

DeneySEL Bağırsak Hasarının Önlenmesinde interferon a-2a'nın Rolü

THE ROLE OF IFN a-2a ON PREVENTING THE EXPERIMENTAL COLONIC DAMAGE

Abdulhalim BAKİ*, Yavuz TEKELİOĞLU**, Abdulkadir REİS***,
Mehmet SARI****, Sait KAPICIOĞLU*****

* Yrd.Doç.Dr., Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları AD, Gastroenteroloji BD,
** Yrd.Doç.Dr., Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları AD, Histoloji AD,
*** Doç.Dr., Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları AD, Patoloji AD,
**** Dr., Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları AD, Gastroenteroloji BD,
***** Prof.Dr., Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları AD, Gastroenteroloji BD, TRABZON

Özet

Bu çalışmada sıçanlarda asetik asitle oluşturulan bağırsak hasarında Interferon a-2a'nın hücreSEL düzeyde etkileri araştırıldı. Çalışma için 20 erkek sıçan kullanıldı. Hayvanlar 24 saat aç bırakıldı. 50 mg/kg pentobarbitals intraperitoneal (i.p.) anesteziye edildikten sonra 2 gruba ayrıldı. Grup 1: Bir milyon Unite/kg i.p. interferon a-2a (Roferon A flakon Roche) rekial infüzyondan 1 saat öncesine kadar 8 saat arayla 3 defa verildi. Bağırsak hasarı yumuşak bir kalelerin anüsten 10 cm itilip kalelerden 3 ml % 5'lik asetik asilin verilmesi, arkasından hava verilmesi ile oluşturuldu. Grup 2: Interferon <x-2a ile aynı volüüde sertini fizyolojik aynı zaman dilimlerinde i.p. verildi ve hasar oluşturuldu. Sıçanlar bağırsak hasarı oluşturulduktan 4 saat sonra öldürüldü. Kolon mukozasında patolojik ve "flowcytometric" analiz yapıldı. Makroskopik ve mikroskopik değerlendirmede gruplar arasında fark yoktu. Grupların "flowcytometric" analiz sonuçları: Grup 1(n=10) Interferon a-2a grubu; G1:53.9± 2.81, S:38.70±4.52, G2:7.4(±)2.64, PPO.46±0.02, Grup 2(n:10) kontrol grubu; G1:74.4±2.16, S:16.77±1.64, G2:6.86±1.34, PI:0.23±0.02. interferon a-2a grubunda sentez fazı (S) ve proliferasyon indeksinin (P!) arttığı (p<.001, p<.0005), G1 fazının azaldığı gözlemlendi (p<.0004). G2 fazında anlamlı değişiklik gözlenmedi. Bulgular interferonun doku hasarında, hücre yenilenmesini hızlandırdığı şeklinde yorumlanabileceği gibi hücre hasarını derinleştirerek proliferasyon indeksi ve sentez fazının artmasına neden olduğu şeklinde de yorumlanabilir.

Anahtar Kelimeler: Interferon a-2a, Sıçan, Asetik asit,
DeneySEL bağırsak hasarı

T Klin Gastroenterohepatol 1999, 10:93-96

Geliş Tarihi: 19.04.1999

Yazışma Adresi: Dr.Abdulhalim BAKİ
Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi
İç Hastalıkları AD
Gastroenteroloji BD
61080 TRABZON

Summary

In this study, the effects of interferon a-2a on the experimental colonic damage, which was created by acetic acid in rats, was researched at the cellular base. For this study. 20 male rats were used. The rats were not fed for 24 hours. They were seperated into two groups after being anesthetized by 50 mg/kg pentobarbital. Group 1: One million unit/kg Interferon a-2a (Roferon A flakon Roche) was given three times with 8 hoars intervals until one hour before rectal infusion. An intestinal damage was developed by pushing a soft catheter 10 cm from the anus giving 3 ml 5% acetic acid by this catheter, and pumping air afterwards. Group 2: Same amount of saline with interferon a-2a was given in the same time intervals and a damage was developed. The rats were killed four hours later as the colonic damage occurred. The pathologic and flowcytometric analysis were done in the colonic mucosa. There was no difference between the two groups in both micro and macro levels. The flowcytometric results of Groups: Group 1(n=10) interferon a-2a group; G1:53.9±2.81, S:38.70±4.52, G2:7.40±2.64, PI:0.46±0.02, Group 2(n:10) control group; G1:74.4±2.16, S: 16.77±1.64, G2:6.86±1.34, PF:0.23M1.02. In contrast to the control group, it was observed that the synthesis phase (S) and the proliferation index (PI) were increased (p<.001, p<.0005), the G1 phase was decreased (p<.0004). and G2 phase remained same in interferon a-2a group. In conclusion, there might be two comments on data produced the first comment might be that the interferon made the cell renew increase. The second comment might be that the interferon increased the cell damage and then caused an increase in the proliferation index and the synthesis phase.

Key Words: Experimental colonic damage, Rat,
Interferon a-2a

T Klin J Gastroenterohepatol 1999, 10:93-96

mim regülatuar rolleri de mevcuttur (3,4). İBH'da naturel killer (NK) hücresi ve periferik mononükleer hücre aktivitesinde azalma mevcuttur ve bu eksiklik interferon uygulamasından sonra normale dönmektedir (5-8). Bu bulgular interferonun İBH'nın tedavisinde yeri olabileceğini düşündürmektedir.

Bu çalışmada sıçanlarda asetik asitle oluşturulan deneysel bağırsak hasarında İnterferon α-2a'nın hücresele düzeyde etkileri araştırıldı.

Materyel ve Metod

Çalışma için 200-250 g ağırlığında 20 erkek sıçan kullanıldı. Hayvanlar sadece su içmelerine izin verilerek 24 saat aç bırakıldı. 50 mg/kg pentobarbitalle intraperitoneal (i.p.) anesteziye edildikten sonra 2 gruba ayrıldı. Grup 1: Bir milyon ünite/kg i.p. İnterferon α-2a (Roferon A flakon Roche) rektal infüzyondan 1 saat öncesine kadar 8 saat arayla 3 defa verildi. Bağırsak hasarı yumuşak bir kateterin anüsten 10 cm itilip kateterden 3 ml %5'lik asetik asitin verilmesi, arkasından hava verilmesi ile oluşturuldu. Grup 2: İnterferon α-2a ile aynı hacimde serum fizyolojik aynı zaman dilimlerinde i.p. verildi ve hasar oluşturuldu. Sıçanlar işlemden 4 saat sonra öldürüldüler. Kolonları histolojik ve "flowcytometric" analiz için çıkarılıp %10'luk formalinde saklandı.

Makroskopik ve mikroskopik değerlendirme: Anüsten itibaren 4 cm'lik bağırsak segmentinde oluşan lezyon sayısı değerlendirildi. Bu dokudan alınan 2 cm'lik bir kesit % 10 formalin içinde patoloji laboratuvarına gönderildi. Rutin takip aşamalarından sonra Hematoksilen Eosin ile boyanıp Olympus 3x50 Tip mikroskopla x100 büyütmede iki ayrı histopatolog tarafından değerlendirildi ve birbirini takip eden 6 ayrı alanda mukozal, submukozal lezyonların derinlik ve genişliği değerlendirildi.

Proliferatif aktivitenin "flowcytometry" ile ölçümü: Taze doku içinde medium (RPMI-1640 + 5% fetal calf serum) bulunan plastik petri kutusunda 4°C'de mekanik olarak parçalandı. Bu işlemden sonra süspansiyon 80µ boyutlu porları olan filtreden süzüldü ve içinde %0.1 triton x-100 PBS (fosfat tampon solüsyon) bulunan buzda 3 dakika bekletildi. Sonra yıkandı ve 37°C'de 20 dakika RNA'z ile inkübe edildi (180 U/mL PBS içinde). Yıkama

işlemden sonra hücre süspansiyonu propidiumiodide ile (50 µg/ml PBS içinde) 1 saat 4°C'de karanlıkta bekletildi ve "flowcytometric" analiz yapıldı (9,10).

"Flowcytometric " analiz (FCA) Epics Elite EST (Coulter-USA) "flowcytometry" aleti ile yapıldı. Hücrelerin G1, S, G2 fazları Multi Cycle DNA bilgisayar programı (Phoenix flow systems, Inc. San Diego) ile hesaplandı. Bu değerler proliferatif-rejeneratif indeks olarak yorumlandı (PI). PI; S fazı G2/M fazı toplamının G0/G1, S, G2/M toplamına bölümünün yüzde fraksiyonu olarak ifade edildi.

Sonuçlar ortalama ± SD olarak ifade edildi. İstatistiksel analiz Student t test ile yapıldı ve p<0.05 anlamlı olarak değerlendirildi.

Bulgular

Makroskopik değerlendirmede kolon mukozasında yer yer hiperemi dışında patoloji tespit edilmedi. Mikroskopik değerlendirmede submukozal damarlar çevresinde minimal iltihabi hücre infiltrasyonu mevcuttu. Gruplar arasında anlamlı fark tespit edilmedi. Grupların "flowcytometric" analiz sonuçları: Grup 1(n:10) interferon α-2a grubu; G1 :53.9±2.81, S:38.70±4.52, G2:7.40±2.64, **PI:0.46±0.02**, Grup 2(n:10) kontrol grubu; **G1:74.4±2.16**, S: 16.77±1.64, G2:6.86±1.34, PI:0.23±0.02. Kontrol grubuna göre İnterferon α-2a grubunda sentez fazı (S) ve proliferasyon indeksinin (PI) arttığı (p<0.001, p<0.005), G1 fazının azaldığı (p<0.0004), gözlemlendi. G2 fazında değişiklik gözlemlenmedi (Tablo 1, Şekil 1).

Tartışma

Bu çalışmada İFN-α-2a kullanılan sıçanlarda asetik asitle oluşturulan bağırsak hasarında sentez fazı (S) ve proliferasyon indeksinin (PI) kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı oranda arttığı gözlemlendi.

İnterferonun İBH patogenezmdeki rolü henüz açık değildir. İnterferonun tedavide etkisi olduğu kadar etkisizliğini de bildiren raporlar mevcuttur. İltihabi bağırsak hastalığında dolaşımda interferon saptanmıştır (1,2). İnterferonlar immün sistem hücreleri üzerine olan etkilerini hücre gelişim ve diferensasyonunu etkileyerek sağlarlar. İnterferonlar makrofajları aktive ederek onların antijen pre-

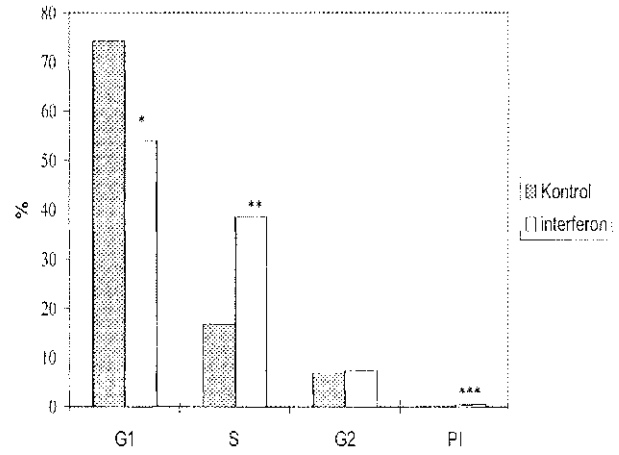
Tablo 1. Deneysel bağırsak hasarında interferon a-2a ve "flowcytometry" ilişkisi.

	Olı fazı	S fazı	G2 fazı	PI
Kontrol	74.4 ± 2.16	16.77 ± 1.64	6.86 ± 1.34	0.23 ± 0.02
Interferon oc-2a	53.9 ± 2.81*	38.70 ± 4.52**	7.40 ± 2.64	0.46 ± 0.02***

*p- 0.004 , **p< 0.001. ***p< 0.0005 kontrolden fark

zente eden özelliklerini, bakterisidal ve tümörosidal etkilerini arttırlar. Lenfosit üzerine olan etkileri doz ve uygulama zamanına bağlı olarak farklıdır. İnterferonlar lenfosit dışındaki hücrelerde diferensasyonunu arttırlar (11). İnterferonun antiviral etkinliği yanında, supressör T lenfositlerin sayısını azaltmak, hipergammaglobulinemi ve immün kompleks oluşumunu azaltmak gibi rolleri de mevcuttur (3,4). İBH'da NK hücresi ve periferik mononükleer hücre aktivitesinde azalma mevcuttur ve bu eksiklik interferon uygulamasından sonra normale dönmektedir (5-8). İBH'da insan intestinal mukozal mononükleer hücrelerinde IFN-γ üretiminin azaldığı gösterilmiştir (4). İnterferon aktif ülseratif kolit ve Crohn hastalarında periferik mononükleer hücrelerde 2'-5' oligoadenilat sentezini indüklemektedir. Ayrıca interferon bu hastalarda P-GE₂ sentezini doza bağlı olarak azaltmaktadır (12)."

İnterferon-gama T84 epitel hücrelerinin özelliklerini değiştirmektedir. TNF-α bu etkisini arttırmaktadır. İFN-γ TNF-α'nın reseptör sentezini arttırmaktadır. İBH'da İFN-γ ve TNF-α sinerjistik etki göstererek epitel fonksiyonunu değiştirmektedir (13). Th1 lenfositler İFN-γ, TNF-α, İL-13 gibi sitokinleri üreterek İBH'da bir orkestra gibi rol almaktadırlar. TNF-α'nın iki ayrı reseptörü keşfedilmiştir. Bu reseptörlere karşı geliştirilen anti-TNF antikolar İBH'nın kliniğinde dramatik düzelmeye yol açmaktadır (14). Herpes virus birlikte ülseratif kolit ve Crohn hastalığında uzun süreli İFN-α-2a tedavisinin erken başladığında hastalığın kronikleşmesini engelleyebileceği ve uzun süreli kullanım ile kanser gelişimini geciktirebileceği veya önleyebileceği idda edilmektedir (15). İBH'da inflame mukozada İFN-γ, TNF-α ve İL-2 aktivitesinin arttığı gösterilmiştir. TNF-α'nın İFN-γ yolu ile İL-2'nin direkt kolonik smıf-II anti-jen sentezini arttırdığı gösterilmiştir (16). Crohn hastalığında iuvivo interferon aktivasyonunun



*p< 0.004 , **p< 0.001. ***p< 0.0005 kontrolden fark

Şekil 1. Deneysel barsak hasarında İnterferon α-2a ve "flowcytometry" ilişkisi.

değerlendirildiği bir çalışmada lamina propriadaki mononükleer hücrelerde kontrol grubu ile karşılaştırıldığında İFN-γ ve İFN-α mRNA düzeylerinin arttığı gösterilmiştir (17). Başka bir çalışmada İFN-γ ve TNF-α aktif ülseratif kolitte artmış bulunmuştur. Bu sitokinler intestinal mukus üretimini hücre dökülmeye neden olarak regüle edebilirler. Bu sonuç zarar görmüş olan mukozanın kuvvetle korunmasını sağlamış olabilir (18). Lamina propriadaki T hücrelerin TGF-β₁ üretimi azaltılıp, İFN-γ üretimi arttırıldığında kolitin ortaya çıktığı, bunun tam tersi yapıldığında ise kolitin oluşmadığı gösterilmiştir (19). Bir çalışmada İFN-γ düzeyi aktif ülseratif kolit ve Crohn hastalığında kontrol grubu ile aynı bulunmuştur (20).

Yirmisekiz hasta üzerinde yapılan bir çalışmada 6-12 ay boyunca İFN-α-2a kullanan hastalarda iki yıldan daha uzun bir süre hastaların 26'sında klinik ve endoskopik iyilik halinin devam ettiği gösterilmiştir (21). Aktif Crohn hastalığı olan 18 hastada 12 haftalık İFN-α-2b tedavisi ile hastaların

%44'ünde tam remisyona gözlenmiş, 1 hastada parsiyel remisyona saptanmış ve hastaların hiçbirisinde tedaviyi kesmeyi gerektirecek yan etki oluşmamıştır (22). Beş Crohn hastası ile yapılan başka bir çalışmada İFN-a-2b tedavisi ile 2 parsiyel remisyona gözlenmiştir (23).

Buna karşılık aktif Crohn hastalığı olan 12 hasta üzerinde İFN-a-2a'nın etkinliğinin araştırıldığı bir çalışmada 24 haftalık tedaviyi 4 hastanın tamamlayabildiği ve bu hastaların hiçbirinde remisyona gözlenmediği, diğer hastaların tedaviye hiç cevap vermedikleri için tedaviyi erken kestikleri rapor edilmiştir, interferon İL-6 ve diğer akut faz reaktanları üzerine ve endoskopik aktivite üzerine iyileştirici bir etki göstermemiştir (24). Başka bir çalışmada steroid dirençli 3 Crohn hastasına 24 hafta boyunca uygulanan İFN-oc-2a tedavisi sonucunda 2 hastada hastalık aktivitesinde azalma olduğu, 1 hastada tedaviyle aktivitede azalma olmayınca 12.haftada tedaviyi kestiği rapor edilmiştir (25). Bu bulgular interferonun İBH'mda dual etkisi olduğunu düşündürmektedir.

Sonuç olarak İnterferonun doku hasarında, hücre yenilenmesini hızlandırdığı şeklinde yorumlanabileceği gibi hücre hasarını derinleştirerek proliferasyon indeksi ve sentez fazının artmasına neden olduğu şeklinde de yorumlanabilir.

KAYNAKLAR

- Anno A, Savilahti H, Tainio VM, Kicmola T. Immunohistochemical study of lymphoplasmacytic infiltrate and epithelial ILLA-DR expression in the rectal and colonic mucosae of children with ulcerative colitis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1989;8:172-80.
- Stalnikowicz R, Goder K, Karmeli F, Fiocchi C, and Rachmilewitz D. (2'-5') oligo adenilate synthetase activity in leucocytes of patients with inflammatory bowel disease. *Gut* 1985;26(6):556-61.
- Liebennan BY, Fiocchi C, Youngman KR, Sapatnekar WK, and Proffitt MR. Interferon gama production by human intestinal mucosal mononuclear cells. Decreased levels in inflammatory bowel disease. *Dig Dis Sci* 1988;33:1297-304.
- Hodgson ID, Wands JR, Isselbacher KJ. Decreased suppressor cell activity in inflammatory bowel disease. *Clin Exp Immunol* 1978;32(3):551-8.
- Kamoi S, Suzuki II, Yano Y, Sato M, Matsuo Y, Matsukuma N, Ikeda II. Immunological studies on the patients with Crohn's disease and new attempt of interferon treatment. *Jpn J Gastroenterol* 1989;86:189-93.
- Fiocchi C, Tubbs RR, Youngman KR. Human intestinal mucosal mononuclear cells exhibit lymphokine-activated killer cell activity. *Gastroenterology* 1985;88:625-37.
- Gibson PR, Jewel DP. Local immune mechanisms in inflammatory bowel disease and colorectal carcinoma. *Gastroenterology* 1986;90:12-19.
- Raddler A, Schreiber S. Immunology of ulcerative colitis. *Hepatogastroenterology* 1989;36:213-8.
- Bauer KD. DNA and nuclear antigen analysis of tissue specimens. 1987 Annual Course in Flow Cytometry, Applications in immunobiology and cell biology. Los Alamos NM, National Flow Cytometry Resource and Smith Kline and French Laboratories 1987.
- Riley RS, Mahin E.I.Ross W. DNA ploidy and cell cycle analysis, in *Clinical Applications of Flow Cytometry*, Eds Riley RS, Mahin RJ, Ross W. Igaku-Shoin New York-Tokyo 1993: 251-322.
- Stephan PJ The immune system. In: Willam SH, Fenton S, Edward JB Bockus, *Gastroenterology*. Philadelphia: WB Saunders. 1995; 3345-72.
- Rachmilewitz D, Karmeli F, Panet A. Interferon inhibits prostaglandin E2 synthesis and stimulates (2'-5') Oligoadenylate synthetase in peripheral blood mononuclear cells of inflammatory bowel disease. *J Interferon Res* 1985;5(4):629-35.
- Fish SM, Proujansky R, Reenstra W. Synergistic effects of interferon tinna and tumour necrosis factor alpha on T84 cell function. *Cyt* 1999;45:191-8.
- Baert FJ, Rutgeerts PR. Anti-TNF strategies in Crohn's disease: mechanisms, clinical effects, indications. *Int J Colorectal Dis* 1999;14:47-51.
- Ruther U, Nunnensiek C, Muller HA, Bader H, May U. Interferon alpha (IFN alpha 2a) therapy for herpes vims-associated inflammatory bowel disease (ulcerative colitis and Crohn's disease). *Hepatogastroenterology* 1998;45:691-9.
- Ilorie Y, Chiba M, Suzuki T, Kudo T, Kamata A, Lizuka M, Masamune O. Induction of major histocompatibility complex class II antigens on human colonic epithelium by interferon-gamma, tumor necrosis factor-alpha, and interlenkin-2. *Gastroenterol* 1998;33:39-47.
- Fais S, Capobianchi MR, Silvestri M, Mercuri F, Pallone F, Dianzani F. Interferon expression in Crohn's disease patientsuncreased interferon-gamma and -alpha mRNA in the intestinal lamina propria mononuclear cells. *J Interferon Res* 1994,14:235-8.
- Jarry A, Muzeau F, Laboisse C, Cytokine effects in a human colonic goblet cell line. Cellular damage and its partial prevention by 5 aminosalicilic acid. *Dig Dis Sci* 1992;37(8): 1170-8.
- Ludviksson BR, Ehrhardt RO, Strober W. TGF-beta production regulates the development of the 2,6,6 trinitrophenol-conjugated keyhole limpet hemocyanin-induced colonic inflammation in IL-2 deficient mice. *J Immunol* 1997; 159(7):3622-8.
- Nakamura M, Saito II, Kasanuki J, Tamura Y, oshida S. Cytokine produuetion in patients with inflammatory bowel disease. *Gut* 1992 ;33(7):933-7.
- Sumer N, Palabiyikoglu M. Induction of remission by interferon-alpha in patients with chronic active ulcerative colitis. *Eur J gastroenterol Hepatol* 1995 Jul;7:597-602.
- Hanauer SB, Baert FJ, Robinson M. Interferon treatment in mild to moderate active Crohn's disease: Preliminary results of an open label pilot study. *Gastroenterology* 1994 (106)A696.
- Davidsen B, Munkholm P, Schlichting OIL Study of tolerability and efficacy of interferon alfa-2b treatment of Crohn's disease: A pilot study. *Gastroenterology* 1994 (106)A670.
- Gasche C, Reinisch W, Vogelsang II, Potzi R, Markis E, Micksche M, With HP, Gangl A, Lochs H. Prospective evaluation of interferon-alpha in treatment of chronic active Crohn's disease. *Dig Dis Sci*. 1995;40:800-4.
- Wirth HP, Zala G, Mayanberger C, Jost R, Ammann R, Munch R. Alpha-interferon therapy in Crohn's disease: initial clinical results. *Sehwitz Med Wochensshr* 1993;13:1384-8.