

T.C.
Dokuz Eylül Üniversitesi
Tıp Fakültesi
İç Hastalıkları
Anabilim Dalı

**RATLARDA TNBS İLE OLUŞTURULAN
DENEYSEL KOLİT MODELİNDE
NİLOTİNİBİN ETKİNLİĞİ**

DR. PINAR ATACA

İÇ HASTALIKLARI UZMANLIK TEZİ

İZMİR-2013

T.C.
Dokuz Eylül Üniversitesi
Tıp Fakültesi
İç Hastalıkları
Anabilim Dalı

**RATLARDA TNBS İLE OLUŞTURULAN
DENEYSEL KOLİT MODELİNDE
NİLOTİNİBİN ETKİNLİĞİ**

İÇ HASTALIKLARI UZMANLIK TEZİ

DR. PINAR ATACA

TEZ DANIŞMANI: DOÇ DR. MÜJDE SOYTÜRK

Bu araştırma DEÜ Araştırma Fon Saymanlığı Tarafından 99.3456.23 sayı ile desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	1
ABSTRACT.....	3
GİRİŞ	5
GENEL BİLGİLER	
EPİDEMİYOLOJİ.....	7
KLİNİK.....	7
PATOGENEZ.....	8
TEDAVİ.....	14
YENİ TEDAVİLER.....	17
TİROZİN KİNAZ İNHİBİTÖRLERİ.....	18
GEREÇ VE YÖNTEM.....	20
BULGULAR.....	27
TARTIŞMA.....	38
KAYNAKLAR.....	42

TABLO LİSTESİ

Tablo 1	Çalışma Grupları
Tablo 2	Gruplara ait 1. ve 14. gün kilo ortalamaları ve 1-14. gün arası kilo farkları
Tablo 3	Gruplarda 7. ve 14. gün kilo ortalamaları ve 7-14. gün arası kilo farkları
Tablo 4	Gruplara göre patolojik makroskopik ve mikroskopik skor ortalamaları
Tablo 5	Gruplarda PDGFR alfa ve beta boyanma skorları ortalamaları
Tablo 6	Gruplarda doku ve serum TNF-alfa ortalamaları (ng/ml), apoptoz oranları

ŞEKİL LİSTESİ

- Şekil 1** İntestinal immün sistemin temel yapısı
- Şekil 2** IBH patogenezi
- Şekil 3** Ülseratif kolit başlangıç tedavi algoritmi
- Şekil 4** Patolojik olarak makroskopik skrlama sistemi
- Şekil 5** Patolojik olarak mikroskopik skrlama sistemi
- Şekil 6** PDGFR alfa ve beta skrlama sistemi
- Şekil 7** Grupların günlerle göre kilo ortalamaları
- Şekil 8** Grup 1’den alınmış normal mukoza örneği
- Şekil 9** Grup 2’de bir olguda geniş ülsera rektum makroskobik görünümü
- Şekil 10** Kolon mukozasında ülser alanı görünümü (Hematoksilen-eosin (HE) boyama 40x büyütme)
- Şekil 11** PDGFR alfa +1 skor ile boyanma (PDGFR, immünohistokimya x200 büyütmede)
- Şekil 12** PDGFR alfa +2 skor ile boyanma (PDGFR, immünohistokimya x200 büyütmede)
- Şekil 13** PDGFR alfa +3 skor ile boyanma (PDGFR, immünohistokimya x400 büyütmede)
- Şekil 14** PDGFR beta +3 skor ile boyanma (PDGFR, immünohistokimya x100 büyütmede)
- Şekil 15** PDGFR beta +1 skor ile boyanma (PDGFR,immünohistokimya x200 büyütmede)
- Şekil 16** Kolon epitelinde apopitotik hücre (siyah ok ile işaretlenmiş x400 büyütme)

KISALTMALAR

5-ASA	5-Aminosalisilat
CH	Crohn Hastalığı
c-fms	Makrofaj koloni stimüle edici faktör reseptörü
CMML	Kronik miyelomonositik lösemi
CRP	C-reaktif protein
DDR-1	Diskoidin reseptör kinaz-1
eNOS	Endotel kaynaklı nitrik oksit sentetaz
ESR	Eritrosit sedimentasyon hızı
FDA	US Food and Drug Administration
FGF	Fibroblast growth faktör
GIST	Gastrointestinal stromal tümör
HE	Hematoksilen-eozin
IBH	İnflamatuvar barsak hastalıkları
ICAM-1	İntersellüler adezyon molekülü-1
IFN-gama	İnterferon-gama
IgG1	İmmünoglobulin G1
IL	İnterlökin
iNOS	İndükte edilebilen nitrik oksit sentetaz
KML	Kronik Myeloid Lösemi
MAdCAM-1	Mukozal addressin hücre adezyon molekülü
MDR1	Human multidrug resistance 1
NO	Nitrik oksit
pANCA	Perinükleer antinötrofil sitoplazmik antikorlar
PDGF	Platelet derived growth faktör
PDGFR	Platelet derived growth faktör reseptörü
Th	T helper
TLR	Toll like reseptör
tmTNF	Transmembran tümör nekroz faktör
TNBS	2,4,6-trinitrobenzen sulfonik asit
TNF-Alfa	Tümör nekroz faktör-Alfa
TGF-Beta 1	Tümör growth faktör-Beta 1
ÜK	Ülseratif kolit
VCAM-1	Vasküler sellüler adezyon molekülü-1
VEGF	Vasküler endotelial growth faktör

TEŞEKKÜR

Asistanlığım boyunca, bilgi ve deneyimleri ile yetişmemde büyük emeği geçen, karşılaştığım her sorunda yardım alabileceğim, danışabileceğim, tezimin her aşamasında desteğini hissettiğim değerli tez danışmanı hocam Sayın Doç. Dr. Müjde SOYTÜRK'e,

Uzmanlık eğitimim boyunca mesleki ve hayata dair bilgi ve deneyimlerini bizimle paylaşan, klinik içi çalışmalarda sorumluluk almamızı destekleyerek bizlere mesleki özgüven kazandıran yanında çalışmaktan büyük onur duyduğum İç Hastalıkları Bölüm Başkanımız, değerli hocam Sayın Prof Dr. İlkay ŞİMŞEK'e,

Tez çalışması ortak paylaştığım, karşılaştığımız sorunlarda soğukkanlılığını koruyup beni yatıştıran, zor çalışma koşullarına rağmen her ihtiyacım olduğunda yanımda olan değerli ablam Sayın Uzm. Dr. Gözde DERVİŞ HAKİM'e,

Hayvan deneyini planlama ve başarılı bir şekilde uygulama sırasında bize büyük destek veren DEÜTF Deney Hayvanları bölümünden kurucu hocam Sayın Prof Dr. Osman YILMAZ'a, sayın Doç.Dr. Meral KARAMAN'a, Deney Hayvanları Bölümü asistanları ve çalışanlarına,

Patolojik değerlendirmede desteklerini esirgemeyen DEUTF Patoloji Bölümü öğretim üyeleri Sayın Prof. Dr. Özgül Sağol ve Yard.Doç. Dr. Mehtat Ünlü'ye.

Bitip tükenmeyen tempoda omuz omuza çalıştığım tüm asistan arkadaşlarıma,
Yetişmemde üstün emekleri olan tüm hocalarıma,

Sevgilerini, desteklerini, güvenlerini hep hissettiğim; hayatıma anlam katan aileme,

Sonsuz Teşekkürler....

Dr. Pınar ATACA

2013, İzmir

ÖZET

Ratlarda TNBS ile Oluşturulan Deneysel Kolit Modelinde Nilotinibin Etkinliği

Giriş ve Amaç: İnflamatuvar barsak hastalıkları (İBH), nedeni halen tam olarak aydınlatılamamış, immünolojik, genetik ve çevresel faktörlerin rol oynadığı ve tedavi seçeneklerinin kısıtlı olduğu bir hastalık grubudur. Çalışmanın amacı; ratlarda, Trinitrobenzen sülfonik asit (TNBS) ile oluşturulan kolit modelinde bir tirozin kinaz inhibitörü olan nilotinibin etkinliğini araştırmaktır.

Yöntem: Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi (DEÜTF) Hastanesi Deneysel Araştırma Laboratuvarından sağlanan 21 adet, ortalama ağırlığı $209,43 \pm 8,92$ gr (aralık 193-222 gr.) olan rat çalışmaya alındı. Sağlıklı kontrol grubunda yer alan (Grup 1) ratlara (n: 7) rektal yolla serum fizyolojik verildi. Pozitif kontrol grubunda (Grup 2) yer alan ratlara (n: 7) rektal kanül ile TNBS uygulamasından sonra tedavi verilmedi. Tedavi grubundaki (Grup 3) ratlara (n: 7) TNBS ile aynı gün başlanacak şekilde 14. güne dek nilotinib 20mg/kg, orogastrik sonda aracılığıyla, 2'ye bölünmüş dozda verildi. 14 gün boyunca günlük kilo takipleri yapıldı. Çalışma sonunda ratlar sakrifiye edildi. Kolon dokusunda makroskobik ve mikroskobik patoloji skorları, apopitotik indeks, immünohistokimyasal yöntem ile gruplar arasında PDGFR alfa ve beta skorları değerlendirildi. Doku ve serum TNF-alfa düzeyleri ELISA yöntemiyle çalışıldı.

Bulgular: Grup 1 ile Grup 3, Grup 2 ile Grup 3 ve Grup 1 ile 2 arasında 1-14.günler arasında kilo farkı açısından istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmıştır (Sırasıyla +8.3 gr ve -0.7 gr, $P=0.031$; -14.0 gr ve -0.7 gr, $P=0.047$; +8.3 gr ve -14.0 gr, $P=0.008$). Grup 1 ve Grup 3 makroskobik skorlar açısından benzerken Grup 1 ile Grup 2 ve Grup 2 ile Grup 3 arasında makroskobik skor ortalaması açısından istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı (Sırasıyla 0 ve 1.43 ± 0.65 , $P=0.014$; 1.43 ± 0.65 ve 0, $P=0.009$). Grup 1 ile Grup 2 ve Grup 2 ile Grup 3 arasında mikroskobik skor ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı (Sırasıyla 2.0 ± 0.45 ve 7.71 ± 1.48 , $P=0.034$; 7.71 ± 1.48 ve 2.86 ± 0.53 , $P=0.030$). Grup 1 ve Grup 3 mikroskobik skorlar açısından benzerdi. Grup 1 ile Grup 2 ve Grup 2 ile Grup 3 arasında PDGFR alfa skorları arasında istatistiksel anlamlı fark saptanmıştır (Sırasıyla 1.33 ± 0.21 ve 2.71 ± 0.18 , $P=0.004$; 2.71 ± 0.18 ve 1.57 ± 0.3 , $P=0.014$). Grup

1 ile Grup 2 ve Grup 2 ile Grup 3 arasında PDGFR beta skorları arasında istatistiksel anlamlı fark saptanmıştır (Sırasıyla 1.50 ± 0.22 ve 2.57 ± 0.20 , $P=0.011$; 2.57 ± 0.20 ve 1.57 ± 0.3 , $P=0.025$). Grup 1 ve Grup 3, hem PDGFR alfa hem de PDGFR beta skorları açısından benzer bulunmuştur. Grup 1 ve Grup 2 ile Grup 1 ve Grup 3 arasında doku TNF-alfa düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmıştır (Sırasıyla 0.23 ± 0.01 ve 0.39 ± 0.06 , $P=0.002$; 0.23 ± 0.01 ve 0.40 ± 0.05 , $P=0.003$). Grup 2 ve Grup 3'te doku TNF-alfa düzeyleri benzerdi. Serum TNF-alfa düzeyleri ve apoptoz açısından tüm gruplar benzerdi.

Sonuç: Nilotinib, ratlarda TNBS ile oluşturulan deneysel kolit modelinde kilo ile makroskobik ve mikroskobik patolojik skorlar üzerine anlamlı etki yapmış yani belirgin mukozal iyileşme sağlamıştır. PDGFR alfa ve PDGFR beta düzeylerinde azalmaya neden olurken apoptotik skorlar ve TNF-alfa üzerine anlamlı etkisi olmamıştır.

Anahtar Kelimeler: Nilotinib, TNBS, PDGFR, TNF alfa, rat

ABSTRACT

Effectiveness of Nilotinib in TNBS-Induced Colitis Model of Rats

Introduction and Aim: Inflammatory bowel disease (IBD) is group of disease with limited treatment alternatives which immunological, genetic and environmental factors contribute still unexplained literally. The aim of the present study was to investigate the effects of nilotinib, a tyrosine kinase inhibitor, in Trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS) induced colitis model in rats.

Method: We included 21 rats with an average weight of $209,43 \pm 8,92$ gr in the study which was provided by Dokuz Eylul University Medicine Faculty (DEUTF) Experimental Research Laboratory. Rectal saline was administered to healthy control group (Group 1) rats (n:7). No treatment was given to positive control group (Group 2) rats (n:7) after administering TNBS through rectal cannula. Nilotinib 20mg/kg in two separate doses per day were administered by orogastric catheter initiating from same day of TNBS administration to 14th day in treatment group (Group 3) rats (n:7). Their daily weights were recorded for 14 days. At the end of the study the rats were sacrificed. Macroscopic, microscopic scores, apoptotic index, PDGFR alpha and beta scores with immunohistochemical method were evaluated between groups. Tissue and serum TNF-alpha levels were detected with ELISA method.

Results: There were statistically significant differences in weights between 1st and 14th day between Group 1 and Group 3, Group 2 and Group 3 and Group 1 and Group 2 (+8.3 gr and -0.7 gr, $P=0.031$; -14.0 gr and -0.7 gr, $P=0.047$; +8.3 gr and -14.0 gr, $P=0.008$, respectively). While no significant difference for Group 1 vs. Group 3 could be determined for macroscopic pathologic scores, macroscopic scores in the Group 1 and Group 3 were significantly lower than in Group 2 (0 and 1.43 ± 0.65 , $P=0.014$; 1.43 ± 0.65 and 0, $P=0.009$, respectively). Microscopic pathologic scores in Group 1 and Group 3 were similar. There were significant differences between Group 1 and Group 2 with Group 2 and Group 3 in microscopic scores (2.0 ± 0.45 and 7.71 ± 1.48 , $P=0.034$; 7.71 ± 1.48 and 2.86 ± 0.53 , $P=0.030$, respectively). PDGFR alpha scores in Group 1 and Group 3 were significantly lower than in Group 2 (1.33 ± 0.21 and 2.71 ± 0.18 , $P=0.004$; 2.71 ± 0.18 and 1.57 ± 0.3 , $P=0.014$, respectively). Also there were significant differences between Group 1 and Group 2 with Group 2 and Group 3 in PDGFR beta scores (1.50 ± 0.22 and 2.57 ± 0.20 , $P=0.011$; 2.57 ± 0.20 and 1.57 ± 0.3 ,

$P=0.025$, respectively). Group 1 and Group 3 were found to be similar regarding both PDGFR alpha and PDGFR beta scores. The significant differences were found in tissue TNF-alpha levels between Group 1 and Group 2 with Group 1 and Group 3 (0.23 ± 0.01 and 0.39 ± 0.06 , $P=0.002$; 0.23 ± 0.01 and 0.40 ± 0.05 , $P=0.003$, respectively). Tissue TNF-alpha levels were similar in Group 2 and 3. All groups were similar in terms of serum TNF-alpha levels and apoptosis.

Conclusion: Nilotinib has significant effects on the weight change and macroscopic and microscopic pathological scores in TNBS induced colitis rat model. So, the present study showed that nilotinib induce remarkable and significant mucosal healing. Nilotinib did not have considerable effects on the level of TNF-alpha and apoptotic score; however, nilotinib decreased PDGFR alpha and beta levels.

Key Words: Nilotinib, TNBS, PDGFR, TNF alpha, rat

GİRİŞ

İnflamatuvar barsak hastalıkları (İBH)'nda edinsel ve doğal bağışıklık sisteminin patolojik yanıtıyla seyreden bir kronik barsak inflamasyonu söz konusudur. İBH'da humoral ve hücrel immünite birlikte rol oynar. Monosit ve makrofajlardan salınan IL-1 ve TNF-alfa'nın proinflamatuvar etkileri sayesinde mukozal inflamasyon ve epitelyal bariyerin hasarlanması hızlanır. Ülseratif kolit (ÜK) hastalarında, lamina propriadaki T hücreleri Fas-FasL indükte apoptozu arttırarak mukozal hasarlanmada önemli rol oynar. TNF-alfa; E-selektin, intersellüler adezyon molekülü-1 (ICAM-1) ve benzeri kemokinlerin yanında proanjiogenik growth faktörlerin vasküler endotelyal growth faktör-A (VEGF-A), platelet derived growth faktör alfa, beta (PDGF alfa,beta) sentezini arttırır. Nötrofil ve makrofajları aktive ederek B hücrelerini stimüle eder. Fetal barsaktaki stromal hücreleri aktive ederek matriks metalloproteinazları sayesinde doku hasarı oluşumunu arttırır, barsaktaki dendritik hücreleri mobilize edip granülom oluşumuna yol açar (1).

İBH patogenezinde yer alan genetik faktörler, çevresel faktörler, infeksiyöz ajanlar, enterik flora yapısı ve immün sistem disfonksiyonu İBH için geliştirilen birçok ilaç için hedef oluşturmaktadır (2, 3). Tedavide oral/rektal 5-aminosalisilatlar (5-ASA), steroidler, tiopürinler, takrolimus, siklosporin gibi ilaçlar kullanılabilir (4). Medikal tedaviye yanıtızsızlık İBH'nda hala önemli bir sorundur. Yapılan çalışmalarda ÜK hastalarında remisyon oranları; rektal 5-ASA ile %47-81, oral 5-ASA ile %9-30, tiopürinler ile %42-82 olarak bildirilmektedir (5, 6,7).

Günümüzde özellikle dirençli ve şiddetli seyreden vakalarda monoklonal tümör nekroz faktör alfa (TNF-alfa) inhibitörleri en seçkin tedavi seçeneğidir. Önceleri küçük pilot çalışmalarda dirençli ÜK hastalarında hayal kırıklığı yaratsa da, plasebo kontrollü çalışmalarda TNF-alfa inhibitörü olan infliximabın klinik yanıtın sağlanması ve korunmasında, remisyon ve mukozal iyileşmede etkinliği kanıtlanmıştır. Fakat infliximaba karşı direnç veya infliximab tedavisine yanıtın zaman içinde azalması hala önemli bir sorun olarak devam etmektedir (1). İnfliximab ile ortalama %33 klinik remisyon elde edilebilmektedir. Diğer bir anti-TNF ajanı olan adalimumab ile yapılan randomize plasebo kontrollü bir çalışmada 52. haftada steroidden bağımsız remisyon oranları plasebo ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (Sırasıyla %13.3 ve %5.7, $P=0.035$) (8). İBH tedavisinde mukozal iyileşme tedavinin mihenk taşı kabul edilmektedir. Kortikosteroid tedavisi

ile yaklaşık %30, anti-TNF tedaviler ile ancak hastaların %60 mukozal iyileşme elde edilebilmektedir (9, 10, 11). İBH hastalarının yaklaşık %20'si Anti-TNF tedaviye cevap vermemekte ve cerrahi tedavi gereksinimi göstermektedir (12). Görüldüğü gibi İBH'na sahip hastaların azımsanmayacak bir grubunda mevcut medikal tedavi seçenekleri yetersiz kalmaktadır.

Tirozin kinazlar normal hücre fonksiyonunda, metabolizmasında, büyümede, farklılaşmada ve apoptoziste rol oynarlar; tirozin kinaz inhibitörlerinin en bilinen üyesi imatinibtir. İmatinib; Abelson protoonkogen (Abl), c-kit, platelet derived growth faktör reseptörü (PDGFR) ve makrofaj koloni stimüle edici faktör reseptörü (c-fms), indükte edilebilen nitrik oksit sentetaz (iNOS), TNF-alfa gibi birçok reseptör tirozin kinazı inhibe eder (13). Nilotinib imatinibten daha potent bir tirozin kinaz inhibitörüdür. Akciğer fibrosisinde IL-6, IL-1beta, TNF-alfa, Tümör Growth Faktör beta1 (TGFbeta1), PDGFR-beta düzeylerini imatinibe göre anlamlı olarak azalttığı ve potent antifibrotik etkisi olduğu gösterilmiştir (14).

Literatürde, tirozin kinaz inhibitörlerinin İBH'nda etkili olabileceğini düşündüren az sayıda yayın mevcuttur. Magro ve Costa 2006'da yayınladıkları vaka takdiminde Crohn hastalığı olan ve Kronik Myeloid Lösemi (KML) tanısı konmuş bir hastanın imatinib ile tedavisi sırasında 3 yıl mesalamin ve steroid tedavilerini kullanmadan remisyonda kaldığını bildirmiştir (15). Cuzzocrea ve arkadaşları 2,4,6-trinitrobenzen sulfonik asit (TNBS) ile oluşturulan kolit modelinde tyrphostin AG 126 isimli tirozin kinaz inhibitörünü kullanarak kolit gelişiminin azaldığını göstermiştir (16).

Görüldüğü gibi tirozin kinaz inhibitörleri, İBH patogenezinde yer alan TNF-alfa, PDGFR ve NO gibi birden fazla yolak üzerine etkilidir. Buradan yola çıkarak tirozin kinaz inhibitörlerinin İBH tedavisinde de etkili olabileceği hipotezi oluşturulmuş ve bu çalışma planlanmıştır. Bu amaçla TNBS ile kolit oluşturulmuş ratlarda bir tirozin kinaz inhibitörü olan nilotinibin; kilo, patolojik skorlar, sitokin düzeyleri, PDGFR düzeyleri ve apoptotik indeks üzerine etkileri araştırılmıştır. Bu çalışma, rat kolit modelinde nilotinibin etkinliğinin araştırıldığı ilk çalışmadır.

GENEL BİLGİLER

EPİDEMİYOLOJİ

İnflamatuvar barsak hastalıkları (İBH), nedeni halen tam olarak aydınlatılamamış, immünolojik, genetik ve çevresel faktörlerin rol oynadığı multifaktöriyel bir hastalık grubudur (17). “İdiopatik kolit” kavramı ilk olarak 1859 yılında Samuel Wilks tarafından basiller dizanteriden farklı bir antite olarak tanımlanmıştır. 1909 yılında Hawkins, hastalığın kronik ve relapslarla seyreden kanamalı sürecini göstermiştir (18). İnflamatuvar barsak hastalıkları Crohn hastalığı (CH), Ülseratif kolit (ÜK) ve sınırlandırılmayan kolit olmak üzere üç alt grupta incelenir (17).

Genel olarak Kuzey Amerika, Avrupa’nın kuzeyi ve Avusturalya’da sık görülür. Kuzey Amerika’da insidansı her 100,000 kişide 6 ile 15.6 arasındadır. Prevalansı 38-246/100.000 kişidir. Asya, Afrika ve Latin Amerika’daki insidans 0.6-6/100.000 olarak saptanmıştır (19). Ülseratif kolit insidansı yahudilerde diğer etnik gruplardan sık olarak görülmektedir (20). Ülseratif kolit her yaşta görülebilir fakat 5 yaş öncesi ve 75 yaş sonrası sık olarak saptanmaz. En fazla ikinci ve üçüncü dekada görülür. Yapılan tüm çalışmalarda kadın ve erkek oranı yaklaşık 1:1 olarak gösterilmiştir. Ülseratif kolit sosyoekonomik düzeyi yüksek gelişmiş ülkelerde daha sık görülür (21). İBH gelişmiş ülkelere genetik, çevresel yatkınlıklar ve barsak florasındaki farklılıklar nedeniyle daha sık görülmektedir (17).

2009 yılında Türkiye’de yapılan 12 merkezin katıldığı çalışmada 661 ÜK ve 216 CH tanımlanmıştır. ÜK insidansı 4.4/100.000, CH insidansı ise 2.2 olarak gösterilmiştir. Bu sıklıklar gelişmiş ülkelere göre düşük saptansa da Asya’dan yüksektir. İBH’ları en sık 20-40 yaş arası erkek hasta grubunda gözlenmektedir (22).

KLİNİK

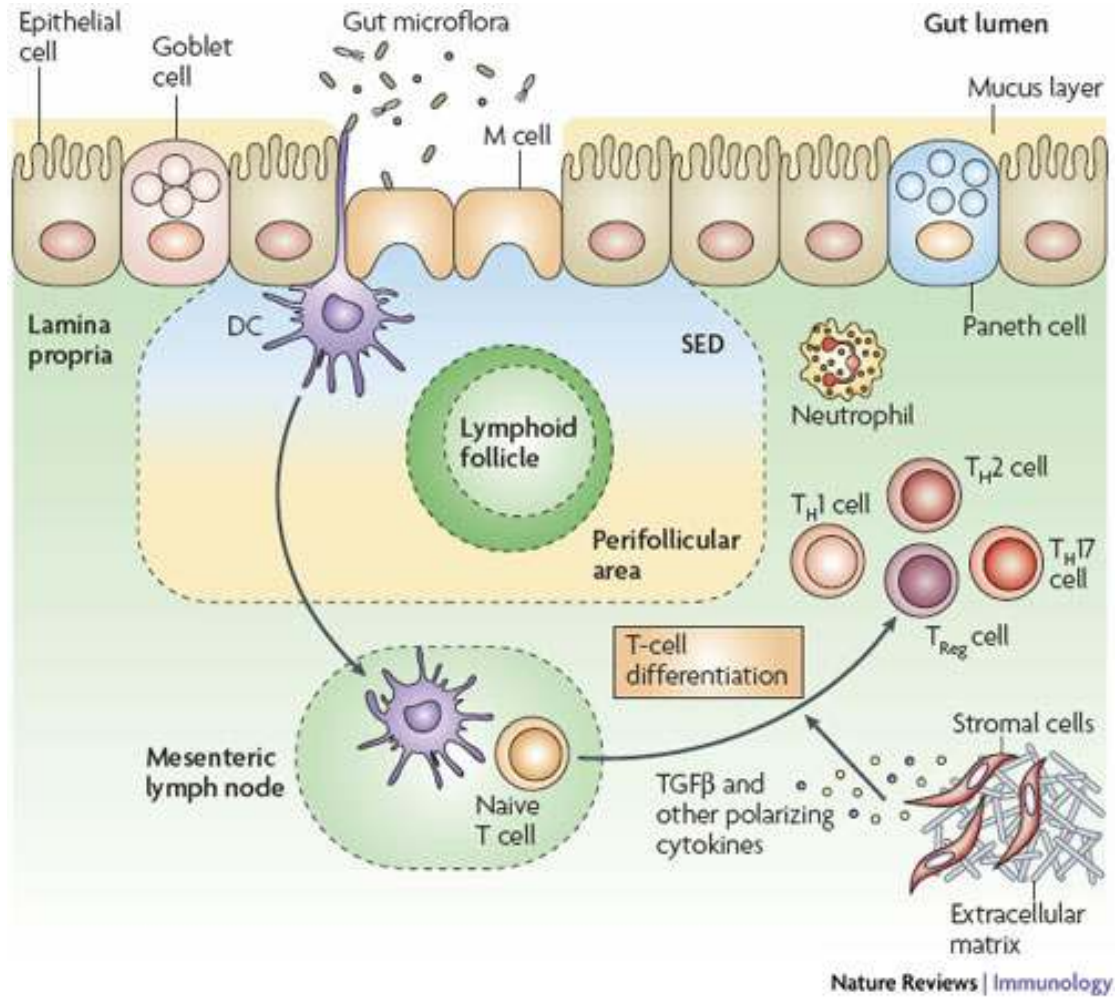
CH ve ÜK rektal kanama, ciddi diyare, abdominal ağrı, ateş ve kilo kaybıyla seyrederler. CH ince ve kalın barsakta görülürken ÜK kalın barsağı tutar. Histolojik incelemede CH’da granümatöz inflamasyonda aktif lökositler özellikle

polimorfonükleer lökositler, lenfositler ve monositler saptanır. İnflamatuvar infiltratla beraber transmural hasar, azalmış goblet hücreleri, azalmış mukus sekresyonu, kript hücre hiperplazisi, erozyon ve ülserler görülür (23).

Ülseratif kolit, diffüz mukozal inflamasyonla giden kolon ile sınırlı kronik bir hastalıktır. Hastaların %95'inde rektum tutulumu vardır. Kesintisiz, simetrik, dairesel şekilde kalın barsak tutulumu yapar. En belirgin semptom kanlı diyaredir, çoğu zaman acil dışkılama hissi veya tenezm ile birliktelik gösterir. Klinik atak ve remisyonlarla seyreder. ÜK tanısı proktosigmoidoskopi veya kolonoskopi ile desteklenen biyopsi ve gaytada infeksiyon nedenlerin dışlanması ile konur. Rutin klinik kullanımda olan genetik veya serolojik marker bulunmamaktadır. Kolon biyopsisinde histolojik olarak tipik bazal plazmasitoz, transmural lamina propria hücre artışı ve yaygın mukoza veya kript distorsiyonu görülür (4). ÜK'te mukoza düzensizleşerek kriptler atrofiye uğrar; lamina propriada ve kript epitelinde nötrofiller, lenfositler ve kript tabanlarında lenfositlerde artış, muskularis mukozaya ulaşamayan kısa kriptler ve bazal lenfosit agregatları görülür (24). Lamina propriada veya kriptlerin altında eosinofil artışının diagnostik özelliği gösterilmiştir. Bazal plazma hücrelerindeki artış hastalığın erken evresinde yüksek prediktif değere sahiptir (4). Villöz mukozal yapıda ve paneth hücrelerinde metaplazi en sık görülen histolojik özelliklerdir. Kript abselerinin mutlaka bulunması gerekmez fakat inflamasyonun tipik göstergeleridir. “Backwash ileit” endoskospide orta derece ileum inflamasyonunu tanımlar ve genelde çekal inflamasyonun eşlik ettiği orta dereceli villöz atrofi ve kript abseleri ile seyreder (24).

PATOGENEZ

İBH etyolojisi karmaşıktır. Özellikle 1950 sonrasında genetik ve immünolojik çalışmalar sayesinde hastalığın patogenezi aydınlatılmaya çalışılmıştır (25). Eldeki verilere göre bu hastalıklar, genetik yatkınlığı olan bireyde, mukozal immün sistemdeki defekt nedeniyle, luminal mikroflora ve diğer antijenlere karşı oluşan anormal immün yanıt sonucunda gelişmektedir (17). İntestinal immün sistemin temel yapısı Şekil 1'de verilmiştir.



Şekil 1. İntestinal immün sistemin temel yapısı (JudyHC. The genetics and immunopathogenesis of inflammatory bowel disease. Nature Reviews Immunology 8, 458-466)’dan alınmıştır.

İBH genetiği üzerine yapılan farklı çalışmalarda en az bir aile üyesinde ÜK insidansı %10-20 olarak tespit edilmiştir (26). ÜK’te kromozom 1, 2, 3, 5, 6, 7, 10, 12 ve 17 ile ilişkili gen çalışmaları yapılmıştır (27). Human multidrug resistance 1 (MDR1) geni, C3435T polimorfizmi ve NOD2/CARD15 haplotipi ÜK’te gösterilmiştir (28). HLA-DR2,DQ2 haplotipi yaygın kolit ile ilişkilidir. Özellikle CARD15/NOD2 haplotipi ve HLA-DR haplotipindeki polimorfizmler IL-23, IL-2 ve IL-10 sinyalinde defektler oluşturup hastalığa yatkınlık yaratır (17).

ÜK patogeneğinde kabul gören bir diğer görüş ise mukozal bariyer fonksiyonlarında defekt bulunan genetik yatkın bireylerdeki enterik bakteri, mantar veya virüslerin antijenik stimülasyonudur. İnsan gastrointestinal sisteminde 15.000 ile 36.000 arasında bakteri türü bulunmaktadır. Mikroplar intestinal inflamasyonu epitel hücrelerden invaze olarak tetikler ve proinflamatuvar sitokinlerin salgılanmasını

arttırır. İkinci bir faktör de koruyucu ve zararlı intestinal bakterilerin arasındaki dengenin bozulmasıdır. Hastalığa sahip kişideki genetik defektten kaynaklanan sorunlu mikrobiyal koruma veya bozulmuş mukozal bariyer nedeniyle bakteriler kolayca barsakta çoğalabilirler (29). Toll like reseptörler (TLR) immün cevabın başlatılmasında önemli rol oynarlar. TLR'ler patojenik mikroorganizmaların eliminasyonunda ve kronik inflamasyonun amplifikasyonunda önemlidir (30).

İBH patogenezi ile ilgili olarak çevresel faktörlerden en fazla sigara üzerine çalışmalar bulunmaktadır. Çoğu çalışmada ÜK'in sigara ile gerilediği, CH'nın ise sigara içenlerde daha sık görüldüğü gösterilmiştir. Sigaranın sellüler ve hümmoral immüniteye etkileri olduğu gösterilmiş olup kolonda mukus salgısını arttırır. Nikotin, ÜK patogenezinde temel rol oynayan T helper 2 (Th2) fonksiyonu üzerine inhibe edici etkisi bulunmaktadır (1).

Hümmoral ve sellüler immünite ÜK patogenezinde rol oynamaktadır. Barsak dokusunun histolojik incelemesinde plazma hücrelerinde artış göze çarpmaktadır. Özellikle immunoglobulin G1 (IgG1) sentezinde artış önemlidir. ÜK hastalarında lenfositlere, ribonükleik asite, düz kasa, gastrik parietal hücrelerine ve tiroide karşı otoantikorlar oluşur (19). Perinükleer antinötrofil sitoplazmik antikorlar (pANCA) ÜK'li hastaların %60-70'inde pozitifdir, spesifitesi %89, sensitivitesi %59'dur (24). Normal barsak antijenlerine karşı patolojik olarak üretilen anti-kolon, anti-musin, anti-tropomiyozin gibi antikorlar sitotoksik T lenfositleri aktifleyerek inflamasyona katkıda bulunurlar.

Makrofaj, lenfosit ve kolonik epitel hücrenin aktive olması ile çeşitli sitokinler ve mediatörler salgılanır. CD4 T hücreleri temelde 3 ana fenotipe ayrılır. T helper 1 (Th1), T helper 2 (Th2) ve yeni bulunan T helper 17 (Th17). Eskiden CH patolojisinde Th1, ÜK'te ise Th2'nin rol oynadığı düşünülürken yeni kaynaklarda ilişkilerin daha kompleks olduğu gösterilmiştir. Th1 yanıtı hücrel immünite ile ilişkili olarak interlökin-2 (IL-2), interferon-gama (IFN-gama) ve TNF-alfa sentezini arttırır. IFN-gama antijen sunucu hücreleri aktive eder ve IL-12 sentezini arttırır. IL-12 sayesinde T hücreleri Th1 hücrelerine dönüşür. Hümmoral immünitede ise Th2 uyarısıyla IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 ve IL-13 salgılanır. Th1 ve Th2 salgıları IL-10 ve TGF-beta tarafından inhibe edilir (31). ÜK'li hastalarda inflame kolon hücrelerindeki makrofajlardan IL-1beta, TNF-alfa ve IL-6 salgılanırken lamina propriadaki T hücreleri IL-2 ve IFN-gama salgılar. Bu immün yanıtı HLA-sınıf II antijeni eksprese eden kolonik epitel hücreleri CD4 lenfositleri aktive ederek katkıda bulunur (32).

İBH patogenezinde Th1 aracılıklı salgılanan proinflamatuvar sitokinler ve Th2den azalmış olarak salınan anjiostatik veya anti-anjiogenik sitokinler arasındaki denge önemlidir (33). Nilson ve arkadaşları (34) tarafından barsak epitel hücrelerinin inflamasyonda etkin rol oynadığı, umbilikal ven epitel hücrelerinden farklı olarak IL-3, IL-6, TNF-alfa ve IL-1 sentezledikleri gösterilmiştir. İBH'da, özellikle plazmada IL-6, IL-23, IL-12 ve TNF-alfa düzeylerinde artış, IL-10 düzeyinde azalma saptanmıştır.

TNF-alfa, İBH'da pleotrofik etkisi olan bir sitokindir ve üretimi çok sıkı denetim altında tutulmaktadır. En önemli kaynakları makrofajlardır ve uyarıyla karşılaştıktan 30 dk içerisinde salınır. TNF salınması IL-1, IFN-gama, IL-2 tarafından pozitif, IL-10 ve prostoglandinler tarafından negatif olarak denetlenmektedir. TNF önce hücre yüzeyine bağlı öncül form olan transmembran TNF (tmTNF) olarak salınır ve TNF alfa dönüştürücü enzim tarafından enzimatik çözünür forma (sTNF) çevrilir (35). İki form da biyolojik olarak aktiftir ve reseptör aracılığıyla etki ettiği hücrenin metabolik durumuna bağlı olarak NF-kB aktivasyonu veya apoptosisi indükler (36).

TGF-beta ise T hücrelerden salınan proliferasyon, migrasyon, farklılaşmada rol oynayan bir ajandır (17). IL-5 ve IL-13 salgılamayan NK T hücrelerinin Th2 yanıtından sorumlu olduğu çalışmalarda gösterilmiştir (36). Th17 hücreleri fibroblast, makrofaj, epitel ve endotel hücrelerini aktive eden IL-6, IL-17 gibi sitokinleri salgılayarak bu hücrelerden IL-1, IL-6, TNF-alfa ve diğer kemokinlerin sentezini artırır. Th17 hücre aktivitesi IL-6, TGF-beta, IL-21 ve IL-23 tarafından aktive edilir (37). IL-23 ile reseptör aktivitesinin çeşitli deneysel kolit modellerinde kolit başlangıcının temelini oluşturduğu gösterilmiştir (38).

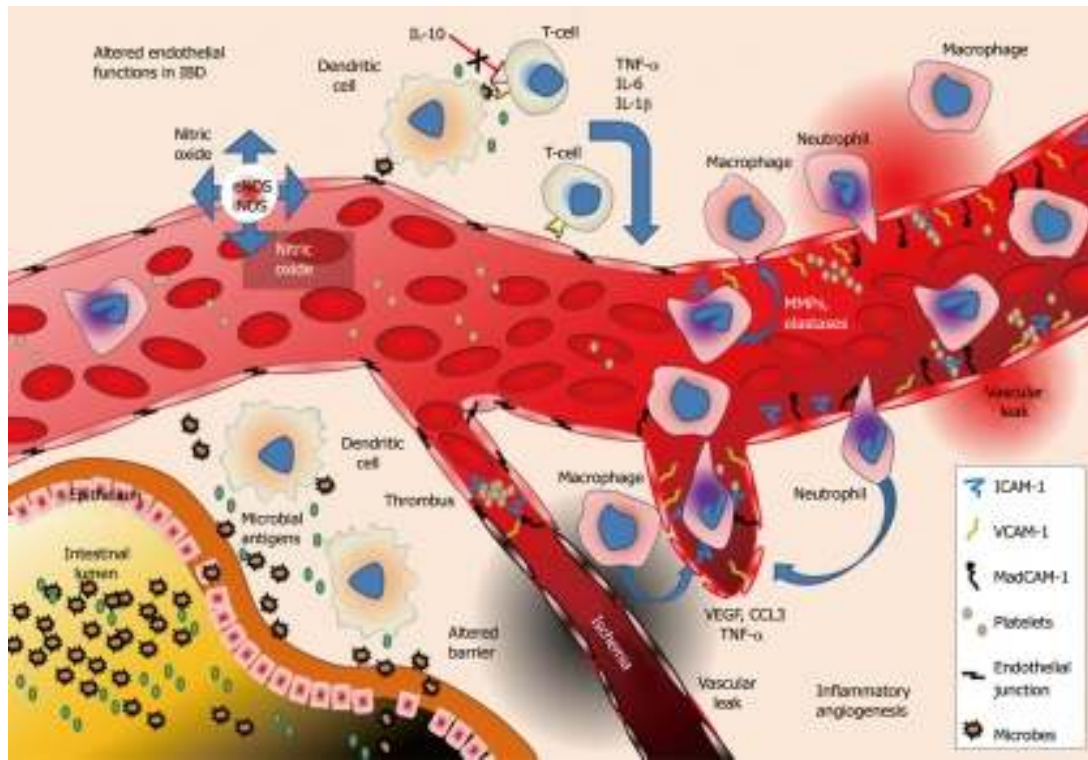
İBH patogenezinde intestinal vasküler mikrosirkülasyon inflamasyonda temel bir rol oynamaktadır (Şekil 2). İnflamasyon sırasında aktive edilmiş vasküler endotel hücreleri sızdırma, lökosit adezyonu, prokoagülan aktivite ve anjiogenezde rol oynar. Lökositlerinin inflame alana göç etmeleri gibi lenfatikler yoluyla inflame alandan ayrılamamaları da önem kazanmaktadır. Lökositlerin vasküler dolaşımdan inflame dokulara geçmelerinde sitokinlerin aktivasyonu ve mikrovasküler endotel adezyon moleküllerinin yeri önemlidir. Lökosit ekstrasvazasyonunda yuvarlanma, aktivasyon, adezyon, transmigrasyon basamakları vardır. Lökosit yüzeyindeki CCR9 kemokin reseptörü ileal endoteldeki CCL25'e bağlanır. Lökosit yüzeyindeki CD11a/CD18 intersellüler adezyon molekülü ICAM-1'e bağlanırken, alfa4beta1 veya alfa4beta7

vasküler hücre adezyonu molekülü VCAM-1 (Vasküler sellüler adezyon molekülü-1) ve mukozal addressin hücre adezyon molekülü (MAdCAM-1)'ne bağlanır (39). Deneysel kolit vakalarında ICAM-1, VCAM-1 ve PECAM-1 adezyon moleküllerinde artış saptanmıştır. MadCAM-1 barsak mukozal endotel hücrelerinde ve mezenterik lenf nodlarında bulunan deneysel kolitte artan bir adezyon molekülüdür (23). VCAM-1 ve MadCAM-1 indüksiyonu, endotel ile trombositlerin etkileşimini ve proanjiogenik büyüme faktörlerinin sentezini artırır. Trombosit ve lökosit agregasyonu ile beraber koagülasyon kaskadı tetkiklenir. Trombus endotelial yüzeyde inflamasyonu artırır (17). Adezyon moleküllerine spesifik rekombinant antikorlar İBH tedavisinde kullanılmaktadır. Örneğin; natalizumab alfa-4 integrinlere karşı olan IgG4 antikorudur. İntestinal endotel hücreleri önemli immün kostimülatör molekül olarak CD40 salgırlar ve T-hücreleri ve trombositlerin üzerindeki CD40L ile bağlanırlar. Bağlantı sonrasında intestinal inflamasyon tetkiklenir. Bu yolağın inhibe edilmesinin terapötik avantajlarını gösteren çalışmalar yapılmıştır (39).

CH ve ÜK'te intestinal mikrovasküler yapı sıkı bir anjiogenik yapıya bürünür, anjiogenik integrinler ve mediatörlerin salgısı inflame mukozada artar (40). Anjiogeneze, yetişkin dokularda önceden bulunan damarsal yapıdan yeni kapillerlerin oluşmasına neden olan büyüme, gelişme ve tamiri içeren biyolojik olay bütünüdür (41). İBH'da anjiogeneze, değişim için endotel alanını genişletip kanın ekstrasvazasyonunu artırır. Oluşan yeni damarlar normal damar yapısına göre daha immatür yapıdadır ve perisitlerle kaplı değildir. İBH'da anjiogenik mediatörlerden vasküler endotelial growth faktör (VEGF-A, C), fibroblast growth faktör (FGF), TGF-beta, platelet derived growth faktör (PDGF-alfa ve beta) düzeyleri artar (17). Scaldaferri ve ark. VEGF-A'nın İBH'daki anjiogeneze temel rolü oynadığını göstermişlerdir (42). İBH'da aktif ülser alanına komşu fibrotik alanlarda artmış PDGF-alfa ve beta aktivitesi tespit edilmiştir. PDGF potent anjiogenik mediatördür; hipoksi, trombin ve diğer sitokinlerle indüklenir. PDGF reseptörleri (PDGFR) iki subtiptir: alfa ve beta (43). PDGF perisit ve vasküler düz kas gibi mezenkimal hücreler için mitojen ve kemoaktif ajandır (23). PDGF alfa ve beta fibroblast proliferasyonu ve fibroblast ilişkili doku-matriks kontraksiyonundan sorumludur (44).

Krzystek ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada trombositlerde depo edilen ve kandaki PDGF düzeylerinde artış saptanmıştır. Fakat kanda PDGF düzeyinin aktif İBH'da C-reaktif protein (CRP), eritrosit sedimentasyon hızı (ESR) veya trombosit düzeylerinden üstünlüğü gösterilmemiştir (45). PDGF-alfa ve beta, VEGF gibi

mediatörler barsak endotel hücrelerini oksidatif strese korur. Endotel hücrelerinde P-selektin sentezini artırır ve histamin sekresyonunu etkileyip vasküler göllenmeye neden olur (17). Sandor ve ark.nın çalışmasında endostatin ve anjiostatin gibi anjiogenez inhibitörlerinin erken dönem deneysel kolit modelinde arttığı gösterilmiştir. Bu nedenle mukozal lezyonlar artmış VEGF'e rağmen yavaş iyileşmektedir (46). Danese ve ark.nın yapmış olduğu ratlarda deneysel kolit çalışmasının sonuçlarına göre antianjiogenik ajanlar yeni damar oluşumunu engelleyerek inflamasyon, doku hasarı ve mikrovasküler yapının patolojik yayılımı önlenmektedir (40).



Şekil 2. IBH patogenezi (Cromer WE, Mathis JM, Granger DN, Chaitanya GV, Alexander JS. Role of endothelium in inflammatory bowel diseases. Cromer February 7 17(5):578-593)'den alınmıştır.

Nitrik oksit (NO), organ spesifik regülatör fonksiyonu olan serbest radikaldır. NO, inflamatuvar sinyallerini, transkripsiyon faktörlerini, lökosit yuvarlanmasını ve apoptozu yönlendirir (47). Endotel kaynaklı nitrik oksit (eNO) lökosit ve trombositlerin endotele yapışmalarına engel olur, vazodilatasyon sağlar, permeabilititede önemlidir. Deneysel kolitte iki tip NO sentetaz bulunmaktadır; 1) eNOS (endotel kaynaklı nitrik oksit sentetaz) nitrik oksit kaynağıdır, 2) iNOS ise

indükte edilebilen nitrik oksit sentetazdır. eNOS, İBH'nda azalır. Bununla birlikte endotel bağımlı vazodilatasyon azalıp kontrolsüz oksidatif ürün artışı olur. İntestinal nitrik oksit sentetaz (iNOS) lökosit kaynaklıysa inflamasyonu artırırken intestinal endotel hücrelerde ise lökosit adezyonu, permeabilite ve vazodilatasyon gibi inflamatuvar yanıtları sınırlandırır (17). eNOS ve iNOS düzeyinin azalması artmış hastalık aktivitesini gösterir (23).

İnflamasyonla birlikte koagülasyon da aktiflenir. İBH'na sahip bireylerde koagülasyon anormallikleri ve tromboembolik komplikasyonlar sık görülür. Lenfatik sistemin disfonksiyonu İBH'nda önemlidir (39).

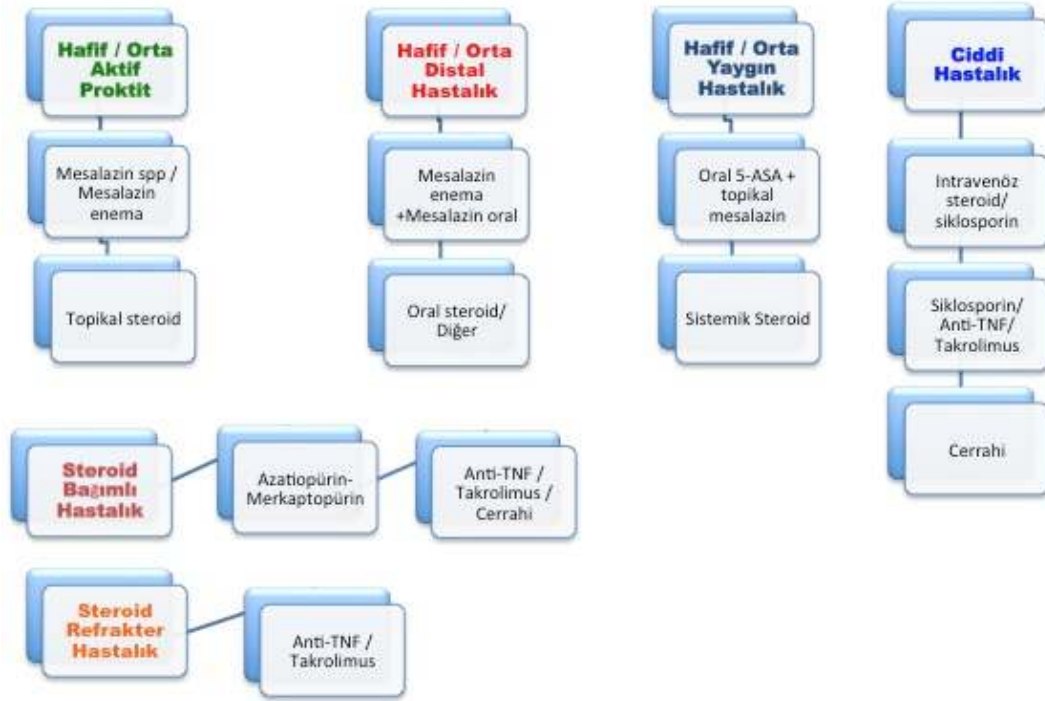
TEDAVİ

ÜK'tettedavi yaklaşımını belirlemede, endoskopik olarak hastalığın yaygınlığının (pankolit, ekstensif kolit, sol kolit vb.) yanı sıra hem endoskopik hem de klinik olarak şiddeti göz önüne alınır. Hastalığın aktivitesi Montreal klasifikasyonuna göre remisyon, hafif, orta, şiddetli olarak sınıflandırılır (48). Bazı ekstraintestinal tutulumlar kolitin aktivitesiyle ilişkilidir; oküler komplikasyonlar (episklerit, sklerit, üveit), küçük ve büyük eklemleri tutan periferik artropatiler, eritema nodozum, pyoderma gangrenosum bunlardandır. Diğer ekstraintestinal tutulumlar hastalık ciddiyetiyle ilişkili değildir ki bunlar; aksiyel artropatiler, sakroileit ve ankilozan spondilit ve primer sklerozan kolanjitir. Tedaviye yanıtızsızlık primer yanıtızsızlık ve primer yanıt alınanlarda yanıtın kaybı şeklinde sınıflandırılır. Primer yanıtızsızlık 4 ile 8 hafta arasında verilen tedaviye rağmen semptomların gerilememesi ve endoskopik iyileşmenin olmamasıdır (49). Remisyon ise steroidsiz dönemde günde 3 ve 3'ten az kan içermeyen dışkılama ile endoskopide normal mukozanın gözlenmesi olarak tanımlanır (50).

Hafif ve orta aktif proktit tedavisinde başlangıç tedavisi olarak mesalazin suppozituar önerilir (Şekil 3). Mesalazin enema alternatif olabilir. Topikal steroid dirençli hastalarda tedaviye eklenebilir. Hafif ve orta distal hastalığı bulunanlarda aminosalisilat enema ile oral mesalazin kombine edilir. Topikal mesalazin topikal steroidlere göre tedavide üstündür (48). ASCEND II çalışmasında 268 orta derecede aktif hastalığı olanlarda mesalazin 4.8g verilenlerde yanıt oranı %71.8 iken 2.4g verilenlerde ise %59.2 olarak belirlenmiş; remisyon oranları yüksek tedavi dozunda

%20.2 iken düşük tedavi dozunda %17.7 olarak saptanmıştır (51). Eğer bu tedavilerin maksimal dozlarına yanıtızsızlık söz konusu ise veya sistemik bir hastalık tutulumu mevcutsa oral steroid ve diğer immünsüpresif tedaviler verilebilir. Hafif ve orta aktivitedeki yaygın ÜK'te tedaviye oral 5-ASA ve topikal mesalazin ile başlanır (48). Kombine oral ve rektal mesalazinle klinik remisyon oranları 8.haftada %64, oral mesalazin tek başına kullanıldığında ise %43'tür ($P=0.03$) (52). Mesalazine yanıtızsız hastalıkta sistemik kortikosteroid kullanılabilir. Ciddi kolitte intravenöz kortikosteroid tedavi ile başlanır. Steroid kontrendike olan hastada siklosporin verilebilir. İntravenöz steroid yanıtı tedavinin üçüncü gününde değerlendirilir. İkinci kuşak tedavide siklosporin, anti-TNF ajanlar veya takrolimus verilebilir. Tedaviye 4-7 gün yanıt vermeyen hastalarda kolektomi önerilebilir (48). CYSIF çalışmasında steroid refrakter ciddi kolit hastasında siklosporin ve infliksimab karşılaştırıldığında iki gruptan da yaklaşık %85 hasta tedavinin 7. gününde yanıt vermiştir. Fakat primer sonlanım noktası olan 98. günde tedavinin başarısızlığı siklosporin grubunda %60 iken infliximab grubunda %54 ($P=0.49$), kolektomi sıklığı ise sırasıyla %18 ve %21 ($P=0.66$) olarak saptanmıştır (53).

Steroid-bağımlı hastalıkta azatiopürin-merkaptopürin, steroid refrakter aktif hastalıkta anti-TNF ajanlar ve takrolimus kullanılabilir. Tiopürin refrakter hastalıkta anti-TNF ajanlar, takrolimus ve cerrahi alternatif olabilir (48). Genç yaşta tanı konup cerrahiye ihtiyaç duyulan, fistülizan-stenozan tip, ağır endoskopik bulguları bulunan, ASCA/p-ANCA pozitifliği ile NOD2/IBD5 mutasyonu olan hastalarda hastalık seyri kötü olacağı öngörüldüğünden erken anti-TNF tedavinin doğal seyri değiştirilebileceğine dair çalışmalar mevcuttur (54).



Şekil 3. Ülseratif kolit başlangıç tedavi algoritmi.(Dignass A, Lindsay JO, Sturm A.Second European evidence-based Consensus on the diagnosis and management of ulcerative colitis: Current management. Journal of Crohns and Colitis 2012'den uyarlanmıştır)

ÜK'te idame tedavide oral 5-ASA, distal hastalıkta rektal 5-ASA önerilir. 5-ASA optimal doz tedavisi altındayken relaps gelişen hafif ve orta aktiviteli hastalıkta, 5-ASA intoleran olanlarda, steroid bağımlı hastalıkta ve indüksiyon remisyon tedavisinde siklosporin veya takrolimusa yanıt alınan hastalarda azatiopürin tedavisi önerilir. Şiddetli kolit tedavisinde intravenöz steroidler, siklosporin, infliximab, azatiopürin kullanılabilir (48). 115 steroid tedavisine dirençli ÜK hastası üzerinde yapılan karşılaştırmalı randomize kontrollü çalışmada siklosporin, infliximab'a göre tedavide daha etkin bulunmamıştır (53).

Medikal tedavinin kullanımının yaygınlaşmasına rağmen kurtarıcı tedavi cerrahidir. Kolektomi sonrası görülen problemlerden bazıları; fekal inkontinans, poşit, stenoz ve anastamoz ülseridir. Günümüzde ÜK hastalarında medikal tedavilerin kullanılmasıyla cerrahi oranları %30-70'lerden %10-20'lere gerilemiştir (55). Hastalarda kesin cerrahi endikasyonları; durdurulamayan kanama, perforasyon ve

karsinom varlığıdır. Konvensiyonel tedavilere yanıtız toksik megakolonda da cerrahi tedaviye gidilebilir (24). Medikal tedavi yanıtızlığında veya 6 hafta süreyle 20 mg prednol tedavisine yanıtızlıkta cerrahi akla getirilmelidir (48).

YENİ TEDAVİLER

Biyolojik tedaviler İBH'da yeni nesil tedavi yöntemini oluşturmaktadır. Bu tedaviler başlıca doğal biyolojik preperatlar (aşı, kan ürünleri vs.), rekombinan peptit veya proteinler, antikor bazlı tedavi, nükleik asid bazlı tedavi, hücre ve gen tedavileridir. CD40 ligand antikorı, anti CD4 antikorları, anti CD3 antikorları, rekombinant IL-10 ve IL-11, anti IL-6 reseptörü antikorı, anti IL-2 reseptörü antikorı, anti-IFN-gama antikorı, adezyon molekül inhibitörleri, MLN-02-alfa4b7 integrin antagonisti, CTLA4-Ig kostimulatör reseptör inhibitörü, Janus kinaz inhibitörleri İBH'da üzerinde çalışma yapılmış moleküllerdir (1,4).

Tüm biyolojik ajanlar arasında en iyi etki TNF-alfa monoklonal antikorları ile elde edilmiştir. İnfliximab ve adalimumab bivalent IgG monoklonal antikorlarıdır ve iki farklı sTNF trimerini aynı anda bağlayıp multimerik kompleksler oluşturur. Anti TNF etki ile hücre aktivasyonu, sitokin baskılanması ve apoptozis ortaya çıkmaktadır (35). Bir çalışmada CH sahip hastalarda anti-TNF ilaçlardan olan infliximabın tedaviden 24 saat sonra lamina propriadaki T lenfositlerin apoptozunu arttırdığı gösterilmiştir (56). Ford ve ark. yayınladığı metaanalizde yer alan 5 randomize kontrollü çalışmada aktif ve 5-ASA/steroid tedavisine dirençli ÜK hastalarına 6 ile 12 hafta süresince 5 mg/kg'dan 20 mg/kg'a kadar değişik dozlarda infliximab verilir plasebo ile karşılaştırılmıştır. Toplam 827 hastanın dahil edildiği çalışmada, remisyona ulaşmadaki başarısızlığın relatif riski 0.72 (%95 CI, 0.57-0.91) olarak bulunmuş ve infliximabın plasebodan daha etkin olduğu gösterilmiştir (57). İnfliximabın plaseboyla karşılaştırıldığı en önemli çalışmalar ACT 1 ve ACT 2 çalışmalarıdır. ACT 1 çalışmasına 364 hasta alınmış, infliximab 5mg/kg, infliximab 10mg/kg ve plasebo grupları arasında 8. hafta yanıt ve remisyon oranları sırasıyla %69.4/%38.8, %61.5/%32.0 ve %32.2/%14.9 olarak saptanmıştır (58). ACT 2 çalışmasına 5-ASA dirençli hastalar da katıldığında 8. hafta yanıt ve remisyon oranları sırasıyla %64.5/%33.9, %69.2/%27.5,%29.3/%5.7 olarak bulunmuştur (11). Günümüzde FDA (US Food and Drug Administration) tarafından erişkin ve çocuk

ülseratif kolit tedavisinde önerilen tek anti TNF ajan infliximab olmakla birlikte diğer hedefe yönelik biyolojik ajanlar arasında kanıta dayalı karşılaştırmalı çalışma bulunmamaktadır (59). Rutgeerts ve ark. çalışmasında infliximab klinik remisyon oranı 30. haftada %33 olarak bildirilmiştir (58). Adalimumab ile yapılan randomize plasebo kontrollü çalışmalarda 52. haftada steroidden bağımsız remisyon oranları plasebo ile karşılaştırıldığında (sırasıyla %13.3 ve %5.7, $P=0.035$) istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (8). Adalimumab 2012’de Avrupa’da orta ve ciddi hastalıkta kullanılmak üzere lisans almıştır. Primer yanıtı ve tedaviye direnç gelişimi sık görüldüğünden ÜK hastalarında uzun süreli remisyonu sağlayacak yeni ajanlara gereksinim vardır.

TİROZİN KİNAZ İNHİBİTÖRLERİ

1992’de Sakanoue ve ark. tarafından ÜK hastalarında kolonik mukozada artmış tirozin kinaz aktivitesi tespit edilmiştir (60). Tirozin kinazlar normal hücre fonksiyonunda, metabolizmasında, büyümede, diferansiyasyonda ve apoptoziste rol oynar. Tirozin kinazlar bulundukları yere göre başlıca iki gruba ayrılırlar:

- 1) Membran reseptörü olarak intrasellüler sinyalizasyonda görev alanlar,
- 2) Reseptör olmayanlar ve sitoplazmada aktive olduktan sonra sinyalizasyonda görev alanlar.

Tirozin kinaz aktivitesinin patolojik olarak aktivasyonu karsinogenez, vasküler remodeling ve fibrojenizde rol oynar (21). Tirozin kinaz inhibisyonu ile kolonda proinflatuar sitokinler olan TNF-alfa ve IL-1beta sentezi ile COX-2 ve iNOS aktivitesi azalmaktadır (44).

İmatinib birçok reseptör tirozin kinazı inhibe eder: Abelson protoonkogen (Abl), c-kit, PDGFR ve makrofaj koloni stimüle edici faktör reseptörü (c-fms). İmatinibin tedavide kullanıldığı hastalıklar, kronik myeloid lösemi (KML), gastrointestinal stromal tumor (GİST), kronik miyelomonositik lösemi (CMML) ve pigment villonodüler sinovittir. KML, DNA’nın yapısında t(9,22) sonucu oluşan Abelson-füzyon geni BCR-ABL’nin rol oynadığı primitif pluripotent hemapoeitik kök hücrenin aşırı proliferasyonu ile seyreden bir hastalıktır. Bu onkogen şimerik tirozin kinaz ile bağlantılı BCR-ABL1 proteinini kodlar. İmatinib BCR-ABL 1 kinaz inhibitörüdür (13). Tirozin kinaz inhibisyonu sayesinde lösemik hücrelerin apoptozu

tetiklenir (61). Öncelikle Bcr-Abl pozitif KML tedavisinde kullanılmaya başlanmış olup PDGFR ve c-kit inhibe edici özelliklerinden dolayı GIST'de etkinliği gösterilmiştir.

Yapılan diğer çalışmalarda imatinibin romatoid artritli hastalarda sinovyal sıvıdaki TNF-alfa düzeyini azalttıkları ve makrofajlardan c-fms salınımını azalttıkları gösterilmiştir (62). İmatinib mast hücrelerin gelişiminde önemli rol oynayan c-kit tirozin kinaz aktivitesini inhibe ederek immün yanıt üzerine olan etkileri sayesinde agresif sistemik mastositoz tedavisindeki etkinliği kanıtlanmıştır (63). İmatinib, fibroblast proliferasyonunu ve fibroblast ilişkili doku-matriks kontraksiyonundan sorumlu PDGFR sinyalini inhibe ederek fibrogenesi baskılar. Bu etkisinden yararlanılarak bleomisin veya radyasyon ile indükte pulmoner fibrosis vakalarında profibrogenik aktiviteyi engellediği gösterilmiştir (44). İmatinib sistemik sklerozisde iki ana profibrotik yolu daha inhibe eder ve ekstrasellüler matriks yapımı ve fibroblast kontraktilitesini azaltır (21).

Nilotinib, imatinib-dirençli veya imatinib-intoleran KML hastalarına daha potent ve selektif BCR-ABL1 inhibitörü olarak üretilmiştir. Nilotinibin protein kinazlar üzerine etkisi imatinib ile benzerdir ayrıca yan etki profile daha azdır, iyi tolere edilir. Nilotinib ve imatinib c-KIT, koloni stimüle edici faktör (CSF-1R), PDGFR subtipleri üzerine aynı güçte inhibitör etki gösterirler. İmatinib ve nitotinib aynı zamanda ekstrasellüler matriks sinyalleşmesinde rol oynayan kollajen-aktive, diskoidin reseptör kinaz (DDR-1 ve 2)'yi inhibe eder fakat bunun terapötik anlamı henüz bulunamamıştır (13).

Nilotinib ile yapılan çalışmalar genelde fibrosis üzerinedir. Farelerde bleomisin ile ilişkili akciğer fibrosisinde nilotinibin IL-6, IL-1beta, TNF-alfa, TGF-beta1 ve PDGFR-beta düzeylerini imatinibe göre anlamlı olarak azaltarak daha potent bir antifibrotik etkisinin olduğunu göstermiştir (14). Nilotinib aynı zamanda hepatik fibrosis tedavisinde imatinibten etkin bulunmuştur (64). Nilotinib karaciğer fibrosisi üzerine etkisinin araştırıldığı bir diğer çalışmada ratlara 12 hafta boyunca verilmiştir ve etkin bulunmuştur (65). Yine ratlarda geliştirilmiş kronik böbrek hastalığında progresyonun engellenmesinde nilotinib 8 hafta kullanılmıştır ve etkin bulunmuştur (66). Mast hücre ilişkili anafilakside nilotinibin proinflamatuvar sitokin olan TNF-alfa düzeyini azalttığı gösterilmiştir (67).

GEREÇ VE YÖNTEM

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi (DEÜTF) Hastanesi Deneysel Araştırma Laboratuvarından 21 adet, ortalama ağırlığı $209,43 \pm 8,92$ gr (aralık 193-222 gr.) olan dişi Wistar Albino rat, DEÜTF Hayvan Çalışmaları Etik Komitesi'nden onay alındıktan sonra çalışmaya alınmıştır. Literatürde, TNBS ile oluşturulan deneysel kolit modellerinde en çok tercih edilen hayvan cinsi rat olduğundan ve kliniğimizde uygulanan birkaç çalışmada da aynı yöntemle deneysel kolit modeli başarı ile oluşturulduğundan denek hayvanı olarak rat seçilmiştir.

1989 yılında Morris ve arkadaşlarının ratlar üzerinde biokimyasal inflamatuvar yolların ve antijen spesifik çalışmaların gösterilebileceği TNBS modelini geliştirmiştir (23). 1995'te Neurath ve arkadaşları tarafından TNBS'nin rektumdan uygulamasında IL-12'nin başrolde olduğu Th1 yanıt ile ilişkili transmurale infiltrasyon gösterilmiştir. TNBS deneysel kolit modelinde hapten olarak 2,4,6-trinitrobenzen sulfonik asit (TNBS) (5-30mg) 0.25ml %50 etanol içerisinde çözündürülmüştür. Etanol mukozada bariyer kırıcı rolü üstlenerek mukoza ile TNBS temasını artırır (68).

TNBS'nin ratlara uygulaması sonrasında mikroskopik olarak ratlarda ülserasyonlar ve mukozal-submukozal inflamatuvar hücre infiltrasyonu saptanır. Modelde mukoza/submukoza ve muskularis eksterna tabakasında oksidatif stres, sitokinler ve kemokinler ile indüklenir. Muskularis eksterna tabakasında IGF-1 ve TGF-beta düzeyinde artış olur. Mezenterik adipoz dokuda TNF-alfa ve IL-10 salgılanır (47). Histolojik olarak inflamatuvar cevap mukozal ve submukozal infiltrasyonu polimorfonükleer lökositler, makrofajlar, lenfositler, konnektif doku mast hücreleri ve fibroblastlarla gösterilir.

TNBS ile oluşturulan kolit modeli yıllardır kullanılmaktadır ve ratların tümünde kolit oluşumu sağlamaktadır. Bu nedenle TNBS uygulaması sonrasında kolit oluştuğunu ispatlamak için herhangi bir test uygulamasına gerek duyulmamaktadır ve TNBS koliti ile ilgili çalışmaların hiçbirinde böyle bir uygulama bulunmamaktadır. Daha önce kliniğimizce gerçekleştirilmiş başka bir çalışmada da ratların tümünde kolit oluştuğu çalışma sonunda gözlenmiştir.

Ratlar, DEÜTF Deney Hayvanları Laboratuvarında, 23 ± 2 °C ısıda, ışık-karanlık siklusunda ve deney sonuna kadar 3-4 sıçan bir kafeste olacak şekilde

tutulmuşlardır. Çalışma öncesi ve çalışma boyunca standart rat diyeti ile beslenip ve her gün tartılarak ağırlık yönünden izlenmişlerdir. Ratların istedikleri kadar su içmelerine izin verilmiştir.

TNBS verildikten sonra ratlarda barsakta oluşan ülserasyonlar sonucunda perforasyonlar, jeneralize peritonit ve exitus gelişebilmektedir. Bu durumda deney hayvanı çalışma dışı bırakılmıştır. Yine TNBS uygulamasına bağlı ratlarda gelişen GIS kanamaları, dışlama nedeni olarak sayılmamıştır.

Ratlar 3 gruba ayrılmıştır. Bu grupların her birine 7'şer rat dahil edilmiştir. Bu denek sayısı, sonuçları değerlendirmede kullanılacak nonparametrik istatistiksel yöntemlerin uygulanabilirliği ve doğruluğu açısından gereklidir. Sağlıklı kontrol grubunda yer alan (Grup 1) ratlara (n: 7) eter anestezisi altında rektal kanül yoluyla serum fizyolojik verildi. Pozitif kontrol grubu (Grup 2) ratlara (n: 7), kolit oluşturma amacıyla 0,25 ml'sinde 30 mg (80 mg/kg) TNBS (trinitrobenzen sülfonik asid) (Sigma,Germany) bulunan TNBS + %30 etanol karışımının 0,25 ml'si rektal yoldan 8 cm kanül ile verildi. TNBS uygulamasından sonra tedavi verilmedi. Her iki gruba rektal uygulamadan sonra 14.güne dek plasebo serum fizyolojik orogastrik tüp yolu ile verildi. Diğer gruba (Grup 3, n: 7) TNBS ile aynı gün başlanacak şekilde 14. güne dek nilotinib 20mg/kg(Novartis Pharma AG, Basle, Switzerland), ikiye bölünmüş dozlarda oragastrik tüp yolu ile verildi.

Tablo 1. Çalışma Grupları

Grup	Sayı	Rektal Uygulama (1. gün)	Orogastrik Uygulama (1-14. günler)
Grup 1	7	Serum Fizyolojik	Serum Fizyolojik
Grup 2	7	TNBS	Serum Fizyolojik
Grup 3	7	TNBS	Nilotinib

Ratlardan, 14 günlük süre bitiminde eter anestezisi altında kan ve patolojik inceleme için doku örnekleri alındı ve ardından dekapitasyon yapıldı. Abdominal kavite orta hat kesisi ile açıldı, distal ileumdan rektuma dek kalın barsak çıkarıldı.

Barsak lümeni serum fizyolojik ile yıkandı ve ardından çıkartılan ve lümen boyunca açılan barsak materyali tamponlu formol ile fikse edildi.

Patolojik İnceleme:

Patolojik değerlendirme patolog tarafından, barsak örneğinin hangi gruba ait olduğu bilinmeksizin kör olarak yapıldı. Barsak mukozasında makroskopik olarak izlenen ülserlerin sayısı ve boyutu belirtildi. Ardından gros ülseratif lezyonlardan, çevredeki normal mukozayı da kapsayacak şekilde doku kesitleri alındı. Bunların dışında, kolon longitudinal açıldıktan sonra, Vilaseca ve ark. tarafından bildirilen yöntemle göre makroskopik skorlama yapıldı (69) (Şekil 4).

Makroskopik Skor		
Adezyon	Yok	0
	Minimal	1
	Birkaç kolon segmentinde	2
Striktür	Yok	0
	Hafif	2
	Ciddi, proksimal dilatasyon	3
Ülser	Yok	0
	Lineer ülser < 1cm	1
	İki lineer ülser < 1cm	2
	Birçok ülser veya bir geniş ülser > 1cm	3
Duvar kalınlığı	1 mm'den az	0
	1-3 mm	1
	3mm'den fazla	2
Maksimum skor		10

Şekil 4. Patolojik olarak makroskopik skarlama sistemi (Vilaseca J, Salas A, Guarner F, Rodriguez, Martinez M, J-R Malagelada. Dietary fish oil reduces progression of chronic inflammatory lesions in a rat model of granulomatous colitis. Gut, 1990, 31, 529-544'den uyarlanmıştır)

Örneklerden Dieleman ve ark'nın mikroskopik skollama yönteminden yararlanılarak hematoksilin-eosin (HE) boyasıyla boyanan preperatlardan patolog tarafından mikroskopik skollama yapıldı (Şekil 5) (70).

Mikroskopik Skollama		
İnflamasyon yaygınlığı	Yok	0
	Mukozada	1
	Mukoza ve Submukozada	2
	Transmural	3
İnflamasyon şiddeti	Yok	0
	Hafif	1
	Orta	2
	Şiddetli	3
Kript hasarı	Yok	0
	1/3 hasar	1
	2/3 hasar	2
	Kript kaybı var, yüzey epiteli sağlam	3
	Kript ve yüzeyel epitel kaybı	4

Şekil 5. Patolojik olarak mikroskopik skollama sistemi.(Dieleman LA, Palmen JHJ, Akol H et al. Chronic experimental colitis induced by dextran sulphate sodium (DSS) is characterized by Th1 and Th2 cytokines. Clin Exp Immunol 1998;114:385-391'den uyarlanmıştır)

Apopitoz:

Patolog tarafından TUNEL tekniğı ile boyanan örneklerde mikroskopta (Olympus DX51) 10 büyük büyütmede (x400) mukozada ve yüzey kript epitelindeki

apoptotik hücreler sayıldı. TUNEL tekniğinde, lizinli lama alınan kesitler 3 gece 37°C, 1 gece 60°C etüvde tutuldu. Kesitler etüvlendikten sonra, 3 değişim ksilen ile (20şer dk) deparafinizasyon işlemi gerçekleştirildi (ilk ksilen etüvde, diğerleri oda ısısında). Ardından azalan derecede alkol serileri ile (absolu, %96, %80, %70 çalkalama) rehidratasyon sağlanarak distile suda 5 dakika bekletildi. Dokuya zarar vermeden kesit etrafı kurulanıp pappenile çevreleri sınırlandı. Fazla su kesit kenarından alındıktan sonra Proteinaz K (Invitrogen Proteinaz K, USA) 10 dk oda ısısında uygulandı. 2 defa 2'şer dk fosfat tamton solüsyonu (PBS) ile yıkama yapıldı. Kesit etrafı kurulandıktan sonra doku endojen peroksidazını inhibe etmek amacıyla 5 dakika %3'lük H₂O₂ (Merck, Germany) uygulandıktan sonra 2 defa 5'er dakika PBS ile yıkandı. Kesit etrafı kurulandıktan sonra kesitlere equilibration buffer (Apoptag Plus Peroxidase Kit, Millipore, USA) 10 dk oda ısısında uygulandı. Kesit etrafı yıkanmadan kurulandı. Her kesit için 55 µL TdT-enzimi koyuldu. Kesit üzerleri coverslip ile kapatıldı (Apoptag Plus Peroxidase Kit, Millipore, USA). 37°C de 1 saat enkübe edildi. Etüvden alınan kesitlere 10 dk oda ısısında stop/wash buffer (Apoptag Plus Peroxidase Kit, Millipore, USA) uygulandı. Ardından PBS ile oda sıcaklığında 3 defa 1'er dk yıkanan kesitler, etrafları kurulandıktan sonra anti-streptavidin-peroksidaz (Apoptag Plus Peroxidase Kit, Millipore, USA) ile 30 dakika oda sıcaklığında enkübe edildi. PBS ile 4 defa 2'şer dk yıkanan kesitler TUNEL reaksiyonunun görünürlüğünü saptamak amacıyla diaminobenzidine (DAB)(DAB-PLUS kit, Invitrogen, USA) ile boyandı. (Boyanma ilk dakikadan itibaren DAB mikropipete geri çekilerek mikroskop altında kontrol edilir. Tutmamışsa tekrar DABı konarak devam edilir. Boyanma süresi her kesit için farklıdır). Distile su ile yıkandıktan sonra metil green (yoksa Mayers hematoksilin de olabilir) ile zemin boyaması yapıldı. Metil green 10 dk oda ısısında, mayers 20-30 sn bekletilir. Metil green kullanıldıysa 3 değişim distile su ile yıkanır. Aynı şekilde 3 değişim %100lük butanolde dip yapılır (Mayers kullanıldıysa akarsuda 30 sn kadar yıkanır. Kesitler %70, %80, %96 ve %100'lük alkollerde dehidratasyon yapılır). 20'şer dk 3 değişim ksilen ile şeffaflaştırma işleminden sonra entellan ile kapatıldı.

Doku homojenizasyonu ve doku-serum TNF- α Ölçümü:

Sakrifiye edilen sıçanların ileum dokusu 2 mL'lik mikrosantrifüj tüpüne alındı ve oda ısısı ile temas etmeden -80°C'da çalışma gününe kadar saklandı. Çalışma günü -80°C'dan çıkarılan dokular +4°C de çözöldü. Daha sonra buz üzerine alınan örneklerden 60-80 mg'lık parça önceden soğutulmuş içinde 5 mm çapında paslanmaz çelik boncuk ve 1:7 oranında fosfat tampon (pH: 7.2) olan tüpe alındı. Mikrosantrifüj tüpleri önceden soğutulmuş Tissuelyser LT raklarına alınıp TissueLyser (Qiagen-Almanya) doku homojenizasyon cihazına yerleştirildi. Frekans 50, zaman 5 dakikaya ayarlandı. Elde edilen homojenat +4°C de 5000 g'de 10 dakika santrifuj edildi. Santrifuj sonrası elde edilen doku süpernatantlarından ve serumdan TNF-alfa düzeyleri üretici firmanın önerileri doğrultusunda ELISA yöntemiyle çalışıldı (İnvitrogen Rat TNF-alpha, USA). ELISA plakları 450 nm'de spektrofotometrik olarak değerlendirildi (BioTek Synergy HT, USA).

PDGFR alfa ve beta düzeyi:

İmmünohistokimyasal yöntem ile gruplar arasında PDGFR alfa ve betaboyanma skorları karşılaştırıldı. İmmünohistokimyasal boyama için 2-3 mikron kesitler 1 gece 40 derece etüvde bekletildi. 20 dk ksilol, azalan alkol serileri ve distile su ile yıkandı. pH: 8 olan EDTA solüsyonunda 20 dakika pt modöle kaynatıldı. Triss ile yıkandı. Dakoflex peroksidaz solüsyonda 5 dakika bekletildi. Triss ile tekrar yıkandı. Primer antikor uygulandı. PDGFR-Alpha için 1/100 dilüsyonda (NOVUS Biologicals, NBP1-19423, USA) PDGFR-Beta için (1/50 dilüsyonda, NOVUS Biologicals, NBP1-19473, USA) 30-60 dk bekletildi. Triss ile yıkandı. Dakoflex HRP solüsyonda 20 dakika bekletildi. Triss ile yıkandı. Dakoflex Dab'da 7 dk bekletildi. Triss ile yıkandı. Akan çeşme suyunda 5 dk bekletildi. Mayers Hematoksilende 10 dakika zıt boyandı. Çeşme suyunda 1 dk yıkandı. Yükselen alkol serilerinde bekletildi. Ksilolde 5-10 dk şeffaflanma yapıldı. Entellan ile kapatıldı. PDGFR alfa ve beta pozitifliği düzenlenen skorlama sistemine göre belirlendi (Şekil 6).

SKOR	ÖZELLİK
+1	L.propriada inflamatuvar,stromal ve submukozal endotel hücrelerinde pozitiflik
+2	L.propriada ve submukozada hafif artmış ekspresyon
+3	Ülser alanı inflamatuvar hücreler, fibroblastlar ve endotel hücrelerde yaygın (mukoza-submukoza) ve/veya çevre mukozada boyanma

Şekil 6. PDGFR alfa ve beta skrolama sistemi

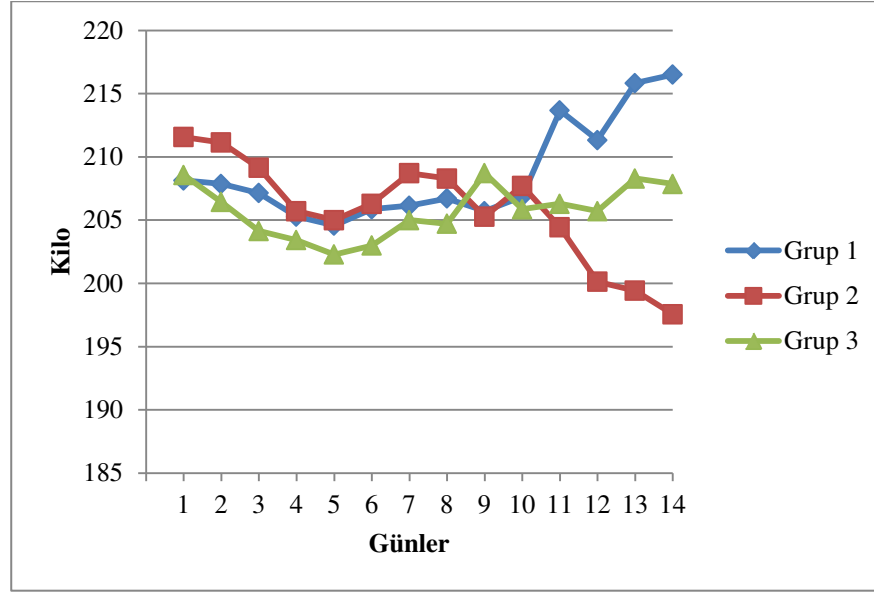
İstatistiksel analiz:

Tüm istatistiksel işlemler SPSS 15.0 programında yapılmış, çoklu grup ortalamalarının karşılaştırılmasında Kruskal-Wallis, ikili grup ortalamalarının karşılaştırılmasında Mann-Whitney U testleri kullanılmıştır. İstatistiksel anlamlılık için $P < 0.05$ kabul edilmiştir.

BULGULAR

Grup 1 dışındaki iki grupta toplam 14 sıçanda kanlı diyare rektal TNBS uygulamasının 1. gününde tespit edildi. Grup 2 ve Grup 3'te diyare 5. günde yarı katı hale geldi. Grup 3'te 7.gün sonrası normal gayta tespit edilirken Grup 2'de toplam 14 gün boyunca diyare izlendi. Grup 1'de eter anestezisi altında rektal serum fizyolojik uygulanırken 1 sıçanda solunum arresti gelişti, CPR sonrası durumu stabil seyretti. Fakat ilerleyen günlerde genel durumu bozulup deneyin 6. gününde exitus oldu. Rattan otopsi yapılmadı.

Birinci gün kilo ortalamaları gruplar arasında benzerdi. Kilo ortalamaları günlere göre incelendiğinde Grup 2'de 7. günden itibaren kiloda belirgin azalma dikkati çekerken Grup 3'te kilo ortalamalarında belirgin azalma olmamıştır (Şekil 7).



Şekil 7. Grupların günlere göre kilo ortalamaları

Grup 1'deki ratlarda 14 gün sonunda ortalama 8.3 gr kilo artışı olurken, Grup 2'deki ratlar çalışma boyunca ortalama 14 gr vermiş ve Grup 3'teki ratlar ortalama 0.7 gr vermiştir. Tüm gruplar arasında anlamlı fark saptanmıştır ($P=0.006$). Grup 1 ve Grup 3 arasında kilo farkı istatistiksel olarak anlamlıdır (Sırasıyla +8.3 gr ve -0.7 gr, $P=0.031$). Kilo farkı açısından Grup 2 ile Grup 3 ve Grup 1 ile 2 arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmıştır (Sırasıyla -14.0 gr ve -0.7 gr, $P=0.047$; +8.3 gr ve -14.0 gr, $P=0.008$)(Tablo 2).

Tablo 2. Gruplara ait 1. ve 14. gün kilo ortalamaları ve 1-14. gün arası kilo farkları

Gruplar	1. Gün (Ort± SD)	14. Gün (Ort±SD)	1-14. Gün Arası Kilo Farkı
Grup1	208.14 ± 9.59	216.50 ± 11.84	+ 8.3
Grup 2	211.57 ± 7.72	197.57 ± 17.32	- 14.0
Grup 3	208.57 ± 10.27	207.86 ± 8.59	-0.7

Grup 1'e bakıldığında ratlar 7. gün ve 14. gün arasında ortalama 8 gr alırken, grup 2'de ortalama 11.1 gr kayıp olmuştur. Grup 3'teki ratlar 2.9 gr almıştır. Tüm gruplar karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı fark saptanmıştır ($P=0.004$). Grup 1 ve Grup 2, Grup 2 ve Grup 3, Grup 1 ve Grup 3 arasındaki 7-14.gün arası kilo farkları istatistiksel olarak anlamlıdır (Sırasıyla +8.0 gr ve -11.1 gr, $P=0.007$; -11.1 gr ve +2.9 gr, $P=0.015$; +8.0 gr ve +2.9 gr, $P=0.042$)(Tablo 3).

Tablo 3. Gruplarda 7. ve 14. gün kilo ortalamaları ve 7-14. gün arası kilo farkları

Gruplar	7. Gün (Ort±SD)	14. Gün (Ort±SD)	7-14. Gün Arası Kilo Farkı
Grup1	206.14 ± 13.6	216.50 ± 11.84	+ 8.0
Grup 2	208.71 ± 8.48	197.57 ± 17.32	- 11.1
Grup 3	205 ± 6.5	207.86 ± 8.59	+2.9

Makroskobik patolojik skor ortalamalarına bakıldığında Grup 1 ve Grup 3'te ortalama 0 iken Grup 2'de 1.43 ± 0.65 olarak saptanmıştır. Makroskobik skorların ratlara göre dağılımına bakıldığında Grup 1 ve Grup 3'teki ratların skorlarının tamamının 0 olduğu dikkat çekmektedir (Şekil 8). Grup 2'teki ratlarda adezyon ve striktür saptanmayıp ülserlere ve duvar kalınlık artışına rastlanmıştır (Şekil 9). Grup 1 ve Grup 3 makroskobik skorlar açısından benzerken Grup 1 ile Grup 2 ve Grup 2 ile Grup 3 arasında makroskobik skor ortalaması açısından istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmıştır (Sırasıyla 0 ve 1.43 ± 0.65 , $P=0.014$; 1.43 ± 0.65 ve 0, $P=0.009$) (Tablo 4).



Şekil8. Grup 1’den alınmış normal mukoza örneği



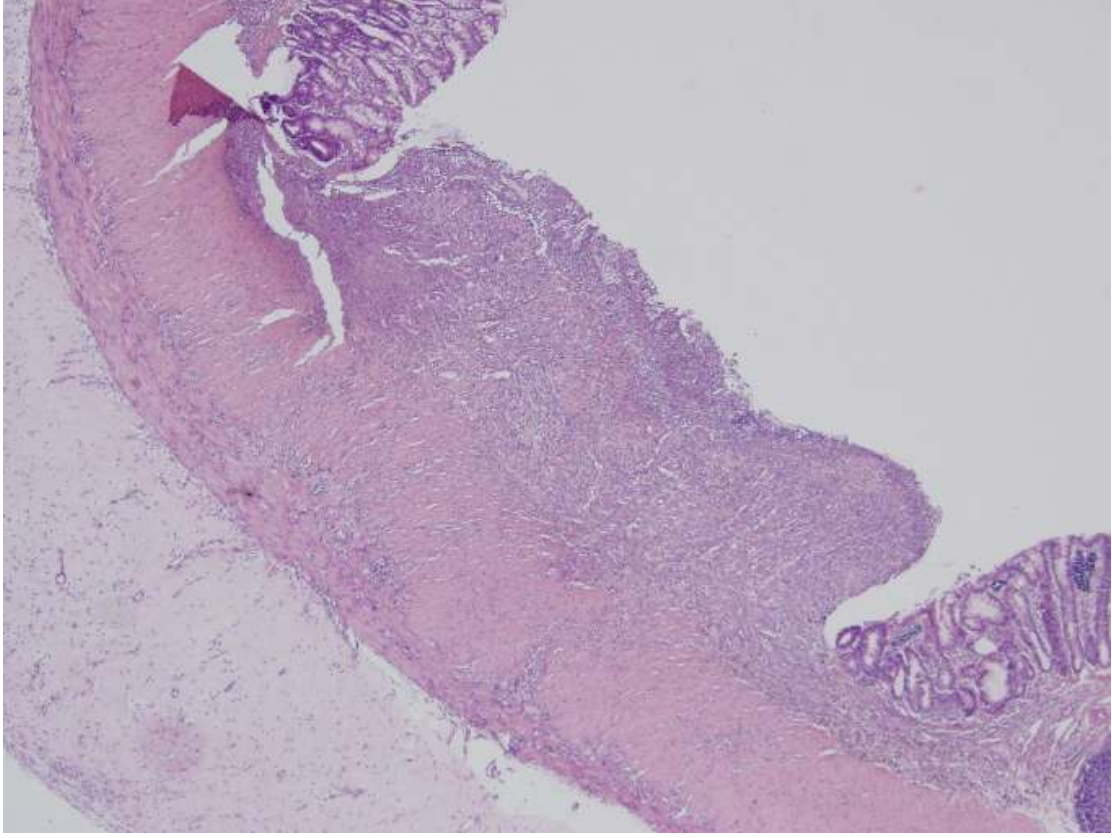
Şekil 9. Grup 2’te bir olguda geniş ülserle rektumun makroskopik görünümü

Tablo 4. Gruplara göre patolojik makroskopik ve mikroskopik skor ortalamaları

Gruplar	Makroskopik Skor* (Ort±SD)	Mikroskopik Skor** (Ort±SD)
Grup1	0	2.0 ± 0.447
Grup 2	1.43 ± 0.649	7.71 ± 1.475
Grup 3	0	2.86 ± 0.553

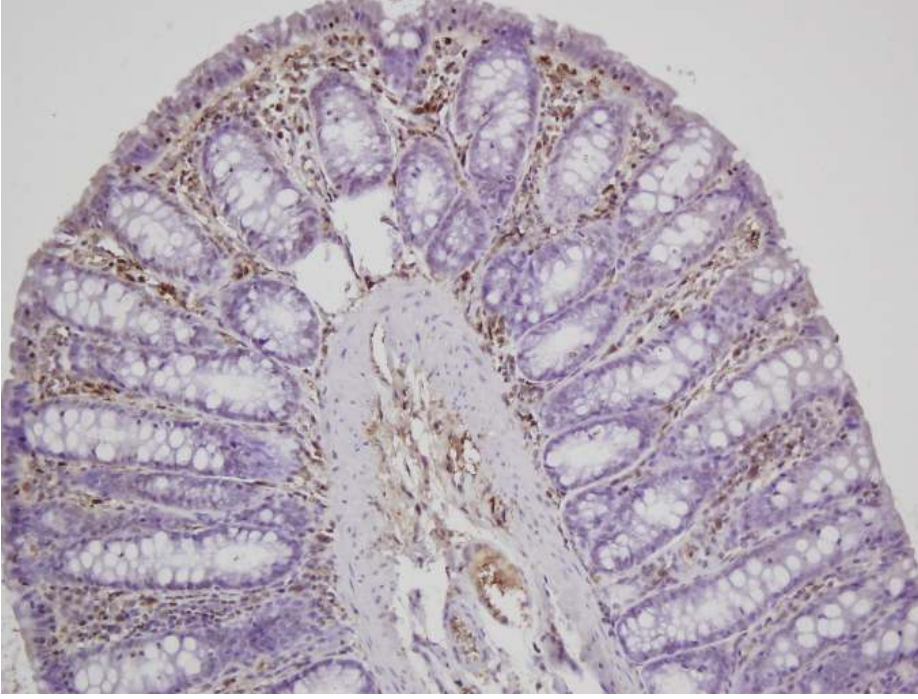
*Grup 1 ve Grup 2 için $P=0.014$; Grup 2 ve Grup 3 için $P=0.009$, **Grup 1 ve Grup 2 için $P=0.034$; Grup 2 ve Grup 3 için $P=0.030$)

Mikroskopik skor ortalamalarına bakıldığında Grup 1’de 2.0 ± 0.45 , Grup 2’de 7.71 ± 1.48 , Grup 3’te 2.86 ± 0.55 olarak saptanmıştır. Grup 1 ile Grup 2 ve Grup 2 ile Grup 3 arasında mikroskopik skor ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmıştır (Sırasıyla 2.0 ± 0.45 ve 7.71 ± 1.48 , $P=0.034$; 7.71 ± 1.48 ve 2.86 ± 0.55 için $P=0.030$). Grup 1 ve Grup 3 arasında anlamlı fark saptanmamıştır ($P>0.05$) (Tablo 4)(Şekil 10).

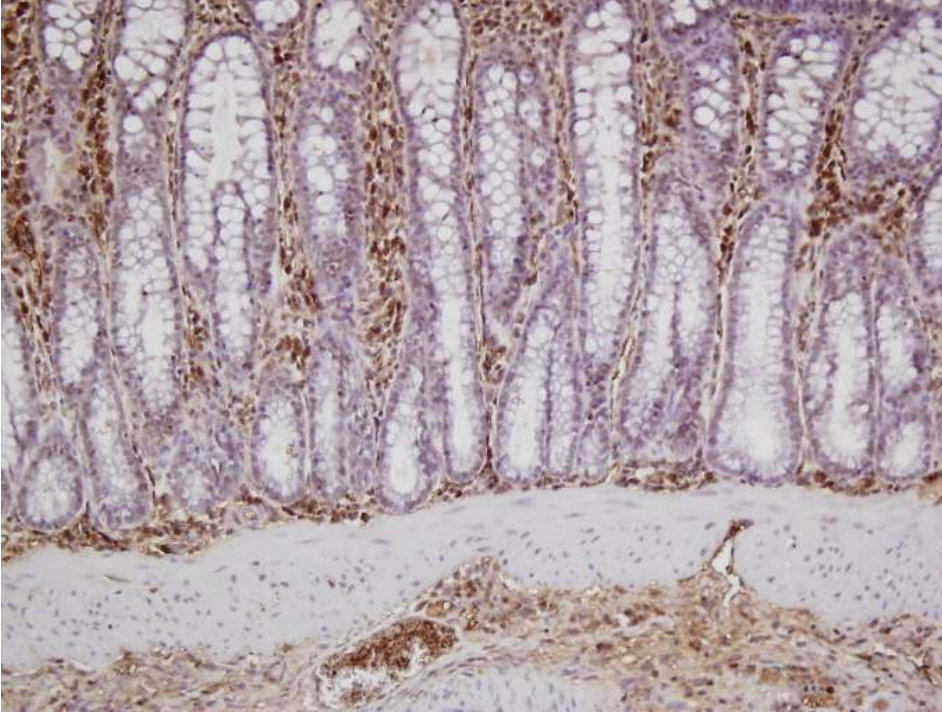


Şekil 10. Kolon mukozasında ülser alanı görünümü. Hematoksilen-eosin (HE) boyama 40x büyütme.

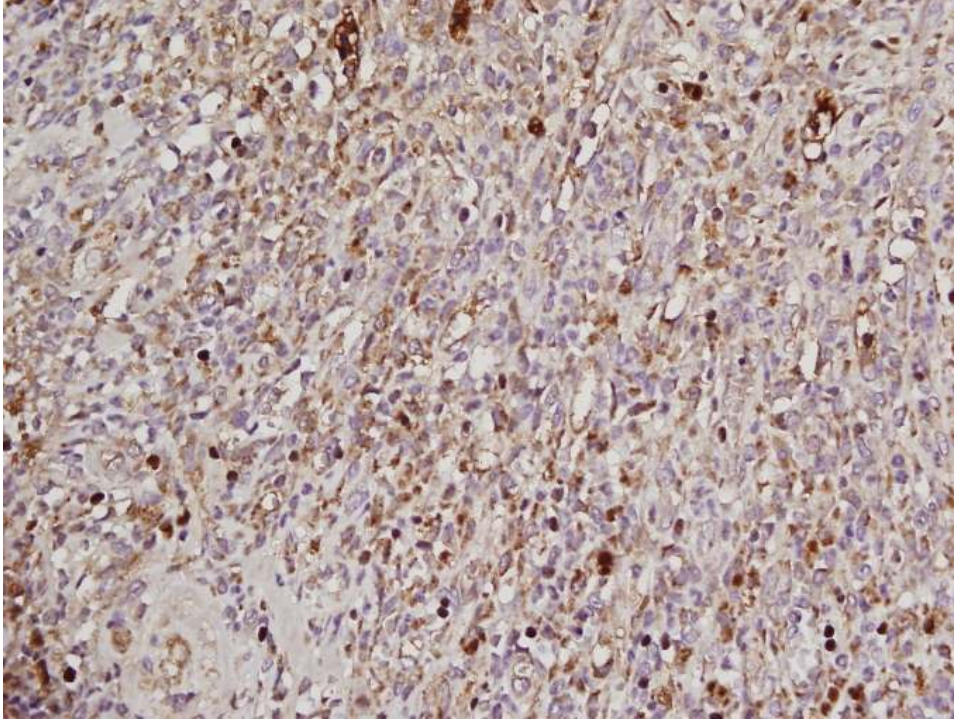
PDGFR alfa ve beta skorum sistemine göre örnekler boyanma özellikleri açısından +1, +2 ve +3 şeklinde sınıflandırılmıştır (Şekil 11,12,13, 14, 15). PDGFR alfa skorları Grup 1’de 1.33 ± 0.21 , Grup 2’de 2.71 ± 0.18 , Grup 3’te 1.57 ± 0.30 ’dur. Tüm gruplar arasında anlamlı fark saptanmıştır ($P=0.007$). Grup 1 ile Grup 2 ve Grup 2 ile Grup 3 arasında PDGFR alfa skorları arasında istatistiksel anlamlı fark saptanmıştır (Sırasıyla 1.33 ± 0.21 ve 2.71 ± 0.18 , $P=0.004$; 2.71 ± 0.18 ve 1.57 ± 0.3 , $P=0.014$). Grup 1 ve Grup 3, PDGFR alfa skorları açısından benzer bulunmuştur ($P>0.05$) (Tablo 5).



Şekil 11. PDGFR alfa +1 skor ile boyanma (PDGFR, immünohistokimya x200 büyütmede)



Şekil 12. PDGFR alfa +2 skor ile boyanma(PDGFR, immünohistokimya x200 büyütmede)



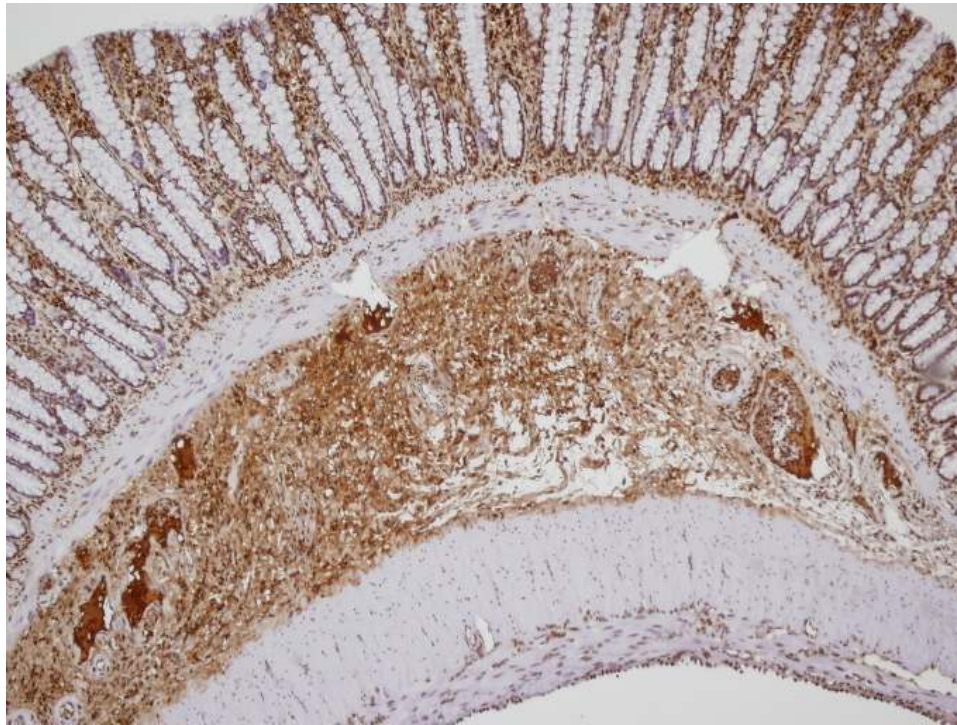
Şekil 13. PDGFR alfa +3 skor ile boyanma (PDGFR, immünohistokimya x400 büyütmede)

Grup 1’de PDGFR beta skor ortalaması 1.50 ± 0.22 , Grup 2’de 2.57 ± 0.20 , Grup 3’te 1.57 ± 0.3 olarak gelmiştir. Tüm gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık vardır ($P=0.020$). Grup 1 ile Grup 2 ve Grup 2 ile Grup 3 arasında PDGFR beta skorları arasında istatistiksel anlamlı fark saptanmıştır (Sırasıyla 1.50 ± 0.22 ve 2.57 ± 0.20 , $P=0.011$; 2.57 ± 0.20 ve 1.57 ± 0.3 , $P=0.025$). Grup 1 ve Grup 3, PDGFR beta skorları açısından benzer bulunmuştur ($P>0.05$) (Tablo 5).

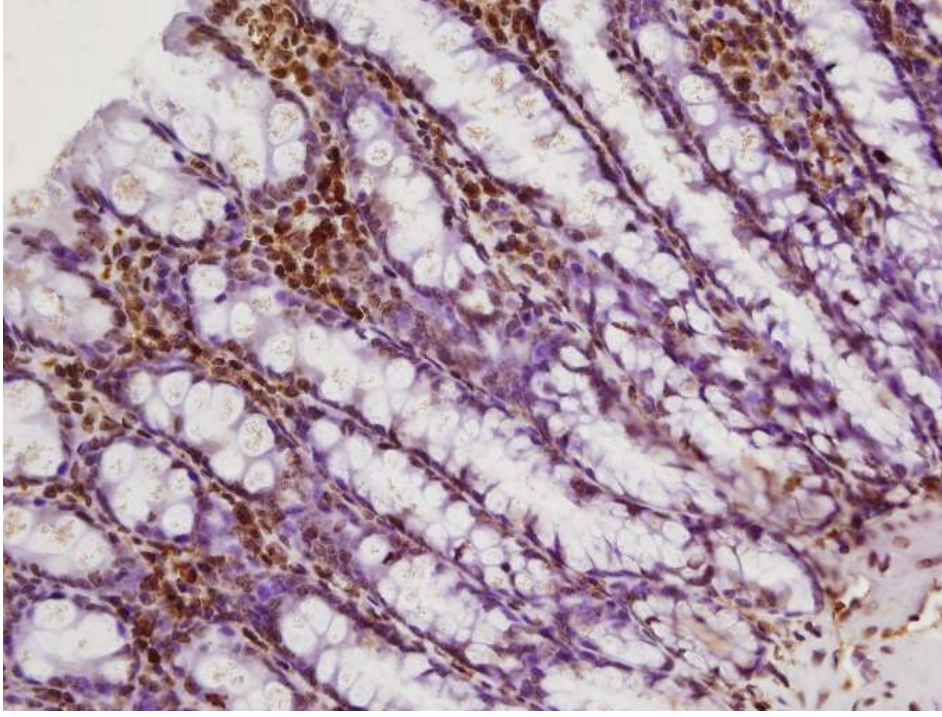
Tablo 5. Gruplarda PDGFR alfa ve beta boyanma skorları ortalamaları

Gruplar	PDGFR Alfa*	PDGFR Beta**
	(Ort±SD)	(Ort± SD)
Grup1	1.33 ± 0.211	1.50 ± 0.224
Grup 2	2.71 ± 0.184	2.57 ± 0.202
Grup 3	1.57 ± 0.297	1.57 ± 0.297

*Grup 1 ve Grup 2 için $P=0.004$ ve Grup 2 ve Grup 3 için $P=0.014$; **Grup 1 ve Grup 2 için $P=0.011$ ve Grup 2 ve Grup 3 için $P=0.025$.



Şekil 14. PDGFR beta +3 skor ile boyanma (PDGFR,immünohistokimya x100 büyütmede)



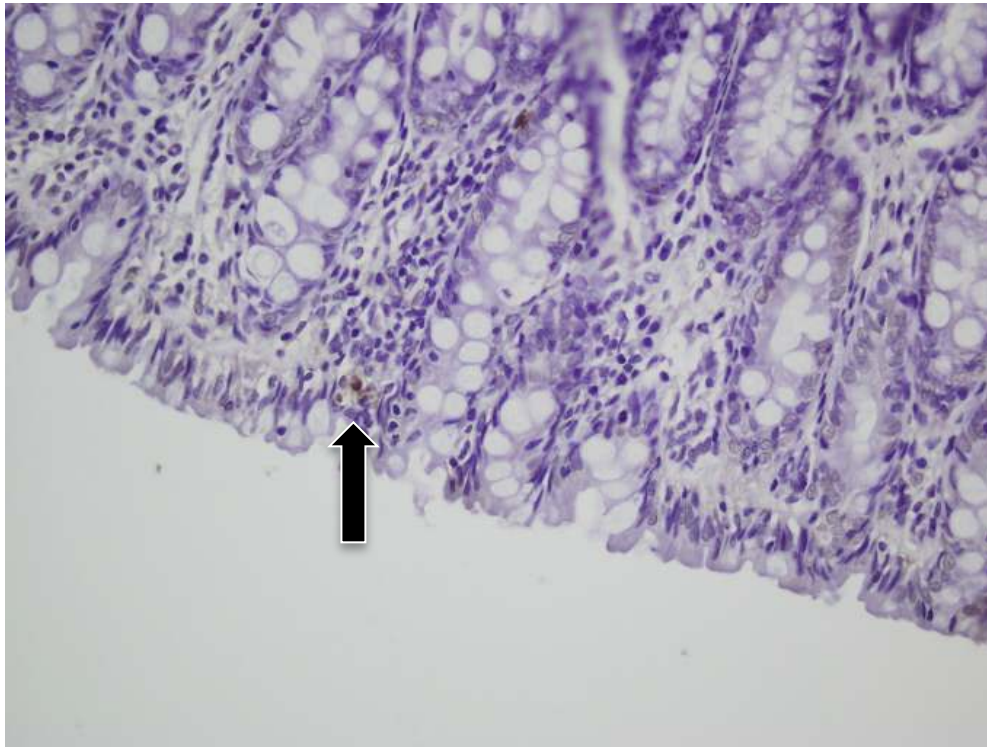
Şekil 15. PDGFR beta +1 skor ile boyanma (PDGFR,immünohistokimya x200 büyütmede)

Serum TNF-alfa düzeyleri ortalaması Grup 1’de 0.03 ± 0.03 , Grup 2’de 0.02 ± 0.01 , Grup 3’te ise 0.03 ± 0.01 olarak saptanmıştır. Gruplar arasında serum TNF-alfa düzeyleri ortalaması açısından istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır ($P > 0.05$) (Tablo 6). Doku TNF-alfa düzeyleri ortalaması Grup 1’de 0.23 ± 0.01 ng/ml, Grup 2’de 0.39 ± 0.06 ng/ml, Grup 3’te 0.40 ± 0.05 ng/ml olarak saptanmıştır. Gruplar arası anlamlı fark mevcuttur ($P = 0.002$). Grup 1 ve Grup 2 ile Grup 1 ve Grup 3 arasında doku TNF-alfa düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmıştır (Sırasıyla 0.23 ± 0.01 ve 0.39 ± 0.06 , $P = 0.002$; 0.23 ± 0.01 ve 0.40 ± 0.05 , $P = 0.003$). Fakat Grup 2 ve Grup 3 doku TNF-alfa düzeyleri ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark yoktur ($P > 0.05$) (Tablo 6).

Gruplar arasında TUNEL yöntemiyle bakılan apoptotik hücre sayısı ortalamaları Grup 1’de 5.50 ± 0.67 , Grup 2’de 4.14 ± 0.88 , Grup 3’te ise 4.14 ± 1.06 olarak saptanmıştır. Gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildir ($P > 0.05$)(Tablo 6)(Şekil 16).

Tablo 6. Gruplara göre doku ve serum TNF-alfa ortalamaları (ng/ml) ve apoptoz oranları

Gruplar	Doku TNF-alfa (Ort± SD)	Serum TNF-alfa (Ort± SD)	Apoptoz Oranları (Ort± SD)
Grup1	0.23 ± 0.01	0.03 ± 0.03	5.50± 0.67
Grup 2	0.39 ± 0.06	0.02 ± 0.01	4.14 ± 0.88
Grup 3	0.40 ± 0.05	0.03± 0.01	4.14 ± 1.06



Şekil 16. Kolon epitelinde apoptotik hücre (siyah ok ile işaretlenmiş x400 büyütme)

TARTIŞMA

İnflammatuar barsak hastalıkları, CH ve ÜK'i içeren kronik tekrarlayan intestinal inflamatuvar durumlardır. Etyopatogeneizde genetik, çevresel, mikrobiyal ve immün faktörler rol oynar. Refrakter hastalıkta genetik teknoloji ile geliştirilmiş biyolojik tedavi yöntemleri ile yeni bir dönem başlamış olmasına rağmen tedavi seçenekleri hala kısıtlıdır. İBH tedavisinde mukozal iyileşme, tedavinin mihenk taşı kabul edilmektedir. Kortikosteroid tedavisi ile yaklaşık %30, anti-TNF tedaviler ile hastaların en fazla %60'ında mukozal iyileşme elde edilebilmektedir (9, 10, 11). İBH hastalarının yaklaşık %20'si Anti-TNF tedaviye cevap vermemekte ve cerrahi tedavi gereksinimi göstermektedir (12). Görüldüğü gibi İBH'na sahip hastaların azımsanmayacak bir grubunda mevcut medikal tedavi seçenekleri yetersiz kalmaktadır.

Çalışmamızda kullanılan nilotinib güçlü bir tirozin kinaz inhibitörüdür. Abelson protoonkogen (Abl), c-kit, platelet derived growth faktör reseptörü (PDGFR) ve makrofaj koloni stimüle edici faktör reseptörü (c-fms), indükte edilebilen nitrik oksit sentetaz (iNOS) ve TNF-alfa gibi birçok reseptör tirozin kinazı inhibe eder (13). Görüldüğü gibi tirozin kinaz inhibitörleri, İBH patogenezinde yer alan TNF- alfa, PDGFR ve NO gibi birden fazla yolak üzerine etkilidir. Buradan yola çıkılarak bu çalışmada, TNBS ile kolit oluşturulmuş ratlarda bir tirozin kinaz inhibitörü olan nilotinibin; kilo, patolojik skorlar, TNF alfa düzeyleri, PDGFR alfa ve beta düzeyleri ve apoptotik indeks üzerine olan etkileri araştırılmıştır.

Çalışmamızda klinik değerlendirme açısından, ratların kilosu günlük olarak takip edilmiştir. Ondört gün sonunda Nilotinib grubundaki ratların, TNBS uygulanıp tedavi verilmeyen gruptaki ratlara göre anlamlı düzeyde daha az kilo kaybı gösterdikleri ($P=0.047$) saptanmıştır. Gruplar arasında ilk 7 gün kilo değişiklikleri açısından fark saptanmazken, özellikle tedavinin 7. gününden sonra farkın belirginleştiği görülmüştür. Bu durum nilotinibin klinik etkinliğinin 7. günden sonra başladığını düşündürmektedir. Cuzzocrea ve ark. tarafından yapılmış bir başka çalışmada dinitrobenzen sülfonik asit (DNBS) ile kolit oluşturulmuş ratlarda tirozin kinaz inhibitörü olan Tyrophostin AG 126, 7 gün süreyle uygulanmıştır. Bu çalışmada da çalışmamızdaki sonuçlara benzer şekilde, tedavi grubunda, DNBS uygulanan gruba göre anlamlı düzeyde daha az kilo kaybı olmuştur (16). Bu çalışmada kullanılan

tirozin kinaz inhibitörü çalışmamızdakinden farklıdır. Literatürde rat kolit modelinde tirozin kinaz inhibitörlerinin etkinliğinin araştırıldığı başka bir çalışma da bulunmamaktadır. Buna karşın tirozin kinaz inhibitörü ilaçların kolit oluşturulmuş ratlarda kiloya ve dolayısıyla kliniğe olumlu etkisi olduğu görülmektedir. İBH hastalarında tirozin kinaz inhibitörü ilaçların kullanımına ait çalışma olmamakla birlikte, Magro ve ark.nın bir olgu sunumu da bu sonucu destekler niteliktedir. Araştırmacılar 2006'da yayınladıkları vaka takdiminde Crohn hastalığı olan ve kronik myeloid lösemi (KML) tanısı konmuş bir hastanın imatinib ile tedavisi sırasında 3 yıl mesalamin ve steroid tedavilerini kullanmadan klinik remisyonda kaldığını bildirmiştir (15).

Önceleri İBH'ı tedavisinde kullanılacak ilaç çalışmalarında tedavi hedefi, hastalığın semptomlarının geriletilmesi olmuştur. Bunun en önemli nedeni tedavide kullanılan ilaçların hastalığı modifiye edici ajan olmamalarıydı. Son dönemde İBH tedavisinin etkinliğinin değerlendirildiği çalışmalarda, "mukozal iyileşme" primer sonlanım noktasını oluşturmaktadır (71). Tedavi hedefi olan mukozal iyileşme ile sürekli klinik remisyon hali ve cerrahisiz sağkalım sağlanabilmektedir (72). Anti-TNF ajanların mukozal iyileştirme oranları ACT1 ve ACT2 çalışmalarında %60 civarında bildirilmektedir (58, 11). Çalışmamızda nilotinibin mukozal iyileşme üzerine olan etkilerini değerlendirebilmek üzere patolojik olarak makroskobik ve mikroskobik skorlama yapılmış ve oldukça dikkat çekici sonuçlar elde edilmiştir. Nilotinib grubundaki ratlarda makroskobik ve mikroskobik patolojik skorların, sağlıklı kontrol grubundaki ratlara benzer olduğu ($P>0.05$) ve TNBS uygulanıp tedavi verilmeyen gruptaki ratlara göre ise anlamlı düzeyde düşük olduğu (sırasıyla $P=0.009$, $P=0.030$) saptanmıştır. Çalışmamızda, nilotinib verilen grubun mikroskobik ve makroskobik skorlarının sağlıklı kontrol grubuyla benzer oluşu nilotinibin mukozal iyileştirici özelliğinin en önemli kanıtıdır. Nitekim Cuzzocrea ve ark.nın çalışmasında da tirozin kinaz inhibitörü verilen ratlarda kontrol grubuyla karşılaştırıldığında, histolojik olarak anlamlı düzeyde iyileşme saptanmıştır ve bu sonuç çalışmamızın sonuçlarına paralellik göstermektedir (16).

Çalışmamızda nilotinibin kolit üzerindeki etkinliğini hangi yolla gösterdiğini saptamak amacıyla gruplar arasında PDGFR alfa, PDGFR beta, TNF-alfa ve apoptoz düzeyleri karşılaştırılmıştır. PDGFR alfa ve beta skorları; kilo değişimi ve patolojik makroskobik ve mikroskobik skora benzer şekilde nilotinib verilen grupta, TNBS grubuna göre anlamlı düzeyde düşük bulunurken (sırasıyla $P=0.014$, $P=0.025$),

sağlıklı kontrol grubuyla benzer olduğu görülmüştür. Literatürde tirozin kinaz inhibitörlerinin, kolit modelinde, PDGFR alfa ve beta düzeyleri üzerine etkisinin araştırıldığı başka bir çalışma bulunmamaktadır. İBH'nda intestinal mikrovasküler yapı sıkı bir anjiyogenik yapıya bürünür, anjiyogenik integrinler ve mediatörlerin salgısı inflamme mukozada artar (40). PDGF-alfa ve beta, İBH'da düzeyi artan anjiyogenik mediatörlerdendir (17). Danese ve ark.nın ratlarda deneysel kolit oluşturduğu çalışmanın sonuçlarına göre antianjiyogenik ajanlar yeni damar oluşumunu engelleyerek mikrovasküler yapının patolojik yayılımını, inflamasyonu ve sonuç olarak doku hasarını önlenmektedir (40). PDGF, anjiyogenik olmasının yanı sıra mitojenik ve kemotaktik bir moleküldür ve sonuçta mukozal iyileşmede rol oynar. İBH'da aktif ülser alanına komşu fibrotik alanlarda artmış PDGF-alfa ve beta aktivitesi tespit edilmiştir. Kumagai ve ark, İBH'da aktif fibrosis olan alanlarda artmış PDGF ve PDGFR ekspresyonu saptamışlar ve İBH oluşumunda da katkıları olduğunu düşünmüşlerdir (43). Çalışmamızın sonuçları, nilotinibin kolit üzerindeki mukozal iyileştirici etkisini PDGFR alfa ve beta üzerinden gösterdiğini düşündürmektedir.

TNF alfa; hücre proliferasyonu, diferensasyonu ve hücre sağkalımında rol oynayan bir proteindir. Adezyon moleküllerinin ekspresyonu, fibroblast proliferasyonu, prokoagülan maddelerin salınımı, sitotoksik, apoptotik ve akut faz cevabının başlatılmasında görevlidir (73). İBH patogenezindeki rolü açıktır ve günümüzde anti-TNF ajanlar, İBH tedavisinde başarıyla kullanılmaktadır (58, 11). Tirozin kinaz inhibisyonu ile kolonda proinflamatuvar sitokinler olan TNF-alfa ve IL-1beta sentezinin azaldığı gösterilmiştir (44). Buradan yola çıkılarak çalışmamızda serum ve doku TNF alfa düzeylerinin yanı sıra apoptotik index değerlendirilmiştir. Nilotinib alan gruptaki serum ve doku TNF-alfa düzeyleri ile apoptotik indexler, TNBS uygulanmış ancak tedavi verilmemiş gruptakiyle benzer bulunmuştur. TNF-alfa'nın molekül olarak stabil olmadığı ve çevre koşullarından etkilendiği bilinmektedir. Çalışmamızda serum ve doku TNF-alfa düzeyleri sadece 1 kez çalışılmıştır. Belki aynı örneklerde daha fazla sayıda çalışılmış ve ortalaması alınmış olsaydı sonuçlar daha güvenilir olabilirdi. Ancak TNF-alfa düzeylerine paralel olarak gruplar arasında apoptoz indexlerinin de benzer bulunmuş olması; nilotinibin TNF-alfa düzeyi ve apoptoz üzerine anlamlı bir etkisi olmadığını düşündürmektedir.

Nilotinib, ratlarda TNBS ile oluşturulan deneysel kolit modelinde kilo ile makroskopik ve mikroskopik patolojik skorlar üzerine anlamlı etki yapmış yani belirgin mukozal iyileşme sağlamıştır. PDGFR alfa ve PDGFR beta düzeylerinde

azalmaya neden olurken apoptotik skorlar ve TNF-alfa üzerine anlamlı etkisi olmamıştır.

KAYNAKLAR

1. Bosani M, Ardizzone S, Porro GB. Biologic targeting in the treatment of inflammatory bowel diseases. *Biologics:Targets and Therapy* 2009;3 77-97.
2. Baumgart DC, Carding SR. Inflammatory bowel disease: cause and immunobiology. *Lancet* 2007;369:1627-40.
3. Engel MA, Neurath MF. New pathophysiological insights and modern treatment of IBD. *J Gastroenterol* 2010;45:571-83.
4. Dignass A, Rami E, Fernando M, Maaser C, Chowers Y, Geboes K, Mantzaris G, Reinisch W, Colombel JF, Vermeire S, Travis S, Lindsay JO, Assche GV. Second European evidence-based Consensus on the diagnosis and management of ulcerative colitis: Definitions and Diagnosis. *Journal of Crohns and Colitis* 2012.
5. Marshall JK, Thabane M, Steinhart AH, Newman JR, Anand A, Irvine EJ. Rectal 5-aminosalicylic acid for induction of remission in ulcerative colitis. *Conchrane Database Syst Rev* 2010;1:CD004115.
6. Sutherland LR, Macdonald JK. Oral 5-aminosalicylic acid for induction of remission in ulcerative colitis. *Cochrane Database Syst Rev* 2006;2:CD000543.
7. Gisbert JP, Linares PM, McNicholl AG, Mate J, Gomollon F. Meta-analysis:the efficacy of azathioprine and mercaptopurine in ulcerative colitis. *Aliment Pharmacol Ther* 2009;30:126-127.
8. Reinisch W, Sandborn WJ, Hommes DW, D'Haens G, Hanauer S, Schreiber S, Panaccione R, Fedorak RN, Tighe MB, Huang B, Kampman W, Lazar A, Thakkar R. Adalimumab for induction of clinical remission in moderately to severely active ulcerative colitis: results of a randomised controlled trial. *Gut* 2011 Jun;60(6):780-7.
9. Truelove SC, Witts LJ. Cortisone in ulcerative colitis: preliminary report on a therapeutic trial. *Br Med J* 1954;2:375-8.
10. Rutgeers P, Vermeire S, Assche GV. Mucosal healing in inflammatory bowel disease:impossible ideal or therapeutic target?. *Gut* 2007;56:453-455.
11. Sandborn WJ, Colombel JF, Reinisch W, Feagan BG, Rachmilewitz D. Infliximab induces and maintains mucosal healing in ulcerative colitis patients:the ACT trials. *Am J Gastroenterol* 2005;100:310.
12. Peyrin-Biroulet L, Lemann M. Review article:remission rates achievable by current therapies for inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2011;33:870-9.

13. Manley PW, Stiefl N, Cowan-Jacob SW, Kaufman S, Mestan J, Wartmann M, Wiesmann M, Woodman R, Gallagher N. Structural resemblances and comparisons of the relative pharmacological properties of imatinib and nilotinib. *Bioorg Med Chem*. 2010 Oct 1;18(19):6977-6986.
14. Rhee CK, Lee SH, Yoon HK. Effect of Nilotinib on Bleomycin-Induced Acute Lung Injury and Pulmonary Fibrosis in Mice. *Respiration* 2011;82:273-287.
15. Magro F, Costa C. Long-standing remission of crohn's disease under imatinib therapy in a patient with crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis*.(Volume 12), 2006 Nov;12(11):1087-9.
16. Cuzzocrea S, McDonald MC, Mazzon E, Mota-Filipe H, Lepore V, Ciccolo A, Terranova ML, Britti D, Caputi AP, Thiemermann C. The tyrosine kinase inhibitor tyrhostin AG 126 reduced the development of colitis in the rat. *Lab Invest*. 2000 Sep; 80(9):1439-53.
17. Cromer WE, Mathis JM, Granger DN, Chaitanya GV, Alexander JS. Role of endothelium in inflammatory bowel diseases. *World J Gastroenterol* 2011 February 7 17(5):578-593.
18. Feldman M, Freidman LS, Brandt LJ. Sleisenger and Fordtran's Gastrointestinal and Liver Disease, Pathophysiology\Diagnosis\Management Volume 2, 9th ed. Philadelphia: WB Saunders; 2010:1975.
19. Loftus Jr EV. Clinical epidemiology of inflammatory bowel disease: Incidence clinical epidemiology of inflammatory bowel disease: Incidence, prevalence and environmental influences. *Gastroenterology* 2004; 126:1504.
20. Sandler RS, Loftus EV. Epidemiology of inflammatory bowel diseases. In: Sartor RB, Sandborn WJ, ed. *Kirsner's inflammatory bowel diseases*, 6th ed. Philadelphia: WB Saunders; 2004:245.
21. Beyer C, Distler JH, Distler O. Are tyrosine kinase inhibitors promising for the treatment of systemic sclerosis and other fibrotic diseases? *Swiss Med Wkly*. 2010 Sep 1;140:w13050.
22. Tozun N, Atug O, Imeryuz N, Hamzaoglu HO, Tiftikci A, Parlak E, Dagli U, Ulker A, Hulagu S, Akpınar H, Tuncer C, Suleymanlar I, Ovunc O, Hilmioglu F, Aslan S, Turkdogan K, Bahcecioglu HI, Yurdaydin C. Clinical characteristics of inflammatory bowel disease in Turkey. A multicenter epidemiologic survey. *J Clin Gastroenterol*. 2009 Jan;43(1):51-7.
23. Chidlow JH Jr, Shukla D, Grisham MB, Kevil CG. Pathogenic angiogenesis in IBD and experimental colitis: new ideas and therapeutic avenues. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 293; G5-G18;2007.

24. Kornbluth A, Sachar DB. Erratum. Ulcerative Colitis Practice Guidelines in Adults: American College of Gastroenterology, Practice Parameters Committee. *Am J Gastroenterol*. 2010 Mar;105(3):501-23.
25. Laharie D, Debeugny S, Peeters M, Van Gossum A, Gower-Rousseau C, Belaiche J, Fiasse R, Dupas JL, Lerebours E, Piotte S, Cortot A, Vermeire S, Grandbastien B, Colombel JF. Inflammatory bowel disease in spouses and their offspring. *Gastroenterology* 2001; 120:816.
26. Satsangi J, Jewell DP, Rosenberg WM, Bell JR. Genetics of inflammatory bowel disease. *Gut* 1994; 35:696.
27. Satsangi J, Parkes M, Louis E, Hashimoto L, Kato N, Welsh K, Terwilliger JD, Lathrop GM, Bell JI, Jewell DP. Two-stage genome-wide search in inflammatory bowel disease provides evidence for susceptibility loci on chromosomes 3, 7, and 12. *Nature Genet* 1996; 14:199.
28. Schwab M, Schaeffeler E, Marx C, Fromm MF, Kaskas B, Metzler J, Stange E, Herfarth H, Schoelmerich J, Gregor M, Walker S, Cascorbi I, Roots I, Brinkmann U, Zanger UM, Eichelbaum M. Association between the C3435T MDR1 gene polymorphism and susceptibility for ulcerative colitis. *Gastroenterology* 2003; 124:26.
29. Ley RE, Turnbaugh PJ, Klein S, Gordon JI. Microbial ecology: Human gut microbes associated with obesity. *Nature* 2006; 444:1022.
30. Himmel ME, Hardenberg G, Piccirillo CA, Steiner TS, Levings MK. The role of T-regulatory cells and Toll-like receptors in the pathogenesis of human inflammatory bowel disease. *Immunology*, 125, 145-153.
31. Smith KM, Eaton AD, Finlayson LM, Garside P. Oral tolerance. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 162:S175.
32. Mayer L, Shlien R. Evidence for function of Ia molecules on gut epithelial cells in man. *J Exp Med* 1987; 166:1471.
33. Chidlow JH Jr, Langston W, Greer JJ, Ostanin D, Abdelbaqi M, Houghton J, Senthilkumar A, Shukla D, Mazar AP, Grisham MB, Kevil CG. Differential Angiogenic Regulation of Experimental Colitis. *The American Journal of Pathology*, 2006 Dec;169(6):2014-30.
34. Nilsen EM, Johansen FE, Janhsen FL, Lundin KE, Scholz T, Brantzaeg P, Haraldsen G. Cytokine profiles of cultured microvascular endothelial cells from the human intestine. *Gut* 1998;42:635-642.
35. Ertenli İ, Kalyoncu U. Anti-TNF ajanlara genel bakış, temel farklılıklar. *Türkiye Klinikleri J Immunol Rheumatol-Special Topics* 2010;3(2).
36. Kronenberg M, Gapin L. The unconventional lifestyle of NK T cells. *Nature Rev Immunol* 2002; 2:557.

37. Palmer MT, Weaver CT. Narcissistichelpers. *Nature* 2007; 448:416.
38. Wiekowski MT, Leach MW, Evans EW, Sullivan L, Chen SC, Vassileva G, Bazan JF, Gorman DM, Kastelein RA, Narula S, Lira SA. Ubiquitous transgenic expression of the IL-23 subunit p19 induces multiorgan inflammation, runting, infertility, and premature death. *J Immunol* 2001; 166:7563.
39. Danese S. Role of the vascular and lymphatic endothelium in the pathogenesis of inflammatory bowel disease: 'brothers in arm's'. *Gut*. 2011 Jul; 60(7):998-1008.
40. Danese S, Sans M, Spencer DM, Beck I, Donate F, Plunkett ML, de la Motte C, Redline R, Shaw DE, Levine AD, Mazar AP, Fiocchi C. Angiogenesis blockade as a new therapeutic approach to experimental colitis. *Gut*. 2007 Jun; 56(6):855-862.
41. Shi XZ, Winston JH, Sarna SK. Differential immune and genetic responses in rat models of Crohn's colitis and ulcerative colitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2011 Jan; 300(1):G41-G51.
42. Scaldaferri F, Vetrano S, Sans M, Arena V, Straface G, Stigliano E, Repici A, Sturm A, Malesci A, Panes J, Yla-Herttuala S, Fiocchi C, Danese S. VEGF-A links angiogenesis and inflammation in inflammatory bowel pathogenesis. *Gastroenterology*, 2009 Feb; 136(2):585-95
43. Kumagai S, Ohtani H, Nagai T, Funa K, Hiwatashi NO, Shimosegawa, Nagura H. Platelet-Derived Growth Factor and its receptors are expressed in areas of both active inflammation and active fibrosis in inflammatory bowel disease. *Tohoku J Exp. Med*. 2001 Sep; 195(1): 21-33.
44. De Backer O, Lefebvre RA. Is There a Role for Imatinib in Inflammatory Bowel Disease? *Inflamm Bowel Dis*. 2008 Apr; 14(4):579-81.
45. Krzystek-Korpacka M, Neubauer K, Matusiewicz M. Platelet-derived growth factor-BB reflects clinical, inflammatory and angiogenic disease activity and oxidative stress in inflammatory bowel disease. *Clin Biochem*. 2009 Nov; 42(16-17):1602-9.
46. Sandor Z, Deng XM, Khomenko T, Tarnawski AS, Szabo S. Altered angiogenic balance in ulcerative colitis: a key to impaired healing? *Biochem Biophys Res Commun*. 2006 Nov 10; 350(1):147-50.
47. Clemente TR, Dos Santos AN, Sturaro JN, Gotardo EM, de Oliveira CC, Acedo SC, Caria CR, Pedrazzoli J Jr, Ribeiro ML, Gambero A. Infliximab modifies mesenteric adipose tissue alterations and intestinal inflammation in rats with TNBS induced colitis. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*. 2012 Sep; 8-9(47):943-50.

48. Dignass A, Lindsay JO, Sturm A. Second European evidence-based Consensus on the diagnosis and management of ulcerative colitis: Current management. *Journal of Crohns and Colitis* 2012.
49. D'Haens G, Sandborn WJ, Feagan BG. A review of activity indices and efficacy end points for clinical trials of medical therapy in adults with ulcerative colitis. *Gastroenterology* 2007;132:763-86.
50. Stange EF, Travis SPL, Vemeire S, et al. European evidence-based consensus on the diagnosis and management of ulcerative colitis definitions and diagnosis. *Journal of Crohn's and Colitis* 2008;2:1-23.
51. Hanauer SB, Sandborn WJ, Kornbluth A, Kartz S, Safdi M, Woogen S, Regalli G, Yeh C, Smith-Hall N, Ajayi F. Delayed-release oral mesalamine at 4.8g/day (800mg tablet) for the treatment of moderately active ulcerative colitis: the ASCEND II trial. *Am J Gastroenterol* 2005;100:2478-85.
52. Marteau P, Probert CS, Lindgren S, Gassul M, Tan TG, Dignass A, Befrits R, Midhagen G, Rademaker J, Foldager M. Combined oral and enema treatment with Pentasa (mesalazine) is superior to oral therapy alone in patients with extensive mild/moderate active ulcerative colitis:a randomised, double blind, placebo controlled study. *Gut* 2005;54:960-5.
53. Laharie D, Bourreille A. Branche J, Allez M, Bouhnik Y et al. Ciclosporin versus infliximab in patients with severe ulcerative colitis refractory to intravenous steroids: a parallel,open-label,randomized controlled trial. *Lancet* 2012;380:1909-1915.
54. Baran B, Kaymakoglu S.İnflamatuvar bağırsak hastalıklarında tümör nekrotizan faktör alfa antagonistleri ile tedavi. *Türkiye Klinikleri J Immunol Rheumatol-Special Topics* 2010;3(2):20-31.
55. Dayan B, Turner D. Role of surgery in severe ulcerative colitis in the era of medical rescue therapy. *World J Gastroenterol* 2012 August 7;18(29):3833-3838.
56. Ten Hove T, Van Montfrans C,Pepplenbosch MP, Van Deventer SJ. Infliximab treatment induces apoptosis of lamina propria T lymphocytes in Crohn's disease. *Gut* 2002;50:206-11.
57. Ford AC, Sandborn WJ, Khan KJ, Hanauer SB, Talley NJ, Moayyedi P. Efficacy of biological therapies in inflammatory bowel disease: systemic review and meta-analysis. *Am J Gastroenterol*. Apr 2011;106(4):644-659,quiz 660.
58. Rutgeerts P, Sandborn WJ, Feagan BG, Reinisch W, Olson A, Johanns J, Travers S, Rachmilewitz D, Hanauer SB, Lichtenstein GR, de Villiers WJ, Present D, Sands BE, Colombel JF. Infliximab for induction and maintenance therapy for ulcerative colitis. *N Engl J Med* 2005;353:2462-76.

59. Thaler KJ, Gartlehner G, Kien C, Van Noord MG, Tharkurta S, Wines RCM, Hansen RA, McDonagh MS. Drug Class Review: Targeted Immune Modulators. Final Update 3 Report. Oregon Health and Science University; March 2012.
60. Sakanoue Y, Hatada T, Horai T, Okamoto T, Kusunoki M, Utsunomiya J. Increased protein tyrosine kinase activity of the colonic mucosa in ulcerative colitis. *Scand J Gastroenterol*. 1992 Aug;27(8):686-90.
61. Drullion C, Tregoeat C, Lagarde V, Tan S. Apoptosis and autophagy have opposite roles on imatinib-induced K562 leukemia cell senescence. *Cell Death and Disease* 2012 Aug 16;3:e373.
62. Paniagua RT, Sharpe O, Ho PP, Chan SM, Chang A, Higgins JP, Tomooka BH, Thomas FM, Song JJ, Goodman SB, Lee DM, Genovese MC, Utz PJ, Steinman L, Robinson WH. Selective tyrosine kinase inhibition by imatinib mesylate for the treatment of autoimmune arthritis. *J Clin Invest*. 2006 October 2;116(10):2633-2642.
63. Droogendijk HJ, Kluin-Nelemans HJC, van Doormaal JJ, Oranje AP, van de Loosdrecht AA, van Daele PL. Imatinib mesylate in the treatment of systemic mastocytosis. A phase II trial *Cancer* 2006;107:345-51.
64. Shaker ME, Zalata KR, Mehal WZ. Comparison of imatinib, nilotinib and silymarin in the treatment of carbon tetrachloride-induced hepatic oxidative stress, injury and fibrosis. *Toxicol Appl Pharmacol* 2011 Apr 15;252(2):165-75.
65. Shaker ME, Shiha GE, Ibrahim TM. Comparison of early treatment with low doses of nilotinib, imatinib and a clinically relevant dose of silymarin in thioacetamide-induced liver fibrosis. *Eur J Pharmacol*. 2011 Nov 30;670(2-3):593-600.
66. Iyoda M, Shibata T, Hirai Y, Kuno Y, Akizawa T. Nilotinib attenuates renal injury and prolongs survival in chronic kidney disease. *J Am Soc Nephrol*. 2011 Aug;22(8):1486-96.
67. El-Agamy DS. Anti-allergic effects of nilotinib on mast cell-mediated anaphylaxis like reactions. *European Journal of Pharmacology* 680 (2012) 115-121.
68. Strober W, Fuss IJ, Blumberg RS. The Immunology of Mucosal Models of Inflammation. *Annu. Rev. Immunol.* 2002;20:495-549.
69. Vilaseca J, Salas A, Guarner F, Rodriguez , Martinez M, J-R Malagelada. Dietary fish oil reduces progression of chronic inflammatory lesions in a rat model of granulomatous colitis. *Gut*, 1990;31,529-544.

70. Dieleman LA, Palmen MJ, Akol H, Bloemena E, Pena AS, Meuwissen SG, Van Rees EP. Chronic experimental colitis induced by dextran sulphate sodium (DSS) is characterized by Th1 and Th2 cytokines. Clin Exp Immunol 1998;114:385-391.
71. Chevaux JB, Vavricka SR, Rogler G, Lakatos PL, Schoepfer A, Peyrin-Biroulet L. Mucosal Healing with Anti-TNF antibodies. Digestion 2012;86(suppl1):16-22.
72. Neurath MF, Travis SPL. Mucosal healing in inflammatory bowel diseases: a systematic review. Gut 2012;61:1619-1635.
73. Györgyi M, Bela M, Zsolt T, Ferenc S. Changes of the cytokine profile in inflammatory bowel disease. World J Gastroenterol 2012 November 7;18(41):5848-5861.