

Sıçanlarda Oluşturulan Deneysel İntestinal Reperfüzyon Modelinde Curcuminin Hasar Önleyici Etkileri

Effects of Curcumin in Experimental Intestinal Ischemia Reperfusion Model on Rats

ADEM KARABACAK, ABDULLAH BAHADIR ÖZ, MUHAMMET AKYÜZ, HIZIR YAKUP AKYILDIZ, ALPER CELAL AKCAN, ERDOĞAN MÜTEVELLİ SÖZÜER, ENGİN OK
Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Genel Cerrahi Ana Bilim Dalı, Kayseri - Türkiye

ÖZET

Amaç: Çeşitli organlarda iskemi reperfüzyon (İ-R) hasarına karşı etkili olan curcuminin (CUR) intestinal İ-R modelinde etkilerini araştırmak.

Yöntemler: Çalışmada 24 adet Wistar-Albino tipi sıçan kullanıldı. Üç grup oluşturuldu. Sham grubunda laparotomiye takiben 105 dk gözlem sonrası sakrifiye edildiler. Kontrol grubuna 45 dakika iskemi, 60 dakika reperfüzyon uygulandı. Çalışma grubuna 100 mg/kg dozunda CUR intraperitoneal verildi. Histopatolojik inceleme ve doku malondialdehit (MDA), süperoksid dismutaz (SOD) ve glutatyon (GSH) aktivitesi ölçümü için ileum rezeksiyonu yapıldıktan sonra laktat için kan örneği alınarak sıçanlar sakrifiye edildi.

ABSTRACT

Objective: The use of curcumin that known the protectional effect on such as brain, spinal cord, heart etc. from ischemia and reperfusion injury as a pharmacological agent in experimental intestinal ischemia reperfusion model on rats and to investigate the effects of it.

Methods: We used 24 Wistar-Albino rats. We composed 3 groups each containing 8 rats. Rats in sham group were sacrificed 105 minutes observation after laparotomy. Sixty minutes reperfusion was performed following 45 minutes ischaemia in control group. We performed the study group by administration of 100 mg/kg curcumin intraperitoneally. We sacrificed all of the rats by taking blood samples to evaluate of the lactate after resection of ileum for detecting tissue malondialdehid, superoxide dismutase, glutatone activities and histopathological evaluation.

Başvuru Tarihi: 27.02.2013, Kabul Tarihi: 20.05.2013

Dr. Abdullah Bahadır Öz
Erciyes Üniversitesi Gevher Neshibe Hastanesi
6. Kat Genel Cerrahi Servisi 38039 Kayseri-Türkiye
Tel: 0532 307 38 51
e-mail: bahadiroz@erciyes.edu.tr

Kolon Rektum Hast Derg 2013;23:186-191

Bulgular: Serum laktat düzeyleri ve doku MDA düzeylerinde sham grubunda kontrol ve çalışma gruplarına göre anlamlı olarak düşük bulundu. Çalışma grubunda kontrol grubuna göre anlamlı olarak düşük bulundu. SOD ve GSH aktivitelerinde sham grubunda en yüksek değerler elde edilirken kontrol grubunda en düşük değerler elde edildi. Farklar istatistiksel olarak anlamlı idi. Histopatolojik olarak kontrol grubunda hücre hasarı tespit edilirken; çalışma grubunda bu hasarın azalmış olduğu görüldü.

Sonuç: CUR kullanımı ile ince barsaktaki İ-R hasarı azalmaktadır.

Anahtar Kelimeler: İskemi, Reperfüzyon, Curcumin, İnce bağırsak

Results: Lactate and MDA levels were significantly higher in control and study groups than sham group ($P<0.001$). These levels were significantly lower in study groups. In Sham group SOD and GSH activities were higher. In control group these activities were statistically lower. Although definitive cell damage was determined in the control group, the damage in the study groups observed lower in different levels.

Conclusion: Administration of curcumin reduced the ischemia-reperfusion injury at small intestine.

Key words: Ischemia, Reperfusion, Curcumin, Small intestine

Giriş

İskemi-Reperfüzyon (İ-R) hasarı; tüm organ ve sistemleri ilgilendiren, dokulara yeterli oksijen (O_2) sağlanamamasının tetiklediği hüresel olaylar dizisidir. Dokulara yeterli miktarda O_2 ve diğer metabolik gereksinimlerin ulaştırılamaması sonucunda oksidatif stres ortaya çıkar. Oksidatif stres çoklu organ yetmezliğine kadar varan ciddi klinik sonuçlara neden olabilir.¹ İskemi sonrası reperfüzyon, hasarlı dokuların iyileşmesi için bir önkoşul olmasına rağmen hasarı daha da arttırabilmektedir.³ Klinik olarak İ-R hasarı; intestinal cerrahi, organ transplantasyonu, travma cerrahisi ve vasküler cerrahide önem kazanmaktadır.² Reperfüzyon ile iskemik dokuda oluşan Serbest Oksijen Radikalleri (SOR)'nin, bu hasardan sorumlu olduğu ortaya konulmuş ve bazı farmakolojik ajanlar ile oluşan reperfüzyona bağlı hasarın azaltılabileceği veya önlenebileceği yine bir dizi deneysel araştırmayla kanıtlanmıştır.⁴ Curcumin (CUR); biyolojik etkileri son zamanlarda bir çok araştırmacı tarafından *in vivo* ve *in vitro* çalışmada gösterilmiştir.⁵ "Curcuma longa" bitkisinin yumrusundan elde edilen, sarı renkte ve oldukça lipofilik bir pigmenttir.^{6,7} Curcuminin antioksidan özelliğinin yanı sıra antiinflatuvar, immünomodulatuvar, antitümoral ve antipsoriatik etkinliği olduğu bildirilmiştir.⁸ Curcuminin antioksidan etkinliği ile böbrek, kalp, beyin dokusu, karaciğer İ-R hasarında oksidatif stresi ve doku hasarlanmasını azalttığı gösterilmiştir.⁷ Bu çalışmanın amacı, sıçanlarda oluşturulan deneysel ince barsak İ-R hasarına CUR'un

etkisini araştırmaktır.

Materyal ve Metod

Çalışma Düzeni: Bu deneysel çalışma, Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Hakan Çetinsaya Deneysel ve Klinik Araştırma Merkezi'nde (DEKAM) Temmuz-Ağustos 2008 tarihleri arasında Etik Kurul onayı ile yapıldı. Çalışmada ağırlıkları 250-300 gram arasında değişen yirmi dört adet erkek Wistar-Albino tipi sıçan kullanıldı. Sıçanlar randomize olarak sham, kontrol ve çalışma gruplarına ayrıldı.

Grup I. Sham grubu (n=8): Bu gruptaki deneklere yukarıda tarif edildiği şekilde sadece laparotomi yapılarak yüz beş dakika süreyle gözlem yapıldı.

Grup II. Kontrol grubu (n=8): Bu gruptaki deneklere ise laparotomi sonrası SMA'nın klemplenmsi vasıtasıyla kırk beş dakika iskemi ve klempin açılmasıyla birlikte altmış dakika reperfüzyon yapılarak İ-R hasarı oluşturuldu.⁹

Grup III. Çalışma (CUR) grubu (n=8): Deneklere kırk beş dakika iskemi uygulandıktan sonra 100 mg/kg dozunda CUR (Sigma C7727) intraperitoneal uygulaması sonrası altmış dakika reperfüzyon sağlandı.¹⁰

Cerrahi işlem: Çalışma öncesinde on iki saat aç bırakılan sıçanların tümünde cerrahi girişim, enjeksiyonlar, kan örneklerinin alınması intraperitoneal 50 mg/kg ketamin (Ketalar®, Pfizer-İstanbul) ve 10mg/kg xylazin anestezi (Rompun®, Bayer-İstanbul) altında yapıldı. Karın cildi

traş edildikten sonra povidon iyot ile temizlendi. Ksifoidden itibaren yaklaşık 6 cm'lik vertikal insizyon ile laparotomi yapıldı. İntestinal İ-R modeli için intestinal yapılar retrakte edildikten sonra süperior mezenterik arter (SMA) aortadan çıktığı yerden bulundu ve klempe edildi. Çalışma esnasında mortalite olmadı. Sakrifikasyon; doku ve plazma örnekleme sonrası abdominal aort ve vena cavaya yapılan transvers kesi ile oluşan hemoraji ile sağlandı.

Sham grubunda yüz beş dakikalık gözlem, diğer gruplarda ise reperfüzyon sonrası v.cava inferiordan 1 ml kan heparinize enjektörlere alınarak eşzamanlı laktat çalışması yapıldı. Doku örnekleme için ileoçekal valvin 10 cm proksimalindeki yaklaşık 3 cm'lik ileum segmenti rezeke edildi.⁹ Alınan ileum rezeksiyon materyalinden fekal içerik %0.9 salin ile hafifçe temizlendi. Alınan spesmenin 2 cm'i histopatolojik değerlendirme amacıyla %10'luk formaldehit içerisinde saklandı. Geri kalan 1 cm'lik kısım ise doku MDA, SOD ve GSH aktivitesi tayini için alimünyum folyo içerisinde -80°C'de saklandı.

Çalışılan parametreler

Serum laktat tayini: Deney günü heparinize enjektörlere alınan kan örnekleri eşzamanlı olarak (Rapidlab865, Bayer, Germany) kan gazı ölçüm cihazında çalışıldı. Sonuçlar mmol/L olarak birimlendirildi.

Doku MDA seviye tespiti: Dokular %1.15 lik KCl tamponunda homojenize edildi (100mg/ml). Homojenizat Okhawa ve ark. yöntemine göre hazırlanarak µM/mg olarak birimlendirildi.¹¹ Doku SOD aktivite tayini: SOD aktivite tayini için dokular Sun metodu ile hazırlanarak

Tablo 1. Chiu histopatolojik hasar skorlaması.¹⁴

Evre 0	Normal mukoza
Evre 1	Genellikle kapiller konjesyonla birlikte ve vilusların apeksinde subepitelyal Guenhagen boşluklarının oluşturulması
Evre 2	Subepitelyal alanın genişlemesi ve epitelin Lamina Propria'dan hafif derece ayrılması
Evre 3	Villusların üst kısımlarında yaygın epitelyal ayrılma
Evre 4	Lamina Propria ve villuslarda dökülme, kapiller dilatasyon, Lamina Propria'da artmış selülarite
Evre 5	Lamina Propria'da sindirilme ve bütünlüğünde bozulma, kanama ve ve ülserasyon

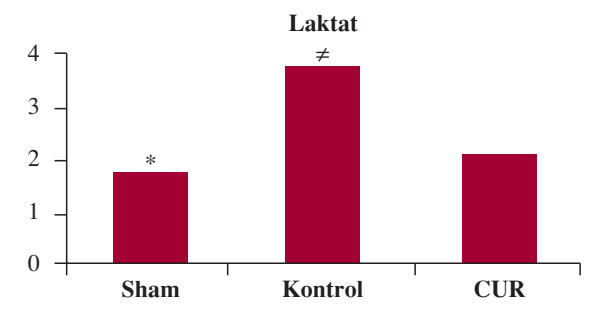
ü/ml/g doku olarak birimlendirildi.¹² Doku GSH seviye tespiti: Dokular Lindasy ve ark.¹³ yaptığı yöntem ile hazırlanarak nmol/ml/g olarak birimlendirildi. Histopatolojik değerlendirme: %10'luk formol içinde saklanan ileum örnekleri parafin bloklara gömülerek beş mikron kalınlığında kesitler alınarak H&E boyası ile boyandı. Boyanan preparatlar ışık mikroskopunda değerlendirildi. Tüm histopatolojik değerlendirmelerde bakılan preparatın hangi gruba ait olduğu patoloj tarafından bilinmemekteydi. İskemi reperfüzyon (İ-R) hasarına bağlı ileumda oluşan histopatolojik değişiklikler Chiu ve arkadaşlarının değerlendirmesine göre yapıldı (Tablo 1).

İstatistiksel Analiz

Veriler ortalama \pm standart sapma ($X \pm SD$) ve/veya median (min.-max.) olarak gösterildi. Veriler Sigmatat 3.5 istatistik paket programında değerlendirildi. Verilerin normal dağılım gösterip göstermediğine Shapiro-Wilk Normallik testi ile bakıldı. Normal dağılım gösteren değişkenler için gruplar arası farkın olup olmadığına Tek Yönlü Varyans Analizi (ANOVA) ile bakıldı. Fark çıkan gruplarda çoklu karşılaştırmalar için Tukey testi ile yapıldı. $P < 0.05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

Sonuçlar

Laktat değerleri: Sham grubunda 1.29 ± 0.12 mmol/L, kontrol grubunda 2.21 ± 0.28 mmol/L, CUR grubunda 1.55 ± 0.15 mmol/L olarak bulundu. Sham grubunda değerler diğer iki gruba göre anlamlı olarak düşüktü. Kontrol grubundaki değerler ise CUR grubundaki değerlere göre anlamlı olarak yüksekti ($p < 0.001$) (Şekil 1).

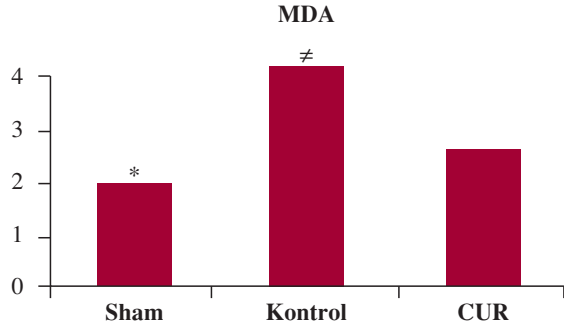


* $p < 0.001$ Sham grubunun Kontrol ve CUR grubundan farkını gösterir.

≠ $p < 0.001$ Kontrol grubunun CUR grubundan farkını gösterir

Şekil 1. Serum Laktat düzeylerinin karşılaştırılması.

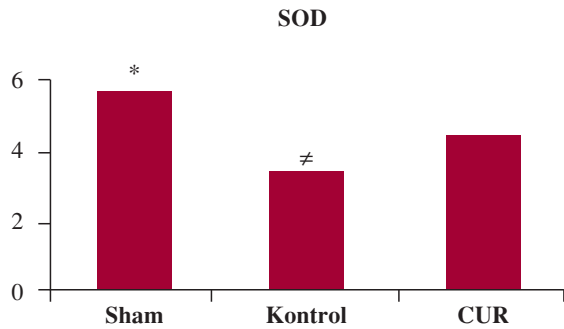
Doku MDA sonuçları: Sham grubunda 0.15 ± 0.02 $\mu\text{M}/\text{mg}$, kontrol grubunda $0,38 \pm 0,05$ $\mu\text{M}/\text{mg}$, CUR grubunda ise 0.22 ± 0.04 $\mu\text{M}/\text{mg}$ olarak bulundu. Sham grubunda değerler diğer iki gruba göre anlamlı olarak düşüktü. Kontrol grubundaki değerler ise CUR grubundaki değerlere göre anlamlı olarak yüksekti ($p < 0.001$) (Şekil 2).



* $p < 0.001$ Sham grubunun Kontrol ve CUR grubundan farkını gösterir.
 \neq $p < 0.001$ Kontrol grubunun CUR grubundan farkını gösterir

Şekil 2. MDA değerlerinin karşılaştırılması.

Doku SOD değerleri: Sham grubunda 5.13 ± 0.57 U/ml/g, kontrol grubunda 2.70 ± 0.56 U/ml/g, CUR grubunda ise 3.9 ± 0.37 U/ml/g olarak bulundu. Sham grubunda değerler diğer iki gruba göre anlamlı olarak yüksekti. Kontrol grubundaki değerler ise CUR grubundaki değerlere göre anlamlı olarak düşüktü ($p < 0.001$) (Şekil 3).

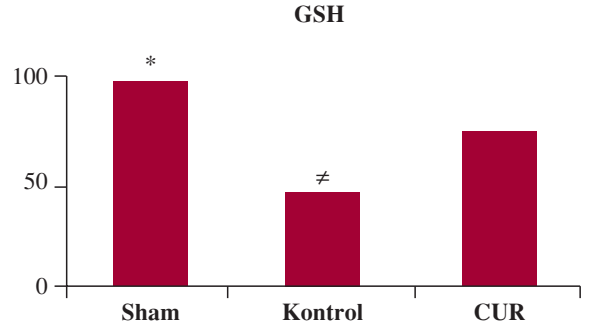


* $p < 0.001$ Sham grubunun Kontrol ve CUR grubundan farkını gösterir.
 \neq $p < 0.001$ Kontrol grubunun CUR grubundan farkını gösterir

Şekil 3. SOD değerlerinin karşılaştırılması.

Doku GSH değerleri: Sham grubunda 89.01 ± 11.79 nmol/ml/g, kontrol grubunda 32.89 ± 6.55 nmol/ml/g, CUR grubunda ise 64.40 ± 6.89 nmol/ml/g olarak bulundu. Sham grubunda değerler diğer iki gruba göre anlamlı olarak yüksekti. Kontrol grubundaki değerler ise CUR

grubundaki değerlere göre anlamlı olarak düşüktü ($p < 0.001$) (Şekil 4).



* $p < 0.001$ Sham grubunun Kontrol ve CUR grubundan farkını gösterir.
 \neq $p < 0.001$ Kontrol grubunun CUR grubundan farkını gösterir

Şekil 4. GSH değerlerinin karşılaştırılması.

Histopatolojik değerlendirme: Sham grubunda intestinal mukoza hasarının olmadığı görüldü. Kontrol ve çalışma gruplarında İ-R'dan sonra önemli histopatolojik değişiklikler meydana geldi. Curcumin grubunda subepitelyal alanın genişlemesi ve epitelin lamina propia'dan hafif derece ayrıldığı görüldü. Özellikle kontrol grubunda lamina propia ve villuslarda dökülme, kapiller dilatasyon, lamina propia'da artmış selülarite izlendi. İskemi reperfüzyon hasarının neden olduğu histopatolojik değişiklikler en fazla kontrol grubunda gözlemlendi. Kontrol grubu ile diğer tüm gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık vardı. Curcumin grubundaki histopatolojik değişikliklerde, sham ve kontrol grubuna göre anlamlı fark olduğu görüldü ($p < 0.001$).

Tartışma

İnce bağırsaklarda emboli, tromboz veya ateroskleroza bağlı damar tıkanıklıkları veya volvulus, strangülasyon, invajinasyon gibi mekanik nedenlerle iskemik hasar görülebilmektedir.^{15,16} İnce bağırsaklarda yirmi dakikadan kısa süren bir iskemi mukozada anlamlı bir değişiklik yapmazken iki saatten uzun süren bir iskemi transmural nekroza kadar giden kalıcı hasara neden olabilmektedir.¹⁷ İntestinal iskemide oksijen ve doku kanlanması azalması çeşitli serbest radikallerin ortaya çıkması ve temizlenememesi yoluyla doku hasarını başlatır. İskemi takiben gelişen reperfüzyon ise hasarı daha da şiddetlendirme potansiyeline sahiptir.^{15,18} İskemi reperfüzyon sürecinde reaktif oksijen türlerinin fazla miktarda oluştuğu ve bunların da özellikle reperfüzyonda arttığı, bu nedenle intestinal doku hasarının da

reperfüzyonla ağırlaştığı ileri sürülmektedir.²² İskemi ve reperfüzyon sürecinde her iki aşamada da oksidatif mekanizmaların devreye girmesi bu klinik problemin çözümünde antioksidan maddelerin kullanılabilceğini düşündürmüştü ve konuyla ilgili birçok deneysel çalışma yapılmıştır.^{18,23}

Sıçanlarda deneysel intestinal İ-R modelinde SMA'nın obliterasyonu vasıtasıyla iskemi ve obliterasyonun giderilmesiyle reperfüzyon oluşturma süreleri literatürde hala tartışmalı bir konudur. Mallick ve ark. deneysel modellerinde bu süreleri iskemi için otuz dakika, reperfüzyon için ise yüz yirmi dakika olarak uygulamışlardır.²⁴ Bu çalışmada intestinal İ-R modelinde daha önce Hei ve arkadaşlarının kullandığı ve reperfüzyon hasarının tüm aşamalarının histopatolojik olarak gösterilebildiği kırk beş dakika iskemi, altmış dakika reperfüzyon protokolü kullanıldı.²⁵ Bu prototokolde antioksidan olarak çeşitli hayvan modellerinde pek çok dokuda etkinliği gösterilmiş ama ince bağırsaklarda hiç çalışılmamış olan CUR kullanıldı.²⁶⁻³¹

Çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlar literatürde bu konuda diğer dokularla yapılan çalışmaların sonuçlarıyla paralellik gösterdi. İstatistiki olarak anlamlı en yüksek MDA ve Laktat seviyeleri ile istatistiki olarak en düşük GSH ve SOD seviyeleri hep kontrol grubunda saptandı. Curcumin verdiğimiz tedavi grubunda MDA ve Laktat

seviyeleri kontrol grubuna göre anlamlı olarak düşükken, GSH ve SOD seviyeleri ise anlamlı olarak yüksekti. Bu sonuçlar CUR'in intraperitoneal verilmesinin lipid peroksidasyonunun etkilerini anlamlı olarak azaltabildiğini ve oksidatif hasara karşı koruyucu olabildiğini net olarak göstermektedir. Histopatolojik incelemede de bu etkilerini destekleyen bulgular saptadık. Sham grubunda bağırsak duvar yapıları bozulmamışken, çalışma grubunda iyi korunmuş, fazla etkilenmemiş duvar yapılarına karşın kontrol grubunda artmış selülarite ve dilate kapiller damarlar ile beraber villöz paternin ve lamina propria bütünlüğünün ileri derecede bozulduğunu saptadık. Curcuminin peroksidasyonu ve oksidatif stresi azalttığına dair literatürde oldukça fazla kanıt olmasına rağmen İ-R sürecinin ve buna bağlı ortaya çıkan patolojinin çok kompleks olması ve halen tam olarak anlaşılammış birçok etabı içermesi İ-R hasarında CUR'nin önleyici biyolojik etkilerinin daha fazla anlaşılabilmesi için yeni ve detaylı çalışmaları gerekli kılmaktadır.

Sonuç

Çalışmamızda ratlarda yapılan incebağırsak İ-R modelinde CUR tedavisi, mekanizması tam bilinmemesine rağmen hem biyokimyasal hem de morfolojik kriterlere göre incebağırsakta İ-R hasarını azaltmıştır.

Kaynaklar

1. Girn HR, Ahilathirunayagam S, Mavor AI, *et al.* Homer-Vanniasinkam S. Reperfusion syndrome: cellular mechanisms of microvascular dysfunction and potential therapeutic strategies. *Vasc Endovascular Surg* 2007;41:277-93.
2. Cerqueira NF, Hussni CA, Yoshida WB. *et al.* Pathophysiology of mesenteric ischemia/reperfusion: a review. *Acta Cir Bras* 2005;20:336-43.
3. Parks DA, Granger DN. Contributions of ischemia and reperfusion to mucosal lesion formation. *Am J Physiol* 1986;250:749- 53.
4. Mallick IH, Yang W, Winslet MC, *et al.* Ischemia-reperfusion injury of the intestine and protective strategies against injury. *Dig Dis Sci* 2004;49:1359-77.
5. Eybl V, Kotyzova D, Bludovska M. *et al.* The effect of curcumin on cadmium-induced oxidative damage and trace elements level in the liver of rats and mice. *Toxicol Lett* 2004;151:79-85.
6. Duvoix A, Blasius R, Delhalle S, *et al.* Chemopreventive and therapeutic effects of curcumin. *Cancer Lett* 2005;223:181-90.
7. Thiyagarajan M, Sharma SS. Neuroprotective effect of curcumin in middle cerebral artery occlusion induced focal cerebral ischemia in rats. *Life Sci* 2004;74:969-85.
8. Miquel J, Bernd A, Sempere JM, *et al.* The curcuma antioxidants: pharmacological effects and prospects for future clinical use. *Arch Gerontol Geriatr* 2002;34:37- 46.
9. Abrahao MS, Montero EF, Jungiera VB, *et al.*