

# Deneyisel intestinal iskemi-reperfüzyonunda d-xylose absorpsiyonu ile buna allopurinol ve glukokortikoidlerin etkisi

Ferit BERNAY, Savaş DEMİRBİLEK, Bahar SINAV, Rıza RIZALAR, Filiz KARAGÖZ, Naci GÜRSES

Ondokuz Mayıs Üniv. Tıp Fak. Çocuk Cerrahisi, Biyokimya ve Patoloji Anabilim Dallar, Samsun

## Özet

## Summary

Bu çalışmada ratlarda oluşturulan deneyisel intestinal iskemi reperfüzyon sendromunda, allopurinol ve deksametazon ile preiskemik tedavinin mukozal hasar ve d-xylose intestinal absorpsiyon testi üzerindeki etkileri araştırılmıştır. İskemik model superior mezenterik arterin 30 dakikalık tam ligasyonu ile gerçekleştirilmiştir. İskemi-reperfüzyon sonrasında anlamlı olarak azalan d-xylose absorpsiyonunun, allopurinol ve deksametazon ile normale ulaşamamakla beraber daha iyi korunduğu gözlemlendi. Histopatolojik incelemede, mukozal hasarın preiskemik allopurinol ve deksametazon uygulaması ile anlamlı şekilde korunduğu saptandı. Nötrofil infiltrasyonunda ise, hem deksametazon, hem de allopurinol ile preiskemik tedavi uygulanan gruplarda anlamlı düşüşler görülmüştür. Sonuç olarak iskemi-reperfüzyon sendromunun gerek histopatoloji ve gerekse absorpsiyon yönünden önemli intestinal hasar meydana getirdiği, preiskemik allopurinol ve deksametazon uygulamasının da bu hasarı histopatolojik olarak engellediği, fakat absorpsiyon yönünden normal değerlere ulaştıramadığı tespit edilmiştir.

*Effect of allopurinol and glucocorticoid on d-xylose absorption in experimental intestinal ischemia-reperfusion*

In this study, the effect of preischemic allopurinol and dexamethasone on mucosal damage and d-xylose intestinal absorption test were investigated in experimental intestinal ischemia-reperfusion in rats. We used an ischemic model in which the superior mesenteric artery was ligated for 30 minutes. Significant d-xylose absorption decrease induced by ischemia reperfusion is observed to be protected better when pretreated with allopurinol and dexamethasone although it was lower than normal. In the histopathological investigation of intestinal segment, it was observed that the damage of mucosa was prevented when pretreated with allopurinol and dexamethasone. The neutrophil infiltration was reduced by pretreatment of allopurinol and dexamethasone. As a result, ischemia reperfusion syndrome caused intestinal mucosal damage and reduced intestinal absorption, although allopurinol and dexamethasone pretreatment prevent the mucosal damage but inefficient for absorption.

**Anahtar kelimeler:** Intestinal iskemi-reperfüzyon sendromu, allopurinol, deksametazon

**Key words:** Intestinal ischemia-reperfusion syndrome, allopurinol, dexamethasone

## Giriş

İntestinal iskemi-reperfüzyon sonrasında serbest oksijen radikalleri mukozal hasarda mediatör bir rol oynamaktadır (14,24,25,26,27,28,31). Xanthine oxidase, O<sub>2</sub> radikallerinin primer kaynağı olarak gösterilmişse de (13,14,26), O<sub>2</sub> radikallerinin diğer bir güçlü kaynağının da enflamatuar nötrofiller olduğu iddia edilmektedir (3,15,16,17,22,23,30). İskemi sonrası hasar-

dan intesinin korunmasında allopurinol gibi xanthine oxidase inhibitörlerinin yanında, glukokortikoidlerin de nötrofil infiltrasyonunu azaltma ve muhtemel lizozomal membran stabilizasyonunu sağlayarak lipid peroksidasyonunun önlenmesinde yardımcı olduğu, biyokimyasal parametrelerle gösterilerek savunulmuştur (15,26). Bu çalışmada, intestinal iskemi-reperfüzyon sendromunda allopurinol ve deksametazon ile iskemi öncesi tedavinin mukozal hasarın önlenmesi üzerindeki etkilerinin, histopatolojik çalışmalarla karşılaştırılması ve d-xylose intestinal absorpsiyon testinin iskemi sonrası mukozal hasar-

Adres: Ferit BERNAY, Ondokuz Mayıs Üniv. Tıp Fak. Çocuk Cerrahisi Anabilim Dalı, 55139, Samsun

Tablo I: Deney grupları ve uygulanan yöntemler

GRUPLAR	Preiskemik Tedavi	İskemi (30 dk)	Reperfüzyon (30 dk)	D-Xylose testi (60 dk)	İntestinal Spesmen
1- Kontrol Grubu (iskemisiz)	Serum Fizyolojik	-	-	+	+
2- Kontrol Grubu (iskemili)	Serum Fizyolojik	+	+	+	+
3- Preiskemik Tedavi Grubu	Allopurinol (50 mg/kg)	+	+	+	+
4- Preiskemik Tedavi Grubu	Deksamethazon (1,5 mg/kg)	+	+	+	+
5- Preiskemik Tedavi Grubu	Allopurinol + Deksamethazon	+	+	+	+

dan nasıl etkilendiği, bu etkilenmenin iskemi öncesi allopurinol ve glukokortikoid (Deksamethazon) tedavisi ile ne ölçüde engellenebildiğinin tespiti amaçlanmıştır.

## Gereç ve Yöntem

Bu deneysel araştırmada ağırlıkları 185-215 gr arasında değişen 50 adet sıçan kullanıldı. Sıçanlar 10'ar adetlik 5 gruba ayrıldı. Tablo I'de her gruptaki sıçanlarda yapılan çalışmalar özetlenmiştir.

Allopurinol (50 mg/kg) ve deksametazon (1,5 mg/kg) ile preiskemik tedavi, iskemiden 30 dakika önce intraperitoneal olarak uygulanarak gerçekleştirildi.

İntestinal iskemi yöntemi, superior mezenterik arterin (SMA) 30 dakikalık tam ligasyonu ile gerçekleştirildi (7). Eter anestezisini takiben 3-4 cm'lik orta hat insizyonu ile sıçanların karnı açılarak SMA izole edildi ve 2/0 ipek ile bağlandı. İntraperitoneal olarak 20 ml ringer laktat solüsyonu verildikten sonra karın kapatıldı. 30 dakikalık iskemi periyodundan sonra karın tekrar açıldı ve SMA'daki sütür alındı. 20 ml ringer laktat solüsyonu intraperitoneal olarak tekrar verildikten sonra karın tekrar kapatıldı. 30 dakikalık reperfüzyon periyodundan sonra d-xylose testi uygulandı (18). Bu test için sıçanların karnı tekrar açılarak proksimal jejunumdan % 25'lik d-xylose çözeltisinden 2 cc (500 mg) verildi. Bir saatlik test periyodundan sonra, intrakardiyak olarak kan ve treitzden yaklaşık 30 cm mesafeden 2 cm'lik intestinal doku örnekleri alındı. Örnekler % 10'luk formol çözeltisinde 48 saat fikse edildikten sonra parafinle blok-

landı ve yaklaşık 6 mm kalınlığında kesilerek hematoxilen eozin ile boyandı.

Kan plazma örneklerinde d-xylose düzeyleri p-bromoanilin reaksiyon testi methodu ile spektrofotometrik olarak ölçüldü (22).

İntestinal örneklerde meydana gelen hasar düzeyi, villus ve kripta epitelyal hücrelerindeki enflamasyon ve nekroz ile mukozanın villus yapısının harabiyet derecesine göre, 0 ila 4+ arasında aşağıdaki şekilde evrelendi. 1+; villus uçlarının bazılarının epitelyumu etkilenmiş, 2+; villus uçlarının çoğunluğunun epitelyumu etkilenmiş, 3+; villus uçlarının çoğunluğu ve bazılarının orta kesimleri etkilenmiş, 4+; vilusların çoğunluğunun uç, orta ve alt kesimleri etkilenmiş kripta hücre enflamasyonu ve epitel nekrozu ise şu şekilde evrelendi. 1+; kriptaların seyrek olarak epitelyumu etkilenmiş, 2+; kriptaların dağınık olarak epitelyumu etkilenmiş, 4+; kriptaların çoğunluğunun epitelyumu etkilenmiş. Ayrıca oküler mikrometri ile mukoza, villus ve kripta kalınlık ölçümleri gerçekleştirildi. Nötrofil infiltrasyonun değerlendirilmesi H.E. 400X objektif alınında sayım yapılarak, 0-25 arası 1+, 25-50 arası 2+, 50-75 arası 3+, 75 ve üstü 4+ olarak evrelendirilerek yapılmıştır.

## Olgular

D-xylose testinin sonuçları Tablo II'de özetlenmiştir. İskemisiz kontrol grubu (Grup 1) ile iskemili kontrol grubu (Grup 2) karşılaştırıldığında d-xylose değerlerinde belirgin bir düşme görülmüştür ( $p < 0.01$ ). İskemili kontrol grubu ile, preiskemik te-

Tablo II: D-Xylose İntestinal Absorbsiyon Testi Sonuçları

Gruplar	D-Xylose Düzeyi (mg/L)
1	23.91±1.88
2	9.60±0.87*
3	12.53±1.11*,##
4	13.60±1.22 *,##
5	12.82±0.57*,#

Grup 1'e göre p<0.01\*, Grup 2'ye göre p<0.01#, p<0.05##

davi uygulanan diğer gruplar (Grup 2,3,4) arasında, d-xylose düzeylerinde iskemili kontrol grubuna göre anlamlı bir artış gözlenmiştir (p<0.05). Fakat bu artış iskemisiz kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı değildir. Yine preiskemik tedavi uygulanan gruplardaki d-xylose değerleri arasında ise anlamlı bir fark bulunamamıştır.

Tablo III ve Tablo IV'de histopatolojik çalışma sonuçları özetlenmiştir. Mukozal kalınlık, villus boyu ve kripta derinliğinde, iskemi-reperfüzyon ile belirgin bir azalma görülürken (p<0.01), preiskemik tedavilerle bu hasar anlamlı düzeyde (p<0.05) engellenmiştir. İskemi-reperfüzyon sonucunda belirgin bir villus ve kripta epitelyal nekrozu, nötrofil infiltrasyonu ortaya çıkmıştır. Deksametazon ve allopurinol+deksametazon ile preiskemik tedavi ile bu mukozal hasarları anlamlı ölçüde engellenmiştir (p<0.01). Post iskemik villus epitelyal nekrozunun engellenmesi yönüyle allopurinol+deksametazon ile preiskemik tedavi grubunda, tek başına allopurinol (p<0.01) ve deksametazon (p<0.05) ile preiskemik tedavi gruplarına göre anlamlı bir fark tespit edilmiştir. Nötrofil infiltrasyonunun engellenmesi yönüyle her üç preiskemik tedavi grubunda da iskemi grubuna göre anlamlı bir azalış (p<0.01) görülürken, bu grupların kendi aralarında ise anlamlı bir fark görülmemiştir.

## Tartışma

İntestinal mukozal iskemiye en hassas dokulardan biridir. İntestinal iskemi-reperfüzyon periyodunda ortaya çıkan mukozal hasarın, iskemi periyodundan ziyade reperfüzyon sürecinde ortaya çıktığı çalışma-

larla gösterilmiştir (27). Post iskemik süreçte ortaya çıkan bu mukozal hasardan ise süperoksit, hidrogen peroksit ve hidroksil gibi oksijen türevi serbest radikaller sorumlu tutulmuştur (14,24,25,26,28,29,31). Serbest radikallerin sitotoksik etkileri muhtemelen hücre ve mitokondriyal membranların lipid komponentlerinin peroksidasyonu sonucudur (5,11). Yine bu radikaller, epitelyal bazal membranın temel yapılarından olan hyaluronik asidi parçalayarak subepitelyal boşlukların ve epitelyal ayrılmaların gelişmesine sebep olmaktadır (9,20). Reaktif oksijen türevi serbest radikallerin primer kaynağı olarak iskemik barsakta ortaya çıkan xanthine oxidase gösterilmiştir (13,14,17,26). Allopurinol, pterin aldehit gibi xanthine oxidase inhibitörleri ya da süperoksit dismutaz (SOD) gibi antioksidan enzimlerle preiskemik tedavinin, postiskemik mukozal hasarı engellemesi bu görüşü desteklemiştir (13,26,28). İskemik intestinal mukozada nötrofil infiltrasyonunun arttığı (15,23) ve bu infiltrasyonu xanthine oxidase türevi oksijen metabolitlerinin başlattığı ileri sürülmüştür (15). İnfiltratör olan bu nötrofiller serbest oksijen radikallerinin diğer önemli bir kaynağıdır (30). İskemik mukozaya nötrofil infiltrasyonu, mukozal hasarı arttıran diğer bir faktör olan fosfolipaz A2 ve buna bağlı trombosit aktivite edici faktör (Platelet Activating Factor: PAF) salınımını arttırmaktadır (1,2). Glukokortikoidler fosfolipaz A2'yi inhibe edici bir protein olan lipokortin sentezini uyararak fosfolipaz A2'yi inhibe etmektedir (10,19). Fosfolipaz A2 aktivasyonunun inhibisyonu da nötrofil infiltrasyonunun azaltan diğer bir etkidir (23). Nötrofil infiltrasyonunu engelleme (22), fosfolipaz A2 inhibisyonunun yanısıra, glukokortikoidlerin, iskemi-reperfüzyonda mukozal hasarın engellenmesindeki etkinliklerinin bir başka mekanizması da lizozomal membran stabilizasyonunu sağlamalarıdır (12).

Görüldüğü gibi intestinde iskemi-reperfüzyon sonrası mukozal hasar çok yönlü bir olaydır ve yapılan çalışmalarda bu sendromun etkileri engellenmeye çalışılmaktadır. Post iskemik hasarda xanthine oxidase türevi radikallerin mi, yoksa nötrofil infiltrasyonu ve bunun sonucunda ortaya çıkan radikallerin mi daha etkin bir rol oynadığı halen tartışmalıdır. Çalışmamızda xanthine oxidase inhibitörü olarak; allopurinol, nötrofil infiltrasyonunun engellenmesi ve lizozomal membran stabilizasyonu için glukokortikoid (Deksmetazon) ile preiskemik tedavi ham ayrı

Tablo III: İskemi-reperfüzyon sonrası intestinal morfolojik değişiklikler.

Grup	Rat Sayısı	Ortalama Mukozal Kalınlık (mm)	Ortalama Villus Boyu (mm)	Ortalama Kripta Derinliği (mm)
1	6	335.14±21.85	192.37±16.5	138.23±9.85
2	7	191.82±7.6*	105.09±7.46*	86.70±4.18*
3	9	228.01±10.66*	120.95±11.46*	108.12±4.10*
4	8	226.02±14.30*	127.82±16.5*	98.13±4.43*
5	7	259.51±16.94 *,**	148.93±11.88	109.80±5.74

Grup 1'e göre p<0.01\*, p<0.05\*\*

TabloIV: İskemi-reperfüzyon sonrası intestinal morfolojik değişiklikler ve nötrofil infiltrasyon düzeyi

Grup	Rat Sayısı	Villus Epitelyal Nekrozu (0-4+)	Kripta Epitelyal Nekrozu (0-4+)	Muskularis Propria Hasarı (0-4+)	Nötrofil İnfiltrasyon Düzeyi (0-4+)
1	6	0	0	0	1.0±0
2	7	3.42±0.29 *	2.0±0.25*	0	3.57±0.20*
3	9	2.66±0.28 *	1.33±0.23 *	0	2.44±0.24*,≠
4	8	2.12±0.12 *,≠,ϕ	1.12±0.12 *,≠	0	2.12±0.24*,≠
5	7	1.71±0.18 *,≠,ϕ,!	0.8±0.34 *,≠	0	2.0±0.21*, ≠

Grup 1'e göre p<0.01\*, Grup 2'ye göre p<0.01≠, Grup 3'e göre p<0.01ϕ, Grup 4'e göre p<0.05!

ayrı, hem de birlikte uygulanarak post iskemik mukozal hasarın engellenmesindeki etkinlikleri karşılaştırılmıştır. Post iskemik villus ve kripta epitelyal nekroz düzeyinin sadece iskemi uygulanan grup ile yapılan karşılaştırmalarında ise, allopurinol+deksametazon uygulanan grubun, mukozal hasarın engellenmesinde, tek başına uygulanan allopurinol (p<0.01) ve deksametrazondan (p<0.05) daha etkin olduğu görülmüştür. Yine tedavinin, allopurinolden daha etkin olduğu saptanmıştır (p<0.01).

D-xylose absorpsiyon testi, intestinal absorpsiyonun değerlendirilmesinde % 95'e varan spesiflik ve sensitivitede yararlı bir testtir (4,8,18). D-xylose 5 karbonlu bir monosakkarittir ve luminal hiçbir enzime gerek olmaksızın proksimal ince barsaklardan kolaylaştırılmış diffüzyonla absorbe edilmektedir. Hekzos transport sistemine affinitesinin diğer şekerlere göre çok yüksek olması, intestinal absorpsiyon ve muko-

zal fonksiyonun değerlendirilmesindeki etkinliğini sağlamaktadır (6). Çalışmamızda intestinal iskemi-reperfüzyon sendromundaki mukozal hasarın intestinal fonksiyona ne ölçüde yansıdığını göstermek amacıyla uygulanmıştır. Çalışmamızın sonuçlarında intestinal iskemi-reperfüzyon sonucu ortaya çıkan mukozal hasara bağlı olarak d-xylose absorpsiyonunun önemli ölçüde düştüğü (p<0.05), preiskemik tedavi ile bu düşüşün anlamlı düzeyde (p<0.05) engellendiği, fakat yine de normal değerlere ulaşamadığı görülmüştür. Çalışmamızdaki bu erken devrede elde edilen d-xylose absorpsiyon testi sonuçları ise, histopatolojik olarak mukozal hasarın engellenmesinin mukozal fonksiyonlara aynı ölçüde yansımadığını, barsağın absorpsiyon fonksiyonunun iskemi reperfüzyona bağlı mukozal hasardan önemli ölçüde etkilendiğini düşündürmektedir.

## Kaynaklar

1. Albert DH, Synder F: Biosynthesis of 1-alkyl 2-acetyl-singly-cero 3- phosphocholine (platelet activating factor) from 1-alkyl 2-acyl-Snglycero 3-phosphocholine by rat alveolar macrophages, phospholipase A2 and acetyltransferase activities during phagocytosis and ionophore stimulation. *J Biol Chem* 258:97, 1983.
2. Benveniste J, Chingord M, Le Coudeic J, Vargaftig B: Biosynthesis of platelet activating factor (PAF-acether). II. Involvement of phospholipase A2 in the formation of PAF-acether and lyso-PAF-acether from rabbit platelets. *Throm Res* 25:375, 1982.
3. Brown MF, Ross AJ, Dasher J, Turley DL, Ziegler MM, O'Neil JA: The role of leucocytes in mediating mucosal injury of intestinal ischemia reperfusion. *J Pediatr Surg* 25:214, 1990.
4. Buts JP, Morin CL, Roy CC: One hour blood xylose test: Reliable index of small bowel function. *J Pediatrics* 90:729, 1978.
5. Butterfield JD, McGrow CP: Free radical pathology. *Stroke* 9:443, 1978.
6. Caspary WF: On the mechanism of d-xylose absorption from the intestine. *Gastroenterology* 63:531, 1972.
7. Chiu CS, McArdle AH, Brown R, Scott HJ, Gurd FN: Intestinal mucosal lesion in low flow states. *Arc Surg* 101:478, 1970.
8. Christie DL: Use of one-hour blood xylose test on indicator of small bowel function. *J Pediatrics* 90:729, 1978.
9. Del Maestro, Thow HH, Bjork J: Free radicals as mediators of tissue injury. *Acta Physiol Scand* 492:43, 1980.
10. Flower RJ, Blackwell GJ: Anti-inflammatory steroids induce biosynthesis of a phospholipase A2 inhibitor which prevents prostoglandin generation. *Nature* 278:456, 1979.
11. Fridovich I: The biology of oxygen radicals. *Science* 201:875, 1978.
12. Glenn TM, Lefer AM: Role of lysosomes in the pathogenesis of splanchnic ischemia shock in cats. *Circ Res* 27:783, 1979.
13. Granger DN, Mc Cord JM, Parks Da, hollwart ME: Xanthine oxidase inhibitors attenuate ischemia-induced vascular permeability changes in the cat intestine. *Gastroenterology* 90:80, 1986.
14. Granger DN, Rutili G, Mc Cord JM: Superoxide radicals in feline intestinal ischemia. *Gastroenterology* 81:22, 1981.
15. Grisham MB, Hernanadez LA, Granger DN: Xanthine oxidase and neutrophil infiltration in intestinal ischemia. *Am J Physiol* 251:567, 1986.
16. Grisham MB, Jefferson MM, Melton DF, Thomas EI: Chlorination of endogenous amines by isolated neutrophils. Ammonia-dependent bactericidal, cytotoxic and cytolytic activities of chloramines. *Biol Chem* 259:10404, 1984.
17. Grisham MB, Jefferson MM, Thomas EL: Role of monochloramine in the oxidation of erythrocyte hemoglobin by stimulated neutrophils. *J. Biol Chem* 259:6757, 1984.
18. Groig RM, Atkinson JA: D-xylose testing: A review. *Gastroenterology* 95:223, 1988.
19. Hiroto F, Schiffmann E, Venkotosubramanian K, Solomon D, Axelrod J: A Phospholipase A2 inhibitory protein in rabbit neutrophils induced by glucocorticoids. *Proc Natl Acad Sci USA* 77:2533, 1980.
20. Mc Cord JM: Free radicals and inflammation: Protection of synovial fluid by superoxide dismutase. *Science* 185:529, 1974.
21. Mc Neely MDD: D-xylose: Amedeo JP, Lawrence AK (ed) "Methods in Clinical Chemistry" Toronto, CV, Mosby, 1987, s:862.
22. Otamiri T: Oxygen radicals, lipid peroxidation, and neutrophil infiltration after small intestinal ischemia and reperfusion. *Surgery* 105:593, 1989.
23. Otamiri T, Lindahl M, Tagesson C: Phospholipase A2 inhibition prevents mucosal damage with small intestinal ischemia in rats. *Gut* 29:489, 1988.
24. Parks DA, Bulkey GB, Granger DN: Role of oxygen derived free radicals in digestive tract disease. *Surgery* 94:415, 1983.
25. Parks DA, Bulkey GB, Granger DN: Role of oxygen free radicals in shock, ischemia and organ preservation. *Surgery* 94:428, 1983.
26. Parks DA, Bulkey GB, Granger DN, Hamilton SR, Mc Cord JM: Ischemic injury in the cat small intestine: role of superoxide radicals. *Gastroenterology* 82:9, 1982.
27. Parks DA, Granger DN: Contributions of ischemia and reperfusion to mucosal lesion formation. *Am J Physiol* 250:749, 1986.
28. Parks DA, Granger DN: Ischemia-induced vascular changes: Role of xanthine oxidase and hydroxyl radicals. *Am J Physiol* 245:285, 1983.
29. Parks Da, Granger DN, Bulkey GB: Soybean trypsin inhibitor attenuates injury to the feline small intestine. *Gastroenterology* 89:6, 1985.
30. Thomas EL, Grisham MB, Jefferson MM: Myeloperoxidase-dependent effect of amines on functions of isolated neutrophils. *J Clin Invest* 72:441, 1983.
31. Younes M, Schoenberg MH, Jung H: Oxidative tissue damage following regional intestinal ischemia and reperfusion in the cat. *Res Exp Med* 184:259, 1984.