

# Sıçanlarda İntestinal İskemi/Reperfüzyon Hasarında N-Asetilsisteinin ve Ebselenin Etkileri

## Effects of N-Acetylcysteine and Ebselen on Rat Intestinal Ischemia/Reperfusion Injury

Dr. Ahmet GÜVEN,<sup>a</sup>  
Dr. Turan TUNÇ,<sup>b</sup>  
Dr. Cüneyt ATABEK,<sup>a</sup>  
Dr. Bülent UYSAL,<sup>c</sup>  
Dr. Turgut TOPAL,<sup>c</sup>  
Dr. Esra ERDOĞAN,<sup>d</sup>  
Dr. Ahmet KORKMAZ,<sup>c</sup>  
Dr. Haluk ÖZTÜRK<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Çocuk Cerrahisi AD,  
<sup>b</sup>Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları AD,  
<sup>c</sup>Fizyoloji AD,  
<sup>d</sup>Histoloji ve Embriyoloji AD,  
GATA, ANKARA

Geliş Tarihi/Received: 16.08.2007  
Kabul Tarihi/Accepted: 23.11.2007

Yazışma Adresi/Correspondence:  
Dr. Ahmet GÜVEN  
GATA, Çocuk Cerrahisi AD,  
ANKARA  
drahmetguven@yahoo.com

**ÖZET Amaç:** Serbest oksijen radikalleri, intestinal iskemi/reperfüzyon (İ/R) hasarı gibi birçok hastalığın patofizyolojisinde önemli rol oynarlar. Çalışmamızda, N-asetilsisteinin (NAC) ve Ebselenin İ/R'nin bağırsaklarda oluşturduğu hasara karşı iyileştirici etkisinin olup olmadığının araştırılması amaçlandı. **Gereç ve Yöntemler:** Kırk adet erkek Sprague Dawley sıçan, 1. Grup kontrol, 2. Grup İ/R, 3. Grup İ/R+NAC, 4. Grup İ/R+ Ebselen, 5. Grup İ/R+NAC+Ebselen grubu olmak üzere 5 eşit gruba ayrıldı. İ/R, İ/R+NAC, İ/R+Ebselen ve İ/R+NAC+Ebselen gruplarında, superior mezenterik arter (SMA) klemp aracılığı ile anestezi altında kapatılarak, 30 dk iskemi ve 3 gün reperfüzyon uygulandı. Kontrol grubunda SMA klemp edilmeden sadece disseke edildi. Çalışma sonunda terminal ileum rezeksiyonu yapıldı. Dokulardan oksidatif hasar göstergesi olarak protein karbonilasyon (PK) ve malondialdehit (MDA) seviyesi, antioksidan sistem göstergesi olarak da süperoksit dismutaz (SOD) ve glutatyon peroksidaz (GPx) enzim aktiviteleri ölçüldü. Ayrıca ileum histopatolojik olarak incelendi. **Bulgular:** İ/R grubunda; doku SOD ve GPx aktivitelerinde azalma, PC ve MDA seviyelerinde artış ve intestinal hasar derecelerinde artış gözlemlendi ( $p < 0.05$ ). NAC, Ebselen ve özellikle NAC+Ebselen uygulanan grupta, SOD ve GPx seviyelerinde İ/R grubuna göre anlamlı artma, PK ve MDA seviyelerine ise anlamlı azalma gözlemlendi. İ/R'ye bağlı olarak artmış doku hasar göstergelerinin ve azalmış antioksidan enzim seviyelerinin özellikle NAC ve ebselenin birlikte kullanıldığı grupta kontrol seviyelerine döndüğü görüldü. **Sonuç:** Bu çalışmada, intestinal İ/R hasarında oksidatif stresin önemli rol oynadığı ve bu hasara karşı N-asetilsistein ile birlikte ebselenin kullanılmasının daha yararlı olacağı görülmüştür.

**Anahtar Kelimeler:** İskemi/reperfüzyon hasarı; ebselen; bağırsak; N-asetilsistein

**ABSTRACT Objectives:** Reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS) generated during reperfusion of the tissue are characteristic of ischemia and reperfusion (I/R) injury. The present study was designed to evaluate whether the administration of N-acetylcysteine (NAC) and Ebselen has protective potential in intestinal I/R injury. **Material and Methods:** Forty male Sprague-Dawley rats were divided into five groups equally: Group-1 Sham operated; Group-2 I/R; Group-3 I/R+ NAC; Group-4 I/R+Ebselen; Group-5 I/R+ NAC+Ebselen. Intestinal ischemia for 30 min and reperfusion for 3 days were carried out. Ileal specimens were obtained to determine the tissue levels of Malondialdehyde (MDA), Protein Carbonyl (PC) content, Superoxide dismutase (SOD) and Glutathione Peroxidase (GPx) and histologic changes. **Results:** There was a statistically significant decrease in SOD and GPx levels, with an increase in MDA and PC content and intestinal mucosal injury scores in intestinal I/R group ( $p < 0.05$ ). However, NAC and Ebselen, especially administered combination of them, led to a statistically significant increase in SOD and GPx level, with a decrease in MDA and PC content and intestinal mucosal injury scores when compared with I/R group. ( $p < 0.05$ ). **Conclusion:** NAC and Ebselen played significant protective role in attenuating I/R injury of the intestine by scavenging ROS and RNS.

**Key Words:** Reperfusion injury; ebselen; intestines; N-acetylcysteine

İntestinal iskemi/reperfüzyon (İ/R) genellikle belirgin morbidite ve mortalite ile sonuçlanan ciddi bir klinik tablodur. İntestinal kan akımında bozukluğa yol açabilen nedenler nekrotizan enterokolit, hemorajik şok, sepsis, travma, mezenter arter trombozu gibi oldukça geniş bir klinik spektruma sahiptir ve her yaş grubundan hasta intestinal İ/R riski altındadır.<sup>1-3</sup> İskemi tek başına intestinal hasarlara neden olsa da, asıl hasar dokunun reperfüzyonu esnasında gelişmektedir.<sup>1,4,5</sup>

İ/R dokudaki serbest oksijen radikallerini artırarak bir dizi karmaşık olaylar zinciri sonucu hasara yol açar. İskemi sırasında hücrede mitokondrielerde oksidatif fosforilasyon etkilenmekte ve ATP üretimi azalmaktadır. ATP azalması membran iyon geçirgenliğini etkileyerek hücre içi  $Ca^{+2}$  konsantrasyonunda artışa neden olur.<sup>5,6</sup> Bu artış ksantin dehidrogenazı, ksantin oksidaza çeviren proteazları aktive eder. Reperfüzyon esnasında ise sağlanan moleküler oksijen ksantin oksidaz tarafından iki süperoksit anyonuna ( $O_2^{\cdot -}$ ) dönüşür. Bu dönüşüm sırasında ortaya çıkan  $H_2O_2$  ve hidroksil radikali ( $OH^{\cdot}$ ) doku hasarından asıl sorumlu olan moleküllerdir.<sup>4-6</sup> Dokularda oksidatif hasarının önlenmesinde en etkili antioksidan enzimler süperoksit dismutaz (SOD) ve glutatyon peroksidazdır (GPx). SOD dokulardaki süperoksit anyonlarını enzimatik mekanizma ile  $H_2O_2$ , GPx ise  $H_2O_2$ 'yi suya çevirir.<sup>3,7-9</sup>

İ/R hasarındaki fizyopatolojik sürecin diğer önemli bir unsuru da uyarılabilir nitrik oksit sentaz (iNOS) enzim indüksiyonudur. iNOS yüksek düzeyde nitrik oksit (NO) oluşumuna neden olur.<sup>10</sup> Ortamdaki süperoksit NO ile hızla reaksiyona girerek peroksinitritleri ( $ONOO^{\cdot}$ ) oluşturur. Ortamda bulunan yüksek NO'nun süperoksit için SOD enzimi ile yarıştığı gösterilmiştir. Bu yarışma sonucunda SOD süperoksiti süpüremez ve peroksinitritler ortaya çıkar. Bu nedenle İ/R'de ortaya çıkan hasar nitro-oksidatif bir hasardır. Peroksinitritler radikal olmamalarına rağmen, reaktif moleküllerdir ve tüm makromoleküllere saldırarak hasara neden olurlar.<sup>11,12</sup>

Serbest oksijen radikalleri (SOR) ve peroksinitritler DNA, nükleik asit, serbest aminoasitler, proteinler, lipidler, lipoproteinler, karbonhidratlar

ve bağ dokusu makro-molekülleri ile reaksiyona girerek geriye dönüşümlü veya dönüşümsüz olarak hasar meydana getirebilirler.<sup>4,5</sup> Oksidatif hasar sırasında ortaya çıkan protein oksidasyonu doku protein karbonil içeriği (PK) ile lipid peroksidasyonu ise doku malondialdehit (MDA) seviyesi ile biyokimyasal olarak belirlenebilmektedir.<sup>6,10,13</sup>

Çalışmamızda etkinliği değerlendirilen N-asetilsistein (NAC)'in serbest radikaller tarafından oluşturulan doku hasarına karşı koruyucu etkisi olduğu, direkt "süpürücü" etki göstererek veya stabil nitrozotil türevleri oluşturarak gerçekleştirdiği bildirilmektedir.<sup>14</sup> Selenyumlu bir bileşik olan ebselen ise GPx aktivitesini güçlendiren ve lipooksijenaz yolunu inhibe eden bir antioksidandır. Ebselenin diğer önemli özelliği peroksinitrit süpürücüsü olmasıdır.<sup>15,16</sup> Bu nedenle çalışmamızda antioksidan özellikleri yanında güçlü bir peroksinitrit süpürücüsü olan ebselen de kullanılmıştır.

Bu çalışmada; sıçanlarda, NAC ve ebselenin intestinal İ/R hasarında antioksidan enzimler, protein oksidasyonu ve lipid peroksidasyon düzeyleri ile intestinal histopatolojik değişiklikler üzerindeki etkileri araştırıldı.

## ■ GEREÇ VE YÖNTEMLER

Bu çalışmada 40 adet 3-4 haftalık Sprague Dawley cinsi erkek sıçan (100-150 g) kullanıldı. Hayvanlar, kontrollü bir odada (Sıcaklık 20-25°C, nem %70-80, 12 saat gündüz / 12 saat gece) ve ayrı kafeslerde tutuldu. Sıçanlara deneye kadar, standart sıçan yemi ve çeşme suyu verildi. Sıçanlar her biri 8'er denekten oluşan 5 gruba ayrıldı; Grup 1: Kontrol, Grup 2: Kontrol İ/R, Grup 3: NAC + İ/R, Grup 4: ebselen+İ/R ve Grup 5: NAC+ebselen+İ/R. NAC 300 mg/kg/gün dozunda intraperitoneal, ebselen ise 20 mg/kg/gün dozunda intragastrik olarak operasyondan 24 saat önce başlanarak deney sürecinde verildi.

Standart beslenmeye alınan denekler operasyondan 12 saat önce aç bırakıldı. Tüm operasyonlar ketamin/ksilazin (20/2 mg/kg) anestezisi altında steril koşullarda gerçekleştirildi. Anestezisi sonrası sıçanların karın boşluğu açılarak superior mezenterik arter (SMA) ortaya konuldu, kontrol grubu dışındakilere bir atravmatik mikroklempt yardımcı

ile 30 dk. iskemi, ardından 3 gün reperfüzyon uygulandı. Reperfüzyonun sonunda terminal ileumun, çekumdan 10 cm proksimale kadar olan kısmının rezeksiyonu yapıldı. Çıkarılan kısım soğuk izotonik sodyum klorür (%0.9 NaCl) ile perfüze edilerek temizlendi, bir parçası histopatolojik inceleme için %10'luk formalin solüsyonuna konularak fiske edildi ve diğer parçalar biyokimyasal analizler yapıncaya kadar -80 °C'de saklandı.

### BİYOKİMYASAL ANALİZLER

Dondurulmuş dokular fosfat tampon (pH 7.4) içinde bir homojenizatör (Heidolph DiAx 900; Heidolph Elektro GmbH, Kelheim, Almanya) yardımıyla homojenize edildi. Süpernatant, biyokimyasal analiz için kullanılmak üzere ayrı bir tüpe alındı. İlk olarak doku homojenatlarından Lowry metodu ile protein miktarları saptandı.<sup>17</sup>

### DOKU PROTEİN KARBONİL MİKTARI TAYİNİ

Doku PK miktarı, karbonil grupların 2.4-dinitrofenilhidrazin ile reaksiyona girerek 2.4-dinitrofenilhidrazona çevrilmesi temeline dayanan Levine ve ark.nın tarif ettiği yöntemle spektrofotometrik (Helios, Epsilon, USA) olarak tayin edildi.<sup>18</sup>

### DOKU LİPİD PEROKSİDASYON MİKTARI TAYİNİ

Lipid peroksidasyon seviyesi Ohkawa ve ark.nın tarif ettiği şekilde tiobarbitürik asit (TBA) reaksiyonu ile tayin edildi.<sup>19</sup> Bu yöntem tiobarbitürik asit ile reaksiyona giren MDA'nın 535 nm'de verdiği renk değişikliğinin spektrofotometrik olarak tayinine dayanır.

### SÜPEROKSİT DİSMUTAZ ENZİM AKTİVİTESİNİN TAYİNİ

SOD aktivitesi Sun ve ark. tarafından tanımlanan nitroblue tetrazolyum (NBT) yöntemi ile ölçüldü.<sup>9</sup> NBT süperoksitler ile blue-formazana dönüşür ve bu 560 nm'de absorbansları okunarak tayin edilir.

### GLUTATYON PEROKSİDAZ ENZİM AKTİVİTESİNİN TAYİNİ

GPx enzim aktivitesi Paglia ve Valentine'nin tanımladığı, GPx'in glutatyon redüktaz tarafından oluşturulan okside NADPH ile birleşmesi esasına dayanan yöntem ile tayin edildi.<sup>7</sup> Okside NADPH'nın GPx ile birleşmesi sonucu ortaya çıkan absorban değişimi spektrofotometrik olarak 37°C'de 340 nm'de 5 dk.

boyunca 15 sn. aralarla okunarak kinetik olarak tayin edildi.

### HİSTOPATOLOJİK İNCELEME

Sıçanlardan alınarak formalinle tespit edilen dokular parafine gömüldü. Seri 5 µm kesitler alınarak hemotoksilen-eozin ile boyandı. Kesitler ışık mikroskobu altında incelendi. Histolojik olarak ileum mukoza-sındaki patolojik değişiklikler Chio ve ark.nın tanımladığı şekilde 5 gruba ayrıldı.<sup>20</sup> Normal mukoza; 0, epitelyal tabaka lamina propriadan bir miktar ayrılması; 1, epitelyal tabaka lamina propriadan belirgin olarak ayrılması ve bunun yanında villusların kısalması; 2, belirgin lamina propria ile birlikte villusların kaybolması ve dilate damarların mevcut olması; 3, lamina proprianın tamamen ayrılması, kanama ve ülserasyonların olması; 4 olarak değerlendirildi. Tüm histopatolojik incelemeler körleme olarak bir patolog tarafından değerlendirilmiştir.

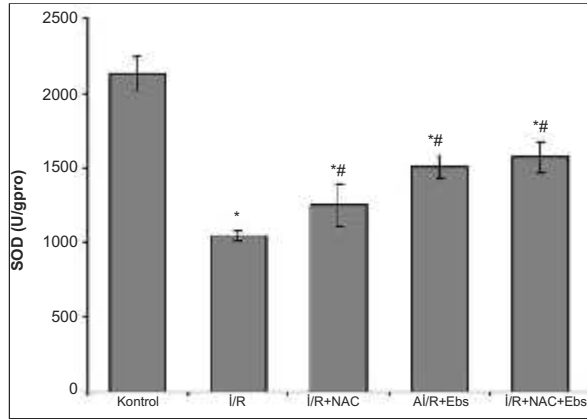
Çalışmamız, Ulusal laboratuvar hayvanları bakım ve kullanım prensipleri doğrultusunda hayvan hakları korunarak ve GATA Hayvan Etik Kurulundan onay alındıktan sonra gerçekleştirildi.

Sonuçlar ortalama ± standart sapma olarak verildi. Verilerin normal dağılıma uygun olup olmadığı "SPSS 11.0 for Windows Statistic" programı kapsamında yer alan "Normality plots with tests" ile tespit edildi. Verilerin normal dağılıma uygun olduğu görüldüğünden istatistiksel analizlerde ANOVA (Bonferroni) testi kullanıldı ve p< 0.05 anlamlı olarak kabul edildi.

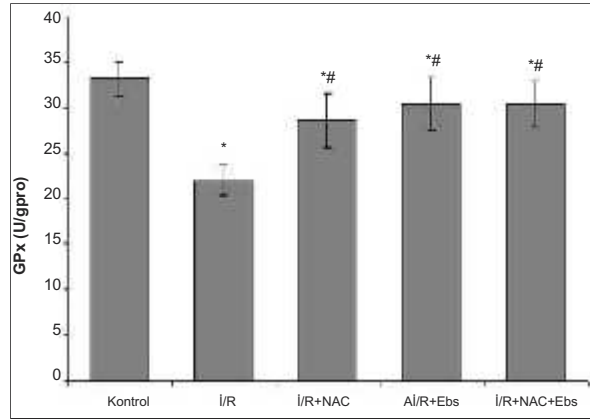
## BULGULAR

Doku SOD ve GPx enzim aktivitesi sırasıyla Şekil 1 ve 2'de görülmektedir. Enzim aktivitelerinin İ/R grubunda, kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde düşük olduğu saptandı. Tedavi gruplarında ise enzim aktivitelerinin İ/R grubuna göre yüksek olduğu gözlemlendi.

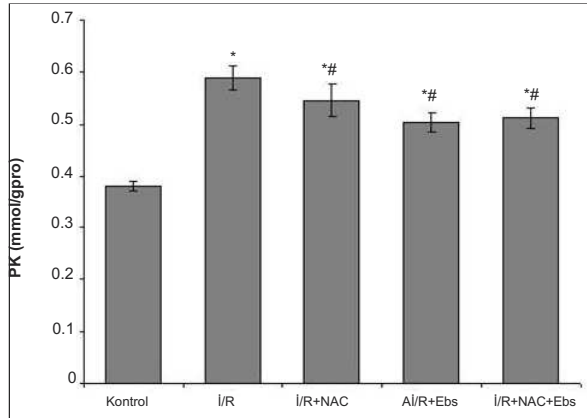
İntestinal doku PK düzeyinin İ/R grubunda anlamlı olarak arttığı gözlemlendi (Şekil 3). İ/R+NAC, İ/R+ebselele grubu ve İ/R+NAC+ebselele grubu İ/R grubu ile karşılaştırıldığında doku PK düzeyinin anlamlı olarak azaldığı saptandı. Bu azalma NAC+ebselele ile tedavi edilen grupta en fazla seviyeydi. Doku MDA seviyeleri PK seviyeleri ile paralellik gösterdi (Şekil 4). NAC ve ebselele uygu-



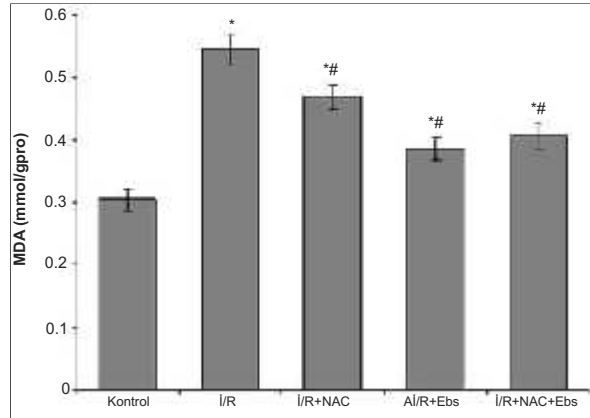
ŞEKİL 1: Terminal ileum SOD seviyeleri (\*p< 0.05 kontrol grubuna göre farklılık, #p< 0.05 I/R grubuna göre farklılık).



ŞEKİL 2: Terminal ileum GPx seviyeleri (\*p< 0.05 kontrol grubuna göre farklılık, #p< 0.05 I/R grubuna göre farklılık).



ŞEKİL 3: Terminal ileum PK seviyeleri (\*p< 0.05 kontrol grubuna göre farklılık, #p< 0.05 I/R grubuna göre farklılık).



ŞEKİL 4: Terminal ileum MDA seviyeleri (\*p< 0.05 kontrol grubuna göre farklılık, #p< 0.05 I/R grubuna göre farklılık).

lanan I/R'li grupta MDA seviyesi kontrol seviyesine yaklaştı ama halen yüksekti. Tüm biyokimyasal analiz sonuçları Tablo 1'de sunulmuştur.

Gruplara ait intestinal hasar derecelendirmesi Tablo 2'de sunulmuştur. Histopatolojik incelemede, I/R uygulanan sıçanlarda mukozal hasar belirdi. Özellikle villus boylarında kısalma, lamina proprianın mukozadan belirgin olarak ayrıldığı ve glandüler yapılarda kayıplar olduğu gözlemlendi. NAC ve ebselen ile tedavi edilen gruplarda mukozal hasarların I/R uygulanan grup ile kıyaslandığında belirgin olarak azaldığı ve lamina proprianın daha iyi korunduğu gözlemlendi. NAC ve ebselenin birlikte kullanıldığı grubun incelenen histopatolojik kesitlerinde ise minimal lamina propria ayrılması dışında başka patolojik bulgu gözlemlenmedi (Resim 1).

## TARTIŞMA

Çalışmamızda iki majör endojen antioksidan enzim olan SOD ve GPx aktiviteleri I/R'ye maruz bırakılan intestinal dokularda düştüğü gözlemlendi. Ayrıca oksidatif strese bağlı olarak artan protein oksidasyonu ve lipid peroksidasyonu göstergesi olan PK ve MDA seviyelerinde artış olduğu gözlemlendi. Biyokimyasal sonuçlara göre, tedavi gruplarında SOD ve GPx enzim aktivitelerinde artma, buna karşın PK ve MDA seviyelerinin azalma saptandı. NAC ve ebselenin birlikte kullanıldığı sıçanlarda ise antioksidan enzim aktivitelerinde diğer gruplara oranla daha belirgin artış gözlemlendi. Histopatolojik inceleme intestinal dokularda I/R'ye bağlı olarak gelişen hasarların NAC'ın ebselen ile birlikte kullanıldığı grupta normale döndüğü gözlemlendi.

**TABLO 1:** Tüm gruplara ait biyokimyasal analiz sonuçları (ortalama  $\pm$  SD).

Gruplar	MDA (mmol/gprotein)	PK (mmol/gprotein)	SOD (U/gprotein)	GPx (U/gprotein)
Kontrol	0.304 $\pm$ 0.018	0.381 $\pm$ 0.010	2124.77 $\pm$ 115.36	33.18 $\pm$ 1.78
İ/R	0.544 $\pm$ 0.024*	0.589 $\pm$ 0.023*	1039.36 $\pm$ 34.84*	22.05 $\pm$ 1.73*
İ/R +NAC	0.469 $\pm$ 0.019* #	0.546 $\pm$ 0.031* #	1248.18 $\pm$ 144.65* #	28.65 $\pm$ 3.01* #
İ/R +Ebs	0.386 $\pm$ 0.018* #	0.503 $\pm$ 0.018* #	1507.71 $\pm$ 77.46* #	30.42 $\pm$ 2.91* #
İ/R +NAC+Ebs	0.407 $\pm$ 0.020* #	0.512 $\pm$ 0.020* #	1572.54 $\pm$ 105.16* #	30.46 $\pm$ 2.46* #

\*p&lt; 0.05, kontrol grubuna göre farklılık.

#p&lt; 0.05, İ/R grubuna göre farklılık.

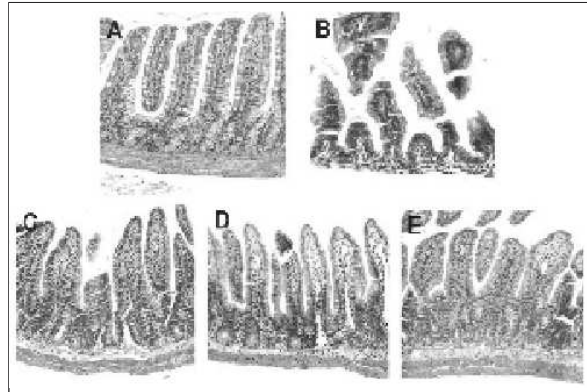
İntestinal kan akımındaki azalma veya kesilme ve sonradan oluşan reperfüzyon çeşitli derecelerde doku hasarı oluşturmaktadır. İskemik durumlarda, dokularda lipooksijenazlar, siklooksijenazlar, NADPH oksidaz ve nitrik oksit sentetaz gibi enzimlerin aktivasyonu sonucu SOR oluşmaktadır ve ayrıca reperfüzyonu takiben SOR'da hızlı bir yükselme olduğu bilinmektedir. Bu endojen süperoksit süpürücülerinin kapasitesinin üzerindedir.<sup>4,5,11,15</sup> İlk olarak mukolitik ajan olarak kullanılan NAC, antioksidan etkisi nedeniyle oksidatif strese bağlı hasarların önlenmesinde yaygın olarak deneysel çalışmalarda kullanılmıştır.<sup>6,14,21,22</sup> NAC'ın antioksidan etkisi iki şekilde açıklanabilir. NAC dokularda NAC-thiol radikallerine ve sonunda NAC disülfidlerine dönüşmektedir.<sup>21,23</sup> Oluşan bu disülfid türevleri OH<sup>-</sup>'i inaktive etmesi direkt etkisi olarak düşünülebilir. İkinci etkisi ise dolaylı olarak glutasyon sentezini artırmasıdır. NAC asetilen grubunu kaybedip L-sistein'e dönüşerek hücrelere girmekte ve GPx sentezine yardımcı olmaktadır. Bu nedenle kanser ve kalp hastalıkları gibi glutasyon aktivitesi azaldığı veya oksidatif stresin arttığı durumlarda NAC etkili olmaktadır.<sup>13</sup> Bu etkisi çalışmamızdaki yüksek GPx enzim aktivitesini açıklamaktadır. Ayrıca çalışmamızda lipid peroksidasyon ve protein karboksilasyon göstergeleri olan MDA ve PK düzeyleri NAC ile tedavi edilen grupta düşük bulunmuştur. Bu etki, NAC'ın nötrofil ve monositlerin inflamasyon sahasına göçünü önlemesi ve antioksidan etkisi sayesinde olmuş olabilir.<sup>22</sup> NAC, İ/R'ye maruz bırakılan kalp kası, karaciğer, böbrek ve solunum sisteminde deneysel olarak kullanılmış ve MDA seviyelerinde düşüş, antioksidan enzim etkinliğinde artışa neden olduğu gösterilmiştir.<sup>6,13,14,22</sup> Bu bilgiler de çalışmamız

**TABLO 2:** Terminal ileum hasarlarının histopatolojik değerlendirilmesi.

Gruplar	Mukozal Hasar Dereceleri (ortalama $\pm$ SD)
Kontrol	0
İ/R	3.1 $\pm$ 0.4*
İ/R + NAC	1.4 $\pm$ 0.2*#
İ/R + Ebselen	1.2 $\pm$ 0.4*#
İ/R + NAC+Ebselen	0.7 $\pm$ 0.3*#

\*p&lt; 0.05, kontrol grubuna göre farklılık

#p&lt; 0.05, İ/R grubuna göre farklılık

**RESİM 1:** A: Kontrol, B: Kontrol İ/R, C: Ebselen+İ/R, D: NAC+İ/R, E: NAC+Ebselen+İ/R.

ile uyumluluk göstermektedir. Diğer bir deneysel çalışmada; intestinal İ/R'de endotelial ve epitelyal bariyeri sağlamlaştırarak reperfüzyon hasarını önlediği gösterilmiştir.<sup>24</sup> Dolayısıyla bu bilgiler ışığında NAC, intestinal hasarı önlemede yararlı bir ajan olabilir.

İkinci olarak ebselenin İ/R hasarında koruyucu etkisi değerlendirildi. Ebselenin, İ/R sonucu ortaya çıkan peroksinitritlerin süpürülmesinde etkili

olduğu bilinmektedir.<sup>15</sup> Çalışmamızda da ebselenin İ/R'ye bağlı olarak artan lipid peroksidasyonu ve protein karboksilasyonunu azalttığı gözlemlendi. Dokuların korunmasında etkin olan bu rolünün, hidrojen peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) ve tioredoksin sistem ile ilişkisi sonucu lipid hidroperoksitleri azaltması yanında proteaz ve fosfolipazları inhibe etmesi ile açıklanabilir.<sup>15,25</sup> Çalışmamızda ebselen verilen grupta GPx enzim aktivitesinde artış ajanın GPx ve fosfolipid hidroperoksit-GPx enzim benzeri etkisi ile açıklanabilir.<sup>25</sup> Ayrıca selenyum içeren ebselenin hücre membranındaki inositol 1.4.5-triphosphate kanallarını inhibe ederek hücre içi Ca<sup>2+</sup> seviyesinin yükselmesini engellediği bildirilmiştir.<sup>26</sup> Bu etkisi sayesinde İ/R sonucu ortaya çıkan Ca<sup>2+</sup> yüklenmesine bağlı hücre yıkımından sorumlu proteazlar ve lipooksijenazların aktiviteleri azaltılmış olacaktır. Ebselenin serebral iskemi hasarlarında koruyucu etkisi olduğu çeşitli çalışmalarda bildirilmiştir. Diğer yandan kalp ve karaciğer İ/R hasarlarındaki etkinliği bildirilmesine karşın, intestinal İ/R hasarlarındaki etkisi bilinmemektedir.<sup>27,28</sup> Çalışmamız ebselenin intestinal İ/R hasarında da koruyucu rolü olabileceğini ortaya koymuştur.

Son olarak NAC ve ebselen İ/R'ye maruz bırakılan sıçanlarda tedavi edici ajanlar olarak birlikte kullanıldı. Doku antioksidan enzim aktiviteleri diğer gruplar ile karşılaştırıldığında daha etkili olduğu görüldü. Diğer yandan doku hasarlarının da daha az olduğu gözlemlendi. Sonuçta antioksidan olan

NAC ile ortamdan hidroksil türevleri ve süperoksitler etkin olarak temizlenebilmektedir. Fakat peroksinitritler ortamda bulunmaya devam etmektedir. Peroksinitrit süpürücüsü olan ebselenin tedaviye eklenmesi ile hasarların daha az olması peroksinitritlerin de doku hasarında süperoksitler kadar etkili olabileceğini düşündürmektedir.

Histolojik olarak, intestinal İ/R modelimizde intestinal hasar oldukça belirgindi. Çalışmamızda NAC ve ebselen ile tedavi edilen gruplarda az seviyede mukozal hasar olmasına karşın, NAC ve ebselenin birlikte kullanıldığı grupta hasarların tamamen kaybolduğu gözlemlendi. Sonuçta her iki ajan tek başlarına hasarın engellenmesinde etkili olmakla beraber, birlikte kullanılmaları bu etkiyi belirgin şekilde artırmaktadır.

## SONUÇ

Sonuç olarak çalışmamız biyokimyasal ve histopatolojik sonuçlar göz önüne alındığında, NAC, ebselen ve özellikle her iki ajanın birlikte kullanılmasının birçok cerrah tarafından tedavi edilmeye çalışılan mezenter arter iskemisinin, intestinal sistemde oluşturduğu hasarı azaltmada etkili ajanlar olabileceğini ortaya koymuştur.

## TEŞEKKÜR

*İstatistiksel analizlerin yapılmasında bize destek olan GATA Halk Sağlığı AD'de görevli Doç.Dr. Recai Oğur'a teşekkürlerimizi sunarız.*

## KAYNAKLAR

1. Deitch EA. Multiple organ failure. Pathophysiology and potential future therapy. *Ann Surg* 1992;216:117-34.
2. Schoenberg MH, Beger HG. Reperfusion injury after intestinal ischemia. *Crit Care Med* 1993;21:1376-86.
3. Slavikova H, Lojek A, Hamar J, Duskova M, Kubala L, Vondracek J, et al. Total antioxidant capacity of serum increased in early but not late period after intestinal ischemia in rats. *Free Radic Biol Med* 1998;25:9-18.
4. Cerqueira NF, Hussni CA, Yoshida WB. Pathophysiology of mesenteric ischemia/reperfusion: a review. *Acta Cir Bras* 2005;20:336-43.
5. Li C, Jackson RM. Reactive species mechanisms of cellular hypoxia-reoxygenation injury. *Am J Physiol Cell Physiol* 2002;282: C227-41.
6. Erdogan H, Fadilloğlu E, Yagmurca M, Ucar M, Irmak MK. Protein oxidation and lipid peroxidation after renal ischemia-reperfusion injury: protective effects of erdosteine and N-acetylcysteine. *Urol Res* 2006;34:41-6.
7. Paglia DE, Valentine WN. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med* 1967;70:158-69.
8. Salvemini D, Riley DP, Lennon PJ, Wang ZQ, Currie MG, Macarthur H, et al. Protective effects of a superoxide dismutase mimetic and peroxynitrite decomposition catalysts in endotoxin-induced intestinal damage. *Br J Pharmacol* 1999;127:685-92.
9. Sun Y, Oberley LW, Li Y. A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clin Chem* 1988;34:497-500.
10. Beckman JS, Koppenol WH. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *Am J Physiol* 1996;271(5 Pt 1):C1424-37.
11. Denicola A, Radi R. Peroxynitrite and drug-dependent toxicity. *Toxicology* 2005;208:273-88.
12. Szabo C. Multiple pathways of peroxynitrite cytotoxicity. *Toxicol Lett* 2003;140-141:105-12.

13. Stewart S, Ryan C, Poropat S. Managing patients with acute myocardial ischemia and reperfusion injury with N-acetylcysteine. *Dimens Crit Care Nurs* 1997;16:122-31.
14. Cuzzocrea S, Mazzon E, Costantino G, Serrano I, De Sarro A, Caputi AP. Effects of n-acetylcysteine in a rat model of ischemia and reperfusion injury. *Cardiovasc Res* 2000;47:537-48.
15. Klotz LO, Sies H. Defenses against peroxynitrite: selenocompounds and flavonoids. *Toxicol Lett* 2003;140-141:125-32.
16. Squadrito GL, Pryor WA. Oxidative chemistry of nitric oxide: the roles of superoxide, peroxynitrite, and carbon dioxide. *Free Radic Biol Med* 1998;25:392-403.
17. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951;193:265-75.
18. Levine RL, Garland D, Oliver CN, Amici A, Clement I, Lenz AG, et al. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol* 1990;186:464-78.
19. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 1979;95:351-8.
20. Chiu CJ, McArdle AH, Brown R, Scott HJ, Gurd FN. Intestinal mucosal lesion in low-flow states. I. A morphological, hemodynamic, and metabolic reappraisal. *Arch Surg* 1970;101:478-83.
21. Ferrer JV, Ariceta J, Guerrero D, Gomis T, Larrea MM, Balen E, et al. Allopurinol and N-acetylcysteine avoid 60% of intestinal necrosis in an ischemia-reperfusion experimental model. *Transplant Proc* 1998;30:2672.
22. Nakano H, Nagasaki H, Barama A, Boudjema K, Jaeck D, Kumada K, et al. The effects of N-acetylcysteine and anti-intercellular adhesion molecule-1 monoclonal antibody against ischemia-reperfusion injury of the rat steatotic liver produced by a choline- methionine-deficient diet. *Hepatology* 1997;26:670-8.
23. Haenen GR, Vermeulen NP, Timmerman H, Bast A. Effect of thiols on lipid peroxidation in rat liver microsomes. *Chem Biol Interact* 1989;71:201-12.
24. Sun Z, Lasson A, Olanders K, Deng X, Andersson R. Gut barrier permeability, reticuloendothelial system function and protease inhibitor levels following intestinal ischaemia and reperfusion--effects of pretreatment with N-acetyl-L-cysteine and indomethacin. *Dig Liver Dis* 2002;34:560-9.
25. Müller A, Gabriel H, Sies H, Terlinden R, Fischer H, Römer A. A novel biologically active selenoorganic compound-- VII. Biotransformation of ebselelen in perfused rat liver. *Biochem Pharmacol* 1988;37:1103-9.
26. Xia R, Ganther HE, Egge A, Abramson JJ. Selenium compounds modulate the calcium release channel/ryanodine receptor of rabbit skeletal muscle by oxidizing functional thiols. *Biochem Pharmacol* 2004;67:2071-9.
27. Saad SY, Najjar TA, Arafah MM. Cardioprotective effects of subcutaneous ebselelen against daunorubicin-induced cardiomyopathy in rats. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2006;99:412-7.
28. Ozaki M, Nakamura M, Teraoka S, Ota K. Ebselelen, a novel anti-oxidant compound, protects the rat liver from ischemia-reperfusion injury. *Transpl Int* 1997;10:96-102.