

Sıçanlardaki asetik asit kolitinde diltiazemin etkisi

The role of diltiazem on acetic acid induced colitis in rats

Dr. A. Ömer ÖZÜTEMİZ¹, Dr. Belkıs ÜNSAL², Dr. Murat ALKANAT³, Dr. Kadir AKSÖZ², Dr. Çiğdem DİNÇER¹, Dr. Yücel BATUR¹

Ege Üniversitesi Tip Fakültesi Gastroenteroloji¹ Bilim Dalı, İzmir Atatürk Devlet Hastanesi Gastroenteroloji Kliniği², Ege Üniversitesi Tip Fakültesi Patoloji³ Anabilim Dalı, İzmir

ÖZET: İltihabi barsak hastalığında prostaglandinler mukoza koruyucu, oysa leukotrienler (LT) proinflamatuarıdır. Yeni bulgular LT'lerin oluşum ve etkilerinin kalsiyuma bağlı, prostaglandinlerin ise bağımlı olmadığını göstermiştir. Bir kalsiyum kanal blokeri olan verapamilin sıçanlardaki deneysel kolitte mukoza koruyucu etkisi vardı. Bu çalışmada diğer bir tip kalsiyum kanal blokeri olan diltiazem (DLTZ), sıçanlarda geliştirilen asetik asite (AA) bağlı deneysel kolitte terapötik etkisi araştırılmıştır.

Metotlar: Erkek Swiss Albino sıçanlar dört gruba ayrılmışlardır ($n=10$). I-Sıçanlara 1 ml %4 AA rektal yolla verilmiştir. II-AA. verilmeden önce 7 gün boyunca 2 mg/kg dozda im olarak DLTZ verilmiştir. III- AA verilmeden önce 7 gün boyunca 2 mg/kg dozda DLTZ ek olarak 5 mg/kg indometacin sc. yolla verilmiştir. IV. grupta sıçanlara sadece rektal yolla 1 ml. serum fizyolojik verilmiştir. 2 gün sonra sıçanlar sakrifiye edilmişler ve distal kolonları çıkarılarak makroskopik olarak skorlanmıştır (Normal: grade 1, şiddetli: 4) ve doku myeloperoxidaz (MPO) aktivitesi tayin edilmiştir. Sadece serum fizyolojik verilenlerde makroskopik hasar olusmazken, AA verilen birinci grupta mukozal hasar, ikinci ve üçüncü gruplara göre anlamlı olarak fazla gelişmiştir ($p>0,01$). MPO aktivitesi ise birinci grupta belirgin olarak yüksek saptanırken, ikinci ve üçüncü gruptarda birinci gruba göre anlamlı olarak düşük saptanmıştır ($p>0,01$).

Sonuç olarak; sıçanlarda AA ile oluşturulan kolitiste diltiazem, koruyucu bir rol oynamıştır. Endojen prostaglandin biosentezinin inhibityonunun bu koruyuculuk üzerine etkisi yoktur.

Anahtar Kelimeler: Asetik asit koliti, diltiazem, indometacin

İLTİHABI barsak hastalığının (İBH)ının kesin olarak nedeni halen bilinmemekle birlikte araşışonik asit metabolitlerinin patogenezde önemli roller oynadıkları konusunda giderek artan bilgi birikimi vardır (1-3). Son yıllarda prostaglandinlerin barsak mukozası üzerine koruyucu etki gösterdikleri, buna karşın diğer bir araştıdonik asit metaboliti olan lökotrienlerin mukoza üzerine zararlı

SUMMARY: In inflammatory bowel disease, prostaglandins are mucosal protective whereas leukotrienes (LT) are proinflammatory. Recent evidence suggests that the formation and action of LTs are calcium-dependent, whereas the formation and action of prostaglandins are not. A calcium channel blocker, verapamil, had a mucosal-protective effect experimentally induced colitis in rats. In this study we examined the role of another type of calcium channel blocker, diltiazem (DLTZ), as a therapeutic agent on acetic acid (AA)-induced colitis in rats.

Methods: Male Swiss Albino rats were divided into the 4 groups ($n=10$). I-Rats were administered 1 ml 4% AA intrarectally, II-DLTZ was given i.m., in a dose of 2 mg/kg, for 7 consecutive days before instillation of AA, III-DLTZ was given im, in a dose of 2 mg/kg plus indometacin 5 mg/kg s.c., for 7 consecutive days before instillation of AA. In group IV rats were administered 1 ml of saline alone intrarectally.

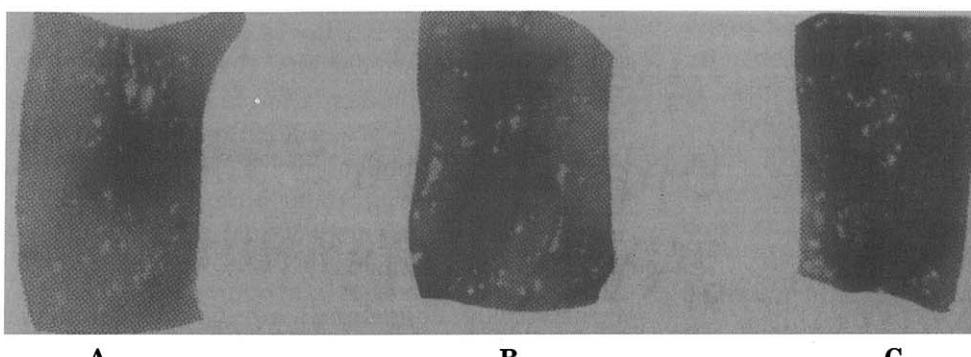
The rats were sacrificed two days later and the distal colons were scored (normal:grade 1, severe: 4) macroscopically and tissue myeloperoxidase (MPO) activity was determined.

Results: While no macroscopic injury occurred in group fourth, mucosal injury occurred in the first-group more than the second and third groups and was statistically meaningful ($p>0,01$). While MPO activity was markedly high in the first group, it was found low in the second and third groups according to the first group which was statistically meaningful ($p<0,01$).

In conclusion: Diltiazem plays a protective role on AA-induced colitis in rats. Inhibition of endogenous PG biosynthesis has no effect on this protection.

Key Words: Acetic acid induced colitis, diltiazem, indometacin

etkileri olduğu gösterilmiştir (4). Gerçekten de İBH'lı olguların indometasin kullandıklarında bu ilaçın prostaglandin inhibe edici etkisi nedeni ile hastalıklarının ağırlaşabildiği gözlenmiş, benzer olarak deneysel hayvan modellerinde de aynı durum söz konusu olup, dışardan verilen uzun etkili prostaglandin analogları ile mukozal hasar azaltılmıştır (5). Ayrıca lökotrien sentezinin azaltılması ile deneysel kolitte iyileşme hızlandırılmıştır.



Şekil 1. Sıçanlarda gelişen makroskopik kolon lezyonlarından bazı örnekler:
A- serum fizyolojik, B-diltiazem, C- asetik asit verilen gruba ait kolon örnekleri.
C'de yaygın hemorajî ile birlikte giden ciddi lezyonlar saptanırken, kısmen korunan B'de lezyonlar belirgin olarak azdır.

miştir (6). Araşidonik asitten 5-lipooksijenaz enzimi ile gerçekleşen lökotrien sentezi üzerine kalsiyum iyonlarının etkisi iyi bilinmektedir (7). Yapılan birçok çalışmada bu enzimin kalsiyuma bağımlı olduğu ve adenozin trifosfata gereksinim duyduğu ortaya konmuştur (8-10). Lökositler gerekli deneyel şartlar altında uyarıldıklarında sitozolik fraksiyonda bulunan 5-lipooksijenaz enzimi, hücre membranına transloke olur, daha sonra ise membranda bulunan 5-lipooksijenaz aktive edici protein ile bireleşerek, ortamda kalsiyumun varlığı halinde hücre içinde lökotrien sentezini başlatır (11,12). Kolon mukozasında yer alan makrofajlarda, 5-lipooksijenaz aktivitesi için membrandan araşidonik asitin salınması ve intraselüler kalsiyum düzeyinin yükselmesi gerekmektedir. Fakat cyclo-oksjenaz (prostaglandin sentezi için gerekli olan) enzim aktivitesi kalsiyuma bağımlı değildir (13). Buradan yola çıkan Fedorak ve arkadaşları (7) bir kalsiyum kanal blokeri olan verapamil ile önceden tedavi ettikleri sıçanlarda, geliştirdikleri deneyel kolitin hafifletileceğini göstermişlerdir. Biz de bu çalışmamızda diğer bir kalsiyum antagonisti olan diltiazem, sıçanlarda geliştirilen asetik asite (AA) bağlı deneyel kolit modelinde koruyucu rolünü araştırmayı amaçladık.

GEREC VE YÖNTEM

Hayvanlar: Çalışmada Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Merkezi'nden temin edilen 40 adet erkek Swiss Albino sıçan kullanılmıştır. Ortalama 200-250 gr ağırlığındaki sıçanlar 10'ar hayvanlık dört gruba ayrılmışlar ve deney sonuna kadar dört ayrı kafeste tutulmuşlardır. Sıçanların hepsinin günlük temizlikleri yapılmış ve gaitalarını yememeleri için kafes altına ağ şeklinde delikli tel sistemi yerleştirilmiştir. Tüm gruplar standart sıçan yemi ile beslenmişlerdir. Rektal yolla AA veya serum fizyolojik verilmesinden 12 saat önce yem verilmesi kesilmiş ve sadece su içmelerine izin verilmiştir. kolit geliştirilmesi aşağı-

da özetlenmiştir:

Grup I: Sıçanlar hafif eter anestezisi altında iken yumuşak 8 mm'lik pediatrik sonda anüsten sokularak 6 cm ileriye uzanacak şekilde yerleştirilmiştir. Hayvanlar bu işlem sırasında trendelenburg pozisyonuna getirilerek %4'lük asetik asit çözeltisinden (pH:2.3) 1 ml yavaş bir şekilde intrarektal enjekte edilmiştir. Asitin dışarı kaçmaması için sıçan baş aşağı pozisyonunda 30 saniye süreyle tutulmuş ve verilen asetik asit çözeltisinin kalabilen kısmı elden geldiğince geri alınacak şekilde yavaş olarak aspire edilmiştir. Bu işlemin ardından pH'sı 7 olan fosfat tampon sisteminden 2 ml intrarektal olarak uygulanmıştır (14).

Grup II: Bu gruptaki hayvanlarda aynı birinci grupta olduğu gibi AA koliti gelişirilmiş, fakat bu işlemden önceki yedi gün boyunca 2 mg/kg dozda diltiazem (Mustafa Nevzat İlaç, İstanbul) her gün i.m. yolla verilmiştir.

Grup III: Aynı ikinci gruptaki işlemler yapılmış diltiazeme ek olarak bunlara her gün 5 mg/kg doza indometacin (Deva İlaç, İstanbul) s.c. yolla uygulanmıştır.

Grup IV: Bu hayvanlara rektal yolla AA yerine sadece 1 ml serum fizyolojik verilmiş, başkaca işlem uygulanmamıştır.

Her dört gruptaki sıçanlar rektal AA veya serum fizyolojik uygulamasından 48 saat sonra aşırı doz eter ile sakrifiye edilmişlerdir bu süre içerisinde normal yemlerini yemelerine izin verilmiştir. Daha sonra karınları pubisten göbek hizasına kadar makasla kesilerek rektum mümkün olan en distal kısımdan kesilip çıkarılmıştır. Daha sonra buradan itibaren 10 cm'lik kolon segmenti çıkarılmıştır. Çıkarılma sırasında kolon içerisindeki feces mümkün olduğu kadar el ile sıvazlanarak temizlenmiş ve serum fizyolojikle ykanarak kurutulmuştur. Rektuma en yakın olan 5 cm'lik kısım patolojik değerlendirme için ıslak bir sargı bezile

Tablo 1. Deney gruplarındaki hayvanların kolon dokusu hasar dereceleri ve myeloperoksidaz enzim aktiviteleri

| Gruplar | MPO U/g. Yaş ağırlık | Makroskopik skor |
|---------------------|-------------------------|---------------------|
| I- AA | 19.8 ± 2.7 (a) | 3.74 ± 0.32 (a) |
| II-DLTZ+AA | 3.4 ± 1.0 (b), (d) | 1.42 ± 0.23 (c) |
| III-DLTZ+ | 5.5 ± 1.7 (b), (d) | 1.57 ± 0.28 (c) |
| Indometasin.+AA | | |
| IV-Serum Fizyolojik | 0.8±0.04 | 1.00 |

AA: Asetik asit, DLTZ: Diltiazem, MPO: Myeloperoksidaz enzim aktivitesi. Sonuçlar ortalama ± SEM olarak sunulmuştur.

(a): Grup IV'e göre anlamlı ($p<0.001$), (b): Grup I'e göre anlamlı ($p<0.001$), (c): Grup I'e göre anlamlı ($p<0.01$), (d): Grup IV'e göre anlamlı ($p<0.05$).

döşenmiş petri kutusuna numaralandanarak alınmıştır. Sonraki 5 cm'lik kısım myeloperoksidaz (MPO) değerlendirmesi için ayrılmıştır. MPO aktivitesi için ayrılan parça ise hemen çalışılmıştır.

Kolon inflamasyonunun ve hasarının değerlendirilmesi: Patolojik değerlendirme aynı patolojik tarafından, gönderilen kolon örneklerinin hangi gruba ait olduğundan haberi olmaksızın değerlendirilmiştir. Histopatolojik değerlendirmede rutin hematoksilen eozin boyaması ile mukozal hücre infiltrasyonuna dikkat edilmiş ve makroskopik değerlendirme ile birlikte skorlama 1 den 4. dereceye kadar yapılmıştır (14). Buna göre: Normal mukoza (derece 1), dağınik erozyonlar (2. derece), diffüz iltihaplı doku yanında 5 mm'den daha az ülserasyonlar (3. derece), diffüz ülserasyonlar, 6 mm'den daha büyük, (4. derece), sikatriz edici ülserler 2. ve iyileşmekte olan ülserler 3. derecede nitelendirilmişlerdir.

MPO enzim aktivitesinin ölçülmesi: Her iki gruptaki sıçanların eter ile sakrifiye edilmesi sonrası elde edilen kolon örnekleri MPO aktivitesi için bekletilmeden çalışılmıştır. Dokuda MPO tayini Krawisz ve arkadaşlarının (15) tarif ettikleri yöntemle göre yapılmıştır. Bunun için 200-400 mg⁻¹ yaş doku örneği 1 ml HTAB (hexadecyltrimethylamonyumbromid) tamponu içinde politron homojenizatör (B. Braun Melsungen) kullanılarak 30 sn. buz içinde homojenize edilmiştir. Homojenizatör 2 defa 1 ml'lik HTAB tamponu ile yılanarak homojenat bir test tüpünde toplanmıştır. Daha sonra 10 sn süpersonik karıştırıcıda karıştırılmıştır. Daha sonra 3 defa dondurulup çözülmüş ve 40.000 gravitede 15 dakika soğukta (+4°C) santrifüj edildikten sonra süpernatanttan çalışma yapılmıştır. Bunun için 0.1 ml süpernat 2.9 ml reaksi-

yon karışımı ile karıştırılır ve 430 nm'de, 3 dakika süreyle absorbansın değişimi ölçülmüştür. 1 ünite MPO, 25°C'da 1 dakikada harcanan 1 μmol H₂O₂ olarak verilmiştir. Çözeltiler: Reaksiyon karışımı = 50 mM fosfat tamponu pH 6; 0,167 mg/ml O-dianisidine hidrochlorid; %0,0005 H₂O₂ (taze hazırlanır). HTAB= %0,5 HTAB, 50 mM pH: 6 fosfat tamponu ile hazırlanmıştır.

İstatistiksel değerlendirme: Gruplar arasında farklılık olup olmadığı Student t testi ile değerlendirilmiştir.

SONUÇLAR

Rektal yolla sadece serum fizyolojik verilen sıçanlarda makroskopik olarak hasar oluşmaz iken, AA verilen birinci grupta mukoza ve submukozada (az bir miktarda musküleris tabakasında) belirgin iltihabi reaksiyon gelişmiştir, bu gruptaki hayvanlarda 48 saat boyunca adinami ve zaman zaman da kanlı ishal gözlenmiştir. İkinci ve üçüncü gruplarda ise mukozal hasar birinci gruba göre anlamlı olarak daha az olmuştur (sırasıyla $t=5.887$, $p<0.05$, $t=5.103$, $p<0.01$, Şekil 1). İkinci ve üçüncü ve dördüncü gruplar arasında istatistiksel fark yoktur. MPO enzim aktivitesi ise birinci grupta belirgin olarak yüksek saptanırken, ikinci ve üçüncü gruplarda birinci gruba göre anlamlı şekilde düşük saptanmıştır (sırasıyla $t=5.696$, $p<0.001$, $t=4.482$, $p<0.001$). İkinci ve üçüncü gruplar arasında anlamlı fark saptanmazken, bu gruplar dördüncü gruba göre daha yüksek MPO aktivitesi göstermişlerdir (sırasıyla $t=2.598$, $p<0.05$, $t=2.744$, $p<0.05$). Sonuçlar tablo 1'de toplu olarak sunulmuştur.

TARTIŞMA

Çalışmamızda sıçanlarda AA ile kolit oluşturulmadan önce yedi gün süre ile i.m. yolla uygulanan diltiazem, kolon hasarını makroskopik olarak belirgin şekilde azaltmıştır. AA kolit modelinde sıçanlarda gelişen lezyonlar insanlardaki ülseratif kolitte görülen histopatolojik değişikliklere oldukça benzemektedir (2). Bununla birlikte bu modelin de ülseratif kolitten önemli farklılıklar da vardır. Asetik asit koliti akut olarak gelişmekte ve sürelle iyileşmeye eğilim göstermektedir. Histopatolojik olarak görünümde akut iltihab egemendir, oysa ki ülseratif kolit daha yavaş olarak ortaya çıkar ve yavaş iyileşir, histopatolojik tablo ise akut ve kronik iltihab elemanlarının değişik şekillerde bir araya gelmesi ile oluşur. Biz bu çalışmamızda bu modeli özellikle seçtiğimiz因为, 1. etkisini test et-

mek istediğimiz kalsiyum kanal blokeri bir ilaç olan diltiazemin, daha önce belirttiğimiz gibi verapamile (7) benzer olarak (kalsiyuma bağlı bir enzim olduğu bilinen 5-lipoksigenaz aktivitesini azaltarak) kolitte koruyucu rol oynayıp oynamadığını test etmek istiyorduk, bu şekilde verapamilin kalsiyum kanal antagonist olma özelliği dışındaki olası bir etkisi olup olmadığı sorusuna da yanıt bulabildirdik. 2. sıçanların asetik asit kolitinde araşidilik asit metabolizması, iltihabi barsak hastalığı olan hastalardaki duruma çok benzemektedir (1,2,16). Diltiazem makroskopik hasarı azaltması yanında, buna paralel olarak MPO enzim aktivitesini de anlamlı olarak azaltmıştır. Bilindiği gibi bu enzim esas olarak PMN lökositlerde bulunmakta ve kolon dokusundaki enzim aktivitesi dokunun PMN hücreler ile infiltrasyonunun derecesi ile yakından ilişkili bulunmakta ve genellikle makroskopik skorlandırma ile ilişkili sonuçlar vermektedir (15). Bundan dolayı gözlemci hatalarından kısmen de olsa kaçınmak amacıyla ayrıca mikroskopik skorlandırma yapılmamıştır.

Kalsiyum kanal blokerlerinin keşfi kardiyovasküler hastalıkların tedavisinde önemli bir aşama olmuştur. Alt özofagus sfinkter basincını anlamlı şekilde düşüren kalsiyum kanal blokerleri, son yıllarda akalazya ve diffüz özofageal spazmli olgularda alternatif bir tedavi şekli olarak gastroenteroloji pratigine de girmişlerdir (17). Bu ilaçlar kimyasal olarak 4 ana grupta toplanırlar ve bu yazda ayrıntılarına girilmeyecek mekanizmalar ile hücrelerde kalsiyum kanallarını bloke ederler. Özellikle düz kas ve nöronlarda yoğun olarak bulunan kalsiyum kanalları 1-potansiyel bağlı kanallar (PDCs) ve 2-reseptör kullanan kanallar olarak (ROCs) iki ana gruba ayırlırlar. Tipik kalsiyum kanal blokerleri düşük dozlarda PDCs'ı bloke ederken yüksek dozlarda ROCs'ı da bloke edebilirler (18). Genel olarak kalsiyum kanal blokerleri benzer etkiler gösterirken herbir grubun etkileri diğerinden farklıdır. Düz kaslar üzerine güçlü kas gevşetici özelliğinden ötürü nifedipin, gastrointestinal sistem üzerine etkileri en sık araştırılan kalsiyum kanalblokeri olmuştur. Son yıllarda diltiazemin gastrointestinal sistem üzerine olan etkileri de daha yoğun şekilde incelenmeye başlanmıştır (19).

Çalışmamızda diltiazem dozu 2 mg/mg/gün keyfi olarak seçilmiştir, çünkü adı geçen ilacın deneysel kolitte rolünü inceleyen başkaca bir çalışmaya literatürde rastlanmamıştır. Genel tıpta diltiazem dozunun yaklaşık verapamilin yarısı kadar olduğu düşünülerek böyle bir seçim yapılmıştır. Fedorak ve arkadaşlarının (7) çalışmasında verapamilin

i.m. yolla kullanıldığı gözönüne alınarak, diltiazem de i.m. yolla bahsedilen çalışmada olduğu gibi kolit geliştirilmesinden önceki 7 gün boyunca verilmiştir. Fedorak ve arkadaşlarının (7) çalışmada MPO enzim aktivitesi, makroskopik kolon hasarı yanında, kolon dokusunun sıvı absorpsiyon derecesi ve doku leukotrien B4 (LTB4) düzeyleri ile prostaglandin E2 (PGE2) düzeyleri de tayin edilmiştir. Biz elimizde yeterince olanak olmadığı için doku PG ve LT düzeylerini tayin edemedik, ancak onlardan farklı olarak ikinci bir deney grubu oluşturduk ve bu gruba her gün endojen prostaglandin sentezini inhibe edici dozda indometasini s.c yolla (20) vererek, diltiazem ile birlikte azalmış prostaglandin düzeylerinin etkisini bir arada inceledik. Verapamil (7) çalışmada, bu ilacın AA kolitinde LTB4 düzeylerini azalttığı, PGE2 düzeylerini artttığı ve makroskopik hasarı engellerken, kolonik sıvı absorbsiyonunu artttığı gösterilmiştir. Verapamil ile birlikte prostaglandin analogu verildiğinde korunma genel olarak daha iyİ olmuştu. Bizim çalışmamızda endojen prostaglandin sentezinin azaltılması diltiazemin koruyucu etkisi üzerine anlamlı bir etki göstermemiştir. Bu sonuca göre (dokuda leukotrien tayini yapamamış olmakla birlikte) diltiazemin etkisinin prostaglandinlerden bağımsız olduğunu söyleyebilir ve etkisini esas olarak leukotrienleri azaltarak gösterdiği şeklinde spekülaysyonda bulunabiliriz. Bu yazının giriş kısmında da kısmen dechinildiği üzere kalsiyum kanal blokerleri eicosanoid biyosentezini etkilerler. Verapamil ve nifedipin sıçanlarda basofil lösemi hücrelerinde leukotrien sentezini inhibe eder (21). Verapamil sıçanlarda gerek stres gerekse de alkolle oluşturulan akut gastrik mukoza lezyonharını dokuda PGE2 ve 6-ketoPGF1 α düzeylerini arttırarak "sitoprotektive" rol oynar (22,23).

Barret ve arkadaşları (13) tavşan kolonundaki makrofajlarda 5-lipoksijenaz aktivitesi için intraselüler kalsiyuma gereksinim olduğunu, buna karşın ise cyclooxygenaz yolu için intraselüler kalsiyum artışının gereklidğini göstermişlerdir. Bizim sonuçlarımız da yukarıda tartışıldığı şekilde bu sonucu indirekt olarak (dokuda eicosanoid tayini yaplamadığı için) desteklemektedir. Esas olarak etkisini gastrointestinal düz kas üzerine gösterdiği bilinen kalsiyum kanal blokerlerinin motilité azaltıcı etkisinin bizim çalışmamızda ne rol oynadığı sorusuna cevap veremiyoruz. Bu soru diğer araştırmacılar tarafından da sorulmamış ve daha çok eicosanoid metabolizması üzerinde durmuştur. Ancak bilindiği gibi irritabl barsak send-

romunda kullanılması önerilen ve gastrointestinal traktusa seçici olarak etki yaptığı bildirilen bir diğer grup kalsiyum kanal blokeri olan pinaverium bromidin iltihabi barsak hastalığında kullanılması önerilmemektedir (24).

Burada referans olarak belirttiğimiz kalsiyum kanal blokerlerinin kolon hasarı üzerine olan etkisini araştıran birçok çalışmada ilaçlar parenteral yolla kullanılmışlardır. Acaba bu ilaçlar deney hayvan-

KAYNAKLAR

1. Sharon P, Stenson WF. Enhanced synthesis of leukotriene B4 by colonic mucosal inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 1984; 86:453-460.
2. Sharon P, Stenson WF. Mechanism of arachidonic acid in acetic acid colitis in rat: similarity to human inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 1985; 88:55-63.
3. Peskar BM. Eicosanoids in inflammatory bowel disease and their pharmacological modulation. In: *Inflammatory Bowel Disease. Falk Symposium 60: Progress In Basic Research and Clinical Implications.* (Ed: Goebell H, Malchow H, Ewe K, Koelbel CH). Kluwell Academic Publishers, London, 1991, pp:169-178.
4. Rampton DS. Functional aspects of eicosanoids in inflammatory bowel disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1989; 1:145-149.
5. Fedorak RN, Empey LR, Mac Arthur C, Jewell LD. Misoprostol provides a colonic mucosal protective effect during acetic acid-induced colitis in rats. *Gastroenterology* 1990; 98:615-625.
6. Wallace JL, Mac Naughton WK, Morris GP, Beck PL. Inhibition of leukotriene synthesis markedly accelerates healing in a rat model of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 1989; 96:29-36.
7. Fedorak RN, Empey LR, Walker K. Verapamil alters eicosanoid synthesis and accelerates healing during experimental colitis in rats. *Gastroenterology* 1992; 102:1229-1235.
8. Samuelsson B. Leukotrienes: mediators of immediate hypersensitivity reactions and inflammation. *Science* 1983; 220:568-575.
9. Ochi K, Yoshimoto T, Yamamoto S, et al. T. Arachidonate 5-lipoxygenase of guinea pig peritoneal polymorphonuclear leukocytes. Activation of adenosine 5'-triphosphate. *J Biol Chem* 1983; 258:5754-5758.
10. Ueda N, Kaneko S, Yoshimoto T, Yamamoto S. Purification of arachidonate 5-lipoxygenase from porcine leukocytes and its reactivity with hydroperoxyeicosatetraenoic acids. *J Biol Chem* 1986; 261:7982-7988.
11. Dixon RAF, Diehl RE, Opas E, et al. Requirement of a 5-lipoxygenase-activating protein for leukotriene synthesis. *Nature* 1990; 343:282-284.
12. Miller DK, Gillard JW, Vickers PJ, et al. Identification and isolation of a membrane protein necessary for leukotriene production. *Nature* 1990; 343:278-281.
13. Barret TA, Musch MW, Vaitla R, et al. Differential regulation of lipoxygenase and cyclooxygenase metabolism of arachidonic acid in isolated rabbit colonic macrophages (abstr.). *Gastroenterology* 1989; 93:A29.
14. Mac Pherson B, Pfeiffer CJ. Experimental colitis. *Digestion* 1976; 14:424-452.
15. Krawisz JE, Stenson WF. Quantitative assay for acute intestinal inflammation based on myeloperoxidase activity. *Gastroenterology* 1984; 87:1344-1350.
16. Boughton-Smith NK, Hawkey CJ, Whittle BJR. Niosynthesis of lipoxygenase products from (14C) - arachidonic acid by human colonic mucosa. *Gut* 1983; 24:1175-1182.
17. Castell DO. Calcium-channel blocking agents for gastrointestinal disorders. *Am J Cardiol* 1985; 55:210B-213B.
18. Christen MO. A new class of calcium antagonist selective for the GI tract. In: *Calcium Antagonists in Gastroenterology.* (Eds: MO Christen, R. Paoletti), Kluwer Academic Publishers, printed in Netherland, pp: 53-63, 1993.
19. Özütemiz AÖ, Tekeşin O, İlter T, et al. Diltiazemin interdigestif safra kesesi volumü ve postprandiyal safra kesesi boşmasına etkileri. *Gastroenteroloji* 1993; 4:279-283.
20. Özütemiz AÖ, Batur Y, Aydin A, et al. A. Dopamin ve dobutaminin sıçanlarda geliştirilen etanole bağlı gastrik mukozal hasar üzerine koruyucu rolleri. *Gastroenteroloji* 1993; 4:306-310.
21. Levine L. Inhibition of the A-23187-stimulated leukotriene and prostaglandin biosynthesis of rat basophil leukemia cells by nonsteroidal antiinflammatory drugs, anti-oxidants, and calcium channel blockers. *Biochem Pharmacol* 1983; 32:3023-3026.
22. Auguste LJ, Sterman HR, Stein TA, et al. Effects of verapamil on the gastric mucosal level of PGE2 during stress. *J Surg Res* 1990; 49:34-36.
23. Mach T, Fukuda T, Arakawa T, Tarnawski A. The role of prostaglandins and calcium in protection of gastric surface epithelial cells by verapamil. *Gastroenterology* 1991; 100:A116.
24. McCallum R. Therapeutic application of calcium antagonists in gastroenterology. In: *Calcium Antagonists in Gastroenterology.* (Eds: MO Christen, R. Paoletti), Kluwer Academic Publishers, printed in Netherland, pp:41-51, 1993.