

# Bağırsakta iskemi-reperfüzyon hasarında sulfasalazinin koruyucu etkisi

Protective effect of sulfasalazine on the intestinal ischemia-reperfusion injury

Ramazan Eryılmaz\*, Mustafa Şahin\*, Tamer Gündođdu \*  
Adem Akçakaya\*, Orhan Alimođlu\*, İsmail Okan\*,  
Adnan Somay\*\*, M. Baki Çekmen\*\*\*, Emin Özbek\*\*\*\*

## Amaç:

Bu çalışma potent bir NF-kappaB inhibitörü olan sulfasalazin ile ratlarda intestinal iskemi/reperfüzyon hasarının önlenilebileceği veya azaltılabileceği hipotezi üzerine kurulmuştur.

**Durum Deđerlendirmesi:** Mezenter iskemi sıklıkla cerrahi girişim gerektiren ciddi bir klinik durumdur. İskemik dokuların reperfüzyonu onarım fazı için gerekli olmasına karşın reaktif oksijen radikallerinin salınması ve nötrofil birikimini aktive etmesi nedeniyle akut iskemik hasarı daha kötüleştirmektedir. İnflamatuvar süreçte NF-kappaB'nin önemli ve merkezi bir rolü vardır.

## Yöntem:

Bu deneysel çalışmada her grupta 10 rat olmak üzere 3 grup oluşturuldu. Kontrol grubunda (Grup I) superior mezenter arter bulundu ve askıya alındı, ancak bağlanmadı. 120dk beklendikten sonra ileumdan doku örnekleri ve portal venden kan örnekleri alınarak ratlar sakrifiye edildi. İskemi /reperfüzyon (I/R) grubunda (Grup II) superior mezenter arterin aorttan çıktığı yerin hemen distaline klemp konularak 60 dk iskemi oluşturuldu. Daha sonra klemp açılarak 60 dk reperfüzyon yapıldı. Kontrol grubundaki gibi doku ve kan örnekleri alındı. Sulfasalazin grubuna (Grup III) ise Grup II'den farklı olarak iskemiden 30 dk sonra sulfasalazin verildi. Alınan ileum doku örneklerinde immunohistokimyasal boyama yöntemiyle iNOS, p65 ve kaspas protein ekspresyonları çalışıldı. Kan örneklerinden ise Greiss reaksiyonu aracılığıyla NO miktarları ölçüldü.

## Bulgular:

Kontrol grubunda iNOS, p65, kaspas protein ekspresyonları ve serum NO seviyeleri bazal seviyede bulundu. I/R grubunda (Grup II) ise bu proteinlerin ekspresyonları en yüksek seviyede tespit edildi. Sulfasalazin (Grup III) grubunda kontrol grubundan yüksek, I/R grubundan ise düşük seviyede bulundu. Yapılan istatistiksel çalışmada, NO seviyeleri, iNOS ve kaspas ekspresyonlarında kontrol grubuyla I/R grubu arasında anlamlı fark bulunurken (p<0.05), sulfasalazin kullanılan grup ile kontrol grubu arasında anlamlı fark saptanmadı. P65 ekspresyonunda I/R grubu kontrol grubuyla karşılaştırıldığında anlamlı bir artış olmasına karşın, sulfasalazin grubunda I/R grubuna göre belirgin bir azalma olmakla beraber bu azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.

## Sonuç:

Bu çalışmada, ratlarda intestinal I/R modelinde kullanılan sulfasalazinin hücre hasarından sorumlu doku proteinlerinin ekspresyonlarını azaltarak koruyucu etkiye sahip olabileceği gösterilmiştir.

## Anahtar Kelimeler:

Bağırsak, iskemi-reperfüzyon hasarı, sulfasalazin,

İntestinal iskemi, erken tanı ve agresif tedavi protokollerinin uygulandığı serilerde bile %50'ye ulaşan mortalite oranlarıyla ölümcül bir hastalık olma özelliğini sürdürmektedir(1). İskemi, hücreyi homeostazisi sürdürmek için ihtiyaç duyduğu enerjiden yoksun bırakarak ölümüne yol açarken, reperfüzyon hasarı iskemik bağırsaktan salınan serbest radikallerin, endotelial faktörlerin ve nötrofillerin eşlik ettiği karmaşık bir mekanizmayla oluşur. Reperfüzyon esnasında daha önce iskemik olan dokuya çok miktarda oksijen ulaşır ve çeşitli reaksiyonlarla serbest radikaller (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, O<sub>2</sub><sup>-</sup>, OH<sup>-</sup>, NO<sup>-</sup>) oluşur(2). Bunun sonucunda intestinal mukozada hücre membranlarının lipid peroksidasyonu ile iskemi-reperfüzyon (I/R) hasarı meydana gelir. İskemik dokuların kanlanması yeniden sağlanmasıyla ortama salınan sitokinler (IL-1, IL-6, TNF alfa, INF gamma) hem lokal hem de sistemik yanıtı yol açarak doku ve sistemleri hasara uğratar(3).

Bu süreçteki önemli medyatörlerden biri nitrik oksittir (NO). Sentezlenen sitokinler indüklenebilir nitrik oksit sentetaz (iNOS) enzimini indüklerler. iNOS L-Arginin'den NO sentezini sağlayan enzimdir(4). I/R hasarının fizyopatolojisinde artmış iNOS aktivitesinin etkili olduğu bildirilmiştir. NO, süperoksit anyonu ile birlikte peroksinitrat oluşturmaktadır. Bu madde çok etkili bir oksidan olup hücrenin lipid ve protein komponentlerine saldırarak hasara yol açmaktadır. Sonuçta, DNA parçalanması, mitokondriyal disfonksiyon gelişir ve apoptozis gerçekleşir(5). iNOS aktivitesi nükleer transkripsiyon faktör (NF-kappaB) tarafından düzenlenmektedir. Literatürde miyokard ve çizgili kas I/R hasarı modellerinde NF-kappaB aktivitesinin arttuğu gösterilmiştir(6-8). Fakat bu konuda intestinal I/R hasarı modeli çalışılmamıştır.

Bu çalışmada potent bir NF-kappaB inhibitörü olan sulfasalazin aracılığıyla ile intestinal I/R hasarının önlenmesi veya azaltılması amaçlanmıştır.

## Gereç ve Yöntem

Bu çalışma İstanbul Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırmaları Merkezi (DETAM)'nde etik kurul onayı alınarak gerçekleştirildi. Çalışmada herbiri 250-300 gr ağırlığında 30 adet erkek Wistar-Albino rat kullanıldı. Ratlar deney öncesinde en az bir hafta boyunca aynı laboratuvar ortamında

\* Vakıf Gureba Eğitim Hastanesi I. Cerrahi Kliniđi, İSTANBUL

\*\* Vakıf Gureba Eğitim Hastanesi Patoloji Kliniđi, İSTANBUL

\*\*\* Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya AD, KOCAELİ

\*\*\*\* Vakıf Gureba Eğitim Hastanesi Üroloji Kliniđi, İSTANBUL

Dr. Ramazan ERYILMAZ

Neslişah mah. Emlak Bankası Evleri E-4 Blok / 55 34250  
Fatih / İSTANBUL Tel : 0212 621 89 87 Faks: 0212 635 20 46  
e-posta : ramazaneryilmaz@hotmail.com

tutuldu, standart sıçan yemi ve suyla beslendiler. Tüm denekler işlemiden 12 saat önce aç bırakıldı. Anestezi 90mg/kg intramüsküler Ketamin HCL ile sağlandı. Her grupta 10 rat olmak üzere 3 grup oluşturuldu.

#### GRUP I (Sham Grubu)

Bu gruptaki deneklere genel anestezi uygulandı, karın duvarı traşı ve povidon iodine ile temizlendikten sonra 3cm'lik orta hat kesisi ile laparotomi yapıldı. Süperior mezenterik arter abdominal aortadan çıktığı yerden bulunarak ortaya konuldu, ancak bağlanmadı. Genel anestezi altında 120 dk sonra ince bağırsağın terminal ileum bölgesindeki 1cm'lik bağırsaktan tam kat doku örneği alındı. Serum fizyolojik ile yıkandıktan sonra %10'luk formaldehit içine konuldu. NO ölçümü için portal venden heparinize tüplere 5ml kan örnekleri alındı ve sıvı azot içine yerleştirildi. Denekler yüksek doz eter ile sakrifiye edildi.

#### GRUP II (Süperior mezenterik arter: SMA oklüzyon grubu)

Bu gruptaki deneklerde kontrol grubundan farklı olarak disseke edilen superior mezenterik arter abdominal aortadan çıktığı yerin hemen distalinden atravmatik klemp ile oklüze edilerek iskemi başlatıldı. 60 dk bekledikten sonra klemp

açılarak reperfüzyon yapıldı. 60 dk'lık reperfüzyondan sonra terminal ileum bölgesinden 1cm'lik bağırsak segmenti alındı. Daha sonra alınan doku örnekleri kontrol grubuyla aynı işlemlere tabi tutuldu.

#### GRUP III (SMA oklüzyonu + Sulfasalazin grubu)

Bu gruptaki deneklere grup II'deki aynı işlemler uygulandı. İskemi başlatıldıktan 30 dk sonra kuyruk veninden 75mg/kg intravenöz sulfasalazin verildi. İskemiden 60 dk sonra klemp açılarak 60 dk'lık reperfüzyon başlatıldı. İ/R tamamlandıktan sonra terminal ileum bölgesinden 1cm'lik bağırsak segmenti alındı ve doku örnekleri aynı işlemlere tabi tutuldu.

Çalışmada kullanılan sulfasalazin Sigma-Aldrich Chemical GmBH (İnterlab, İstanbul)'dan sağlandı. NO ölçümü Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalında yapıldı. Alınan kanlar 1000 devirde 10 dk santrifüje edildi ve plazmalar -70°C'de bekletildi. NO ölçümü için; ZnSO<sub>4</sub>, NaOH, nitrat redüktaz, glisin, sulfanilamid, N-(1-Naphthyl) etilendiamin, NADPH, FAD, LDH, piruvat kloroform, etanol, xantin, xantin oksidaz, nitroblue tetrazolium (NBT) maddeleri Sigma Chemical Co (St. Louis, MO, USA)'dan, CuCl<sub>2</sub>, sıgır serum albumini, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, EDTA, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>,

(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, NaCl, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, Na<sub>2</sub>N<sub>3</sub>(sodyum azid), glutatyon redüktaz ve indirgenmiş glutatyon ise Merck (Darmstad, Germany)'den temin edildi. Manuel değerlendirmeler Shimadzu (Shimadzu UV mini-1240 Kyoto, Japan) spektrofotometresi ile 1cm dalga boyundan yapıldı.

Total nitrit (NO), çözeltinin NO<sub>3</sub>'ü NO<sub>2</sub>'ye çeviren E. coli nitrat redüktazla inkübasyonu ve Greiss reaksiyonu ile ölçüldü. Greiss ajanı 1ml çözeltiye katıldı. Absorbans 545 nm'de 30 dk inkübasyon sonrası okundu. Absorbans, standart NaNO<sub>2</sub> grafisi ile karşılaştırıldı. Sonuçlar mol /litre olarak belirlendi.

İmmünohistokimyasal ölçümler için kullanılan 3 adet kit: 1-NF-KappaB / p65 (Rel A) Ab-1, 7 ml 2-Nitric Oxide Synthase, inducible (iNOS) Ab-1, 7 ml 3-Caspase 3 (CPP32 Ab-4, 0.5 ml konsantre) Neomarkers (Freemont, USA)'den temin edildi. İmmünohistokimyasal çalışma SSK Vakıf Gureba Eğitim Hastanesi Patoloji laboratuvarında yapıldı. Örnekler bloklandı ve kesit yapılmak üzere oda sıcaklığında saklandı. İmmünohistokimyasal çalışmada; dokuda aranacak proteine karşı geliştirilmiş işaretli poliklonal ya da monoklonal antikorlar kullanıldı. Tüm gruplardaki iNOS, NF-kappaB/p65 ve kaspas protein ekspresyonlarını belirlemek amacıyla %10'luk formalinde fikse edilmiş parafine gömülü doku bloklarından 2 mikronluk kesitler Poly-L-lysine (PLL) ile kaplanmış lamlara alındı. 37°C'lik etüvde 1 gece bekletildi. İki defa 15 dk'lık sürelerde ksilol ile deparafinize edilen kesitler saf alkolden başlayarak %90-80-70'lik alkollerden geçirilerek suya indirildi. Mikrodalga ısıtıcıda yüksek derecede 5 dk, orta derecede 3 defa 5'er dk muamele edildikten sonra 20 dk oda ısısında soğumaya bırakıldı. Distile suyla yıkanan kesitler tris-buffer solüs-

**Tablo 1:** Tüm gruplardaki plazma total nitrit değerleri (mikromol/litre)

Denekler Micromol / litre	GRUP I Micromol / litre	GRUP II Micromol / litre	GRUP III
1	31	55	39
2	38	52	34
3	39	40	38
4	30	44	42
5	36	43	28
6	37	47	43
7	36	41	45
8	25	56	36
9	37	42	34
10	34	65	30
Ortalama±standart sapma	34.3±4.37	48.5±8.2	37±5.5

F=14, sd=2, p<0.0001; çoklu karşılaştırma sonucu anlamlı farklılık gösteren gruplar I-II ve II-III idi

yonuna alındı. Endojen peroksidazı bloke etmek için %3'lük hidrojen peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) ile 20 dakika muamele edildi. Distile su ile yıkandıktan sonra tris-buffer solüsyonuna alındı. Kesitler Ultra V-Block ile 5 dk muamele edildikten sonra primer antikolar ile (Nitric oxide synthase, inducible (iNOS) Ab-1, NF-kappaB / p65 (Rel A) Ab-1, Caspase 3 (CPP32) Ab-4 ) 30 dk inkübe edildi. Tris-buffer ile yıkanan kesitler Biotinyalated secondary immunoglobulins ile 20 dk, enzim işaretli streptavidin ile 20 dk inkübe edildi. Tris-buffer'a alınan kesitler AEC kromojen'de 20'şer dk tutuldu. Kesitler yıkandıktan sonra Mayer Hematoksilin ile 3 dk inkübe edilerek zıt boyama yapıldı. Kesitler Agueous-mount jel ile kapatılarak hazırlandı.

Her bir olgu için hazırlanan kesitler ışık mikroskobunda incelendi. İmmün boyamanın spesifikliğini kontrolünde, pozitif kontrol amacıyla antikor üretici firma verilerine uygun olarak rat akciğer kesitleri kullanıldı.

Olgular sitoplazmik boyanmanın yaygınlığı ve yoğunluğu açısından değerlendirildi. Boyanma yaygınlığı ve yoğunluğu ileum doku kesitlerinde epitelyal komponentte (vilus epiteli + kript epiteli) değerlendirilerek, dokunun genelinde epitelyal komponent olarak skorlandı. Boyanma yaygınlığı epitelyal komponent yüzdesi esas alınarak yapıldı. Boyanma olmaması 0, <%25 boyanma +1, %25-50 boyanma +2, %50-75 boyanma +3, >%75 boyanma +4 olarak skorlandı. Boyanma yoğunluğu ise, doku kesitlerinde sitoplazmik boyanma gösteren hücrelerin kromojen ile boyanma yoğunluğunu yansıtmakta olup, hiç boyanma gözlenmeyen olgularda 0, hafif boyanan olgularda +1, orta yoğunlukta boyanan olgularda +2, kuvvetli boyanan olgularda +3 olarak skorlandı. İstatistiksel değer-

lendirme yaygınlık ve yoğunluk skorlarının toplamı alınarak yapılmıştır.

İstatistiksel analizler SPSS 10.00 versiyonu ile yapıldı. Parametrik verilerin karşılaştırması tek yönlü varyans analizi, post hoc analizi LSD testi ile yapıldı. Non-parametrik verilerin karşılaştırılması Kruskal-Wallis testi ile grupların ikili karşılaştırılması ise Dunn's testi ile yapıldı. p<0.05 istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

## Bulgular

Tüm gruplardaki total nitrit ölçüm sonuçları mol/litre olarak

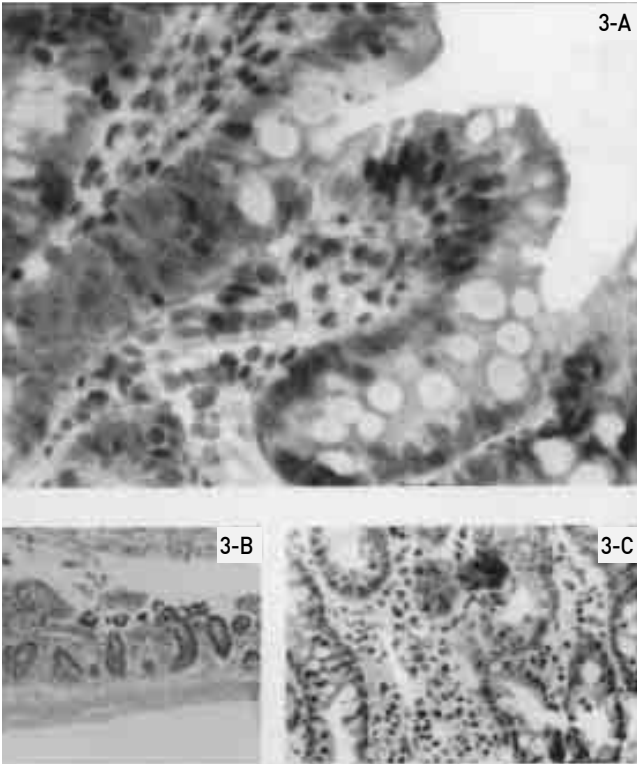
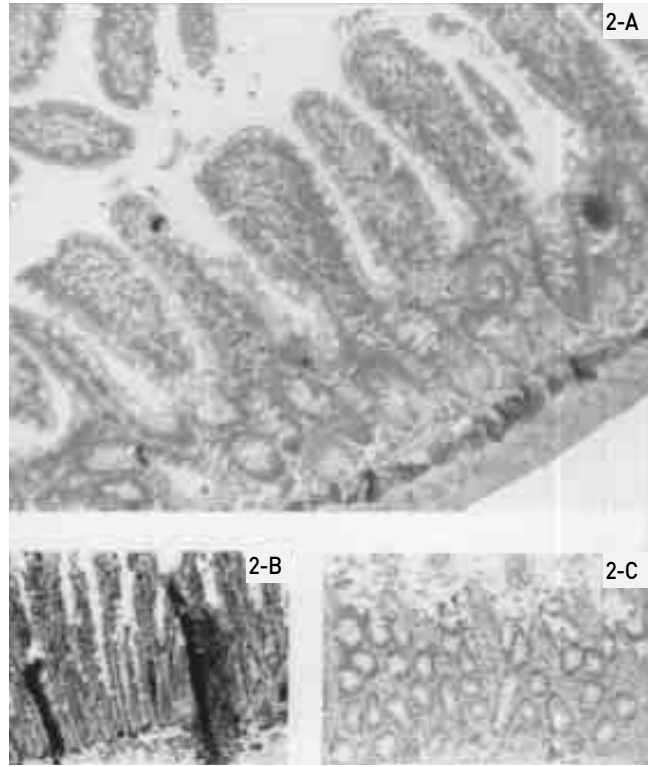
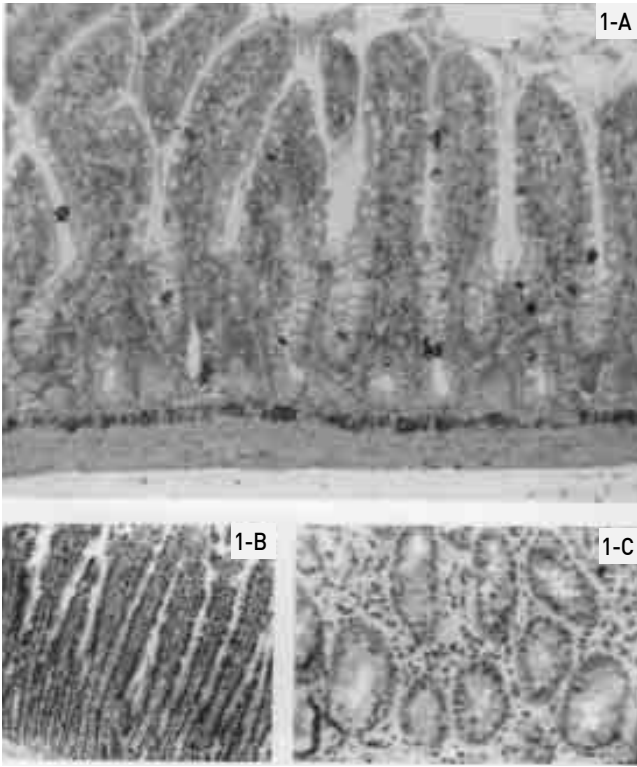
Tablo 1'de verildi. İ/R hasarında plazmada ölçülen total nitrit miktarlarının belirgin olarak yüksek olduğu tespit edildi (p<0.001).

Plazma total nitrit miktarlarının gruplar arasındaki farkı araştırıldığında; kontrol grubuna kıyasla, diğer gruplarda total nitrit miktarının yüksek olduğu tespit edildi. Yapılan istatistiksel çalışmada kontrol grubuyla (Grup I) İ/R yapılan (Grup II) grup arasında anlamlı fark gözlemlendi (p<0.05). Diğer taraftan; sulfasalazin grubunda (Grup III) total nitrit miktarları kontrol grubuna göre daha fazla bulundu, ancak yapılan istatis-

**Tablo 2:** iNOS, P65 ve kaspas'ın immunohistokimyasal boyanma ile oluşturulan epitelyal komponentteki boyanma skorları

	Olgu	İnos Epitelyal Skor	P65 Epitelyal Skor	Kaspas Epitelyal Skor
Grup I	1	3	2	3
	2	3	3	4
	3	3	2	5
	4	2	2	5
	5	3	2	4
	6	2	2	3
	7	2	2	3
	8	2	3	2
	9	3	2	3
	10	2	2	3
	Ortanca (min-maks)	2.5(2-3)	2(2-3)	3(2-5)
Grup II	1	5	3	6
	2	3	2	4
	3	2	3	5
	4	4	3	6
	5	4	2	5
	6	6	6	6
	7	7	5	7
	8	7	6	7
	9	7	7	7
	10	6	6	6
	Ortanca (min-maks)	5.5(2-7)	4(2-7)	6(4-7)
Grup III	1	4	3	5
	2	3	3	4
	3	3	3	4
	4	3	6	4
	5		4	5
	6		3	3
	7	3		
	8	3	3	4
	9	4		3
	10	2	3	2
	Ortanca (min-maks)	3(2-4)	3(2-6)	4(2-7)

iNOS için K.W.:12.68, s.d=2, p= 0.002 ; Dunn's testine göre ikili karşılaştırmada anlamlı farklılık gösteren gruplar I-II, II-III idi.  
p65 için K.W.:9.74 sd=2, p= 0.008; Dunn's testine göre ikili karşılaştırmada anlamlı farklılık gösteren gruplar I-II  
Kaspas için K.W.:15.96 sd=2, p= 0.000; Dunn's testine göre ikili karşılaştırmada anlamlı farklılık gösteren gruplar I-II, II-III.



**Resim 1:** İmmünohistokimyasal boyama ile **A-** kontrol grubu (x100), **B-** i/R grubu (x100), **C-** sulfasalazin grubunda (x400) iNOS ekspresyonu  
**Resim 2:** İmmünohistokimyasal boyama ile **A-** kontrol grubu (x100), **B-** i/R grubu (x100), **C-** sulfasalazin grubunda (x100) p65 ekspresyonu  
**Resim 3:** İmmünohistokimyasal boyama ile **A-** kontrol grubu (x400), **B-** i/R grubu (x100), **C-** sulfasalazin grubunda (x400) kaspas ekspresyonu

tiksel çalışmada gözlenen fark anlamlı değildi. (F:14, sd:2, p<0.0001; Dunn's testi ile yapılan çoklu karşılaştırma sonucu anlamlı farklılık gösteren gruplar I-II ve II-III).

İmmünohistokimyasal boyanma ile iNOS ekspresyonu en yaygın ve yoğun olarak ileum mukozasındaki villus epitelinde gözlemlendi. Kript epitel villuslara göre daha az yaygın-

lık ve yoğunlukta boyanma gösterdi.

İmmünohistokimyasal boyanma ile gösterilen iNOS ekspresyonunun gruplar arasındaki farkı araştırıldığında (Tablo 2) kontrol grubunda (Grup

I) epitelyal komponentte az boyanma gözlenmesine karşın (Resim 1A) İ/R grubunda (Grup II) boyanma daha kuvvetliydi ( $p=0.002$ ) (Resim 1B). Epitelyal boyanma skoru açısından kontrol grubuyla, sulfasalazin kullanılan (Grup III) grup (Resim 1C) arasında anlamlı fark gözlenmedi ( $p=0.218$ ). İ/R grubu (Grup II) ile sulfasalazin kullanılan grup (Grup III) arasında anlamlı fark gözlendi ( $p=0.007$ ). (K.W:12.68, s.d:2,  $p=0.002$ ; Dunn's testine göre ikili karşılaştırmada anlamlı farklılık gösteren gruplar I-II, II-III).

İmmünohistokimyasal boyanma yöntemi ile NF-kappaB/p65 ekspresyonunun değerlendirildiğinde epitelyal komponentte boyanma yoğunluğu ve yaygınlığı en fazla olan hücreler mukozadaki villus epitelyal di. Kriptlerde villuslara göre daha fazla yaygınlık ve yoğunlukta p65 ekspresyonu bulundu ve özellikle kript tabanında yüzeye göre p65 ekspresyonu daha az tespit edildi.

İmmünohistokimyasal boyanma ile gösterilen p65 ekspresyonunun gruplar arasındaki farkı araştırıldığında; Tablo 2'de görüldüğü gibi kontrol grubuna kıyasla diğer gruplarda p65 ekspresyonu daha fazlaydı. Kontrol grubuyla (Grup I) (Resim 2A) İ/R yapılan (Grup II) grup (Resim 2B) ve kontrol grubu (Grup I) ile sulfasalazin grubu (Grup III) (Resim 2C) arasında anlamlı fark gözlendi ( $p=0.007$  ve  $p=0.043$ ). Sulfasalazin verilen grupta p65 ekspresyonu İ/R grubuna göre azalmakla beraber anlamlı fark saptanmadı ( $p=0.218$ ).

İmmünohistokimyasal boyanma yöntemi ile kaspas ekspresyonu değerlendirildiğinde epitelyal komponentte sitoplazmik boyanma gözlendi. En kuvvetli boyanan hücreler villus uçlarındaki epitelyal hücreler ile iskemi-reperfüzyon hasarına bağlı olarak lümen içerisine

dökülen hücrelerdi. Muskularis mukozaya yakın olan kript epiteli daha az boyanmıştı. Kaspas ekspresyonunun göstergesi olan epitelyal komponentteki boyanmanın gruplar arasındaki farkı araştırıldığında; kontrol grubuyla (Grup I) (Resim 3A) İ/R yapılan grup (Grup II) (Resim 3B) arasında anlamlı fark tespit edildi ( $p<0.0001$ ) Ancak kontrol grubuyla, sulfasalazin kullanılarak (Grup IV) (Resim 3C) bağırsakları korunmaya çalışılan grup arasında kaspas ekspresyonu açısından anlamlı fark gözlenmedi ( $p>0.05$ ). İ/R yapılan grup (Grup II) ile sulfasalazin kullanılan (Grup III) arasında da anlamlı fark mevcuttu ( $p<0.0001$ ).

### Tartışma

İntestinal iskemi/reperfüzyon (İ/R) hasarı sıklıkla cerrahi girişim gerektiren ciddi bir klinik durumdur. İskemik dokuların reperfüzyonu onarım fazı için gerekli olmasına karşın reaktif oksijen radikallerinin salınması ve nötrofil birikimini aktive etmesi nedeniyle akut iskemik hasarı daha kötüleştirir. Lökositlerin aktive olması ve takiben mukozal ve mikrovasküler infiltrasyonu bağırsaklarda selektif bariyer fonksiyonunun bozulmasına ve intestinal permeabilitede artışa yol açarak mikroorganizmaların ve toksik maddelerin translokasyonuna, multipl organ yetmezliğine ve ölüme neden olur(9-10).

İnce bağırsaklar İ/R hasarına ileri derecede duyarlı olup, mikrosirkülasyon bozukluğundan doku hasarına kadar uzanan bir spektrumda etkilere neden olur. İ/R hasarını düzeltmek için yapılan çalışmaların amacı progressif hücre ölümünden sorumlu olan inflamatuvar mekanizmaların tetiklenmesinde rol alan akut mediatörlerin induksiyonunun düzenlenmesidir(11).

İskemik dokuların reperfüzyonu, hızla reaktif oksijen metabolitlerini üretmekte bunlarda NF-kappaB'yi aktifleyerek doku reperfüzyon hasarını artırmaktadır. Transkripsiyon faktörü NF-kappaB çok sayıda gen ekspresyonunu düzenleyen akut inflamasyon gelişimi için kritik bir faktördür. NF-kappaB çeşitli homo ve heterodimerik NF-kappaB/Rel proteinlerinden oluşmakta olup, farklı dimerleri çeşitli transkripsiyonel aktivasyon özelliklerine sahiptir. NF-kappaB uyarılmamış hücrelerde sitoplazma içinde inhibitör protein olan I kappaB'ye bağlı olarak bulunur. İnflamatuvar uyarı sonucu, TNF-alfa, IL-1 beta ve reaktif oksijen bileşikleri, I kappaB alfa spesifik kinaz aracılığıyla fosforillenir ve proteozomlarla parçalanır. I kappaB alfa'nın parçalanması NF-kappaB'nin açığa çıkmasına neden olur. Serbest kalan NF-kappaB nükleusa transloke olur ve spesifik promotör elemanlara bağlanarak gen transkripsiyonunu başlatır.

NF-kappaB proinflamatuvar sitokinler, kemokinler, immünreseptörler, hücre adezyon molekülleri, akut faz proteinleri ve iNOS için hedef genlere etki eder. NF-kappaB'nin aktivasyonu inflamatuvar yanıtta etkili pek çok ürünün genetik transkripsiyonunda artışın koordine edilmesine yol açar. Bu ürünlerle NF-kappaB arasında pozitif geri bildirim mekanizması vardır ve böylece lokal inflamatuvar yanıtlar artırılır ve süreklilik kazanır. İnflamatuvar süreçte NF-kappaB'nin kritik bir rolü vardır ve İ/R hasarında NF-kappaB'nin aktiflenmesiyle karaciğer, kalp, akciğer gibi pek çok organın zarar gördüğü gösterilmiştir(12-14). Bu deneysel çalışmada İ/R hasarında inflamatuvar uyarılarla aktive olan NF-kappaB'nin bağırsak mukozasındaki göstergesi olan iNOS ve p65 (NF-kappaB'nin aktif alt ünitesi) protein ekspresyon-

larını immünohistokimyasal boyanma ile değerlendirdik.

NO'in gastrointestinal mukoza hasarı mediatörü mü yoksa savunma mekanizması mı olduğu tartışmalıdır(15). Wu ve ark. yaptıkları çalışmada(8); İ/R'dan sonra rat ince bağırsağında iNOS'un artmış mukozal apoptozisle ilgili olduğunu göstermişlerdir. Artmış iNOS'un NO üretimini artırması İ/R hasarını takiben apoptozisteki artışla ilgilidir. Apoptozis programlı hücre ölümü olup, doku homeostazisinin devamında olduğu gibi çok hücreli canlıların normal gelişiminde de esastır. Apoptozis; aktif enerji bağımlı hücre ölümüdür; fizyolojik uyarılar, serbest radikaller, FAS, TNF-alfa, TNF apoptozisle ilgili indüklenebilir ligand, hücre zarındaki iyon kanallarında değişiklik ve büyüme faktörünün geri çekilmesi gibi patolojik sitotoksik uyarılarla ortaya çıkar. Apoptozisin gelişiminde anahtar faktör mitokondriden sitozollere sitokrom-c salınmasıdır. İ/R hasarı ve apoptozis arasındaki ilişki karaciğer, beyin, böbrek, miyokard, pankreas ve mide gibi çok sayıda organda gösterilmiştir(16,17). Daha önceki çalışmalarda gösterildiği gibi süperior mezenterik arterin tıkanması ve takiben reperfüzyonu, hasara ve ince bağırsak mukozasında apoptozise yol açar(18). Ancak günümüzde İ/R hasarında apoptozisin nasıl indüklendiği tam olarak açıklığa kavuşmamıştır.

iNOS ve apoptozis arasındaki ilişki açısından iNOS tarafından üretilen yüksek konsantrasyondaki NO çok sayıdaki hücre tipinde (gastrik epitel hücreleri, gastrik enterokromaffin hücreler, makrofajlar, timositler, kondrositler, yumuşak düz kas hücreleri ve çeşitli nöronal hücreler) apoptozisin nedeni olarak tanımlanmıştır ve NO'in çeşitli hücre tiplerinde (pankreas adacık hücreleri ve nöron-

lar), kaspas bağımlı apoptozisi indüklendiği bildirilmiştir(19). Bunun yanında, apoptozis açısından NO'in rolü hala tartışmalı olmakla beraber NO'in bazı hücre tiplerinde apoptozisi önlediği bildirilmiştir(11). Çalışmamızda, iNOS ve NO'in indüklendiği kaspas bağımlı apoptozisi göstermek amacıyla bağırsakta mukozal epitelyal komponentte iNOS ve kaspas protein ekspresyonlarını ve serumda NO seviyelerini araştırdık. İ/R hasarında bu proteinlerin ekspresyonları ve serum NO seviyelerinin arttığını dolayısıyla apoptozisin aktive olduğunu tespit ettik.

Wu ve ark. deneysel çalışmalarında(8), kullandıkları üç inhibitörün İ/R'dan sonra iNOS'u inhibe ederek apoptozisi iyileştirdiğini belirtmişlerdir. L-NAME reperfüzyon aşamasında kan akımını azaltarak, trombosit agregasyonunu inhibe ederek ve lökosit adezyonunu azaltarak kısmen apoptozisi önler. Bunun nedeni L-NAME'in nonselektif NOS inhibitörü olmasıdır. Aminoguanidin rölatif-selektif iNOS inhibitörü olması yanında başka farmakolojik etkilere de sahiptir. Bu etkilerin en önemlisi histamini inaktive eden diamin oksidaz enzimi inhibisyonudur. Yazarlar daha önceki çalışmalarında aminoguanidin ile ön tedavinin diamin oksidaz enzimini inhibe ettiğini ve buna bağlı histamin seviyesinin kanda yükseldiğini göstermişlerdir. Yani apoptozisin azalmasıyla beraber histaminerjik etki söz konusudur.

ONO-1714 yeni bir siklik amidin derivesi olup, potent bir selektif iNOS inhibitörüdür. ONO-1714 L-NAME'e göre 34 kat, aminoguanidine göre kat daha güçlüdür. ONO-1714 ile ön tedavi sonucu İ/R sonrası intestinal apoptozisin azaltılmasında NO dışında başka faktörler olma ihtimaline karşın iNOS'un inhibisyonunun

apoptozisi azalttığına kanıt olarak gösterilebilir(20). Bu çalışmada iNOS inhibisyonunun apoptozis aktivasyonunu önlediği hipotezinden yola çıkarak güçlü NF-kappaB inhibitörü olan sulfasalazin kullanıldı. Bu kimyasalın kullanıldığı deneklerde iNOS ve NO bağımlı kaspas protein ekspresyonlarının azaldığı tespit edildi. Bu bulgular serum NO seviyelerinin azaldığının tespit edilmesiyle de desteklendi. Dolayısıyla sulfasalazinin ince bağırsak İ/R hasarında aktive olan mukoza epitelindeki apoptozu azalttığına inanmaktayız.

Deneysel ve klinik çalışmalar İ/R hasarında NO'in önemi üzerinde dururken, erken dönem İ/R'da NO oluşumu ile ilgili tartışmalı sonuçlar bildirilmiştir. Serum NO konsantrasyonu bazı çalışmalarda yüksek(21), bazılarında değişmemiş(22), bazılarında da düşük bulunmuştur(23). Çalışmamızda ince bağırsak İ/R hasarı sonrası serumda NO seviyelerinin arttığını tespit ettik. İ/R hasarından sonra NO'in doku koruyucu etkiye sahip olduğunu belirten çalışmalar da vardır.(11)

Nakashima ve ark. (24) yaptıkları çalışmada, inflamatuvar süreç sırasında NO üretiminin yalnızca mikroppların ve tümör hücrelerinin öldürülmesi ile ilgili değil, aynı zamanda normal dokularda da harabiyet yaptığını ve septik şokta vasküler yatakta refrakter kollapsa neden olduğunu bildirmişlerdir. NO'in yüksek üretimi vücut için zararlı olmasına karşın, NO üretiminin tam inhibisyonunun NO'in denge sağlayıcı etkisi nedeniyle yararlı olmadığı sonucuna varmışlardır.

Sulfasalazin ve salisilat derivesi olan 5-ASA romatoid artrit ve inflamatuvar bağırsak hastalığının tedavisinde en etkili ilaçlar arasındadır. Ancak bu ilaçların etki mekanizmaları hala tam olarak açık-

lığa kavuşmamıştır. (25,26) Sulfasalazin NF-kappaB inhibitörü olarak İ/R hasarında koruyucu etkisi açısından çeşitli dokularda araştırılmıştır. Transkripsiyon faktör NF-kappaB sulfasalazin tarafından gerçekleştirilen immunsupresyonun hedefidir. NF-kappaB'ye bağımlı transkripsiyon sulfasalazin tarafından mikro ve milimolar konsantrasyonlarda inhibe edilir. 5-ASA ve sulfapiridin bütün dozlarda NF-kappaB'yi bloke etmez. Sulfasalazin NF-kappaB'nin nükleer translokasyonunu sağlayan TNF alfa, I kappaB alfa'nın degradasyonunu inhibe eder. Wahl ve ark.(25) yaptıkları çalışmada, sulfasalazinin NF-kappaB'nin potent ve spesifik bir inhibitörü olduğunu göstermişlerdir.

Sulfasalazinde aktif bileşik 5-ASA'dır. Sulfapiridin taşıyıcı molekül olup, yan etkilerin bir kısmından sorumludur. Sulfasalazin ve 5-ASA in vitro olarak immün süreçteki çok sayıda hücre reaksiyonunu inhibe etmektedir. Bunların en bilinenleri T hücre proliferasyonu ve T hücrelere karşı antijen sunumunun inhibisyonudur. Hem sulfasalazin hem 5-ASA makrofaj ve nötrofillerin kemotaksis ve adezyon fonksiyonlarını bozarak, TNF- alfanın üretimini bloke ederek geniş ölçüde antiinflamatuar etki spektrumuna sahiptir. Sulfasalazin ve 5-ASA siklooksijenazın potent bir inhibitörü olup, inflame bağırsakta prostoglandin E üretimini inhibe eder. Yine 5-lipooksijenaz ve proteinini inhibe ederek, lökötrienlerin kemotaktik etkilerini bozar. 5-ASA aynı zamanda en potent etkili serbest radikal temizleyici antioksidandır. MacDermott ve ark.(26) yaptıkları çalışmada, sulfasalazinin NF-kappaB aktivasyonunun potent bir inhibitörü olduğunu, bunun mekanizmasının ise I kappaB'nin fosforilasyon ve

degradasyonunu inhibe ederek NF-kappaB'nin nükleusa translokasyonunun engellenmesi olduğunu göstermişlerdir.

Feeley ve ark. (27) yaptıkları çalışmada, potent bir NF-kappaB inhibitörü olan sulfasalazin ile tedavinin allograft sürvisini artırdığı, reperfüzyon hasarını azalttığı, adezyon molekül ekspresyonunu azalttığı hipotezinden yola çıkarak sulfasalazin ile tedavinin reperfüzyon hasarını azaltmada etkili bir yöntem olup, rat kardiak transplant modelinde allograft sürvisini artırdığını göstermişlerdir.

Potent bir NF-kappaB inhibitörü olan sulfasalazin bu deneysel çalış-

mada bağırsakta İ/R hasarını önleyebileceği hipoteziyle kullanıldı. İ/R sonrası sulfasalazin kullandığımız deneklerde ince bağırsak mukoza epitelinde iNOS ve p65 protein ekspresyonlarının azaldığı tespit edildi. Aynı deneklerde serumda total nitrit miktarlarında azaldığını tespit ettik. Bu bulgu sulfasalazin ile İ/R hasarı sonrası oluşan mukozal hasarın azaltabileceğini düşündürmüştür.

Sonuç olarak; ratlarda intestinal İ/R modelinde kullanılan sulfasalazinin, mukoza epitelinde iNOS, p65 ve kaspas protein ekspresyonları ile serum NO seviyelerinde azalmaya yol açtığı gösterilmiştir.

## Summary

### Protective effect of sulfasalazine on the intestinal ischemia-reperfusion injury

#### Purpose:

Acute mesenteric occlusion is a serious clinical entity which usually requires prompt surgical intervention. Although reperfusion is mandatory for the repair, the release of free oxygen radicals and the induction of neutrophil accumulation attenuates the injury. NFkappa B has a critical role in inflammatory process. This study is based on the hypothesis that sulfasalazine, a potent inhibitor of NF-kappa B may counteract or decrease the ischemia/reperfusion (I/R) injury in rats.

#### Materials and Methods:

The study consisted of three groups each containing 10 rats. In the control group (Group I) superior mesenteric artery was dissected, but not ligated. Two hours later tissue samples from ileum and blood samples from portal vein were taken and the rats were sacrificed. In I/R group (Group II) after dissection of superior mesenteric artery, it was clamped just distal to the origin from aorta. Clamp is released after 1 hour ischemia and tissues were reperfused. The same samples as in control group were taken. In sulfasalazine group (Group III), apart from group II, 30 minutes after the beginning of the ischemia, sulfasalazine was given. The tissue samples from ileum were stained for iNOS, p65 and caspase immunohistochemically. NO level was determined in blood samples by Greiss reaction. iNOS, p65 and caspase protein expressions in tissue sections and NO levels in serum were at the basal level in control group.

**Results:** In I/R group both protein expressions and serum NO levels were very high. However in sulfasalazine group, these parameter levels were found higher than control group, but less than the levels found in I/R group. Statistical analysis showed that although there was significant difference between control group and I/R group ( $p<0.05$ ) with regard to serum NO levels, iNOS and caspase expressions, sulfasalazine group has no significant difference when compared with control group ( $p>0.05$ ). p65 expression was found to be significantly increased in I/R group compared to control group ( $p<0.05$ ), whereas in sulfasalazine given group the expression decreased compared to I/R group. However, the decrement was not statistically significant.

#### Conclusion:

This study demonstrated that sulfasalazine may have protective effect on experimental rat intestinal ischemia-reperfusion injury through down-regulation of tissue proteins responsible from cellular damage.

#### Key words:

Intestine, ischemia-reperfusion injury, sulfasalazine

## KAYNAKLAR

1. Boley SJ, Brandt LJ, Sammartano RJ. History of mesenteric ischemia. The evolution of a diagnosis and management. *Surg Clin North Am* 1997;77:275-288.
2. Mitchell RN, Cotran RS. Cellular pathology I: Cell injury and cell death. In: Robbins Pathologic Basis of Disease. 6th edition. Philadelphia: WB Saunders Company, 1999:5-28.
3. Grace PA. Ischaemia-reperfusion injury. *Br J Surg* 1994;81:637-647.
4. Lin E, Calvano SE, Lowry SF. Systemic response to injury and metabolic support. In: Brunicaardi FC, Andersen DK, Billian TR, Dunn DL, Hunter JG, Pollock RE, eds. *Schwartz's Principles of Surgery*. 8th edition. New York: McGraw-Hill Medical Publishing Division, 2005:1-32.
5. Girotti AW. Lipid hydroperoxide generation, turnover, and effector action in biological systems. *J Lipid Res* 1998;39:1529-1542.
6. Lille ST, Lefler SR, Mowlavi A, et al. Inhibition of the initial wave of NF-kappaB activity in rat muscle reduces ischemia/reperfusion injury *Muscle Nerve* 2001;24:534-541.
7. Sasaki H, Zhu L, Fukuda S, Maulik N. Inhibition of NF-kappaB activation by pyrrolidine dithiocarbamate prevents in vivo hypoxia/reoxygenation-mediated myocardial angiogenesis. *Int J Tissue React* 2000;22:93-100.
8. Wu B, Iwakiri R, Tsunada S, et al. iNOS enhances rat intestinal apoptosis after ischemia-reperfusion. *Free Radic Biol Med* 2002;33:649-658.
9. Zimmerman BJ, Granger DN. Mechanisms of reperfusion injury. *Am J Med Sci* 1994;307:284-292.
10. Akcakaya A, Alimoglu O, Sahin M, Abbasoglu SD. Ischemia-reperfusion injury following superior mesenteric artery occlusion and strangulation obstruction. *J Surg Res* 2002;108:39-43.
11. Kalia N, Pockley AG, Wood RF, Brown NJ. Effect of FK409 on intestinal ischemia-reperfusion injury and ischemia induced changes in the rat mucosal villus microcirculation. *Transplantation* 2001;72:1875-1880.
12. Ross SD, Kron IL, Gangemi JJ et al. Attenuation of lung reperfusion injury after transplantation using an inhibitor of nuclear factor- B. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2000;279:L528-536.
13. Abraham E. NF-kappa B activation. *Crit Care Med* 2000;28:100-104.
14. Shen WH, Zhang CY, Zhang GY. Antioxidants attenuate reperfusion injury after global brain ischemia through inhibiting nuclear factor-kappa B activity in rats. *Acta Pharmacol Sin* 2003;24:1125-1130.
15. Khanna A, Rossman JE, Fung HL, Caty MG. Attenuated Nitric oxide synthase and protein expression accompany intestinal ischemia/reperfusion injury in rats. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;269:160-164.
16. Yadav S, Sindram D, Perry DK, Clavien PA. Ischemic preconditioning protects the mouse liver by inhibition of apoptosis through a caspase-dependant pathway. *Hepatology* 1999;30:1223-1231.
17. Liang F, Gao E, Tao L, et al. Critical timing of L-arginine treatment in post ischemic myocardial apoptosis-role of NOS isoforms. *Cardiovasc Res* 2004;62:568-577.
18. Iwakiri R, Gotoh Y, Noda T, et al. Programmed cell death in rat intestine: effect of feeding and fasting. *Scand J Gastroenterol* 2001;36:39-47.
19. Fujimoto K, Hosotani R, Wada M, et al. Ischemia-reperfusion injury on the pancreas in rats: identification of acinar cell apoptosis. *J Surg Res* 1997;71:127-136.
20. Naito Y, Takagi T, Ichikawa H., et al. A novel potent inhibitor of inducible nitric oxide inhibitor, ONO-1714, reduces intestinal ischemia-reperfusion injury in rats. *Nitric Oxide* 2004;10:170-177.
21. Basoglu M, Yildirgan I, Akcay F, Kiziltunc A, Kava I, Oren D. Glutathione and nitric oxide concentrations in glutamine-infused rabbits with intestinal ischaemia/reperfusion. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1997;35:415-419.
22. Cuzzocrea S, Zingarelli B, Caputi AP. Role of constitutive nitric oxide synthase and peroxynitrite production in a rat model of splanchnic artery occlusion shock. *Life Sci* 1998;63:789-799.
23. Chan KL, Zhang XH, Fung PC, Guo WH, Tam PK. Role of nitric oxide in intestinal ischaemia-reperfusion injury studied using electron paramagnetic resonance. *Br J Surg* 1999;86:1427-1432.
24. Nakashima O, Terada Y, Inoshita S, Kuwahara M, Sasaki S, Marumo F. Inducible nitric oxide synthase can be induced in the absence of active nuclear factor-kappaB in rat mesengial cells: involvement of the Janus kinase signalling pathway. *J Am Soc Nephrol* 1999;10:721-729.
25. Wahl C, Liptay S, Adler G, Schmid RM. Sulfasalazine: a potent and specific inhibitor of Nuclear factor kappa B. *J Clin Invest* 1998;101:1163-1174.
26. MacDermott RP. Progress in understanding the mechanism of action of 5-aminosalicylic acid. *Am J Gastroenterol* 2000;95:3343-3348.
27. Feeley BT, Park AK, Hoyt EG, Robbins RC. Sulfasalazine inhibits reperfusion injury and prolongs allograft survival in rat cardiac transplants *J Heart Lung Transplant* 1999;18:1088-1095.