

# İnvajinasyonda oluşan iskemi/reperfüzyon hasarına trapidilin koruyucu etkileri\*

Murat ÇAKMAK, Tutku SOYER, Şebnem AYVA, Günnur DİKMEN, Hülya AKMAN

Kırıkkale Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Çocuk Cerrahisi ve Patoloji Anabilim Dalları, Kırıkkale, Hacettepe Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, Ankara

## Özet

**Amaç:** Platelet-derived-growth faktör inhibitörünün (Trapidil) invajinasyona bağlı iskemi reperfüzyon hasarını önleyici etkinliğini değerlendirmek üzere deneysel bir çalışma yapılmıştır.

**Gereç ve Yöntem:** Ağırlıkları 200-250 g olan, her iki cinsten 60 Wistar albino rat çalışmaya dahil edildi. Kontrol grubunda (KG, n:15), ileoçekal valvin 20 cm proksimaldeki 2 cm'lik barsak segmenti, intraperitoneal NaCl infüzyonunu takiben çıkartıldı. İnvajinasyon grubunda, invajinasyon modeli (İG, n:15) ileoçekal valvin 20 cm proksimalindeki barsağın distaldeki barsağa doğru stile yardımıyla itilmesi ile elde edildi. İnvajinasyon 4 saat sonra ileoçekal valvden 20 cm proksimaldeki 2 cm'lik barsak segmenti çıkartıldı. İnvajinasyon-reperfüzyon grubu (IRG, n:15) IG'ye benzer şekilde invajinasyon oluşturulduktan 4 saat sonra reperfüzyona izin verilerek elde edildi. Bu grupta barsak örneklenmesi reperfüzyondan 4 saat sonra yapıldı. Son grupta (TG, n:15), Trapidil (40 mg/kg) İRG'a benzer şekilde iskemi/reperfüzyon oluşturulduktan ve reperfüzyondan bir saat önce intraperitoneal olarak verildi. Bu grupta da barsak segmenti reperfüzyondan 4 saat sonra çıkarıldı. Gruplarda ileoçekal valvden 20 cm proksimalden 2 cm'lik barsak örnekleri histopatolojik değerlendirme için alındı. Örnekler ayrıca oksidatif hasar belirteçleri (katalaz, glutatyon peroksidaz-G-px, superoksit dismutaz-SOD ve malondialdehit-MDA) açısından da değerlendirilmiştir.

**Bulgular:** Histopatolojik değerlendirmelerde KG'de hasara rastlanmazken, diğer gruplarda yüksek evreli barsak hasarı izlenmiştir ( $p<0.05$ ). Ancak IG, IRG ve TG arasında histopatolojik evre bakımından anlamlı fark bulunmamaktadır. MDA seviyeleri deney gruplarında KG'e göre belirgin yüksektir. Buna karşın TG'de MDA seviyeleri, IRG ile karşılaştırıldığında belirgin azalmıştır ( $p<0.05$ ). Antioksidan enzimler; katalaz, G-px ve SOD, IG ve IRG'de anlamlı derecede azalmıştır. IRG ile karşılaştırıldığında, Trapidil verilmesi bu üç enzim düzeyini arttırmıştır ( $p=0.005$ ,  $p=0.036$ ,  $p=0.02$  sırasıyla).

**Sonuç:** Trapidil invajinasyona bağlı iskemi reperfüzyon hasarını katalaz, G-px ve SOD enzim düzeylerini artırarak önlemekte ve MDA düzeylerinde anlamlı azalmaya neden olmaktadır. Fakat benzer sonuçlara histopatolojik değerlendirmelerde ulaşılmamıştır.

**Anahtar kelimeler:** İnvajinasyon, iskemi reperfüzyon, trapidil

\* Çocuk Cerrahisinde Deney Hayvan Modelleri Sempozyumu'nda sunulmuştur, 10-11 Ekim 2008, Kırıkkale  
**Adres:** Dr. Murat Çakmak, Kırıkkale Üniversitesi Tıp Fakültesi, Çocuk Cerrahisi Anabilim Dalı, 71100, Kırıkkale  
**Yayına kabul tarihi:** 23.02.2010

## Summary

**The protective effect of trapidil on ischemia/reperfusion injury in intussusception**

**Aim:** An experimental study was performed to evaluate the protective effect of platelet-derived-growth factor inhibitor (Trapidil) in ischemia reperfusion injury in intussusception.

**Methods:** Sixty Wistar albino rats, weighing 200-250 g in both sexes were enrolled into study. In control group (CG, n:15), 2 cm of intestinal segment, 20 cm proximal to ileocecal valve was removed after intraperitoneal NaCl infusion. In intussusception group, intussusception (IG, n:15) was performed at 20 cm proximal to ileocecal valve by pushing the proximal intestinal segment distally through a stile. Two cm of intestinal segment was removed 4 hours after intussusception. Intussusception-reperfusion group (IRG, n:15) was obtained after performing intussusception similar to IG and allowed to perfusion 4 hours after intussusception. In this group, intestinal segment was removed 4 hours after reperfusion. In the last group (TG, n:15), Trapidil (40 mg/kg) was administered intraperitoneally, one hour before reperfusion, after achieving an ischemia/reperfusion injury similar to IRG. Two cm of intestinal segments, 20 cm proximal to ileocecal valve, were removed for histopathologic evaluation. The specimens were also evaluated for oxidative injury markers (catalase, glutathione peroxidase-G-px, superoxide dismutase-SOD, and malondialdehyde-MDA).

**Results:** Although histopathologic evaluations revealed no intestinal injury in CG, other groups showed higher grades of intestinal injury ( $p<0.05$ ). Though, there was no difference in histopathologic grades between IG, IRG and TG groups. MDA levels were significantly increased in experiment groups when compared to CG. But, significant alteration in MDA levels was detected in TG, when compared to IRG ( $p=0.005$ ). Antioxidant enzymes; Catalase, G-px and SOD, significantly decreased in IG and IRG. Trapidil administration increased the levels of these three enzymes when compared to IRG ( $p=0.005$ ,  $p=0.036$ ,  $p=0.02$  respectively).

**Conclusion:** Trapidil prevents ischemia-reperfusion injury in intussusception by increasing catalase, G-px, SOD levels and causes a significant reduction in MDA levels. However, similar results was not found in histopathologic findings.

**Key words:** Intussusception, ischemia reperfusion, trapidil

## Giriş

İnvajinasyon çocuklarda ve infantlarda acil cerrahi gerektiren ve sık karşılaşılan bir klinik tablodur. İn-

fantlarda görülen invajinasyonun etiyolojisi belirgin olmamakla birlikte, ileokolik invajinasyonların % 90'ının idiyopatik olduğu düşünülmektedir (2). İnvajinasyonda proksimal segmentte ortaya çıkan dolaşım bozukluğu barsak iskemisi ile sonuçlanabilmektedir. İnvajinasyon tedavisinde amaç intestinal segmentin dolaşımının yeniden düzenlenmesi ve barsak kaybının önlenmesidir. İnvajine segmentte ortaya çıkan iskemik hasarı, redüksiyon sonrası reperfüzyon hasarı izlemektedir. Bu durumda barsak rezeksiyonuna gerek duyulmasa bile ortaya bir iskemi reperfüzyon hasarı çıkması kaçınılmaz olmaktadır.

İntestinal iskemi reperfüzyon hasarını önlemek amacıyla birçok deneysel çalışma yapılmıştır. Bu çalışmalarda antioksidan etkili ajanların intestinal iskemi reperfüzyon hasarına olan etkileri hem histopatolojik hem de biyokimyasal olarak değerlendirilmiştir (5). Çolak ve arkadaşları, bir fosfodiesteraz olan platelet-derived-growth faktör inhibitörü olan Trapidil'in intestinal iskemi reperfüzyon hasarına olan ilişkisini incelemişler ve Trapidilin intestinal hasarı azalttığını göstermişlerdir (4). İnvajinasyonda olan iskemi reperfüzyon hasarını önlemeye yönelik çalışmalar bulunmakla birlikte Trapidilin invajinasyona bağlı gelişen iskemi reperfüzyon hasarı üzerine olan etkisi araştırılmamıştır.

Deneysel invajinasyon modeli olarak kullanılan intraperitoneal lipopolisakkarit uygulamalarında deneylerin yalnız % 20 - % 40'ında invajinasyon elde edilmiştir (10,11). Lipopolisakkaritin nitrik oksit salınımını arttırmak ve buna bağlı intestinal motiliteyi azaltmak yoluyla invajinasyona neden olduğu bilinmektedir (3). Lipopolisakkaritlerin nitrik oksit üzerinden yaptıkları bu etki invajinasyondaki iskemi reperfüzyon hasarını incelemeyi amaçlayan çalışmalar için uygun olmayacaktır. Bu nedenle, bu çalışmada bir stile yardımıyla proksimal barsak segmentinin distale itilmesi ile oluşturulan bir invajinasyon modeli geliştirilmiştir. Burada, trapidilin invajinasyona bağlı gelişen iskemi reperfüzyon hasarına etkisini araştırmak üzere deneysel bir çalışma sunulması amaçlanmaktadır.

## Gereç ve Yöntem

Çalışmaya ağırlıkları 200-250 g arasında değişen her iki cinse ait 60 adet Wistar albino rat dahil edildi. Ketamin hidroklorür (40 mg/kg, Ketalar, Eczacıbaşı,

İstanbul Türkiye) ile anesteziyi takiben median laparotomi yapıldı. Kontrol grubunda (KG, n:15), ileoçekal valyden 20 cm proksimaldeki 2 cm'lik barsak segmenti, intraperitoneal NaCl infüzyonunu takiben çıkartıldı. İnvajinasyon grubunda (IG, n:15), invajinasyon modeli ileoçekal valvin 20 cm proksimalindeki barsağın distale doğru stile yardımıyla itilmesi ile elde edildi. İnvajinasyon 4 saat sonra ileoçekal valyden 20 cm proksimaldeki 2 cm'lik barsak segmenti inceleme için çıkartıldı. İnvajinasyon - reperfüzyon grubu (IRG, n:15) IG'ye benzer şekilde invajinasyon oluşturulduktan 4 saat sonra reperfüzyona izin verilerek elde edildi. Bu grupta da reperfüzyondan 4 saat sonra aynı barsak bölümü çıkartıldı. Son grupta (TG, n:15), Trapidil (40 mg/kg) İRG benzer şekilde iskemi reperfüzyon oluşturulduktan ve reperfüzyondan bir saat önce intraperitoneal olarak verildi. Bu grupta da barsak segmenti reperfüzyondan 4 saat sonra çıkarıldı. Gruplarda ileoçekal valyeden 20 cm proksimalden 2 cm'lik barsak örnekleri histopatolojik ve biyokimyasal değerlendirme için ayrılmıştır.

## Histopatolojik değerlendirme

İntestinal doku % 10'luk formol solusyonunda tespit edildi. Dokular uygun şekilde tespit edildikten sonra Ototeknikom cihazına konuldu ve burada 4 kez absolu alkol, 3 kez alkol, propanol ve metanol solusyonu ve 3 kez ksilen olmak üzere 12-13 saat süren 10 işlemden geçirildi. Daha sonra parafin bloklandı, 4-5 mm kalınlığında kesitler alınarak Haematoxylin-eosine boyama yöntemiyle boyandı. Preperatlar grup farkı bilinmeyen bir araştırmacı tarafından ışık mikroskopu (Lecia, Almanya) altında Chiu ve arkadaşlarının skorlama sistemi kullanılarak değerlendirildi (1). Buna göre;

Evre 0: Normal mukozal villus

Evre I: Subepitelyal bölgede konjesyon

Evre II: Subepitelyal bölgede orta derecede genişleme ve epitelyal ayrılma

Evre III: İleri derecede epitelyal ayrılma

Evre IV: Lamina propriada hücre sayısında artış ve soyulma

Evre V: Lamina propriada kayıp, hemoraji ve ülserasyon olarak değerlendirildi.

## Biyokimyasal değerlendirme

Doku homojenizasyonu için intestinal dokular -85°C

derin dondurucudan çıkarıldıktan sonra 100 ml 0.02 M EDTA içinde, Micra D-8 dakika Homojenizatör'de (ART- moderna Labortechnik, Mülheim, Hügelheim, Germany) 20.000 devirde homojenize edildi. Homojenizasyondan sonra Nüve NF 1000 R santrifüj cihazında 3500 rpm'de 10 santrifüj edildi. Elde edilen üst fazdan MDA, G-px, SOD ve katalaz çalışıldı.

#### İstatistiksel değerlendirme ve Etik

Gruplarda elde edilen histopatolojik veriler Kruskal Wallis testi ile karşılaştırıldı. Gruplar arası katalaz, G-px, SOD ve MDA düzeyleri ise Mann-Whitney U testi ile karşılaştırıldı. 0.05'ten küçük p değerleri anlamlı kabul edildi.

Bu çalışma Kırıkkale Üniversitesi Yerel Etik Kurulu tarafından onaylanmıştır.

#### Bulgular

Histopatolojik değerlendirmede kontrol grubunda intestinal hasar ortalaması evre 0 olarak değerlendirilmiştir. IG, IRG ve TG'de ise farklı evrelerde histopatolojik intestinal hasar bulunmaktadır (Tablo 1). Bu sonuçlar istatistiksel olarak KG ile anlamlı fark yaratmaktadır ( $p<0.05$ ). Ancak IG, IRG ve TG arasında histopatolojik evre bakımından fark yoktur ( $p<0.05$ ).

**Tablo 1. Gruplarda histopatolojik evrelerin dağılımı (\* $p<0.05$ ).**

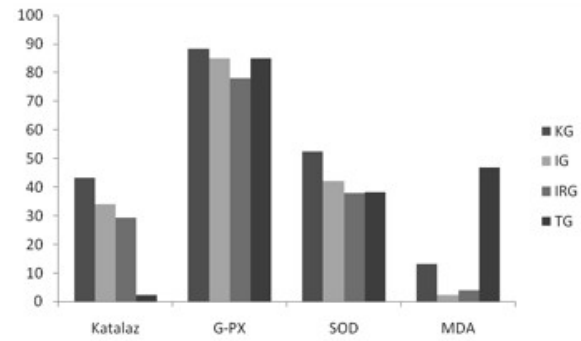
Denek No	KG	IG	IRG	TG
1	0	3	3	2
2	0	2	3	3
3	0	3	3	3
4	1	2	2	5
5	0	3	5	3
6	1	4	2	2
7	1	5	3	3
8	0	3	4	3
9	0	3	3	3
10	0	3	3	4
11	1	3	3	2
12	1	3	4	3
13	0	3	3	3
14	0	3	3	3
15	0	3	3	2
Ortanca	0 (0-1)*	2 (2-5)	3 (2-5)	3 (2-5)

Biyokimyasal incelemede gruplardaki katalaz, G-px, SOD ve MDA değerlerinin ortancaları Tablo 2'de gösterilmiştir. Antioksidan enzimler; katalaz, G-px ve SOD, IG ve IRG'de anlamlı derecede azalmıştır. IRG

ile karşılaştırıldığında, Trapidil verilmesi bu üç enzim düzeyini arttırmıştır ( $p=0.005$ ,  $p=0.036$ ,  $p=0.02$  sırasıyla). MDA seviyeleri deney gruplarında KG'ye göre belirgin yüksektir. Ancak TG'de MDA seviyeleri, IRG ile karşılaştırıldığında belirgin azalmıştır ( $p<0.05$ ) (Şekil 1).

**Tablo 2. Gruplarda oksidatif hasar belirteç düzeyleri (Sonuçlar ortanca değerler ve çeyrekler arası aralıkları göstermektedir).**

Gruplar	Katalaz (m/g)	G-px (u/g)	SOD (u/g)	MDA ( $\mu\text{mol/L}$ )
KG	43,20 (30,30-60,40)	88,30 (73,80-102,60)	52,5 (42,10-61,60)	13,2 (0,88-2,44)
IG	34,10 (26-48,20)	85,10 (68,20-92,50)	42,20 (34,40-52,40)	2,4 (1,60-3,83)
IRG	29,40 (20,20-42,20)	78,10 (58,60-92,80)	38 (31,10-48)	3,93 (2,78-5,63)
TG	2,20 (1,40-3,24)	85 (78-96)	38,20 (26,40-51,60)	47 (32,20-61,10)



**Şekil 1. Gruplarda oksidatif stres belirteçlerinin karşılaştırılması (\* $p<0.05$ ).**

#### Tartışma

İnvajinasyon tedavisinde amaç intestinal segmentin dolaşımının yeniden düzenlenmesi ve barsak kaybının önlenmesidir. İnvajine segmentin redüksiyonu ile birlikte ortaya çıkan iskemi/reperfüzyon hasarı çıkmaktadır.

İntestinal iskemi reperfüzyon hasarı barsak kaynaklı toksinlerin, inflamatuvar mediyatörlerin salınmasına neden olan bir sistemik yanıtı başlatmaktadır. Reaktif oksijen radikalleri, sitokinler, araziidonik asit ürünleri, endotelin peptitleri ve adezyon moleküllerinden oluşan bu yanıt özellikle reperfüzyon fazında hasara neden olmaktadır<sup>(4)</sup>. Bu serbest radikaller mitokondri ve hücre membranlarındaki lipidlerin peroksidasyonlarına neden olarak hücre hasara sebep olmaktadır.

Oluşan bu reperfüzyon hasarını önlemek amacıyla birçok deneysel çalışmada farklı antioksidan madde- nin etkinliği gösterilmiş fakat bunların çoğu klinikte kullanım alanı bulamamıştır. Bu antioksidan madde- ler iskemi reperfüzyon hasarının değişik basamakla- rını inhibe ederek etki göstermektedir. İnvajinasyona bağlı intestinal hasarı önlemek amacıyla yapılan ça- lışmalar ise kısıtlıdır.

Bir fosfodiesteraz olan Trapidil [5-metil-7-dietilami- no-s-triazolo (1,5-a) pirimidin] platelet derived- growth faktör inhibitörüdür <sup>(7)</sup>. Nitrogliserin benzeri vazodilatasyon yapan Trapidil, tromboksan A2'yi in- hibe ederek platelet agresyonuna neden olmakta ve lipid peroksidasyonunu azaltmaktadır <sup>(7)</sup>. Trapidilin, anastomoz iyileşmesi, koroziv özefagus yaralanma- sı, testis ve over torsiyonunda ortaya çıkan iskemi reperfüzyon hasarını önleyici etkileri gösterilmiştir <sup>(6,7,8)</sup>. Bu biyolojik etkileri nedeniyle, Trapidilin inva- jinasyona bağlı oluşan iskemi reperfüzyon hasarına etkisinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

Deneysel invajinasyon modellerinde sıklıkla kulla- nılan intraperitoneal lipopolisakkarid enjeksiyonu iskemi reperfüzyon hasarını önlemek için yapılan araştırmalar için uygun değildir. Çünkü invajinasyon oluşturmak için verilen lipopolisakkaridin nitrik oksid salınımına neden olması iskemi reperfüzyon hasarını arttırıcı etki göstermektedir. Spiro ve arkadaşlarının amoksisilin-klavulanat veya azitromisin ile mezen- ter lenfadenopati oluşturarak yaptıkları invajinasyon modelinde ise deneylerin % 38-54'ünde invajinasyon modeli elde edilmiştir <sup>(9)</sup>. Burada bir stile yardımıyla proksimal barsak segmentinin, distal segmente itil- mesi ile invajinasyon modeli oluşturulmuştur. Diğer modellerden farklı olarak tüm ratlarda invajinasyon elde edilmiştir. Oluşan deney modellerinde histopato- lojik hasarın kontrol grubuna göre belirgin olması, bu deney modelinde invajinasyona benzer bir iskeminin elde edildiğini göstermektedir.

İskemi reperfüzyon hasarıyla ilgili yapılan biyokim- yasal çalışmalarda bakılan katalaz, G-px ve SOD an- tioksidan defans enzimleridir <sup>(8)</sup>. İskemi reperfüzyon hasarı bu enzimlerde belirgin azalmaya neden olmak- tadır. Bizim çalışmamızda katalaz, G-px ve SOD dü- zeyleri özellikle katalaz ve SOD'de istatistiksel ola- rak anlamlı olacak şekilde IG ve IRG'de azalmakla birlikte, TG'de bu gruplara göre artış olmuştur. Bu

sonuçlar invajinasyonda oluşan iskemi reperfüzyon hasarında Trapidilin antioksidan etkinliğini göster- mektedir.

Malondialdehit lipid peroksidasyonla oluşan ve ok- sidatif hasarın gösterilmesinde sıklıkla kullanılan bir göstergedir <sup>(7)</sup>. İskemi reperfüzyon hasarı, MDA düzeylerinde belirgin artışa neden olmaktadır. Çalış- mamızda MDA düzeyleri deney gruplarında KG'a oranla belirgin artmıştır. Ancak, TG'da özellikle re- perfüzyon gruba göre belirgin azalma gözelenmekte- dir. Bu da Trapidilin invajinasyona bağlı iskemi re- perfüzyon hasarının önlediğinin bir göstergesi olarak kabul edilebilir.

Histopatolojik değerlendirmede, tüm deney grupların- da farklı evrelerde hasar saptanmaktadır. Gruplardaki histopatolojik hasarın karşılaştırılması, Trapidilin olu- şan mukozal hasara etkisi olmadığını göstermektedir. Her ne kadar Trapidilin bu antioksidan etkinliğinin histopatolojik hasarıda önlediği barsak ve testis do- kusunda gösterilmişse de, glutamin gibi antioksidan bazı maddelerin histopatolojik hasarı engellemeksi- zin antioksidan seviyelerini arttırdığı ve lipid perok- sidasyonunu önlediği bilinmektedir <sup>(5)</sup>.

Sonuç olarak, Trapidil invajinasyona bağlı iskemi reperfüzyon hasarını katalaz, G-px ve SOD enzim düzeylerini arttırarak önlemekte ve lipid peroksi- dasyonda anlamlı azalmaya neden olmaktadır. Fakat benzer sonuçlara histopatolojik değerlendirmelerde ulaşılmamıştır. Bir stile yardımıyla barsak segment- lerinin iç içe geçirilmesi özellikle invajinasyona ilgili araştırmalarda yeni bir model olarak kullanılabilir.

## Açıklama

Bu çalışma Kırıkkale Üniversitesi Bilimsel Araştırma Birimi tarafından desteklenmiştir.

## Kaynaklar

1. Chiu CJ, Mc Ardle AH, Brown R, Scott HJ, Gurd FN: Intestinal mucosal lesion in low flow states. Arc Surg 101:478-483, 1970
2. Chung JL, Kong MS, Lin JN, et al: Intussusception in infants and children: risk factors leading to surgical reduc- tion. J Formos Med Assoc 93:481-5, 1994
3. Cserni T, Paran S, Puri P: New hypothesis on the pat- hogenesis of ileocecal intussusception. J Pediatr Surg 42:1515-1519, 2007

4. Çolak T, Polat A, Bağdatlıoğlu O, et al: Effect of Trapidil in ischemia/reperfusion injury on rat small intestine. *J Invest Surg* 16:167-176, 2003
5. Demirkan A, Orazakunov E, Savaş B, et al: Enteral glutamine pretreatment does not decrease plasma endotoxin level induced by ischemia-reperfusion injury in rats. *World J Gastroenterol* 14:463-8, 2008
6. Somuncu S, Cakmak M, Erdoğan S, et al: Trapidil, an inhibitor for phosphodiesterase and platelet-derived growth factor, ameliorates corrosive esophageal burn in rats. *Tohoku J Exp Med* 207:203-8, 2005
7. Somuncu S, Çakmak M, Erdoğan S, et al: Protective effects of trapidil in ischemia-reperfusion injury due to testicular torsion and detorsion: An experimental study. *Int J Urol* 13:601-605, 2006
8. Somuncu S, Cakmak M, Dikmen G, et al: Ischemia-reperfusion injury of rabbit ovary and protective effect of trapidil. An experimental study. *Pediatr Surg Int* 24:315-318, 2008
9. Spiro DM, Schmidt JM, Arnold DH, et al: Antibiotic-induced mesenteric adenopathy in an intussusception mouse model. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 41:39-43, 2005
10. Türkyılmaz Z, Karabulut R, Gülen Ş, et al: Role of nitric oxide and cyclooxygenase pathway in lipopolysaccharide-induced intussusception. *Pediatr Surg Int* 20:598-601, 2004
11. Wang P, Liu B, Ou H, et al: Nitric oxide synthase/nitric oxide pathway mediates intussusception pathogenesis in rats. *Chin Med J* 112:1016-1019, 1999