

# DENEYSEL AKUT PANKREATİT MODELİNDE GELİŞEN AKCİĞER HASARINA TEMPOL'ÜN ETKİSİ

## The Effects of Tempol on Lung Injury in A Model of Experimental Acute Pancreatitis

Faruk Önder AYTEKİN

### ÖZET

**Amaç:** Akut pankreatitte gelişen akciğer hasarına Tempol'ün etkisi araştırıldı.

**Yöntem:** 30 adet rat üç gruba ayrıldı (n=10). Grup I (Kontrol grubu): Laparotomi ve bilio-pankreatik kanal hazırlığı yapıldı. Grup II (Akut pankreatit grubu):Bilio-pankreatik kanal bağlanarak akut pankreatit ve akciğer hasarı oluşturuldu. Grup III (Tedavi grubu): Bilio-pankreatik kanal bağlandı ve Tempol verildi. Her üç grupta da akciğer dokusunun ıslak/kuru ağırlık oranı, akciğer dokusu miyeloperoksidaz aktivitesi ve malondialdehit seviyesi ölçüldü.

**Bulgular:** Grup II ve III de ıslak/kuru ağırlık oranında, miyeloperoksidaz aktivitesinde ve malondialdehit miktarında artış kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek saptandı (p<0.0001). Grup III de ıslak/kuru oranında azalma, miyeloperoksidaz aktivitesinde ve malondialdehit seviyesinde düşme görüldü. Fakat bu değişim istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı.

**Sonuç:** Literatürde Tempol'ün deneysel iskemi-reperfüzyon ve sepsis modellerinde gelişen uzak organ hasarı üzerine olumlu etkileri bildirilmiştir. Çalışmamızda oluşturulan pankreatite bağlı akciğer hasarında Tempol'ün kısmen etkili olduğu, fakat bu etkinin literatürde yer alan iskemi-reperfüzyon ve sepsis modellerine göre çok daha sınırlı kaldığı görülmektedir. Bu da pankreatite bağlı akciğer hasarının oluşum mekanizmasında etkili başka faktörlerin de olabileceğini düşündürmektedir. Bu konuda altta yatan mekanizmaları aydınlatmak için ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

**Anahtar Sözcükler:** Akut pankreatit; Akciğer hasarı; Tempol

### ABSTRACT

**Background:** Acute pancreatitis, especially in the severe form, is a well-known disease causing both local intra-abdominal and remote organ disturbances, including lungs. As a membrane-permeable radical scavenger, Tempol was previously shown to attenuate the tissue damage after ischemia-reperfusion and sepsis. Here, we examined the effects of Tempol on pulmonary injury in a rat acute pancreatitis model.

**Methods:** Thirty male Wistar-Albino rats underwent median laparotomy and randomized into three groups: Group I (control) bilio-pancreatic duct was dissected but not ligated (n=10), group II (acute pancreatitis group) bilio-pancreatic duct was ligated (n=10), and group III (Tempol treated group) Tempol 30 mg/kg intravenously was injected following bilio-pancreatic duct ligation (n=10). After observation time (48 hours) animals were killed and level of malondialdehyde, myeloperoxidase activity together with tissue wet/dry ratio in the lung parenchyma were assessed and compared.

**Results:** There was a statistically significant increase in the quantity of malondialdehyde, myeloperoxidase activity and tissue wet/dry ratio of lungs in the acute pancreatitis group when compared to the control group. Treatment of animals with Tempol partly reduced the pulmonary injury characterized by increased tissue wet/dry ratio, level of malondialdehyde and myeloperoxidase activity. But this reduction was not found to be statistically significant.

**Conclusion:** Beneficial effects of Tempol in preventing pulmonary injury following experimental models of sepsis and ischemia-reperfusion have been reported previously. In our model of experimental acute pancreatitis, Tempol showed some attenuating effect on pulmonary injury despite it was limited when compared to that of ischemia-reperfusion and sepsis models. This result suggests that some other confounding factors may be involved in the mechanisms of pulmonary injury related to acute pancreatitis. We believe that further detailed studies are needed to elucidate the exact mechanisms of that injury.

**Keywords:** Stroke; Pediatric; Acute ischemia; Headache

<sup>1</sup>Bozok Üniversitesi Tıp Fakültesi  
Genel Cerrahi Anabilim Dalı, Yozgat

Faruk Önder AYTEKİN, Prof. Dr.

### İletişim:

Prof. Dr. Faruk Önder AYTEKİN  
Yozgat Bozok Üniversitesi Genel Cerrahi  
Anabilim Dalı, Yozgat  
Tel: 0532 254 09 84  
e-mail:  
aytekinfaruk@yahoo.com

Geliş tarihi/Received: : 06.09.2017  
Kabul tarihi/Accepted: 12.09.2017  
DOI: 10.16919/bozoktip.336472

Bozok Tıp Derg 2018;8(3):109-113  
Bozok Med J 2018;8(3):109-113

## GİRİŞ

Akut pankreatit pankreasın akut inflamasyonudur. Modern tıptaki gelişmelere rağmen akut pankreatit (AP) mortalite ve morbidite kaynağı olarak önemini korumaktadır. Zira akut pankreatit ve komplikasyonlarının tedavisinde etkin bir yöntem ortaya konulamamıştır. Halen AP'te organ yetmezlikleri ve ağır metabolik bozukluklar gibi ciddi komplikasyonlar vakaların %20 sinde ortaya çıkmakta ve bu vakalarda morbidite ve mortalite % 40 gibi yüksek oranlara ulaşmaktadır (1). Şiddetli AP olgularının %20'sinde adult respiratuar distress sendromu (ARDS) görülmektedir. AP de ilk hafta içindeki mortalitenin %60'ı akciğer disfonksiyonuna bağlıdır. (2,3)

Serbest radikaller, hücrelerde endojen ve eksojen kaynaklı etmenlere bağlı olarak oluşurlar. Serbest radikaller bir veya daha fazla eşleşmemiş elektrona sahip, kısa ömürlü, kararsız, molekül ağırlığı düşük ve çok etkin moleküllerdir. Bu moleküller oksidatif stresten sorumludurlar. Oksidatif stres basit bir şekilde, vücudun antioksidan savunması ile hücrelerin lipid tabakasının peroksidasyonuna neden olan serbest radikal üretimi arasındaki dengesizlik olarak tanımlanır. (4) Bir inflamatuvar süreç olan akut pankreatitte tüm vücut oksidatif stres altındadır.

Kararlı nitroksid radikallerinin süperoksit dismutaz (SOD) benzeri aktivite göstererek oksidatif strese karşı hücreleri koruduğu gösterilmiştir. Tempol (4-hydroxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidine N-oxyl) biyolojik membranları geçebilen kararlı piperidin nitroksid grubu bir madde olup, serbest radikal süpürücüsü olarak adlandırılmaktadır.(4) Tempol'ün ratlarda serülein ile oluşturulan pankreatitte , hemorajik şokta ve endotoksinle oluşturulan organ yetmezliğinde etkili olduğu gösterilmiştir. (5,6,7)

Bu çalışmada deneysel akut pankreatit modelinde oluşan akciğer hasarına Tempol'ün etkili olup olmadığını araştırmayı amaçladık.

## GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışmada ağırlıkları 280-340 gram arasında değişen 30 adet Wistar-Albino cinsi erkek rat kullanılmıştır. Çalışmaya alınan hayvanlar üç gruba ayrılmıştır. Tüm gruplarda anestezi için ketamine (Ketalar® Eczacıbaşı

İstanbul-Türkiye) 50 mg/kg dozunda intramusküler, xylazine (Rompun® Bayer- Türk İstanbul-Türkiye) 10 mg/kg dozunda intramusküler olarak kullanıldı. Povidone iodine solüsyonuyla ratlarda karın ön duvarı temizlenerek, steril şartlar altında 3 cm'lik orta hat insizyonu ile karına girildi. Kontrol grubunda (n=10) duodenum mobilize edilerek bilio-pankreatik kanal bulundu. Pankreatit grubunda (n=10) duodenum mobilize edilerek bilio- pankreatik kanal bulunup, kanalın duodenuma giriş yeri 4/0 ipek ile bağlandı. Tedavi grubunda (n=10) bilio-pankreatik kanal, duodenuma giriş yerinden bağlandı. Vena cava inferiorundan 26 G x ½ insülin enjektörüyle girilerek 30 mg/kg dozunda Tempol (4-hydroxy-2,2,6,6-tetramethyl-piperidine-N-oxyl, Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany, Exper Laboratories, İzmir, Türkiye) verildi. Tüm gruplarda kanama kontrolü yapılarak fasya 3/0 devamlı sütürlerle, cilt 3/0 tek tek sütürlerle kapatıldı. Her üç gruba operasyon sonrası 2 x 10 ml Ringer's laktat solüsyonu cilt altına verildi. Tempol grubuna 24 saat sonra 30 mg/kg dozunda Tempol intraperitoneal olarak tekrar verildi.

## Örneklerin Alınması

Hayvanlar 48 saat sonra anestezi altında tekrar ameliyata alındı. Göğüs boşluğu açılarak akciğerler çıkartıldı ve hayvanlar kurban edildi.

## Akciğer Ödemi

Yaş/kuru ağırlık oranı kullanılarak akciğer ödemi değerlendirildi. Akciğer sol lobu bu ölçüm için kullanıldı. Sol lob tartılarak yaş ağırlık olarak kaydedildi. Daha sonra bu dokuların fırında 90oC de 24 saat kuruması beklendi. Daha fazla ağırlık değişiminin olmadığı tesbit edilince dokular tekrar tartılarak kuru ağırlık sonuçları elde edildi.

## Akciğer Miyeloperoksidaz (MPO) Aktivitesi

Lökosit aktivasyonun göstergesi olarak doku MPO aktivitesi ölçümü kullanıldı. Akciğer sağ lobunun bir kısmı bu ölçümde kullanıldı. Akciğer dokusunda MPO aktivitesi Koika K. ve ark.'nın tanımladığı metotla ölçüldü.(8)

## Lipid Peroksidasyonunun Değerlendirilmesi

Lipid peroksidasyonunun göstergesi olarak doku

malondialdehit (MDA) düzeyi ölçümü kullanıldı. Akciğer sağ lobunun diğer bir bölümü MDA düzeyini ölçmek için kullanıldı. Akciğer dokusunda MDA ölçümü Ohkawa ve ark.'nın tanımladığı metotla ölçüldü. ( 9)

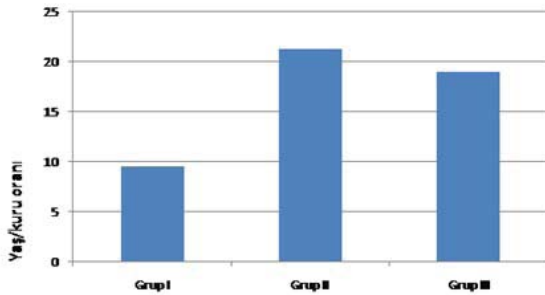
### İstatistiksel Analiz

Ölçümler median ve range olarak bildirildi. Gruplar arasındaki farklılıklar Kruskal-Wallis tek yönlü varyans analizi testiyle karşılaştırıldı. İkili gruplar arası kıyaslamalar Mann-Whitney U testi ile yapıldı.  $p < 0,05$  olduğunda sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Tüm analizler SPSS 11.5 sürümüyle yapıldı.

## BULGULAR

### Akciğer dokusu yaş/kuru ağırlık oranı

Gruplar arasında akciğer dokusu yaş/kuru oranı değerleri açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulundu ( $X: = 20,63$ , 2d.f.  $p < 0.0001$ ). Akut Pankreatit geliştirilen grupla (Grup II) kontrol grubu kıyaslandığında, yaş/kuru ağırlık oranında istatistiksel olarak anlamlı artış saptandı [7,24 (5,60-9,80), 3,86 (3,54-4,45),  $p < 0,0001$ ]. Grup II ve Grup III karşılaştırıldığında Grup III de ödemde azalma saptanmasına rağmen [6,22 (4,90-7,78)] istatistiksel olarak grup II den farklılık yoktu ( $p = 0,096$ ). (Şekil I)

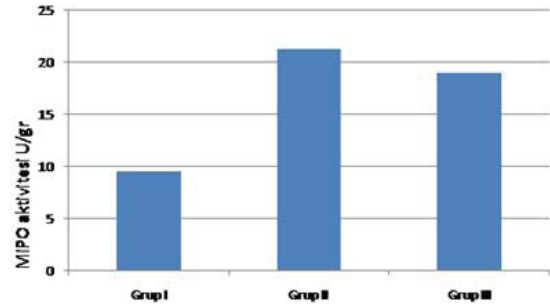


Şekil I. Akciğer dokusu yaş/kuru oranı

### Akciğer dokusunda miyeloperoksidaz aktivitesi ölçümü

Her üç grup arasında MPO seviyeleri arasında istatistiksel farklılık bulundu ( $\text{chi-square} = 20,78$  2d.f.  $p < 0,0001$ ). Grup I ve Grup II kıyaslandığında [5,19 U/gr (4,17-7,50), 21,17 U/gr (17,66-26,89)] Grup II de anlamlı istatistiksel artış vardı ( $P < 0.0001$ ). Grup III'de (Tempol grubu) doku MPO aktivitesinde azalma vardı

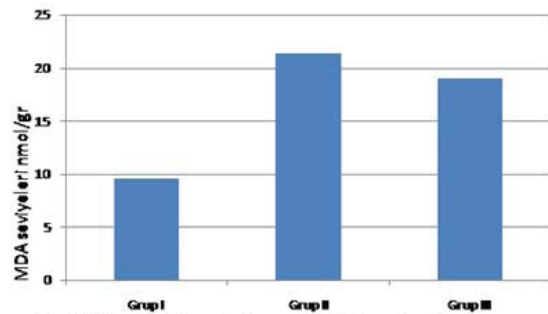
[18,11 U/gr (12,67-23,54)]. Fakat bu farklılık istatistiksel olarak anlamlı değildi ( $p > 0.05$ ) (Şekil II).



Şekil II. Akciğer dokusu MPOaktivitesi

### Akciğer dokusu MDA analizi

Kontrol grubunda ortalama  $9.56 \pm 1.64$  nmol/gr doku olarak ölçülen MDA seviyesi, akut pankreatit grubunda  $21.34 \pm 1.48$  nmol/gr doku olarak ölçülmüştür. Kontrol grubuyla pankreatit grubu arasında MDA seviyeleri açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık mevcuttu. ( $\text{chi-square} = 13.47$ , 2 d.f.,  $p = 0.0001$ ). Grup III'de (Tempol grubu) doku MDA seviyesinde azalma saptandı. ( $19.02 \pm 2.78$  nmol/gr doku) Fakat bu farklılık istatistiksel olarak anlamlı değildi ( $p > 0.05$ ) (Şekil III).



Şekil III. Akciğer dokusu MDA seviyeleri

## TARTIŞMA

Çalışmamızda pankreatit grubunda lökosit aktivasyonunun göstergesi olan akciğer dokusu MPO aktivitesi, lipid peroksidasyonunun gösteren akciğer dokusu MDA düzeyi ve kapiller kaçağı gösteren akciğer dokusu yaş/kuru ağırlık oranındaki artış anlamlı derecede yüksekti. Bu bulgular modelimizde

pankreatite bağlı akciğer hasarının geliştiğini göstermektedir. Pankreatite bağlı çoklu organ yetmezliğinin etiolojisinde tümör nekrozis faktör-alfa (TNF-a), interlökin-1, interlökin-6, platelet aktive edici faktör (PAF) ve nitrik oksit gibi proinflamatuvar mediatörler önemli rol oynamaktadır. (10) Başlangıçta hasar gören pankreas asinar hücrelerinden salınan sitokinler ve kemokinler, olayın ilerlemesiyle peritoneal inflamatuvar hücrelerden salgılanırlar (11-13) Üretilen bu maddelerle aktive olan dolaşımdaki inflamatuvar hücreler ve özellikle aktive nötrofiller pankreatitle ilişkili akciğer hasarında önemli rol oynamaktadır(14-16)

Çalışmamızda grup II de akciğer dokusu MPO aktivitesindeki artış akciğer dokusundaki nötrofil aktivasyonunun indirekt bir göstergesidir. (8) Deneysel sepsis modelinde aktive olan lökositlerin endotel ile etkileşime girerek endotele yapıştıkları ve migrasyonla hedef organda biriktikleri gösterilmiştir. (17)

Son dönemlerde pankreatik enzimlerinin de uzak organ hasarı oluşumunda önemli etkileri olduğu anlaşılmıştır. (10) Pankreatik enzimlerin uzak organlara nasıl ulaştığı net olarak belirlenememesine rağmen, bu yayımda pankreasın portal ve sistemik dolaşımının yanında peripankreatik ve retroperitoneal lenfatik drenajının da önemli rol oynadığı bildirilmektedir. (10) Deneysel olarak pankreas enzimlerinin intraperitoneal olarak verilmesiyle ARDS benzeri bir tablo oluşturulmuştur. Bu tabloyu pankreatik elastaz lökositleri aktive ederek ve sitokin üretimini artırarak yapmaktadır. (18)

Gerek aktive nötrofiller, gerekse pankreatik enzimlerin uzak etkisiyle hücre içi serbest radikaller artmakta ve oksidatif stres oluşmaktadır. Oksidatif stres lipid peroksidasyonuna yol açmaktadır. Lipid peroksidasyonunun en önemli ürünü MDA dır. Oluşan MDA, hücre membranlarındaki iyon alışverişine etki ederek iyon geçirgenliğini ve enzim aktivitelerini olumsuz etkiler. (19) Benzer şekilde DNA'nın nitrojen bazlarıyla etkileşime girerek hücre için toksik, mutajenik ve karsinojenik etki oluşturabilir. (20) Çalışmada akut pankreatit grubunda MDA düzeyleri kontrol grubuna göre anlamlı derecede yükselmiştir. Ancak Tempol tedavisi ile düşmesi beklenen MDA seviyesi istatistiksel anlamlı değerleri görememiştir.

Literatürde akciğer ödeminin derecesini değerlendirmek amacıyla çeşitli metotlar kullanılmıştır. (20-24) Çalışmamızda akciğer vasküler yatağında mikrovasküler permeabilite değişikliklerini değerlendirmek amacıyla akciğer dokusu yaş/kuru ağırlığı oranı kullanıldı. Göreceli olarak basit bir metot olan akciğer dokusu yaş/kuru ağırlık oranı dolaylı olarak bu organda toplanan sıvı miktarını gösterir. Yaş/kuru ağırlık oranıyla gösterilen akciğer ödemi akut pankreatit sonrası istatistiksel olarak anlamlı artış göstermiş ve bu artış grup III'de Tempol kullanımı sonrası kısmen azalmıştır.

Literatürde deneysel iskemi-reperfüzyon ve sepsis modellerinde gelişen akciğer hasarı üzerine olumlu etkileri bildirilen Tempol'ün çalışmamızda oluşturulan pankreatite bağlı akciğer hasarını kısmen azalttığı, fakat bu etkinin iskemi-reperfüzyon ve sepsis modellerine göre çok daha sınırlı kaldığı görülmektedir. Bu da pankreatite bağlı akciğer hasarının oluşum mekanizmasında sepsis ya da iskemi-reperfüzyon modellerinden farklı başka faktörlerin de varlığını düşündürmektedir. Bu konuda altta yatan mekanizmaları aydınlatmak için ileri çalışmalara ihtiyaç olduğu görülmektedir.

#### KAYNAKLAR

1. Steer ML. Etiology and pathophysiology of acute pancreatitis. In: Dimango EP, Gardner JD, Lebenthal E, Rober HA, Scheele GA. The pancreas: biology, pathobiology and disease. New York Raven, 1993. p.581-92.
2. Renner I, Savage W, Pantoja J, et al. Death due to acute pancreatitis: a retrospective analysis of 405 autopsy cases. Dig Dis Sci. 1985;30(7):1005-18.
3. Lankisch PG, Burchard-Recker S, Petersen M, et al. Morbidity and mortality in 602 patients with acute pancreatitis seen between the years 1980-1994. J Gastroenterol. 1996;34(3):371-7.
4. James B. Mitchel et al. Inhibition of oxygen-dependent radiation-induced damage by the nitroxide superoxide dismutase mimic, Tempol. Archives of Biochemistry and Biophysics. 1991;289(2):62-70.
5. Sledzinski Z, Wozniak M, Antosiewicz J, et al. Protective effect of -hydroxy-TEMPO, a low molecular weight superoxide dismutase mimic, on free radical toxicity in experimental pancreatitis. Int J Pancreatol. 1995;18(2):153-60.
6. Novelli GP. Oxygen radicals in experimental shock: effects of spin trapping nitrones in ameliorating shock pathophysiology. Crit Care Med. 1992;20(4):499-507.

7. Leach M, Frank S, Olbrich A, et al. Decline in the expression of copper/zinc superoxide dismutase in the kidney of rats with endotoxic shock: effects of the superoxide anion radical scavenger, Tempol, on organ injury. *Br J Pharmacol.* 1998;125(8):817–25.
8. Koike K, Moore E, Moore F, et al. Gut ischemia/reperfusion produces lung injury independent of endotoxin. *Crit Care Med.* 1994; 22(3):1438-44.
9. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissue by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem.* 1995 ;2(5):351-358.
10. Zyromski N, MUI T MM. Evolving concepts in the pathophysiology of acute pancreatitis. *Surgery* 2003; 133(4):235-7.
11. Kusske AM, Rongione AJ, Reber HA. Cytokines and acute pancreatitis. *Gastroenterology.* 1996; 110(5): 639- 42.
12. Gukovskaya AS, Gukovsky I, Zaninovic V, et al. Pancreatic acinar cells produce, release, and respond to tumor necrosis factor-alpha. Role in regulating cell death and pancreatitis. *J Clin Invest.* 1997; 100(9): 1853- 62.
13. Mikami Y, Takeda KT, Shibuya K, et al. Peritoneal inflammatory cells in acute pancreatitis: Relationship of infiltration dynamics and cytokine production with severity of illness. *Surgery* 2002; 132(1):86-92.
14. Frossard JL, Saluja A, Bhagat L, et al. The role of intercellular adhesion molecule-1 and neutrophils in acute pancreatitis and pancreatitis-associated lung injury. *Gastroenterology.* 1999; 116(5):694-701.
15. Bhatia M, Mochhaia S. Role of inflammatory mediators in the pathophysiology of acute respiratory distress syndrome. *J Pathol.* 2004;202(2):145-56.
16. Pastor CM, Matthay MA, Frossard JL, Pancreatitis- associated acute lung injury: new insights. *Chest.* 2003; 124(3):2341-51.
17. McMillen MA, Huribal M, Sumpio B. Common pathway of endothelial-leukocyte interaction in shock, ischemia and reperfusion. *Am J Surg.* 1993; 166(4): 557- 62.
18. Jaffray C, Yang J, Carter G, et al. Pancreatic elastase activates pulmonary nuclear factor kappa B and inhibitory kappa B, mimicking pancreatitis-associated adult respiratory distress syndrome. *Surgery* 2000; 128(2):225-31.
19. Buchwalow I, Schnekenburger J, Atiakshin D, Samoilova V, Wolf E, Boecker W, Tiemann K. Oxidative stress and NO generation in the rat pancreatitis induced by pancreatic duct ligation. *Acta Histochem.* 2017 ;119(3):252-256.
20. Yang T, Mao YF, Liu SQ, Hou J, Cai ZY, Hu JY, Ni X, Deng XM, Zhu XY. Protective effects of the free radical scavenger edaravone on acute pancreatitis-associated lung injury. *Eur J Pharmacol.* 2010;630(2):152-7.
21. Schmelling DJ, Caty MG, Oldham KT, et al. Evidence for neutrophil-related acute lung injury after intestinal ischemia-reperfusion. *Surgery.* 1989; 106(2):195-7.
22. Dowdall JF, Winler DC, Bouchier-Hayes DJ. Inosine modulates gut barrier dysfunction and end organ damage in a model of ischemia-reperfusion injury. *J SurgRes.* 2002;108(1):61-8.
23. Koike K, Yamamoto Y, Hori Y, et al. Group II phospholipase A2 mediates lung injury in intestinal ischemia-reperfusion. *Ann Surg.* 2000; 232(1):90-7.
24. Tavaf-Motamen H, Miner TJ, Stamcs BW, et al. Nitric oxide mediates acute lung injury by lation of inflammation. *J SurgRes.* 1998; 78(1):137-43.