>, ayrıca yine ortamda bulunan endotoksin ve IL-1, TNF, δ-interferon gibi sitokinlerin immün sistem hücrelerini aktive ederek NOS enziminin ortamda artmasına neden oldukları gösterilmiştir<sup>64</sup>. Yapılan bir çalışmada siklooksijenaz aktivitesi sonucu artmış prostaglandin ürünlerini NO'yi daha da artırdığı saptanmıştır<sup>65</sup>. Daha önce yapılan çalışmalarda, İBH'li hastalarda ve TNBS-E kolitinde mukozal NOS aktivitesinin ve NO miktarının artmış olduğu saptanmıştır<sup>66-68</sup>. Bu artışın hasarın boyutu ile de orantılı olduğu görülmüştür<sup>68</sup>. Bir kısım çalışmalarda ise L-arjinin analogu N<sup>G</sup>-nitro-L-arjinin metil ester (L-NAME)'in sıçanlarda oluşturulan deneysel kolitteki kolon hasarını azalttığı gösterilmesi sonucunda L-arjinin-NO yolunun deneysel kolit modeli patogenezinde önemli rol oynadığı öne sürülmüştür<sup>68,69</sup>. Bütün bu bulgular, İBH'da ortama salınan endotoksin ve sitokinlerin NO aracılığı ile hasar oluşturabileceklerini düşündürmektedir. L-NAME ile tedavi edilen deneysel kolit grubu hayvanlarda mezenterik vasküler dolaşımın %50 oranında azaldığı ve kapiller geçirgenliğin güçleştiği gösterilmiştir<sup>70</sup>. Bu mekanizma ile hasar bölgesine inflamatuvar hücrelerin ve diğer medyatörlerin infiltrasyonunu, ROM'lerinin oluşumunu ve olası ödem gelişimini engelleyerek hasarın derecesini azaltabileceği düşünülmüştür<sup>71</sup>.

İBH'da intraluminal antijenlerin mukozal inflamasyonu başlattığı veya artırdığı düşünülmektedir<sup>72</sup>. Bu muhtemel antijenler arasında tüm bakteri türleri<sup>73</sup> ve onların endotoksin<sup>12</sup>, oligopeptidler<sup>74</sup> veya peptidoglikanlar<sup>75</sup> gibi çeşitli ürünleri bulunmaktadır. Mukozal bariyerin yıkılması sonucunda bu antijenler bağırsak duvarına ve bölgesel vasküler ağa geçerek TNF, IL-1 ve IL-6 gibi sitokinlerin ortamda yoğunlaşmalarına yol açmaktadır<sup>76,77</sup>.

Bunun ötesinde IL-1'in kolonik inflamasyonun en duyarlı göstergesi olduğu gösterilmiş, hatta mukoza myeloperoksidaz (MPO) aktivitesi ile arasında mükemmel bir korelasyon saptanmıştır<sup>11</sup>. Deneysel çalışmaların ötesinde, bu proinflamatuvar sitokinlerin İBH'li hastalarda da artmış olduğu saptanmıştır<sup>13</sup>.

Çeşitli dokulardaki inflamatuvar reaksiyonlarda endotelin peptid ailesinin de rolü olabileceği gösterilmiştir<sup>17</sup>. Ancak bu yeni ortaya çıkarılan peptidin İBH mekanizmasındaki yeri ve rolü gerek hayvan deneylerinde gerekse insanlarda tam olarak açıklığa kavuşturulamamıştır.

## **2. Endotelin (ET):**

ET, kültüre edilmiş domuz aort endotel hücrelerinden izole edilmiş 21 aminoasitten oluşan kuvvetli ve uzun etkili vazokonstriktör bir peptiddir<sup>78</sup>. Günümüzde ET'in, ilk bulunanı ET-1 olmak üzere ET-2, ET-3 ve vazoaaktif intestinal kontraktör (VİK) olarak dört adet izoformu saptanmıştır<sup>25,79</sup>. İnsanlarda önceleri sadece ET-1, 2 ve 3 formları ve daha sonra ET-2 benzeri olan VİK ortaya konmuştur<sup>80</sup>. 212 aminoasitten oluşan prepropeptid 2 aşamada endopeptidaz ve karboksipeptidazlar ile pro-ET-1 veya diğer adı ile "büyük" ET-1'e dönüşmekte, daha sonra "büyük" ET-1, "endotelin çevirici enzim" aracılığı ile ET-1 meydana gelmektedir<sup>17</sup>.

ET-1'in en önemli özelliği, bugüne kadar ortaya çıkarılmış en güçlü vazokonstriktör madde olmasıdır<sup>78</sup>. ET ilk olarak ortaya çıkartıldığında endotel hücrelerinden salındığı sanılmakta idi<sup>78</sup>. Ancak daha sonraları araştırmalar ilerledikçe ET-1'in endotel hücrelerinin dışında santral ve periferik sinir hücreleri, insan makrofaj ve periferik kan monositleri, PNL, böbrek hücreleri ve tümör hücreleri tarafından da ortama salındığı anlaşılmıştır<sup>17,81</sup>. ET-1'in salınımının trombin, IL-1 ve 2, transforme edici büyüme faktörü  $\beta$ , TNF  $\alpha$  ve endotoksin gibi inflamasyon medyatörleri tarafından stimüle edildiği bilinmektedir<sup>82-85</sup>. ET-1'in endotel hücrelerini kendi salınımı için stimüle ettiği de saptanmıştır<sup>86</sup>.

ET-1'in superior mezenterik arter kan akımını azalttığı sıçanda yapılan çalışmalarda saptanmıştır<sup>87</sup>. De Nucci ve arkadaşları<sup>88</sup> ise ET-1'in bu etkisinin doza bağımlı olarak ortaya çıktığı öne sürmüşlerdir. Bu araştırmacılar, sıçanlarda düşük doz ET-1'in izole sıçan

mezenterinde vazodilatasyon, yüksek dozda ise vazokonstriksiyon yaptığını saptamışlardır. ET-1'in vazodilatatör etkisini de NO salınımına yol açmasına bağlamışlardır. Bütün bu bulgulara ek olarak, Miura ve arkadaşları<sup>89</sup>, sıçanda ET-1'i intraarteriyel olarak verdiklerinde iskemik bağırsak nekrozu oluşturmuşlardır. ET'in nonvasküler etkileri arasında bağırsak ve bronşiyal düz kaslarını kasmaları<sup>90,91</sup> ile nörotransmitter fonksiyonu görmeleri<sup>92</sup> sayılabilir. ET peptid ailesinin tümünün bronşlar, mesane, mide ve kalın bağırsak gibi çeşitli organlarda düz kas hücrelerinde kasılma meydana getirdiği saptanmıştır<sup>90,91</sup>. Bunların yanısıra inflamasyonda medyatör olabilecekleri yolunda birtakım bulgular başka araştırmacılar tarafından ortaya konulmuştur. Yaptıkları çalışmalarda ET-1'in insan nötrofillerinin güçlü bir modülatörü olduğunu göstermişler ve ET-1'in bunu kemotaktik peptidler aracılığı ile yaparak nötrofillerden ROM'lerinin salınımını artırarak yaptığını öne sürmüşlerdir<sup>21,22</sup>. Bir başka çalışma da yine bunu destekleyecek şekilde ET'in insan nötrofillerini selektif olarak ortama çekici bir özelliğe sahip olduğunu ortaya çıkarmıştır<sup>20</sup>. Ancak, ET'in ortamda artışı her zaman doku hasarına işaret etmemektedir. Daha önce yapılan çalışmalarda karaciğer ve ince bağırsak iskemi-reperfüzyon hasar modellerinde ET-1'in koruyucu etkisinin olduğu gösterilmiştir<sup>93,94</sup>.

ET-1 ile ökozanoidler arasındaki yakın ilişki çeşitli çalışmalarda ortaya çıkarılmıştır. ET'in ET<sub>A</sub> reseptörü aracılığı ile fosfolipaz A<sub>2</sub> enzimini aktive ederek ökozanoid sentezini artırdıkları anlaşılmıştır<sup>95</sup>. ET-1'in sıçandan izole edilen akciğerde PGI<sub>2</sub> ve TxA<sub>2</sub> salınımını<sup>96</sup>, köpek böbreğinden PGI<sub>2</sub> ve PGE<sub>2</sub> salınımını<sup>97</sup> ve sıçan vasküler düz kas hücrelerinden ise TxB<sub>2</sub> ve PGI<sub>2</sub> salınımını<sup>98</sup> artırdığı saptanmıştır. Bütün bu çalışmaların sonucunda sıçan mukozasının ET-1'e verdiği yanıtta siklooksijenaz ürünlerinin anahtar rol oynadığı düşünülmüştür<sup>99</sup>. Bu ürünlerin hücre kaynaklarının ne olabileceği üzerindeki çalışmalar henüz sonuçlanmamasına rağmen inflamatuvar hücreler, vasküler endotel ve fibroblastlar gibi bağırsağa ait subepitelyal oluşumların ökozanoid salınımında rol oynadığı düşünülmektedir<sup>100</sup>.

ET peptid ailesinin çeşitli dokularda bugüne kadar iki tip reseptörü gösterilmiştir: ET<sub>A</sub> ve ET<sub>B</sub><sup>101</sup>. ET<sub>A</sub> reseptörlerinin ET-1 ve 2'ye eşit olarak kuvvetli, ancak ET-3'e karşı ise daha

düşük affinite gösterdiği,  $ET_B$  reseptörlerinin ise her üç ET izopeptidine karşı eşit derecede kuvvetli affinite gösterdiği saptanmıştır<sup>101</sup>. Daha önceleri  $ET_A$  reseptörlerinin genel olarak vasküler düz kas hücrelerinin membranında<sup>102</sup> bulunup vazokonstriksiyon yaptığına,  $ET_B$  reseptörlerinin ise endotel hücrelerinin membranlarında bulunup vazodilatasyona aracı olduğuna inanılmaktaydı<sup>103</sup>. Ancak sonraları yapılan çalışmalarda  $ET_B$  reseptörlerinin düz kas hücrelerinde de bulunduğu ve ET'in vazokonstriktör etkisine katkıda bulunduğu dair kanıtlar elde edilmiştir<sup>104</sup>. Bu nedenle Warner ve arkadaşları<sup>24</sup>,  $ET_B$  reseptörlerini iki alt gruba ayırmışlar ve vazodilatasyon oluşturan reseptörü  $ET_{B1}$  olarak, vazokonstriksiyon oluşturan reseptörü ise  $ET_{B2}$  olarak isimlendirmişlerdir. Endotel hücrelerinin membranında mevcut bulunan  $ET_{B1}$  reseptörlerinin stimülasyonu sonucu NO salınımına bağlı olarak vazodilatasyon meydana gelmektedir<sup>23</sup>. Ayrıca son zamanlarda yapılan bir çalışmada ortamda artan NO'nin negatif "feed-back" etkisi ile ET'in oluşturduğu etkiyi ortadan kaldırdığı indirekt olarak saptanmıştır<sup>105</sup>. Bu faktörün de vazodilatasyona yardımcı olduğu söylenmektedir.

Yapılan çalışmalarda, ET-1'inki daha fazla olmak üzere sıçan kalın bağırsağında yüksek konsantrasyonda ET benzeri immünreaktiviteye rastlanmıştır<sup>90</sup>. Doku otoradyografisi yöntemi ile sıçan kalın bağırsağının mukoza katmanında ET-1'in özgün bağlanma bölgeleri olduğu saptanmıştır<sup>106</sup>. Bu bölgelerin, mukozal regülasyonun en önemli lokalizasyonu olan myenterik ve submukozal plexus ile kan damarlarını içeren lamina propria olduğu saptanmıştır<sup>19</sup>.  $ET_A$  ve  $ET_B$  reseptörlerinin kolonda varlıkları ise yeni yapılmış çalışmalarda ortaya konulmuştur<sup>107</sup>. ET-1'in bağırsak düz kasları üzerinde de etkileri olduğu yapılan çalışmalarda ortaya konulmuştur. Lin ve Lee<sup>10</sup> yaptıkları çalışmada ET-1'in domuz ileumunda ilk önce gevşeme ardından ise geç dönemde kontraksiyon olmak üzere bifazik olarak yanıt verdiğini saptamışlar. Ayrıca ET-1'in santral ve periferik sinir sisteminde<sup>17</sup> ve dorsal kök gangliyonlarında<sup>108</sup> saptanmış olması, olası bir nöropeptid rolünün çeşitli bağırsak fonksiyonlarında rolü olabileceğini düşündürmüştür. ET-2 aktivitesinin ise primer olarak düz kas hücreleri ve fibroblastları içeren lamina propriyada bulunduğu saptanmıştır<sup>109</sup>. ET-2'nin ise bağırsak düz

kas tonusunu ayarlayıcı rolü olduğu bilinmektedir<sup>25</sup>. İnsan kalın bağırsağında ET-3'ün de bağlanma yerleri bulunmuş ancak fonksiyonları tam olarak açıklığa kavuşmamıştır<sup>90</sup>. Bütün bu bulgular, intestinal kan akımı üzerindeki etkilerine ek olarak ET-1'in ve ayrıca ET-2'nin bağırsak motilitesi gibi gastrointestinal fonksiyonlarda otokrin nöromodülatör olarak belirgin etkilerinin olduğuna işaret etmiştir<sup>19</sup>.

Crohn ve ülseratif kolitli hastalarda inflamasyonlu mukoza örneklerinde normal mukoza örneklerine kıyasla oldukça yüksek konsantrasyonda ET-1 immünreaktivitesi saptanmıştır<sup>18</sup>. Yapılan bir çalışmada sıçan kolonunda enterik sinirler aracılığı ile ET-1'in sekretuar bir medyatör olabileceği<sup>99</sup> ve ET-1'in İBH'da görülen diyareden kısmen de olsa sorumlu olabileceği öne sürülmüştür.

Clozel ve arkadaşları<sup>110-111</sup>, yaptıkları çalışmalarda ilk olarak 1993 yılında geliştirdikleri ilk oral olarak aktif nonselektif ET reseptörleri antagonisti olan Ro 46-2005'i yapısal olarak geliştirip optimize ederek daha yeni bir madde olan Bosentan'ı, bir diğer adı ile Ro 47-0203 (4-tert-butyl-N-[6-(2-hydroxy-ethoxy)-5-(2-methoxy-phenoxy)-2,2'-bipyrimidin-4-yl]-benzenesulfonamide)'ü deneysel kullanıma sunmuşlardır.

Kompetitif bir ET reseptör antagonisti olan Bosentan'ın, ET<sub>A</sub>, ET<sub>B1</sub> ve ET<sub>B2</sub> reseptörlerine karşı başka antagonistlere kıyasla daha güçlü özgünlük gösterdiği saptanmıştır. Bosentan'ın inhibe edici etkisi hem rekombinan insan reseptörlerinde hem de insan ve hayvanların doğal reseptörlerinde test edilmiş ve hiçbirisi arasında etki açısından fundamental bir fark saptanmamıştır. Bosentan'ın tek doz olarak (100 mg/kg; p.o.) verilmesini takip eden süre içerisinde tüm ET etkilerini "büyük" ET-1'i de kapsayacak şekilde 24 saat süre ile inhibe ettiği gösterilmiştir<sup>111</sup>. Genel olarak, özgünlüğü, tüm bilinen ET reseptörlerine olan etkinliği, oral olarak verilebilmesi ve etki süresinin uzunluğu, Bosentan'ı ET reseptörlerinin inhibisyonunun kronik etkilerini ortaya çıkarmada iyi bir madde olarak kullanılmasının uygun olduğunu göstermiştir.



**İnflamatuvar Bağırsak Hastalığı'nda ve Deneysel Kolitte Motilite Değişiklikleri:**

Ülseratif kolitli insanlarda yapılan çalışmalarda "azalmış fazik kontraksiyonlarla kombine olarak ortaya çıkan uzun süreli yüksek amplitüdü kontraksiyon (YAK)'ların" hakim olduğu motilite paterni bu hastalarda saptanmıştır<sup>15</sup>. Uzun süreli YAK'ların artışı kolonik içeriğin hızlı bir şekilde intrakolonik olarak ilerlemesini ve klinik olarak İBH'da görülen ishal, tenesmus ve sık dışkılama hissi gibi semptomların ortaya çıkmasına neden olmaktadır<sup>15</sup>. Bu da kolitte görülen ishalin sekretuvar tipten ziyade motor tipte olduğuna işaret etmektedir. Köpeklerde yapılan bir çalışmada asetik asit ile oluşturulan kolit modelinde toplam kolonik kasılma aktivitesinin azalmasına rağmen YAK'lardaki belirgin artışa paralel olarak kolonik geçiş zamanının hızlandığı saptanmıştır<sup>16</sup>. Ancak TNBS-E ile sıçanlarda oluşturulan kolit modelinde kolonik kasların hasara ikincil yanıtları üzerine çelişkili sonuçlar yayınlanmıştır. Grossi ve arkadaşları<sup>112</sup>, sıçanlarda kolit oluşturmak için kullanılan madde ne olursa olsun kolonik kas yapısının akut inflamasyona verdiği yanıtın aynı olduğunu ve bu ortak yanıtın da kolon duvarında ortaya çıkan gerimin azalması şeklinde olduğunu göstermişlerdir. Yapılan bir diğer deneysel çalışmada ise TNBS-E uygulanan sıçanlarda kolonik sirküler kasın in vitro kasılma yanıtının arttığı ve buna bağlı olarak kolonik motilitenin artmış olduğu saptanmıştır<sup>37</sup>. Pons ve arkadaşları<sup>113</sup> ise, TNBS-E ile oluşturulan sıçan kolit modelinde akut dönemde inflamasyona sekonder olarak kolonik geçiş zamanında kontrol grubundan farklı belirgin bifazik değişiklikler saptamışlardır. Kolit oluşturulan sıçanların radyoaktif materyal ile işaretlenmiş kolonik içeriğinin kontrol grubuna göre daha erken boşalmaya başladığını ancak toplam boşalma süresinin ise uzadığını rapor etmişlerdir. Yine deneysel olarak oluşturulan diğer kolit modellerinde akut dönemde motilitenin arttığı ve bu değişikliklerden IL-1 ve özellikle LTD<sub>4</sub> gibi araziidonik asit kaskadının lipoksijenaz ürünlerinin sorumlu olabileceği öne sürülmüştür<sup>113,114</sup>.

## GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışmada ağırlıkları 220-280 gram arasında değişen erkek Wistar-Albino sıçanlar kullanıldı. Sıçanlarda kolit oluşturmak için daha önce tarif edildiği şekilde 2,4,6-trinitrobenzen sülfonik asit-etanol (TNBS-E) karışımı kullanıldı<sup>30</sup>. Bu yöntemle göre sıçanlar, TNBS-E'e maruz kalmadan 24 saat öncesinden itibaren aç bırakıldılar. Açlık süresi boyunca hayvanlara yem verilmedi, ancak su serbest bırakıldı. Hayvanlar deney süresince altışarlı gruplar halinde kafeslere yerleştirildi ve motilite çalışmasının yapılacağı günün 24 saat öncesine kadar oda sıcaklığında günlük çeşme suyu ile standart sıçan yemi verilerek beslendi. Kolonik geçiş hızı ölçümü ve örneklemelerin yapılacağı günün 24 saat öncesinden itibaren yine sadece su içebilecek şekilde hayvanlar aç bırakıldı. Deney süresince ışık düzeni 12 saat gündüz, 12 saat ise gece olacak şekilde ayarlandı.

### Deneysel Kolit Oluşturulması:

Eter anestezisi altında sıçanlara sırtüstü 30°Trendelenburg pozisyonunda intrarektal tüp (no 5 politetrapoliüretan“feeding” tüp), ucu anüsten 8 cm kadar proksimale ilerleyecek şekilde yerleştirildi. Buradan kolon içerisine 30 mg TNBS (Sigma) 0.5 mL %50'lik etanol içerisindeki (hacim/hacim) solüsyonu beş saniyelik bir süre içinde verildi. Hayvanlar uyanana kadar en az bir dakika süre ile pozisyonları değiştirilmedi (Resim 1).

**Deney Grupları:**

Hayvanlar altı ayrı deney grubuna ayrıldılar:

- I. Kontrol grubu (K) n=4
- II. Taşıyıcı-etanol grubu (T) n=5
- III. a. Akut kolit grubu (AKL) n=8  
b. Bosentan verilen akut kolit grubu (ABT) n=7
- IV. a. Kronik kolit grubu (KKL) n=8  
b. Bosentan verilen kronik kolit grubu (KBT) n=8

Kontrol grubundaki dört sıçanda kolit oluşturulmadı ve herhangi bir tedavi de uygulanmadı. Bu sıçanlarda 24 saatlik açlık dönemi sonrası kolonik geçiş hızı ölçümü ve örneklemeler yapıldı.

Taşıyıcı grubundaki sıçanlara ise intrakolonik olarak 0.5 ml %50 etanol verildi ve 15 gün sonra kolonik geçiş hızı ölçümü ve örneklemeler yapıldı.

Akut kolit grubunda ise sıçanlara kolit oluşturulmadan bir saat önce ve sonrasındaki iki gün süresince Bosentan'ın taşıyıcısı günde tek doz gavaj yolu ile (%5 arap sakızı; 100 mg/kg, p.o.) (Sigma) verildi ve işlemiden sonraki üçüncü gün hayvanlarda kolonik geçiş hızı ölçümü ile örneklemeler yapıldı. Kronik kolit grubunda ise Bosentan'ın taşıyıcısı bir önceki gruptaki gibi ancak bu defa 14 gün süre ile verildi ve 15.günde kolonik geçiş hızı ölçümü ile ardından örneklemeler yapıldı. Bosentan verilen akut ve kronik kolit gruplarında ise tedavi olarak %5 arap sakızı içerisinde çözüldürülmüş Bosentan (Ro 47-0203/029; F.Hoffmann-La Roche Ltd.'den Dr. M.Clozel'in bağıışı) (100 mg/kg; p.o.), hayvanlara üç ya da 14 gün süre ile verilmiştir.

**Kolonik Geçiş Hızı (Geometrik Merkez) Ölçümü :**

Hayvanlara eter anestezisi altında orta hattan laparotomi yapıldı. Çekum bulundu ve 24 G enjektör ile 0.2 ml radyoaktif işaretli krom ( $0.4 \mu\text{Ci Na}^{51} \text{CrO}_4$ ) (Du Pont) çekum içerisine verildi (Resim 2). İnsizyon hattı 2/0 Mersilk ile devamlı dikişlerle kapatıldı ve hayvan

uyanmaya bırakıldı. Radyoaktif materyalin verilmesini takip eden 60 dakika sonunda eter anestezisi altında orta hat dikişleri alınarak çekumdan anüse kadar hayvanların tüm kalın bağırsağı etraf yapışıklıklardan ve anatomik komşuluklarından ayrılarak eksize edildi. Hayvanlar bu aşamada hava embolisi oluşturularak öldürüldüler. İzole edilen kalın bağırsak uzun eksenini boyunca açıldı ve makroskopik hasar puanlamaları yapıldı (Resim 3 ve Tablo 1). Ardından çekum ayrılarak tüm kalın bağırsak proksimalden distale doğru 10 eşit segmente ayrılacak şekilde kesildi ve segmentler birden 10' a kadar numaralandırıldı. Her bir segmentin Sesamüniscales I/S gama sayıcısında bir dakika süre ile radyoaktivite emisyon sayımı yapıldı. Tüm sayımlar tamamlandıktan sonra her hayvana ait kolonik geçiş hızı,  $^{51}\text{Cr}$ 'in bağırsak içerisindeki ilerlemesini belirleyen aşağıdaki "geometrik merkez" formülü kullanılarak hesap edildi<sup>115</sup>. Küçük sayılar, geçiş hızında azalmayı, büyük sayılar ise artışı göstermektedir.

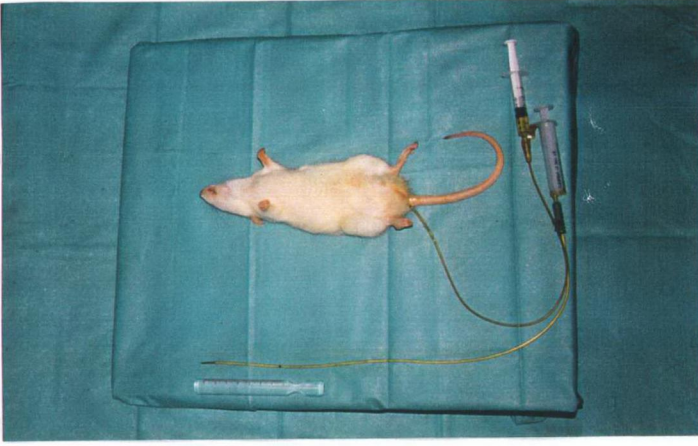
Geometrik merkez =  $\Sigma$  (her segmentteki  $^{51}\text{Cr}$  fraksiyonu\* x segment numarası)

\* Fraksiyon = segmentteki  $^{51}\text{Cr}$  / tüm kalın bağırsaktaki toplam  $^{51}\text{Cr}$

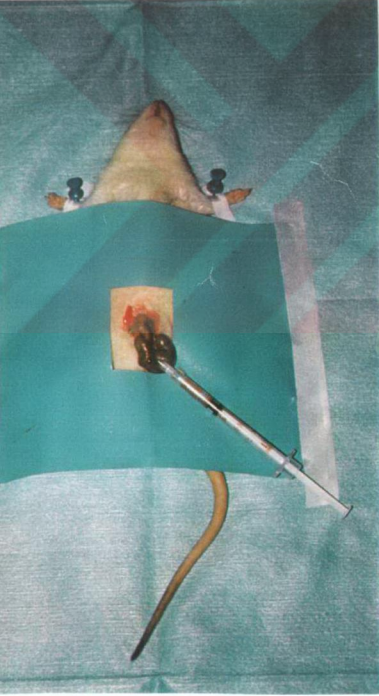
#### **Örnekleme Çalışmaları:**

Kolonik geçiş hızı ölçümü işleminin son aşamasında hayvanlar öldürülmeden önce portal venden yaklaşık 5 ml kan örneği alındı ve 5000 devirde 15 dk santrifüj edildikten sonra plazmaları ayrılarak daha sonra karbonil oluşum miktarını ölçmek üzere  $-70^{\circ}\text{C}$ 'de saklandı.

Tüm kalın bağırsak uzunlamasına eksenini boyunca açılarak daha önce kullanılan makroskopik hasar değerlendirilmesi yapıldı<sup>35</sup> (Tablo 1). Yine kolonik geçiş hızı ölçüm çalışması sırasında 10 eşit parçaya ayrılmış olan distal kolon parçalarından ikisi alındı ve bir tanesi Holand solüsyonu içerisinde üç saat bekletildikten sonra %10 formalin içerisinde mikroskopik inceleme için saklandı. Diğer parça ise dokuda MPO aktivitesi ölçümü için  $-70^{\circ}\text{C}$ 'de saklandı.



Resim 1. Sıçana intrakolonik olarak TNBS-E verilmesi



Resim 2. Sıçan çekumuna  $^{51}\text{Cr}$  verilmesi



Resim 3. Makroskopik hasar değerlendirilmesi (KKL grubu)

### Makroskopik Hasar Değerlendirilmesi:

Makroskopik hasar değerlendirilmesi, aşağıda belirtilen kriterlere göre puanlama yöntemi ile yapılmıştır<sup>35</sup>.

Tablo 1. Makroskopik Hasar Değerlendirme Tablosu

Puan	Kriter
0	Hasar yok
1	Hiperemi
2	Hiperemi ile birlikte duvar kalınlaşması
3	Duvar kalınlaşması olmadan soliter ülser saptanması
4	İki veya daha fazla ülser veya inflamasyon alanı saptanması
5	İki veya daha fazla alanda ağır ülser ve inflamasyon saptanması veya tek bir alanda 1 cm'den daha uzun ülser veya inflamasyon alanı saptanması
6-10	Kolondaki hasarın 2 cm'den daha uzun olduğu durumlarda her fazla 1 cm için puanlamaya bir puan eklenmiştir.

### Protein Oksidasyonu (PO; Karbonil Oluşumu) Ölçümü:

PO, 2,4-dinitrofenilhidrazinin (DNP) proteinlerin okside olması sonucu ortaya çıkan karbonil grupları ile etkileşip 2,4-dinitrofenilhidrazon oluşturması sonucunda 380 nm'de verdiği absorbans ölçülerek saptandı<sup>116</sup>. Kısaca, 0,5 ml portal ven kanından elde edilen plazma örneği alındı ve %20'lik trikloroasetik asit (TCA) çözeltisi ile karıştırılarak proteinlerin çökmesi sağlandı. Ardından karışım 15 saniye süre ile 10000 devirde santrifüj edildi. Süpernatant kısmı atıldıktan sonra çöken proteinler 2 M HCl içinde çözünmüş 10 mM DNP ile karıştırıldıktan sonra karanlıkta ve 37°C'de bir saat süre ile ara ara karıştırılmak sureti ile inkübe edildiler. Daha sonra %20'lik TCA eklenip proteinler tekrar çöktürüldü. 15 saniye süre ile 10000g'de tekrar santrifüj edilen karışımın üstte kalan süpernatant kısmı atıldıktan sonra çökecek 1 ml etanol:etil asetat (1:1) solüsyonu ile iki kez yıkandı ve reaksiyona girmemiş DNP ortamdan

uzaklaştırıldı. Proteinler 1 ml 1 N NaOH çözeltisi ile çözündürüldükten sonra spektrofotometre ile 380 nm'de verdiği absorban okundu. Değerler  $22\ 000\ M^{-1}\ cm^{-1}$  katsayısı kullanılarak mg doku proteini başına oluşan karbonil miktarı (nmol) şeklinde ifade edildi.

#### **Mveloperoksidaz (MPO) Aktivitesi Ölçümü:**

Doku MPO aktivitesi 0.2-0.5 g doku örneklerinde ölçüldü. Dokular ilk önce 20 mM  $K_2HPO_4$  (pH 7.4) çözeltisi ile 10 kez sulandırılıp homojenize edildikten sonra 10000 devirde 20 dakika süre ile 2-4°C'de ultrasantrifüjde çevrildi. Yukarıda kalan sıvı kısım atıldıktan sonra (%5'den daha az MPO aktivitesi içermektedir) aşağıdaki katı kısım, içinde %5'lik heksadesiltrimetilamonyum bromid (HETAB) bulunan 50 mM asetik asit çözeltisi ile karıştırılıp tekrar homojenize edildi. MPO aktivitesi 3,3',5,5'-tetrametilbenzidinin  $H_2O_2$ 'e bağımlı oksidasyonunun spektrofotometrik olarak ölçülmesi ile saptandı. Bir ünite enzim aktivitesi, 655 nm'de, 37°C'de, absorbansta (1.0/dk) meydana gelen değişiklik olarak hesaplandı.

#### **Histolojik İnceleme:**

Daha önce %10'luk formalin içerisinde fikse edilen doku parçaları parafin takip ve blokama sonrası mikrotom ile 0.2  $\mu$  kalınlığında mikroskopik kesitler elde edildi ve histolojik inceleme için hematoxilen ve eozin (H+E) ile boyandı. Tüm örnekler ışık mikroskopu altında değerlendirildi.

#### **İstatistiksel Analiz:**

Tüm veriler ortalama  $\pm$  standart hata ile ifade edildi. Gruplar içerisindeki dağılım, iki yönlü varyans analiz (ANOVA) yöntemi ile değerlendirildi. Gruplar arasındaki farklılığı karşılaştırmak için ise Student t-testi kullanıldı. "p" değerinin 0.05'den küçük olması ( $p < 0.05$ ) halinde gruplar birbirinden istatistiksel olarak farklı kabul edildi.

## BULGULAR

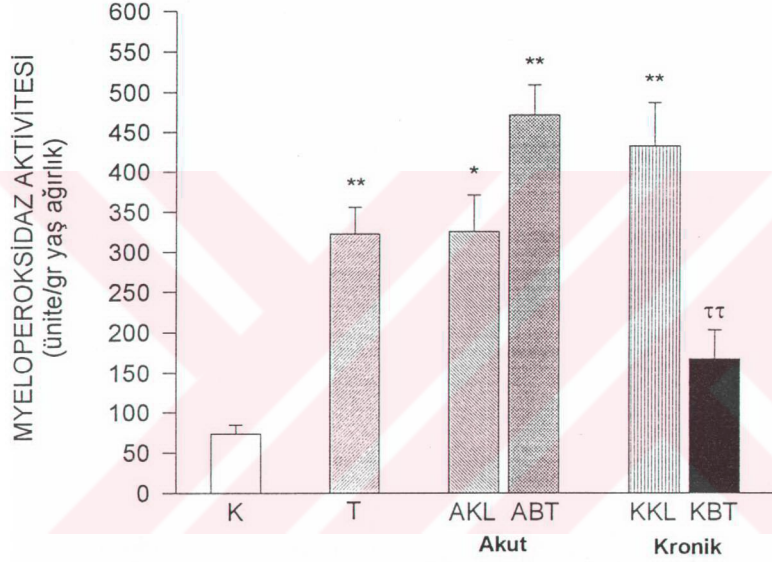
### Mveloperoksidaz (MPO) Aktivite Düzeyleri:

Taşıyıcı grubu ile ( $322.4 \pm 33.3$  ünite/gr yaş ağırlık (y.a.)), akut kolit ( $325.1 \pm 44.9$  ü/gr y.a.) ve kronik kolit gruplarında ( $431.8 \pm 54.6$  ü/gr y.a.) saptanan MPO aktivite değerleri, kontrol grubuna ( $73.6 \pm 11$  ü/gr y.a.) göre artmış olarak saptanmıştır ( $p < 0.05-0.001$ ). Akut kolit grubunda saptanan MPO aktivite düzeyi ile Bosentan verilen akut kolit grubu ( $471.6 \pm 36.6$  ü/gr y.a.) arasında fark saptanmazken, Bosentan verilen kronik kolit grubunun ( $167.5 \pm 35.8$  ü/gr y.a.) MPO aktivitesinde kronik kolit grubuna göre düşüş saptanmıştır ( $p < 0.001$ ) (Şekil 1).

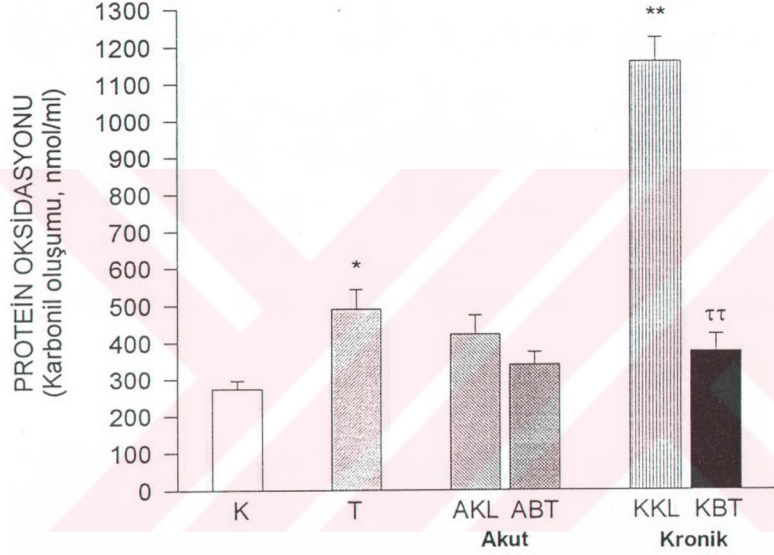
### Protein Oksidasyonu (PO; Karbonil Oluşumu) Düzeyleri:

PO düzeyi, taşıyıcı grubunda ( $490 \pm 52.2$  nmol/ml) kontrol grubuna ( $274.3 \pm 23.1$  nmol/ml) göre artmış olarak saptanmıştır ( $p < 0.05$ ). Kronik kolit grubunda ( $1158.1 \pm 63.4$  nmol/ml) saptanan PO düzeyi, kontrol grubuna ve taşıyıcı grubuna göre daha da artmış olarak saptanmıştır ( $p < 0.001$  ve  $p < 0.001$ ). Bosentan verilen kronik kolit grubunda ( $375.5 \pm 46.9$  nmol/ml) ise, kronik kolit grubuna göre belirgin bir düşüş saptanmıştır ( $p < 0.001$ ). Akut kolit grubuna ait hayvanlarda saptanan PO düzeyi ( $422.2 \pm 50.5$  nmol/ml) ile kontrol ve Bosentan verilen akut kolit grubu ( $341.1 \pm 33.4$  nmol/ml) arasında ise fark saptanmamıştır (Şekil 2).





ŞEKİL 1. Kontrol (K), taşıyıcı (T), akut kolit (AKL), bosentan ile tedavi edilen akut kolit (ABT), kronik kolit (KKL) ve bosentan ile tedavi edilen kronik kolit gruplarında (KBT) ölçülen myeloperksidaz aktiviteleri. \*,\*\*, p<0.05 ve 0.01, K grubuna göre. ττ; p<0.01, KKL grubuna göre.



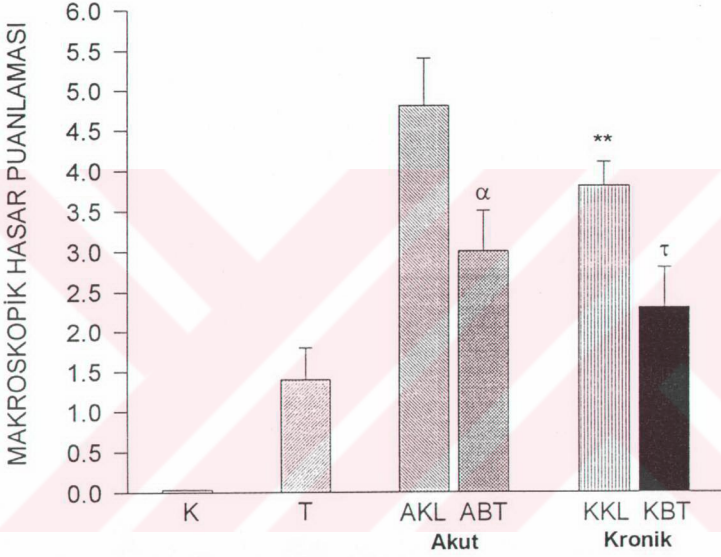
ŞEKİL 2. Kontrol (K), taşıyıcı (T), akut kolit (AKL), bosentan ile tedavi edilen akut kolit (ABT), kronik kolit (KKL) ve bosentan ile tedavi edilen kronik kolit gruplarında (KBT) ölçülen protein oksidasyonu düzeyleri. \*,\*\*; $p < 0.05$  ve  $0.01$ , K grubuna göre. ††;  $p < 0.01$ , KKL grubuna göre.

### **Makroskopik Hasar Puanlamaları :**

Taşıyıcı (1.4±0.4), akut kolit (4.8±0.6) ve kronik kolit gruplarında (3.8±0.3) saptanan makroskopik hasar puanları, kontrol grubuna (0) göre artmış olarak saptanmıştır (p<0.01-0.001). Ayrıca taşıyıcı grubu ile kronik kolit grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmıştır (p<0.001). Bosentan verilen akut kolit grubunda (3±0.5) akut kolit grubuna göre, Bosentan verilen kronik kolit grubunda (2.3±0.5) da kronik kolit grubuna göre hasar puanlarında azalmalar saptanmıştır (p<0.05 ve p<0.01) (Şekil 3).

### **Mikroskopik Değerlendirme:**

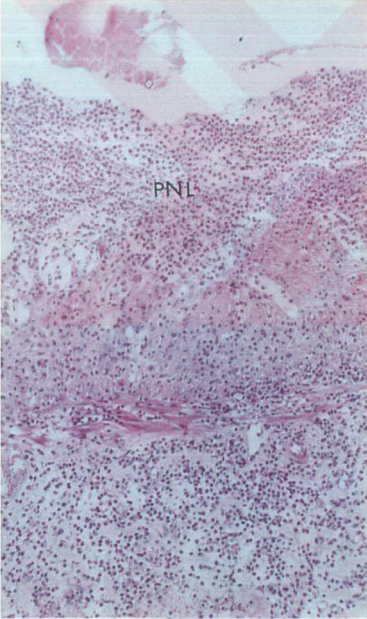
Taşıyıcı grubunda mukozada erozyon görünümünden, en fazla submukoza katmanına kadar inen aftöz, psödomembranöz tipte ülser ve granümatöz iltihap bulgularına kadar değişen sınırlı hasar bulguları saptanmıştır (Resim 4). Akut kolit grubunda ise mukoza ve submukozada PNL'den zengin iltihabi hücre infiltrasyonu ile karakterize ve yüzeysel genç ülserler içeren ince fibrinöz membranlı kolit görünümü hakim idi (Resim 5). Kronik kolit grubunda ise yüzeyinde psödomembranöz iltihabi görünüm olan serozaya dek uzanmış ve yer yer mikroperforasyonlar oluşturmuş derin ülserasyon ile karakterize granümatöz kolit bulguları saptanmıştır (Resim 6). Bosentan verilen akut kolit grubunda çoğunlukla submukozada sınırlı hafif derecede eksüdatif akut iltihap bulguları ile lenfositik infiltrasyon ön planda görülmüştür (Resim 7). Bosentan verilen kronik kolit grubunda ise herhangi bir ülser ya da erozyon bulgusu mevcut olmaması, ancak kripta ve lenfoid folikül hiperplazisi ile birlikte lenfositik infiltrasyonun bosentan verilen akut kolit grubunda olduğu gibi daha da artmış olması dikkat çekici idi. Ortamda PNL gibi akut iltihabi hücrelerden ziyade bozulmamış mukoza altında lenfositlerden zengin mononükleer iltihabi hücre odakları mevcut idi (Resim 8).



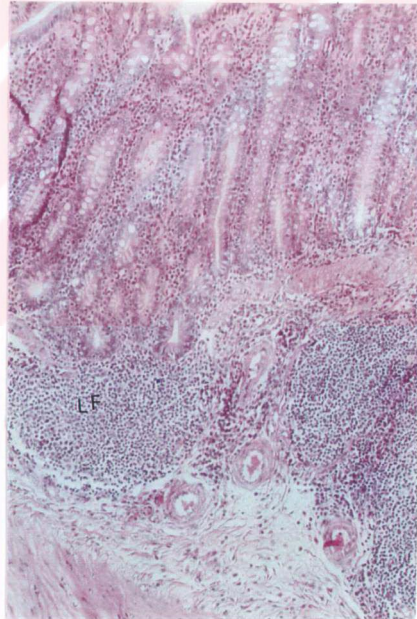
**ŞEKİL 3.** Kontrol (K), taşıyıcı (T), akut kolit (AKL), bosentan ile tedavi edilen akut kolit (ABT), kronik kolit (KKL) ve bosentan ile tedavi edilen kronik kolit gruplarında (KBT) saptanan makroskopik hasar puanları. \*\*:  $p < 0.01$ , T grubuna göre. τ:  $p < 0.05$ , KKL grubuna göre. α:  $p < 0.05$ , AKL grubuna göre.



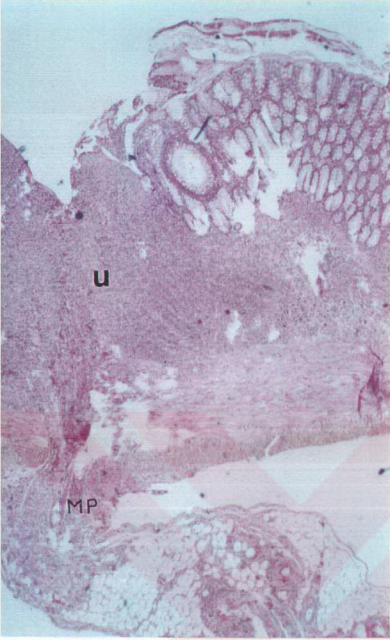
**Resim 4.** Taşıyıcı grubunda kolonun histolojik görünümü (H+E, x40)



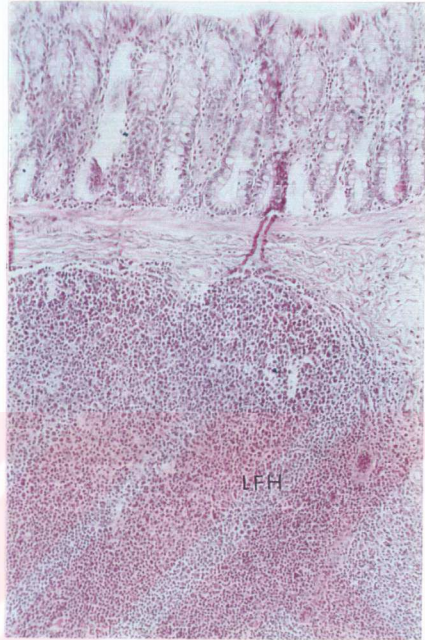
**Resim 5.** Akut kolit grubunda mukoza ve submukozada akut iltihap görünümü (H+E, x125)(PNL: lökosit infiltrasyonu)



**Resim 6.** Bosentan verilen akut kolit grubunda mukoza ve submukoza yapısının korunması (H+E, x125)(LF: lenfositik infiltrasyon)



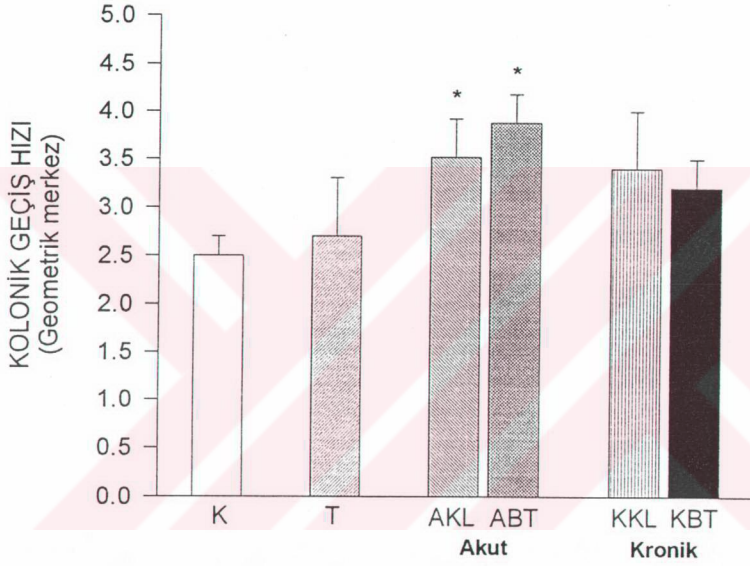
**Resim 7.** Kronik kolit grubunda kolonun ülserasyon (U) ve mikroperforasyon (MP) gösteren görünümü (H+E, x40)



**Resim 8.** Bosentan verilen kronik kolit grubunda lenfoid folikül hiperplazisi (LFH) görünümü (H+E, x125)

#### **Kolonik Geçiş Hızı Değerlendirilmesi (Geometrik Merkez Ölçümü):**

Kalın bağırsak geçiş hızını değerlendirmek için ölçülen geometrik merkez, akut kolit grubunda ( $3.52 \pm 0.4$ ) kontrol grubuna ( $2.52 \pm 0.2$ ) göre artmış olarak saptanmıştır ( $p < 0.05$ ). Taşıyıcı ( $2.74 \pm 0.7$ ) ve kronik kolit gruplarında ( $3.4 \pm 0.6$ ) saptanan geometrik merkez ölçümleri kontrol grubuna göre farklılık göstermemiştir. Bosentan verilen akut kolit grubu ( $3.88 \pm 0.3$ ) ile akut kolit grubu arasında ve Bosentan verilen kronik kolit grubu ( $3.16 \pm 0.3$ ) ile kronik kolit grubu arasında ise fark saptanmamıştır (Şekil 4).



**ŞEKİL 4.** Kontrol (K), taşıyıcı (T), akut kolit (AKL), bosentan ile tedavi edilen akut kolit (ABT), kronik kolit (KKL) ve bosentan ile tedavi edilen kronik kolit gruplarında (KBT) saptanan geometrik merkez ölçümü. \*:  $p < 0.05$ , K grubuna göre.

## TARTIŞMA

Morbiditesi yüksek bir hastalık grubu olarak karşımıza çıkan İBH'nın görülme sıklığı günümüzde giderek artarken cerrahi girişim seçeneği dışındaki tedaviler ancak palyatif olabilmektedir. İlaç tedavisinin hastalığı iyileştirmede yetersiz kalması daha çok hastalığın etyopatogenezinin aydınlatılmamasına bağlanmaktadır<sup>1</sup>. Bugüne kadar birçok infeksiyöz ajan, bağışıklık sistemi faktörü ile NO ve arşidonik asit metabolizması ürünleri gibi çeşitli medyatörler hastalığın etyopatogenezinden sorumlu tutulmuştur<sup>2,3,10-14</sup>. Son yıllarda birçok alanda araştırma konusu olan ET ailesinin de İBH'nın oluşum mekanizmasında rol oynadığı düşünülmektedir<sup>18</sup>. İBH hastalarının dokularında ET seviyesinin sağlıklı dokulara göre anlamlı derecede yüksek olduğunun gösterilmesinin<sup>18</sup> dışında ET'in bu olası rolünü sorgulayan bir çalışma mevcut değildir.

Bu çalışmada ET'in İBH etyopatogenezindeki yerini araştırmak amacı ile sıçanda deneysel TNBS-E kolit modeli kullanılmıştır<sup>30</sup>. Bu kolit modelinin, özellikle sekiz haftaya kadar süren kronik kolit oluşturması ve histopatolojik olarak da insan İBH'na benzer özellikler göstermesi nedeniyle uygun bir model olduğu düşünülmektedir<sup>35-37</sup>. Yine bu model ile yapılan deneysel çalışmalarda sonucunda hasar mekanizmasında rol oynadığı gösterilen medyatörlerin İBH olan hastalarda da saptanması bu modeli seçkin hale getirmektedir<sup>55</sup>. Çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlara göre TNBS-E ile oluşturulan kolit gruplarında kronik dönemde saptanan PO düzeyi, MPO aktivitesi ve makroskopik hasar puanlaması, tek başına etanol uygulanan taşıyıcı grubuna göre anlamlı olarak yüksek saptanmıştır. Bu da oluşturulan kolitin asıl etkeninin etanol değil, TNBS olduğuna işaret etmektedir. Morris ve arkadaşları<sup>30</sup> ilk olarak oluşturdukları bu modelde etanolün yüzeysel mukozal bariyeri ortadan kaldırdığını ve TNBS'nin antijenitesi sonucunda daha kronik süreli ve transmural hasar oluşturduğunu öne sürmüşlerdir. Bizim çalışmamızda da etanol verilmesini takip eden 14 gün sonunda (Taşıyıcı



grubu; T) yapılan histopatolojik incelemede submukozaya kadar olan kolon duvarında sınırlı inflamasyon saptanırken, TNBS ve etanolün beraber verildiği grupta 14 günün sonunda (Kronik kolit grubu; KKL) kronik inflamatuvar hücrelerinin ve derin ülserlerin eşlik ettiği transmural hasar saptanmıştır. Bunun yanısıra PO seviyesi, MPO aktivitesi ve makroskopik hasar puanlamasının da KKL grubunda T grubuna göre anlamlı olarak artması, oluşan kolitin asıl sorumlusunun TNBS olduğunu desteklemektedir.

Akut kolit grubunda (AKL) elde edilen makroskopik ve mikroskopik bulgular, TNBS-E'nin erken dönemde de dokuda hasar oluşturduğunu, ancak bu hasarın KKL grubundaki kadar ağır olmadığını, daha çok T grubundaki hasara benzerlik gösterdiğini ortaya koymuştur. Bu da akut dönemde oluşan hasardan etanolün sorumlu olabileceğini düşündürmektedir. Histolojik bulguların yanısıra, AKL grubunda MPO aktivitesinin de yüksek bulunması, inflamasyonun varlığını desteklemektedir<sup>49</sup>. Erken dönemde PO seviyesinin K grubuna göre farklılık göstermemesi PO'nun hasarlı dokuda değil de portal venden alınan plazma örneklerinde ölçülmesine bağlanabilir. Nitekim kronik dönemde PO seviyesi, K ve AKL gruplarına göre oldukça anlamlı olarak yükselmiştir.

Bir nonselektif endotelin reseptör blokörü olan Bosentan'ın kolit oluşturulmasından önce ve sonra iki gün süre ile verilmesi, makroskopik ve mikroskopik hasarda anlamlı azalmaya yol açmıştır. Ancak aynı grupta MPO aktivitesi ve PO seviyesi, AKL grubuna göre bir farklılık göstermemiştir. Bosentan'ın 14 gün süre ile sıçanlara verilmesini (KBT) takiben yapılan makroskopik ve mikroskopik değerlendirmede hasarın oldukça hafif olduğu saptanmıştır. KBT grubunda MPO aktivitesi ve PO seviyesinde anlamlı istatistiksel düşüşler dikkati çekmiştir. Bu durumda, hem ABT hem de KBT grupları gözönüne alındığında özellikle mikroskopik bulgular Bosentan'ın hasarı engelleyici bir etkide bulunduğuna işaret etmiştir. Bu iki grupta dikkati çeken bir diğer histolojik bulgu ise yaygın lenfoid folikül hiperplazisinin saptanması idi. Bu bulguya diğer gruplarda rastlanmaması, bosentanın bir takım immünolojik mekanizmalar aracılığı ile hasarı engellediğini düşündürmüştür<sup>71</sup>. KBT grubundaki MPO aktivitesi, PO

seviyesi ve makroskopik hasar puanlarındaki düşüşler, bu maddenin hasar engelleyici özelliğini doğrular nitelikteydi.

Bütün bu bulguların ışığında ET reseptörlerinin bloke edilmesinin deneysel kolitteki hasarı kısmen bloke etmesi, ET'lerin hasar mekanizmasında önemli rollerinin olduğunu ortaya çıkarmıştır. Birincil koroziv hasara yanıt olarak endotel hücreleri, periferik sinir hücreleri, periferik kan monositleri ve PNL gibi hücrelerden salınan ET<sup>17,78,81</sup> mikrosirkülasyonda vazokonstriksiyon yaparak hasarın boyutunu artırıyor olabilir<sup>87,88</sup>. Daha önce yapılan bir çalışmada Miura ve arkadaşları<sup>89</sup>, ET-1'in iskemik bağırsak hastalığına yol açtığını saptamışlardır. Ayrıca bilindiği üzere kolonik kan akımının azalması sonucunda oluşan "oksidaz aktivasyonu", geçici iskemi ortadan kalkınca kolon epitel ve endotel tarafından ROM üretimine yol açabilmektedir<sup>42</sup>. Bu da lipid peroksidasyon gibi mekanizmalar ile oksidatif hasarın boyutunu artırıyor olabilir.

ET'in hasarın oluşmasında yer alan olası bir başka etkisi ise, inflamatuvar hücreler ve vasküler endotel gibi oluşumlardan başta LTB<sub>4</sub> olmak üzere çeşitli lipoksijenaz ürünlerinin ortama salınımını sağlamak ve böylece PNL gibi fagositer hücreleri ortama çekmektir<sup>95</sup>. Bunun dışında ET-1'in nötrofiller için hem selektif bir çekici hem de güçlü bir modülatör olduğu gösterilmiştir<sup>20-22</sup>. PNL ve diğer fagositer hücrelerden ortama salınan ROM'ler aracılığı ile ET, bu modelde ülser oluşumundan sorumlu olabilir. Daha önce yapılan bir çalışmada İBH'nın şiddeti ile ROM'lerinin ortamdaki miktarı arasında pozitif korelasyon saptanmıştır<sup>7</sup>. Deneysel olarak da ROM'lerinin ortamdan kaldırılmaları ile kolitte doku hasarının hafifletildiği gösterilmiştir<sup>45</sup>. ET de gerek iskemi oluşturmasına ikincil, gerekse direkt veya indirekt olarak ara proinflamatuvar medyatörleri aracılığı ile ROM'lerin ortamda artışına yol açıyor olabilir. Bosentanın sıçanlara verilmesi ile ET'in etkileri reseptör düzeyinde bloke edilerek hasar yapıcı ROM'lerin ortamda çoğalmalarının engellenmesi mümkün olabilmektedir.

Daha önce TNBS-E kolit modelinde NOS aktivitesinin artışı IL-1, TNF ve  $\delta$  interferon gibi sitokinlerin ortamda artışına bağlanmış<sup>12,64</sup> ve NO'nin doku hasarının oluşmasında önemli

rolünün olabileceği üzerinde durulmuştur<sup>14</sup>. ET'in NO'in salınımına yol açması<sup>23,88</sup> ve NOS'un artışına neden olduğu öne sürülen sitokinlerin de ET'in salınımına yol açtığına gösterilmesi<sup>82-85</sup> göz önüne alındığında sitokinlerin NOS aktivitesini artırmasında ara medyatörün ET olabileceği düşünülebilir. Bu durumda ET'in bloke edilmesi, sitokinlerin artışına rağmen NO'in ortama salınmasının engellenmesine yol açacak ve hasarı önleyecektir.

Bosentan verilen akut kolit grubunda ET blokajına rağmen MPO aktivitesinin yüksek saptanması ise mukozanın bütünlüğünün etanol ile yıkılması sonucunda, ET'den bağımsız olarak, intraluminal bakterilerin ve ürünlerinin antijenik özellikleri sonucunda ortamda PNL gibi fagositer hücrelerin artışına bağlanabilir<sup>72-75</sup>. Bu da MPO aktivitesinin hem AKL hem de ABT grubunda artmış olmasını açıklamaktadır. Ancak geç dönemde hasar mekanizmasında etanolden çok TNBS'in rol oynadığı bilinmektedir<sup>30</sup>. Bu durumda ET'in etkisi daha belirgin şekilde kronik süreçte ortaya çıkıyor olabilir. Daha önce yapılan çalışmalar, PNL'lerin ortamdaki kaldırılmalarının kolitte görülen doku hasarını azaltmadığını göstermiştir. Bu çalışmaların sonucunda fagositer hücrelerin hasarlı alanda çoğalmalarının hastalığın nedeni olmasından çok sonucu olduğu öne sürülmüştür<sup>39,40</sup>.

Daha önce yapılan gerek klinik gerekse deneysel çalışmalarda İBH'lı hastalarda gözlenen ishal ve sık dışkılama hissi gibi semptomların bu hastalarda ve deneysel kolitli hayvanlarda saptanan YAK'lara bağlı olduğu düşünülmüştür<sup>15,16</sup>. TNBS-E kolitli sıçanlarda yapılan bir çalışmada akut dönemde kolonik geçiş hızında artış saptanmıştır<sup>113</sup>. Ancak kronik dönemdeki geçiş hızı üzerinde yapılmış herhangi bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Bizim çalışmamızda da daha önce yapılan çalışmalara paralel olarak akut dönemde kolonik geçiş hızında artış saptanmış ancak kronik dönemde geçiş hızı, yeniden normale dönmüştür.

ET-1 ve ET-2'nin bağırsak düz kası üzerinde tonus ayarlayıcı rolleri olduğu bilinmektedir<sup>10,25</sup>. Periferik sinir sistemi hücreleri, dorsal kök gangliyonlarında ve bağırsak düz kas hücrelerinde ET moleküllerinin varlığının saptanması, kolonik motilite üzerinde otokrin nöromodülatör olarak belirgin etkilerinin olduğunu düşündürmektedir<sup>19</sup>. Ancak akut kolit

grubunda saptanan kolonik geçiş hızındaki artış üzerinde bosentanın bir etkisinin olmaması, ET'in en azından bu modelde kolonik motilite mekanizmasında herhangi bir rolünün olmadığına işaret etmektedir. Kronik dönemde kolonik geçiş hızında normale göre bir değişiklik saptanmaması ve akut dönemde bosentanın bir etkisinin görülmemesi, İBH'da kronik süreçli olarak gözlemlenen motilite paterni değişikliklerindeki ET'in rolünü kesin olarak dışlamamaktadır.

Sonuç olarak, TNBS-E kolitli sııanlarda oluşan hasarın, bir nonspesifik endotelin blokeri olan bosentan verilerek hem akut hem de kronik dönemde engellendiği gösterilmiştir. ET'in kolitte oluşan hasar mekanizmasında ara medyatör rolünün ortaya çıkarılmasının yanısıra bu etkisinin en azından erken dönemde PNL gibi fagositer hücrelerden bağımsız olduğu anlaşılmıştır. Kolonik geçiş hızı sonuçlarına göre ise ET'in bu modelde kolonik motilite üzerinde herhangi bir etkisinin olmadığı saptanmıştır. İBH etyopatogenezindeki rolü ortaya konan ET'in, antagonistleri aracılığı ile ileride bu hastalık grubunun tedavisinde yer alabileceği yolunda ipuçları elde edilmiştir.

## BULGULARIN ÖZETİ

Sıçanlarda TNBS-E ile oluşturulan kolit modeli üzerinde yapılan bu çalışmada,

1. Sıçanlara TNBS-E verilmesi ile makroskopik ve mikroskopik hasar değerlendirilmesi sonucunda granüloamatöz tipte kronik kolit oluştuğu saptanmıştır.

2. Aynı hasar değerlendirme parametreleri gözönüne alındığında, kronik kolit grubunda oluşan hasarın taşıyıcı grubundakinden daha ağır derecede olması, granüloamatöz reaksiyondan sorumlu asıl ajanın etanolden çok TNBS olduğuna işaret etmiştir.

3. Bosentan verilen akut kolit grubunda, MPO aktivitesinin artması dışında PO değerlerinin düşük saptanması ile mikroskopik ve makroskopik olarak akut kolit grubuna göre daha hafif derecede hasar gözlenmesi Bosentan'ın akut dönemde hasarı önleyici etkisi olduğunu göstermiştir.

4. Bosentan verilen kronik kolit grubunda ise kronik kolit grubuna göre MPO aktivitesi ve PO değerlerinde azalma ile makroskopik ve mikroskopik olarak minimum hasar saptanmış olması Bosentan'ın kronik dönemde hasarı engelleyici özelliğinin devam ettiğine işaret etmiştir.

5. Akut kolit grubunda kolonik geçiş hızlanmıştır. Ancak kronik kolit grubunda kolonik geçiş kontrol grubundan farklılık göstermemiştir.

6. Akut dönemde Bosentan verilmesi kolonik geçişteki hızlanma üzerinde herhangi bir değişiklik yapmamıştır. Sonuç olarak, akut ve kronik dönemde Bosentan'ın kolitte oluşan motilite değişiklikleri üzerinde bir rolü saptanmamıştır.

## ÖZET

Günümüzde önemli morbidite ve mortalite nedeni olan inflamatuvar bağırsak hastalıklarının etyopatogenezi henüz açıklığa kavuşturulamamıştır. Bu çalışma, endotelinin (ET) deneysel kolit mekanizmasındaki rolünü araştırmak amacıyla planlanmıştır. Bu amaçla sıçanlarda oluşturulan kolit modelinde bir nonspesifik ET reseptör antagonisiti olan Bosentan'ın (BS) etkileri araştırılmıştır. Wistar-Albino erkek sıçanlara (280-280 g) intrakolonik (i.k.) olarak trinitrobenzen sülfonik asit-%50 etanol karışımı (TNBS-E; 30 mg/0.5 mL) verilerek kolit oluşturuldu. Taşıyıcı-etanol grubuna (T) i.k. olarak yalnızca etanol verilirken, kontrol grubuna (K) ise i.k. olarak herhangi bir madde verilmedi. Kolit oluşturulduktan sonra iki ayrı grupta sıçanlara iki gün (ABT) veya 14 gün (KBT) süre ile BS (100 mg/kg %5 arap sakızı içerisinde) verilirken bir diğer iki gruba ise 2 gün (AKL) veya 14 gün (KKL) süre ile %5 arap sakızı gavaj olarak verildi. AKL ve ABT gruplarında üçüncü gün, T, KKL ve KBT gruplarında ise sıçanlara 15.gün laparotomi yapılarak sıçanların çekumlarına 0.2 ml radyoaktif işaretli krom ( $0.4 \mu\text{Ci Na}^{51}\text{CrO}_4$ ) verildi. 60 dakika sonra relaparotomi yapılarak kolonda makroskopik hasar değerlendirmesi yapılmasının ardından tüm kolon 10 eşit segmente ayrıldı. Her segmentin gama sayıcısında radyoaktivite emisyon sayımı yapıldı ve geometrik merkez formülü ile kolonik geçiş hızı hesaplandı. Plazma protein oksidasyon (PO) düzeyini ölçmek için portal venden kan örneği ve doku myeloperoksidaz (MPO) aktivitesi ile histolojik inceleme için ise kolon örnekleri alındı. AKL ( $325.1 \pm 44.9$  u/gr yaş ağırlık (y.a.)) ve KKL ( $471.6 \pm 36.6$  u/gr y.a.) gruplarında MPO aktivitesi, K grubuna ( $73.6 \pm 11$  u/gr y.a.) göre artmış olarak saptanmıştır ( $p < 0.05$  ve  $p < 0.01$ ). KBT grubunda saptanan MPO aktivitesi ( $167.5 \pm 35.8$  u/gr y.a.) ise KKL grubuna göre azalmıştır ( $p < 0.001$ ). KKL grubunda PO düzeyi ( $1158.1 \pm 63.4$  nmol/ml), K ( $274.3 \pm 23.1$  nmol/ml) ve T ( $490 \pm 52.2$  nmol/ml) grubuna göre artmış olarak saptanmıştır ( $p < 0.001$  ve  $p < 0.001$ ). KBT grubunda ise PO seviyesi ( $375.5 \pm 46.9$  nmol/ml), KKL grubuna


göre azalmış olarak saptanmıştır ( $p<0.001$ ). AKL ( $4.8\pm0.6$ ) ve KKL ( $3.8\pm0.3$ ) gruplarında saptanan makroskopik hasar puanı, K (0) ve T ( $1.4\pm0.4$ ) gruplarına göre artmış olarak saptanmıştır ( $p<0.01$  ve  $p<0.001$ ). ABT grubunun hasar puanı ( $3\pm0.5$ ), AKL grubuna göre, KBT grubunun puanı ise ( $2.3\pm0.5$ ) KKL grubuna göre azalmış olarak saptanmıştır ( $p<0.05$  ve  $p<0.01$ ). Histolojik olarak AKL ve KKL gruplarında transmural inflamasyon ve ülser oluşumu saptanırken, ABT ve özellikle de KBT gruplarında hafif derecede hasar gözlenmiştir. Kolonik geçiş hızı, AKL grubunda ( $3.52\pm0.4$ ) artmış olarak saptanırken, KKL grubunda ( $3.4\pm0.6$ ) normal bulunmuştur. ABT grubunda saptanan kolonik geçiş hızı ( $3.88\pm0.3$ ) ise AKL grubuna göre farklılık göstermemiştir. Sonuç olarak Bosentan'ın TNBS-E kolitinde ET'in etkilerini bloke etmesi sonucunda hasarı engellediği saptanmıştır. Ancak kolonik geçiş hızı üzerinde ET'in etkisi gösterilememiştir. Bu çalışmada ET'in deneysel kolit patogenezinde yer alan medyatörlerden biri olduğuna dair önemli bulgular saptanmıştır.

## İNGİLİZCE ÖZET (SUMMARY)

Several mechanisms were shown to be involved in the pathogenesis of chronic inflammatory bowel disease. The aim of the present study was to determine the role of endothelins (ET) on experimental colitis. Colitis was induced by intracolonic (i.c.) administration of trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS; in 0.5 ml 50% ethanol) in Wistar-Albino male rats (200-280 g). In the vehicle (T) group, animals received ethanol enema, while the rats in the control group (K) received no i.c. instillation. Following the induction of colitis, rats were given orally either Bosentan, a non-selective ET receptor antagonist, (BS; 100 mg/kg in 5% arabic gum) (ABT) or arabic gum (AKL) by gavage for 2 days. Also two more groups of rats were given BS or arabic gum for 14 days (KBT and KKL, respectively). On the third day, animals from AKL and ABT groups and on the 15<sup>th</sup> day, animals from KKL and KBT groups underwent laparotomy. Radiolabelled Cr<sup>51</sup> (0.4 µCi) was instilled into cecum of the rats. After 60 minutes, rats underwent relaparotomy followed by excision of the whole colon. After performing the macroscopic damage scoring, colon was divided into 10 equal pieces. Each segment's radioactive emission was measured by gamma counter and geometric center of each colon was calculated as an indicator of colonic transit time. Blood was withdrawn from the portal vein for the determination of plasma protein oxidation (PO) level and the colon was then excised for the determination of myeloperoxidase (MPO) activity and also for macroscopic and histologic inflammatory assessment. MPO activities of colonic tissues were elevated in AKL and KKL groups (325.1±44.9 u/g wet weight (ww) and 431.8±54.6 u/g ww) as compared with K group (73.6±11 u/g ww). PO levels were found to be significantly increased in KKL group (1158.1±63.4 nmol/ml) compared with K and T groups (274.3±23.1 nmol/ml and 490±52.2 nmol/ml). BS treatment significantly reduced both the PO level (375.5±46.9 nmol/ml) and MPO activity (167.5±35.8 u/gr ww) in KBT group with respect to KKL group. Macroscopic



lesion indices (MLI) of colon were assessed as 0,  $1.4\pm 0.4$ ,  $4.8\pm 0.6$ ,  $3\pm 0.5$ ,  $3.8\pm 0.3$ ,  $2.3\pm 0.5$  in K, T, AKL, ABT, KKL and KBT groups, respectively. Histologically, there was a wide range of severe inflammation evidence in AKL and KKL groups, whereas the findings of mild inflammation in ABT and KBT groups were consistent with damage prevention. There was no difference of colonic transit time among all groups, but the acceleration in AKL group ( $3.52\pm 0.4$ ). In ABT group ( $3.88\pm 0.3$ ), bosentan treatment did not revealed any significant change in the accelerated transit time of AKL group. The results of the present study indicate that the inhibition of ET receptors results in prevention of ulcer formation and a reduction in colonic inflammatory response, as assessed by significant decreases in both PO levels and MPO activity. But, there observed no effect of ETs on colonic motility. In conclusion, it may be suggested that ETs are involved in the pathogenesis of colonic injury in this animal model of chronic colitis.



**KAYNAKLAR**

1. Mortensen N. Inflammatory disease of the colon. In: Oxford Textbook of Surgery (Morris PJ and Malt RA, Ed.) Oxford University Press, New York, 1994, pp 1036-1059.
2. Donaldson R M J R. Crohn's Disease. In: Gastrointestinal Disease, Pathophysiology, Diagnosis and Management (Sleisenger MH and Fordtran JS, Ed.) W B Saunders, New York, 1989 , p 1327.
3. Cello JP, Schneiderman DJ. Ulcerative colitis. In: Gastrointestinal Disease, Pathophysiology, Diagnosis and Management. (Sleisenger MH and Fordtran JS, Ed.) WB Saunders, New York, 1989, p 1435.
4. Owen DA, Kelly JK. Large intestine and Anus: Idiopathic inflammatory bowel disease. In: Anderson's Pathology (Damjanov I and Linder J, Ed.) Mosby-Year Book, St.Louis, 1996, pp 1755-1759.
5. Goldman H. Interpretation of large intestinal mucosal biopsy specimens. Hum Pathol 1994;25:1150-1159
6. Granger DN. Role of xanthine oxidase and granulocytes in ischemia-reperfusion injury. Am J Physiol 1988;255:H1269-1275
7. Shiratora Y, Aoki S, Takada H, Kiriyaama H, Ohto K, Hai K, Teraoka H, Matano S, Matsumoto K, Kamii K. Oxygen-derived free radical generating capacity of polymorphonuclear cells in patients with ulcerative colitis. Digestion 1989;44:163-171
8. von Ritter C, Grisham MB, Hollwarth M, Inauen W, Granger DN. Neutrophil-derived oxidants mediate formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine induced increases in mucosal permeability in rats. Gastroenterology 1989;97:778-780
9. Aust SD, Svingen BA. The role of iron in enzymatic lipid peroxidation. In: Free Radicals in Biology (Prior WA, Ed.) Academic Press, New York; 1982, pp 1-28

10. Sharon P, Ligumsky M, Rachmilewitz D, Zor U. Role of prostaglandins in ulcerative colitis. Enhanced production during active disease and inhibition by sulfasalazine. *Gastroenterology* 1978;75:638-640.
11. Rachmilewitz D, Simon PL, Schwartz LW, Griswold DE, Fondacaro JD, Wasserman MA. Inflammatory mediators of experimental colitis in rats. *Gastroenterology* 1989;97:326-337
12. Neilly PJD, Gardiner KR, Kirk SJ, Jennings G, Anderson NH, Elia M, Rowlands BJ. Endotoxaemia and cytokine production in experimental colitis. *Br J Surg* 1995;82:1479-1482
13. Ligumsky M, Simon PL, Karmeli F, Rachmilewitz D. Role of interleukin 1 in inflammatory bowel disease: enhanced production during active disease. *Gut* 1990;31:686-689
14. Beckman JS, Beckman TW, Chen J, Marshall PA, Freeman BA. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87:1620-1625
15. Chaudhary NA, Truelove SC. Human colonic motility: a comparative study of normal subjects, patients with ulcerative colitis, and patients with irritable colon syndrome. I. Resting patterns of motility. *Gastroenterology* 1961;40:1-36
16. Sethi AK, Sarna SK. Colonic motor activity in acute colitis in conscious dogs. *Gastroenterology* 1991;100:954-963
17. Rubanyi GM, Polokoff MA. Endothelins: molecular biology, biochemistry, pharmacology, physiology, and pathophysiology. *Pharmac Rev* 1994;46:325-415
18. Murch SH, Braegger CP, Sessa WC, MacDonald TT. High endothelin-1 immunoreactivity in Crohn's disease and ulcerative colitis. *Lancet* 1992;339:381-385
19. Inagaki H, Bishop AE, Escrig C, Wharton J, Allen-Mersh TG, Polak JM. Localization of endothelinlike immunoreactivity and endothelin binding sites in human colon. *Gastroenterology* 1991;101:47-54

20. Wright CD, Cody WL, Dunbar Jr JB, Doherty AM, Hingorani GP, Rapundalo ST. Characterization of endothelins as chemoattractants for human neutrophils. *Life Sci* 1994;55:1633-1641
21. Ishida K, Takeshige K, Minakami S. Endothelin-1 enhances superoxide generation of human neutrophils stimulated by the chemotactic peptide N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine. *Biochem Biophys Res Commun* 1990;173:496-500
22. Hafström I, Ringertz B, Lundeberg T, Palmblad J. The effect of endothelin, neuropeptide Y, calcitonin gene-related peptide and substance P on neutrophil functions. *Acta Physiol Scand* 1993;148:341-346
23. Takayanagi R, Kitazumi K, Takasaki C, Ohnaka K, Aimoto S, Tasaka K, Ohashi M, Nawata H. Presence of non-selective type of endothelin receptor on vascular endothelium and its linkage to vasodilation. *FEBS Lett* 1991;282:103-106
24. Warner TD, Allcock GH, Mickley EJ, Corder R, Vane JR. Comparative studies with the endothelin receptor antagonists BQ-123 and PD 142893 indicate at least three endothelin receptors. *J Cardiovasc Pharmacol* 1993;22 (Suppl.8):S117-S120
25. Saida K, Mitsui Y, Ishida N. A novel peptide, vasoactive intestinal contractor, of a new (endothelin) peptide family. Molecular cloning, expression, and biological activity. *J Biol Chem* 1989;264:14613-14616
26. Lin WW, Lee CY. Intestinal relaxation by endothelin isopeptides: involvement of  $Ca^{2+}$  - activated  $K^{+}$  channels. *Eur J Pharmacol* 1992;219:355-360
27. Kodner IJ, Fry RD, Fleshman JW, Birnbaum EH. Colon, rectum, anus. In: *Principles of Surgery* (Schwartz SI, Ed.) McGraw Hill, New York, 1994, pp 1191-1306
28. Elson CH, Sartor RB, Tennyson GS, Riddell RH. Experimental models of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 1995;109:1344-1367
29. MacPherson BR, Pfeiffer CJ. Experimental production of diffuse colitis in rats. *Digestion* 1978;17:135-150.

30. Morris GP, Beck PL, Herridge MS, Depew Wt, Szewcuk MR, Wallace JL. Hapten-induced model of chronic inflammation and ulceration in the rat colon. *Gastroenterology* 1989;96:795-803
31. Yamada T, Deitch E, Specian RD, Perry MA, Sartor RB, Grisham MB. Mechanisms of acute and chronic intestinal inflammation induced by indomethacin. *Inflammation* 1993;17:641-662
32. Hodgson HJF, Potter BJ, Skinner J, Jewell DP. Immune-complex mediated colitis in rabbits. *Gut* 1978;19:225-232
33. Sadlack B, Merz H, Schorle H, Schimpl A, Feller AC, Horak I. Ulcerative colitis-like disease in mice with a disrupted interleukin-2 gene. *Cell* 1993;75:253-261
34. Hammer RE, Maika SD, Richardson JA, Tang JP, Taurog JD. Spontaneous inflammatory disease in transgenic rats expressing HLA-B27 and human beta 2m: an animal model of HLA-B27-associated human disorders. *Cell* 1990;63:1099-1112
35. Wallace JL, MacNaughton WK, Morris GP, Beck PL. Inhibition of leukotriene synthesis markedly accelerates healing in a rat model of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 1989;96:29-36.
36. Higa A, McKnight GW, Wallace JL. Attenuation of epithelial injury in acute experimental colitis by immunomodulators. *Eur J Pharmacol* 1993;239:171-176
37. Barone FC, Joslyn AF, Schwartz LW, Fondacaro JD, Wasserman MA, Rachmilewitz D. Increased colonic motility in rodent experimental colitis (abstr.). *Gastroenterology* 1988;94:A24
38. Williams JG, Hughes LE, Hallet MB. Toxic oxygen metabolite production by circulating phagocytic cells in inflammatory bowel disease. *Gut* 1990;31:187-193
39. Buell MG, Berin MC. Neutrophil-independence of the initiation of colonic injury-comparison of results from three models of experimental colitis in the rat. *Dig Dis Scie* 1994;39:2575-2588

40. Sekizuka E, Grisham MB, Li M, Deitch EA, Granger DN. Inflammation-induced intestinal hyperemia in the rat: Role of neutrophils. *Gastroenterology* 1988;95:1528-1534
41. Parks DA, Granger DN. Contributions of ischemia and reperfusion to mucosal lesion formation. *Am J Physiol* 1986;250:G749-G753
42. Grisham MB, Granger DN. Neutrophil-mediated mucosal injury-role of reactive oxygen metabolites. *Dig Dis Scie* 1988;33:6S-15S
43. Cabelli DE, Bielski BHJ. Kinetics and mechanisms for the oxidation of ascorbic acid/ascorbate by  $H_2O_2/O_2$  radicals. *J Phys Chem* 1983;87:1809-1812
44. Yamada T, Zimmerman BJ, Specian RD, Grisham MB. Role of neutrophils in acetic acid-induced colitis in rats. *Inflammation* 1991;15:399-411
45. Rachmilewitz D, Karmeli F, Okon E. Sulfhydryl blocker-induced rat colonic inflammation is ameliorated by inhibition of nitric oxide synthase. *Gastroenterology* 1995;109:98-106
46. Ligumsky M, Karmeli F, Sharon P, Zor U, Cohen R, Rachmilewitz D. Enhanced thromboxane  $A_2$  and prostacyclin production by cultured rectal mucosa in ulcerative colitis and its inhibition by steroids and by sulfasalazine. *Gastroenterology* 1981;81:444-9
47. Zipser RD, Nast CC, Lee M, Kao HW, Duke R. In vivo production of leukotriene  $B_4$  and leukotriene  $C_4$  in rabbit colitis. *Gastroenterology* 1987;92:33-39
48. Ford-Hutchinson AW, Bray MA, Doig MV, Shipley ME, Smith MJ. Leukotriene B, a potent chemokinetic and aggregating substance released from polymorphonuclear leukocytes. *Nature* 1980;286:264-265
49. Lobos EA, Sharon P, Stenson WF. Chemotactic activity in inflammatory bowel disease. *Dig Dis Sci* 1987;32:1380-1388
50. Stankova J, Dupuis G, Gagnon N, Thivierge M, Turcotte S, Rola-Pleszczynski M. Priming of human monocytes with leukotriene  $B_4$  enhances their sensitivity in IL-2-driven tumor necrosis factor-alpha production. Transcriptional and post-transcriptional up-regulation of IL-2 receptors. *J Immunol* 1993;150:4041-4051

51. Schreiber S, Raedler A, Stenson WF, MacDermott RP. The role of the mucosal immune system in inflammatory bowel disease. *Gastroenterol Clin North Am* 1992;21:451-501
52. Gaginella TS, Walsh RE. Sulfasalazine: multiplicity of action. *Dig Dis Sci* 1992;37:801-812
53. Fretland DJ, Djuric SW, Gaginella TS. Eicosanoids and inflammatory bowel disease: regulation and prospects for therapy. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 1990;41:215-233
54. Kaufmann HJ, Taubin HL. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs activate quiescent inflammatory bowel. *Ann Intern Med* 1987;107:513-516
55. Schumert R, Towner J, Zipser RD. Role of eicosanoids in human and experimental colitis. *Dig Dis Sci* 1988;33(Suppl):58S-64S
56. Vilaseca J, Salas A, Guarner F, Rodriguez R, Malagelada JR. Participation of thromboxane and other eicosanoid synthesis in the course of experimental inflammatory colitis. *Gastroenterology* 1990;98:269-277
57. Wallace JL, Keenan CM. An orally active inhibitor of leukotriene synthesis accelerates healing in a rat model of colitis. *Am J Physiol* 1990;258:G527-G534
58. Allgayer H, Deschryver K, Stenson WF. Treatment with 16,16'-dimethyl prostaglandin E<sub>2</sub> before and after trinitrobenzenesulfonic acid in rats decreases inflammation. *Gastroenterology* 1989;96:1290-1300
59. Wallace JL, Keenan CM, Gale D, Shoupe TS. Exacerbation of experimental colitis by nonsteroidal anti-inflammatory drugs is not related to elevated leukotriene B<sub>4</sub> synthesis. *Gastroenterology* 1992;102:18-27
60. Moncada S, Higgs A. The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Eng J Med* 1993; 329:2002-2012
61. Kaplan SS, Biliar T, Curran RD, Zdiarski UE, Simmons RL, Basford RE. Inhibition of chemotaxis Ng-monomethyl-L-arginine: a role of cyclic GMP. *Blood* 1989;74:1885-1887

62. Sherman MP, Loro ML, Wong VZ, Tashkin DP. Cytokine and pneumocystis carinii induced L-arginine oxidation by murine and human pulmonary alveolar macrophages. *J Protozool* 1991;38:234S-236S.
63. Kirk SJ, Regan MC, Barbul A. Cloned murine T lymphocytes synthesize a molecule with the biological characteristics of nitric oxide. *Biochem Biophys Res Commun* 1990;173:660-665
64. Nussler AK, Billiar TR. Inflammation, immunoregulation, and inducible nitric oxide synthase. *J Leukoc Biol* 1993;54:171-178
65. Salvemini D, Misko TP, Masferrer JL, Seibert K, Currie MG, Needleman P. Nitric oxide activates cyclooxygenase enzymes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:4888-4892
66. Boughton-Smith NK, Evans SM, Hawkey CJ, Cole AT, Balsitis M, Whittle BJR, Moncada S. Nitric oxide synthase activity in ulcerative colitis and Crohn's disease. *Lancet* 1993; 342:338-340
67. Boughton-Smith NK, Evans SM, Whittle BJR. Elevated nitric oxide synthase activity in inflamed colon from a rat model of colitis (abstr.). *Gut* 1992; 33:S12
68. Rachmilewitz D, Karmeli F, Okon E, Bursztyn M. Experimental colitis is ameliorated by inhibition of nitric oxide synthase activity. *Gut* 1995;37:247-255
69. Neilly PJD, Kirk SJ, Gardiner KR, Anderson NH, Rowlands BJ. Manipulation of the L-arginine-nitric oxide pathway in experimental colitis. *Br J Surg* 1995;82:1188-1191
70. Gardiner SM, Compton AM, Bennett T, Palmer RMJ, Moncada S. Control of regional blood flow by endothelium-derived nitric oxide. *Hypertension* 1990;15:486-492
71. Cotran RS, Kumar V, Robbins SL. Inflammation. In: *Pathologic basis of disease* (Robbins SL, Ed.) WB Saunders, Philadelphia, 1989, pp 39-71.
72. Shorter RG, Huizenga KA, Spencer RJ. A working hypothesis for the etiology and pathogenesis of nonspecific inflammatory bowel disease. *Am J Dig Dis* 1972;17:1024-1032



73. Auer IO, Roder A, Wensink F, van de Merwe JP, Schmidt H. Selected bacterial antibodies in Crohn's disease and ulcerative colitis. *Scand J Gastroenterol* 1983;18:217-223
74. Nast CC, Le Duc LE. Chemotactic peptides. Mechanisms, functions, and possible role in inflammatory bowel disease. *Dig Dis Scie* 1988;33(Suppl):50S-57S
75. Sartor RB, Bond TM, Schwab JH. Systemic uptake and intestinal inflammatory effects of luminal bacterial cell wall polymers in rats with acute colonic injury. *Infect Immun* 1988;56:2101-2108
76. Beutler B, Cerami A. Cachectin and tumor necrosis factor as two sides of the same biological coin. *Nature* 1986;320:584-588
77. Wong GG, Clark SC. Multiple actions of interleukin 6 within a cytokine network. *Immunol Today* 1988;9:137-139
78. Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, Tomobe Y, Kobayashi M, Mitsui Y, Yazaki Y, Goto K, Masaki T. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature (Lond)* 1988;332:411-415
79. Inoue A, Yanagisawa M, Kimura S, Kasuya Y, Miyauchi T, Goto K, Masaki T. The human endothelin family: three structurally and pharmacologically distinct isopeptides predicted by three separate genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86:2863-2867
80. Bloch KD, Hong CC, Eddy RL, Shows TB, Quertermous T. cDNA cloning and chromosomal assignment of the endothelin 2 gene: vasoactive intestinal contractor peptide is rat endothelin 2. *Genomics* 1991;10:236-242
81. Sessa WC, Kaw S, Hecker M, Vane JR. The biosynthesis of endothelin-1 by human polymorphonuclear leukocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 1991;174:613-618
82. Kurihara H, Yoshizumi M, Sugiyama T, Takaku F, Yanagisawa M, Masaki T, Hamaoki M, Kato H, Yazaki Y. Transforming growth factor- $\beta$  stimulates the expression of endothelin mRNA by vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1989;159:1435-1440

83. Yoshizumi M, Kurihara H, Morita T, Yamashita T, Oh-hashii Y, Sugiyama T, Takaku F, Yanagisawa M, Masaki T, Yazaki Y. Interleukin-1 increases the production of endothelin-1 by cultured endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1990;166:324-329
84. Miyamori I, Takeda Y, Yoneda T, Ikei K, Takeda R. Interleukin-2 enhances the release of endothelin-1 from rat mesenteric artery. *Life Sci* 1991;49:1295-1300
85. Sugiura M, Inagami T, Kon V. Endotoxin stimulates endothelin-release in vivo and in vitro as determined by radioimmunoassay. *Biochem Biophys Res Commun* 1989;161:1220-1227
86. Saijonmaa O, Nyman T, Fyhrquist F. Endothelin-1 stimulates its own synthesis in human endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1992;188:286-291
87. Blank MA, Fuortes M, Nyrén O, Jaffe BM. Effect of endothelin-1 and vasoactive intestinal contractor on blood flow and output of vasoactive intestinal polypeptide in the feline colon. *Life Sci* 1991;48:1937-1944
88. De Nucci G, Thomas R, D'Orleans-Juste, Antunnes E, Walder C, Warner TD, Vane JR. Pressor effects of circulating endothelin are limited by its removal in the pulmonary circulation and by the release of prostacyclin and endothelium derived relaxing factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988;85:9797-9800
89. Miura S, Kurose I, Fukumura D, Suematsu M, Sekizuka E, Tashiro H, Serizawa H, Asako H, Tsuchiya M. Ischemic bowel necrosis induced by endothelin-1: an experimental model in rats. *Digestion* 1991;48:163-172
90. Takayashi K, Jones PM, Kanse SM, Lam H-C, Spokes RA, Ghatei MA, Bloom SR. Endothelin in the gastrointestinal tract: presence of endothelinlike immunoreactivity, endothelin-1 messenger RNA, endothelin receptors, and pharmacological effect. *Gastroenterology* 1990;99:1660-1667
91. Maggi CA, Giuliani S, Patacchini R, Rovero P, Giachetti A, Meli A. The activity of peptides of the endothelin family in various mammalian smooth muscle preparations. *Eur J Pharmacol* 1989;174:23-31

92. Giaid A, Gibson SJ, Herrero MD, Gentleman S, Legon S, Yanagisawa M, Masaki T, İbrahim NB, Roberts GW, Rossi ML. Topographical localization of endothelin mRNA and peptide immunoreactivity in neurons of the human brain. *Histochemistry* 1991;95:303
93. Güllüoğlu BM, Aktan AÖ, Yeğen C, Kurtel H, Yalın R. Endothelin release is augmented with captopril in rat ischemia-reperfusion injury of the liver. *Res Exp Med* 1996;196:227-233
94. Büyükgebiz O, Aktan AÖ, Yeğen C, Yalçın AS, Haklar G, Yalın R, Ercan ZS. Captopril increases endothelin serum concentration and preserves intestinal mucosa after mesenteric ischemia-reperfusion injury. *Res Exp Med* 1994;194:339-348.
95. Kruger H, Carr S, Brennan JC, McLean J. Activation of phospholipase A<sub>2</sub> by the human endothelin receptor in chinese hamster ovary cells involves G<sub>i</sub> protein-mediated calcium influx. *Biochem Biophys Res Commun* 1995;217:52-58
96. D'Orléans-Juste P, Télémaque S, Claing A, Ihara M, Yano M. Human big-endothelin-1 and endothelin-1 release prostacyclin via the activation of ET<sub>1</sub> receptors in the rat perfused lung. *Br J Pharmacol* 1992;105:773-775
97. Miura K, Yukimura T, Yamashita Y, Shimmen T, Okumura M, Yamanaka S, Imanishi M, Yamamoto K. Renal and femoral vascular responses to endothelin-1 in dogs: role of prostaglandins. *J Pharmacol Exp Ther* 1991;256:11-17
98. Takayasu-Okishio M, Terashita Z, Kondo K. Endothelin-1 and platelet activating factor stimulate thromboxane A<sub>2</sub> biosynthesis in rat vascular smooth muscle cells. *Biochem Pharmacol* 1990;40:2713-2717
99. Kiyohara T, Okuno M, Nakanishi T, Shinomura Y, Matsuzawa Y. Effect of endothelin 1 on ion transport in isolated rat colon. *Gastroenterology* 1993;104:1328-1336
100. Powell DW. Gastrointestinal system: Immunophysiology of intestinal electrolyte transport. In: *Handbook of physiology* (Schultz SG, Ed.) Oxford University Press, New York, 1991, pp 591-641.

101. Sakurai T, Yanagisawa M, Takuwa Y, Miyazaki H, Kimura S, Goto K, Masaki T. Cloning of a cDNA encoding a non-isopeptide-selective subtype of the endothelin receptor. *Nature* 1990;348:732-735
102. Lin HY, Kaji EH, Winkel GK, Ives HE, Lodish HF. Cloning and functional expression of a vascular smooth muscle endothelin 1 receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:3185-3189
103. Takayanagi R, Ohnaka K, Takasaki C, Ohashi M, Nawata H. Multiple subtypes of endothelin receptors in porcine tissues: characterization by ligand binding, affinity labeling and regional distribution. *Regul Pept* 1991;32:23-27
104. Sakurai T, Yanagisawa M, Masaki T. Molecular characterization of endothelin receptors. *Trends Pharmacol Sci* 1992;13:103-108
105. Richard V, Hogie M, Clozel M, Löffler BM, Thuillez C. In vivo evidence of an endothelin-induced vasopressor tone after inhibition of nitric oxide synthesis in rats. *Circulation* 1995;91:771-775
106. Koseki C, Imai M, Hirata Y, Yanagisawa M, Masaki T. Autoradiographic distribution in rat tissues of binding sites for endothelin: a neuropeptide? *Am J Physiol* 1989;256:R858-R866
107. Okabe H, Chijiwa Y, Nakamura K, Yoshinaga M, Akiho H, Harada N, Nawata H. Two endothelin receptors (ET<sub>A</sub> and ET<sub>B</sub>) expressed on circular smooth muscle cells of guinea pig cecum. *Gastroenterology* 1995;108:51-57
108. Giaid A, Gibson SJ, Nassif BN, Ibrahim N, Legon S, Bloom SR, Yanagisawa M, Masaki T, Vardell IM, Polak JM. Endothelin-1, and endothelium-derived peptide, is expressed in neurons of the human spinal cord and dorsal root ganglia. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86:7634
109. De La Monte SM, Quertermous T, Hong CC, Bloch KD. Regional and maturation-associated expression of endothelin 2 in rat gastrointestinal tract. *J Histochem Cytochem* 1995;43:203-209

110. Clozel M, Breu V, Burri K, Cassal JM, Fischli, Gray GA, Hirth G, Löffler BM, Müller M, Neidhart W, Ramuz H. Pathophysiological role of endothelin revealed by the first orally active endothelin receptor antagonist. *Nature* 1993;365:759-761
111. Clozel M, Breu V, Gray GA, Kalina B, Löffler BM, Burri K, Cassal JM, Hirth G, Müller M, Neidhart W, Ramuz H. Pharmacological characterization of bosentan, a new potent orally active nonpeptide endothelin receptor antagonist. *J Pharmacol Exp Ther* 1994;270:228-235
112. Grossi L, McHugh K, Collins SM. On the specificity of altered muscle function in experimental colitis in rats. *Gastroenterology* 1993;104:1049-1056
113. Pons L, Droy-Lefaix MT, Bueno L. Leukotriene D<sub>4</sub> participates in colonic transit disturbances induced by intracolonic administration of trinitrobenzene sulfonic acid in rats. *Gastroenterology* 1992;102:149-156
114. Morteau O, More J, Pons L, Bueno L. Platelet-activating factor and interleukin 1 are involved in colonic dysmotility in experimental colitis in rats. *Gastroenterology* 1993;104:47-56
115. Miller MS, Galligan JJ, Burks TF. Accurate measurement of intestinal transit in the rat. *J Pharmacol Meth* 1981;6:211-217
116. Levine RL, Garland D, Oliver CN, Amici A, Climent I, Lenz AG, Ahn BW, Shaltiel S, Stadtman ER. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol* 1990;186:464-478