

## Kaempferol, kurkumin ve kaempferol-kurkumin kombinasyonunun deneysel akut pankreatitteki yararlı etkileri

*The ameliorative effects of kaempferol, curcumin and kaempferol-curcumin combination on experimental acute pancreatitis*

Musa Turgut, Halil Kocamaz, Esin Avcı, Mutlu Yaka, Gülçin Abban Mete

Gönderilme tarihi: 07.11.2019

Kabul tarihi: 06.12.2019

### Özet

**Amaç:** Akut Pankreatit ani başlayan karın ağrısı ile kendini gösterip sistemik inflamatuvar yanıtı kadar ilerleyebilen acil bir klinik durumdur. Standart bir tedavisi olmayan bu hastalıkta güncel tedavi yaklaşımlarına gereksinim vardır. Deneysel akut pankreatitte kaempferol, kurkumin ve kaempferol-kurkumin kombinasyonunun etkilerini göstermeyi amaçladık.

**Gereç ve yöntem:** Wistar albino erişkin ratlar altı gruba ayrıldı. Gruplara sırasıyla, intraperitoneal (i.p.) olarak (grup I) fizyolojik su, (grup II) L-arginin, (grup III) Dimetil sülfoksit (DMSO), (grup IV) L-Arginin ve kurkumin, (grup V) L-Arginin ve kaempferol ile (grup VI) L-Arginin, kaempferol-kurkumin kombinasyonu uygulandı. Deney bitiminde kan ve pankreas örnekleri alındı. Histolojik, biyokimyasal ve immunohistokimyasal incelemeler yapıldı. Amilaz, lipaz, malondialdehid, TNF- $\alpha$ , IL-6, Superoksit dismutaz (SOD) düzeyleri ölçüldü. Pankreas doku örneklerine, pankreatit skorlaması ile NF (nükleer faktör)- $\kappa$ B immunohistokimya analizi yapıldı.

**Bulgular:** Malondialdehid, tümör nekrozis faktör-alfa (TNF- $\alpha$ ) ve interlökin-6 (IL-6) düzeyleri gruplar arasında farklı değildi. SOD düzeyleri grup VI'da diğer gruplara göre yüksekti ancak istatistiksel olarak anlamlı değildi. Ödem skoru grup VI'da grup II'ye göre daha düşük idi. Grup V ve grup VI'da inflamasyon skoru grup II' den daha az idi. Nekroz skoru grup IV, grup V ve grup VI'da grup II'den daha az idi. Grup II'deki NF- $\kappa$ B boyanma skoru tedavi gruplarından farklı değildi.

**Sonuç:** L-arginin ile oluşturulan deneysel akut pankreatitte kaempferolün ve kaempferol-kurkumin kombinasyonunun özellikle histopatolojik olarak inflamasyonu ve nekrozu azalttığı bu sayede koruyucu etkileri olduğu görülmüştür.

**Anahtar kelimeler:** Arjinin, kurkumin, inflamasyon, pankreatit.

Turgut M, Kocamaz H, Avcı E, Yaka M, Abban Mete G. Kaempferol, kurkumin ve kaempferol-kurkumin kombinasyonunun deneysel akut pankreatitteki etkileri. Pam Tıp Derg 2020;13:101-108.

### Abstrat

**Purpose:** Acute pancreatitis is a medical emergency disorder which manifests itself with sudden onset abdominal pain and may progress systemic inflammatory response syndrome. Novel treatment modalities are required for this disorder which does not have standard treatment regime. We aimed to evaluate the effects of kaempferol, curcumin and kaempferol-curcumin combination on experimental acute pancreatitis.

**Material and method:** Wistar albino adult rats were divided into 6 groups. The groups were exposed following substances by intraperitoneal (ip) administration: (Group I) saline, (Group II) L-arginine, (Group III) Dimethyl sulphoxide (DMSO), (Group IV)L-arginine and curcumin, (Group V) L-arginine and kaempferol, (Group VI) L-arginine and curcumin-kaempferol combination. Blood and pancreas sample of the rats were obtained. Histologic, biochemical and immunohistochemical analysis were made on the samples. Amylase, lipase, tumor necrosis factor-alpha (TNF- $\alpha$ ), interleukine-6 (IL-6), and superoxide dismutase (SOD) levels were analyzed. Pancreatitis staging and NF (nuclear factor)- $\kappa$ B staining were evaluated on pancreas tissues.

**Results:** Malondialdehyde and IL-6 levels were not different between groups. Superoxide dismutase (SOD) levels were higher than other groups but it was not statistically significant. Edema score on pancreas tissue were lower than group II in group VI. Inflammation score were lower than group II in groups V and VI. NF (nuclear factor)- $\kappa$ B staining score were not different between groups.

**Conclusion:** Kaempferol and kaempferol-curcumin combination have protective effects on L-arginine induced experimental acute pancreatitis by diminishing inflammation and necrosis.

Musa Turgut, Uzm. Dr. Denizli Devlet Hastanesi, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Kliniği, DENİZLİ, e-posta: musaturgut1989@hotmail.com (orcid.org/0000-0001-6474-0161)

Halil Kocamaz, Dr. Öğr. Üye. Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı, Çocuk Gastroenterolojisi Bilim Dalı, DENİZLİ, e-posta: drkocamaz@hotmail.com (orcid.org/0000-0002-3366-1695) (Sorumlu Yazar)

Esin Avcı, Dr. Öğr. Üye. Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, DENİZLİ, e-posta: hekimesin@gmail.com (orcid.org/0000-0002-9173-0142)

Mutlu Yaka, Arş. Gör. Dr. Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, DENİZLİ, e-posta: mutluyaka90@gmail.com (orcid.org/0000-0002-5360-3003)

Gülçin Abban Mete, Prof. Dr. Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, DENİZLİ, e-posta: gabban@pau.edu.tr (orcid.org/0000-0001-6794-3685)

**Key words:** Arginine, curcumin, inflammation, pancreatitis.

Turgut M, Kocamaz H, Avcı E, Yaka M, Abban Mete G. The ameliorative effects of kaempferol, curcumin and kaempferol-curcumin combination on experimental acute pancreatitis. Pam Med J 2020;13:101-108.

## Giriş

Akut Pankreatit (AP), ani başlayan karın ağrısı ile karakterize acil bir klinik durumdur [1]. Patogenezi net olarak anlaşılamayan AP tedavi edilmez ise ölüm ile sonuçlanabilir [2]. Akut pankreatit patogenezinde hem sitokin aracılı hem de reaktif oksijen türlerinin (ROS) yol açtığı inflamatuvar bir süreç olduğu düşünülmektedir. Çoğunlukla asiner hücrelerden salınan sitokinler kemotaksisi, hücre ölümünü, endotelial aktivasyonu ve proinflamatuvar gen ekspresyonunu uyurarak iskemi-reperfüzyon hasarı başlatır [3, 4]. İskemi-reperfüzyon hasarı devamında oluşan ROS; sitokinleri, selektinleri ve adhezyon moleküllerini kapsayan birçok proinflamatuvar mediyatörün gen ekspresyonunu düzenleyen nükleer faktör kapa beta'yı (NF- $\kappa$ B) aktive eder [5, 6]. İnflamatuvar süreç asiner hücrelerin tripsinojen, kimotripsinojen gibi sindirim enzimlerin salınımını aktive eder ve interstisyel ödem, inflamasyon ve asiner nekrozu takiben otodijesyon olarak bilinen pankreas hasarı ortaya çıkar [7]. Etiyolojisinde idiyopatik nedenler dışında alkol alımı, safra taşları, duktal tıkanıklıklar, enfeksiyonlar ve ilaç alımı bulunan AP'in tedavisi genellikle analjezik, sıvı-elektrolit desteği ve beslenme desteği gibi semptomatik medikal yaklaşımları içermektedir [8]. Tedavideki amaç inflamasyonun inhibisyonu ile birlikte hastalığın progresyonunun ilerlemesini durdurmak ve mortaliteyi azaltmaktır. Güçlü antiinflamatuvar etkileri olan bitki kaynaklı çok sayıda biyoaktif ajan hastalıkların tedavisinde denenmektedir. Bu moleküllerden biri olan ve zerdeçal bitkisinden elde edilen kurkumin (Curcuma longa) antioksidan, antiinflamatuvar özelliğinin yanısıra anjiyogenezi inhibe edici etkilere de sahiptir [9]. Bitkisel kaynaklı flavonoid yapıdaki bir diğer ajan olan kaempferol de antioksidan, antiinflamatuvar ve antibakteriyel özellikleriyle inflamasyonun eşlik ettiği pek çok hastalığın tedavisi için umut vericidir. Kaempferol antiinflamatuvar etkilerini Nükleer faktör  $\kappa$ B (NF-  $\kappa$ B) ve aktivatör protein-1 (AP-1) yolağını baskılayarak yapmaktadır [10].

Çalışmamızda, L-Arginin ile oluşturulan deneysel AP modelinde, kurkumin ve kaempferolün tek tek ve kombine etkilerini biyokimyasal ve histolojik olarak analiz etmeyi amaçladık. Ayrıca bu iki biyoaktif ajanın pankreatitte gelişen doku hasarını önleyici role sahip olup olmadıkları bu sayede AP için umut verici bir tedavi seçeneği bulmayı amaçladık.

## Gereç ve yöntem

Bu deneysel çalışmaya için Pamukkale Üniversitesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulu'ndan (No: PAUHADYEK-2018/14 - Sayı: 60758568-020/31901) onay alındı. Deneysel çalışma Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Laboratuvarı'nda gerçekleştirildi. Histolojik ve biyokimyasal analizler Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi araştırma laboratuvarlarında yapıldı.

Ortalama 175±35 gr (140-210 gr) ağırlığında, toplam 48 adet, erkek Wistar rat çalışmaya alındı. Gruplar arasında ağırlık yönünden istatistiksel olarak fark yoktu ( $p>0,05$ ). Ratlar Pamukkale Üniversitesi Deney Hayvanları Laboratuvar Merkezi'nden sağlandı. Ratlar 24±2 °C ısıda, %50 nemli ortamda, fare yetiştirme yemi ve su ile beslenerek 12 saat gündüz 12 saat gece ortamında bekletildi. Ratlar rastgele seçilerek 6 gruba ayrılarak çalışma yapıldı. Tüm gruplara sekizer rat alındı.

- Grup I (n=8): Bu gruptaki (kontrol) ratlara intraperitoneal olarak (i.p.) 1 mL/100 gr olarak serum fizyolojik (SF) 6 gün süreyle uygulandı.
- Grup II (n=8): Bu gruptaki (L-arjinin grubu) ratlara i.p. olarak 250 mg/100 gr L-arjinin 1 saat ara ile iki kez 6 gün süreyle verdi.
- Grup III (n=8): Bu gruptaki (DMSO grubu) ratlara i.p. olarak 1 mL/100 gr Dimetil sülfoksit (DMSO) 6 gün süreyle enjekte edildi.
- Grup IV (n=8): Bu gruptaki (L-arjinin+kurkumin) ratlara i.p. olarak ikinci L-arjinin enjeksiyonundan 1 saat sonra kurkumin 50 mg/kg dozunda 6 gün boyunca aynı miktarda aynı saatte uygulandı.

• Grup V (n=8): Bu gruptaki (L-arjinin+kaempferol) ratlara i.p. olarak ikinci L-arjinin enjeksiyonundan 1 saat sonra kaempferol 21 mg/kg dozunda 6 gün boyunca aynı miktarda aynı saatte uygulandı.

• Grup VI (n=8): Bu gruptaki (L-arjinin+kurkumin+kaempferol) ratlara i.p. olarak ikinci L-arjinin enjeksiyonundan 1 saat sonra kurkumin 50 mg/kg ve kaempferol 21 mg/kg 6 gün boyunca aynı miktarda aynı saatte uygulandı.

Son antioksidan madde enjeksiyonundan 24 saat sonra sonra 90 mg/kg ketamin ve 10 mg/kg xylazine HCl anestezisi altında kan (intrakardiyak olarak) ve pankreas örnekleri alındı. Daha sonra SF ile yıkanan pankreas tam olarak ikiye bölünerek yarısı patolojik olarak incelemek diğer yarısı da biyokimyasal analizler için kullanılmak üzere -80 °C de analizlerin yapılacağı güne kadar saklandı.

## İlaçlar

Kurkumin (Curcumin longa tozu 5 gr, ≥65% HPLC, Sigma-Aldrich), kaempferol (Kaempferia galanga 200 gr/paket, 98% min HPLC, CN Lab. Nutrition Asian Group), L-Arginin (Merck, Schaffhausen, Switzerland), Dimetil sülfoksit (DMSO) (500 ml sıvı DMSO, Acar Kimya, İstanbul, Türkiye), serum fizyolojik (%0.9 NaCl 1000 ml'lik şişe, Eczacıbaşı-Baxter, İstanbul, Türkiye) kullanıldı.

## Histopatolojik İnceleme

Histopatolojik inceleme için gönderilen materyaller 24 saat %10'luk nötral tamponlu formalinde tespit edildi. Rutin doku işlemi sonrası parafin bloklara gömülen örneklerden 4 µm kalınlığında kesitler alındı. Kesitler Hematoksilen-Eosin ile boyanarak ışık mikroskopunda Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji Anabilim Dalı'nda incelendi. İncelemede sırasında pankreas dokusunda ödem, inflamasyon ve nekrozu değerlendiren bir skorlama sistemi kullanıldı (Tablo 1) [11].

**Tablo 1.** Akut pankreatitte histopatolojik sınıflama.

Parametre	Skor	Bulgu
<b>Ödem</b>	0	Yok
	1	Lobüller arasında fokal artış
	2	Lobüller arasında diffüz artış
	3	Asini harabiyeti ve ayrılması
<b>İnflamatuar hücre</b>	0	Yok
	1	Nadir ve ya duktal kanalların çevresinde
	2	Parankim içinde (lobüllerin <%50'si)
	3	Parankim içinde (lobüllerin >%50'si)
<b>Nekroz</b>	0	Yok
	1	Mimari değişiklikler, piknotik nükleus
	2	Fokal nekroz (parankimin <%10'unda)
	3	Diffüz nekroz (parankimin >%10'unda)

## İmmunohistokimyasal analiz

İmmunohistokimyasal boyama Avidin-Biyotin kompleks sistemi (ABC) kullanılarak yapıldı. Bu yöntem için bloklardan hazırlanan 4µm kalınlığındaki kesitler poli-L-lysin (MicroSlides Snowcoat X-tra, Surgipath, Richmond, IL, USA) kaplı lamlara alınarak oda ısısında bekletildi. Tüm örnekler NF-κB immunohistokimyasal

boyası uygulandı. Pozitif kontrol için önceden pozitifliği bilinen dokular kullanıldı. Boyanma aşamasında sonra kesitler ışık mikroskobu (Olympus BX51, Tokyo, Japan) altında 4, 10, 20 ve 40'luk büyütmelemlerde incelendi ve boyanma yok "0", zayıf boyanma "+", orta dereceli boyanma "++" ve kuvvetli boyanma "+++" olarak semikantitatif olarak skorlandı.

## İstatistiksel yöntem

Veriler SPSS 24.0 paket programıyla analiz edildi. Sürekli değişkenler ortalama  $\pm$  standart sapma olarak ifade edildi. Verilerin normal dağılıma uygunluğu Shapiro-Wilk testi ile incelendi. Parametrik test varsayımları sağlandığında bağımsız grup farklılıklarının karşılaştırılmasında Tek Yönlü Varyans Analizi (ikili incelemeler için Tukey testi), parametrik test varsayımları sağlanmadığında ise bağımsız grup farklılıklarının karşılaştırılmasında Kruskal Wallis Varyans Analizi (ikili incelemeler için Bonferroni Düzeltmeli Mann Whitney U testi) kullanıldı. Tüm analizlerde  $p < 0,05$  istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

## Bulgular

Deneyin dördüncü gününde L-arjinin+kurkumin+kaempferol grubundan iki, deneyin 6. gününde L-arjinin+kurkumin grubundan iki rat ex oldu.

## Histolojik sonuçlar

Kontrol grubundaki ödem skoru L-arjinin ve L-arjinin+kurkumin+kaempferol grubundakine göre istatistiksel olarak daha düşük tespit edildi ( $p < 0,05$ ). Diğer gruplar arasında ödem bakımından aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı. L-arjinin

grubundaki ödem skoru klinik olarak L-arjinin+kurkumin, L-arjinin+kaempferol ve L-arjinin+kurkumin+kaempferol gruplarından daha yüksek bulundu ( $p > 0,05$ ). Kontrol grubundaki inflamasyon skoru L-arjinin grubundan daha düşük, L-arjinin grubundaki inflamasyon skoru L-arjinin+kaempferol ve L-arjinin+kurkumin+kaempferol grubundan istatistiksel olarak anlamlı düzeyde daha yüksek tespit edildi ( $p < 0,05$ ). Kontrol grubundaki nekroz skoru L-arjinin ve L-arjinin+kurkumin+kaempferol grubundakinden daha düşük tespit edildi ( $p < 0,05$ ). Yine DMSO grubundaki nekroz skorlaması L-arjinin grubundakinden istatistiksel olarak daha düşük bulundu ( $p < 0,05$ ). L-arjinin grubundaki nekroz skoru L-arjinin+kurkumin, L-arjinin+kaempferol ve L-arjinin +kurkumin+kaempferol gruplarına göre daha yüksek hesaplandı ( $p > 0,05$ ). L-arjinin grubundaki NF- $\kappa$ B boyanma skoru kontrol ve DMSO grubuna göre belirgin olarak daha yüksekti ( $p < 0,05$ ). Kontrol grubundaki skor L-arjinin+kurkumin grubuna göre istatistiksel olarak daha düşüktü ( $p < 0,05$ ). L-arjinin grubundaki NF- $\kappa$ B boyanma skoru L-arjinin+kurkumin, L-arjinin+kaempferol ve L-arjinin+kurkumin+kaempferol gruplarına göre daha yüksek hesaplandı ( $p > 0,05$ ). Pankreas dokularında incelenen histolojik parametrelerin gruplar arasındaki karşılaştırması Tablo 2'de verilmiştir.

**Tablo 2.** Histolojik parametreler.

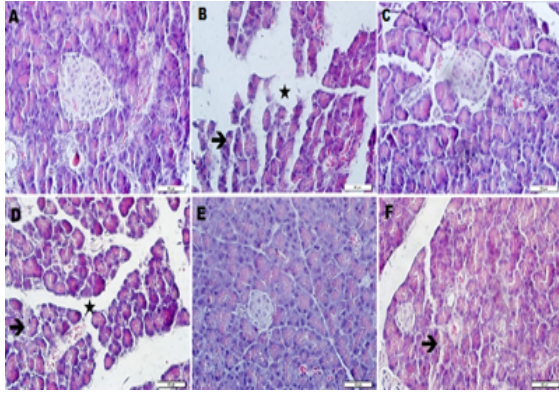
	Ödem (A.O $\pm$ S.S)	İnflamasyon (A.O $\pm$ S.S)	Nekroz (A.O $\pm$ S.S)	NF- $\kappa$ B (A.O $\pm$ S.S)
<b>Grup 1 (n=8)</b>	0,38 $\pm$ 0,52	0,75 $\pm$ 0,46	0,5 $\pm$ 0,53	0,25 $\pm$ 0,46
<b>Grup 2 (n=8)</b>	2,5 $\pm$ 0,53	2,88 $\pm$ 0,35	2,88 $\pm$ 0,35	2,75 $\pm$ 0,46
<b>Grup 3 (n=8)</b>	1,38 $\pm$ 0,52	1,5 $\pm$ 0,76	1,25 $\pm$ 1,04	0,38 $\pm$ 0,52
<b>Grup 4 (n=6)</b>	1,33 $\pm$ 0,52	1,83 $\pm$ 0,75	1,67 $\pm$ 0,52	1,67 $\pm$ 0,52
<b>Grup 5 (n=8)</b>	1,38 $\pm$ 0,52	1,4 $\pm$ 0,53	1,63 $\pm$ 0,92	1,25 $\pm$ 0,46
<b>Grup 6 (n=6)</b>	2 $\pm$ 0,63	1,17 $\pm$ 0,41	2,33 $\pm$ 0,52	1,33 $\pm$ 0,52
Gruplar arası 'p'	0.0001 <sup>a</sup> (grup 1-2,1-6)	0.0001 <sup>b</sup> (grup 2-1, 2-5, 2-6)	0.0001 <sup>c-d</sup> (grup 2-1, 2-3, 1-6)	0.0001 <sup>e-f</sup> (grup 1-2, 3-2,1-4)

\*Grup 1: Kontrol, Grup 2: L-Arjinin, Grup 3: DMSO, Grup 4: L-Arjinin+Kurkumin, Grup 5: L-Arjinin+Kaempferol, Grup 6: L-Arjinin+Kurkumin+Kaempferol

\*\* a:Grup 1 < grup 2 ve 6 ( $p < 0,05$ ) d:Grup 6 > grup 1 ( $p < 0,05$ )  
b:Grup 2 > grup 1,5 ve 6 ( $p < 0,05$ ) e:Grup 2 > grup 1 ve 3 ( $p < 0,05$ )  
c:Grup 2 > grup 1 ve 3 ( $p < 0,05$ ) f:Grup 4 > grup 1 ( $p < 0,05$ )

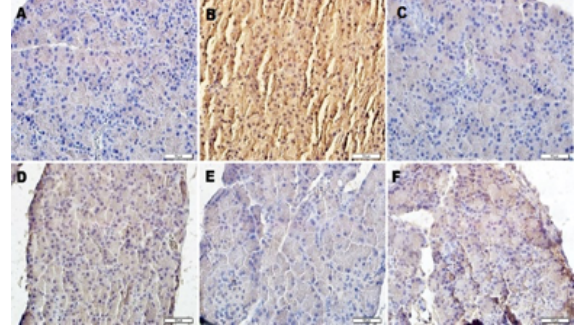
\*\*\* A.O:Aritmetik Ortalama, S.S: Standart Sapma

Hematoksilen-Eosin ile boyanan histoloji preparatları 400X büyütmede incelendi. Birinci ve 3. grupta pankreas normal görünümde izlendi, 2. grupta doku bütünlüğünün kaybolduğu, hücrelerin birbirleriyle bağlantısının azaldığı ve hücrelerde dejenerasyonun oldukça fazla olduğu gözlemlendi, 4. ve 6. grupta yapının biraz korunduğu ve dejeneratif hücrelerde azalma olduğu dikkati çekti, 5. grupta dejeneratif değişiklikler izlenmekle beraber bunların oldukça az olduğu ve doku bütünlüğünün korunduğu tespit edildi (Resim 1).



**Resim 1.** Hematoksilen- Eosin boyama. A; 1. grup, B; 2. grup, C; 3 grup, D; 4.grup, E; 5. grup, F; 6. grup. Bar; 50µm, X400. Ok: Bütünlüğün kaybolduğu alanlar. Yıldız: Asinar hücre dejenerasyonu. Birinci ve 3. grupta pankreas normal görünümde izlendi, 2. grupta doku bütünlüğünün kaybolduğu hücrelerin birbirleriyle bağlantısının azaldığı ve hücrelerde dejenerasyonun oldukça fazla olduğu gözlemlendi, 4. ve 6. grupta yapının biraz korunduğu dejeneratif hücrelerde azalma olduğu dikkati çekti, 5. grupta dejeneratif değişiklikler izlenmekle beraber bunların oldukça az olduğu ve doku bütünlüğünün korunduğu gözlemlendi.

İmmunoperoksidaz boyama ile pankreas dokusunda NF-κB ekspresyonu en yoğun ikinci grupta izlendi. NF-κB ekspresyonu asinar hücrelerin çekirdeğinde değil sitoplazmik bölgesinde izlenmektedir (Resim 2).



**Resim 2.** İmmunoperoksidaz boyama. A; 1. grup, B; 2. grup, C; 3 grup, D; 4.grup, E; 5. grup, F; 6. grup. Bar; 50µm, X400. Pankreas dokusunda NF-κB ekspresyonu en yoğun 2. grupta izlendi. Ekspresyon asinar hücrelerde sitoplazmik olup çekirdekte reaksiyon gözlemlenmedi.

### Biyokimyasal bulgular

Amilaz ve lipaz düzeyleri tüm gruplar arasında farklı değildi (sırasıyla p değerleri: 0,722-0,093). Tüm gruplarda SOD düzeyleri de arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı ( $p=0,169$ ). Ancak SOD düzeyleri L-arjinin+kurkumin+kaempferol grubunda diğer gruplara göre klinik olarak yüksekti ( $p>0,05$ ). Yine SOD düzeyi L-arjinin grubunda kontrol ve diğer gruplara göre klinik olarak düşüktü ( $p>0,05$ ). Katalaz düzeylerinde kontrol grubu ile L-arjinin +kurkumin grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edildi ( $p=0,019$ ), diğer gruplar arasında istatistiksel anlamlı bir fark bulunmadı. En yüksek katalaz düzeyi kontrol grubundaydı. Ayrıca L-arjinin+kaempferol ile L-arjinin+kurkumin+kaempferol gruplarındaki katalaz düzeyi L-arjinin grubundan yüksek tespit edildi ( $p>0,05$ ). Malondialdehid değerleri karşılaştırıldığında gruplar arasında istatistiksel anlamlılık tespit edilmedi ( $p=0,132$ ). Fakat en düşük MDA düzeyi L-arjinin+kurkumin+kaempferol grubunda bulundu. En yüksek MDA düzeyi L-arjinin grubundaydı. TNF-α düzeyleri kontrol grubu ve L-arjinin ile diğer gruplar arasında karşılaştırıldığında anlamlı bir fark bulunmadı ( $p=0,481$ ). Yine de en yüksek değer L-arjinin grubunda tespit edildi. IL-6 değerleri gruplar karşılaştırıldığında arasında istatistiksel anlamlılık bulunmadı ( $p=0,422$ ) (Tablo 3).

**Tablo 3.** Biyokimyasal analiz sonuçları.

	SOD (A.O±S.S)	Katalaz (A.O±S.S)	MDA (A.O±S.S)	TNF-α (A.O±S.S)	IL-6 (A.O±S.S)
<b>Grup 1 (n=8)</b>	0,5±0,6	9,49±1,77	0,31±0,12	64,81±4,55	2,58±0,34
<b>Grup 2 (n=8)</b>	0,2 <sup>b</sup> ±0,43	7,67±0,99	0,39 <sup>c</sup> ±0,04	70,3 <sup>d</sup> ±9,86	2,42±0,15
<b>Grup 3 (n=8)</b>	0,48±0,08	7,32±1,11	0,37±0,12	63,18±4,07	2,46±0,35
<b>Grup 4 (n=6)</b>	0,41±0,16	7,09 <sup>a</sup> ±0,99	0,33±0,06	65,47±7,36	2,44±0,26
<b>Grup 5 (n=8)</b>	0,41±0,32	8,46±1,17	0,34±0,07	64,74±6,8	2,55±0,1
<b>Grup 6 (n=6)</b>	0,74±0,56	7,93±0,74	0,28±0,03	64,47±9,69	2,67±0,2
Gruplar arası 'p'	0,169	0,019 <sup>a</sup> (Grup 1-4)	0,132	0,481	0,422

\*Grup 1: Kontrol, Grup 2: L-Arjinin, Grup 3: DMSO, Grup 4: L-Arjinin+Kurkumin, Grup 5: L-Arjinin+Kaempferol, Grup 6: L-Arjinin+Kurkumin+Kaempferol

\*\*a:Grup 4 < grup 1 (p<0,05), c:Grup 2 > grup 1,3,4,5,6 (p>0,05)  
b:Grup 2 < grup 1,3,4,5,6 (p>0,05), d: Grup 2 > grup 1,3,4,5,6 (p>0,05)

\*\*\*A.O:Aritmetik Ortalama, S.S: Standart S

## Tartışma

L-arjinin ile oluşturduğumuz deneysel pankreatit modelinde kurkumin ve kaempferol gibi bitkisel kaynaklı ajanların pankreasdaki hasarı azaltıcı etkileri olduğunu gösterdik. Özellikle kaempferolün tek başına veya kurkumin ile kombine uygulanması histolojik olarak inflamasyonu belirgin olarak azaltmaktaydı. Amilaz ve lipaz değerlerinin gruplar arasında benzer çıkması ve biyokimyasal olarak pankreatitin gösterilememesi çalışmamızın başlıca kısıtlamasıydı. Ancak çalışmamızda histolojik olarak kontrol grubuna göre L-arjinin sayesinde pankreatit oluşturduğumuzu doğruladık. L-arjininin tetiklediği pankreatitin mekanizması tam olarak bilinmemektedir. Rat çalışmalarında L-arjinini üre ve L-ornitine dönüştüren L-arjinaz enzim aktivitesinin parsiyel inhibisyonu ile pankreatitin ortaya çıkması L-arjinin metabolitlerinden birinin pankreatiti tetiklediğini göstermektedir. L-arjinin ayrıca nitrik oksit sentaz enzimi için bir substrattır ve bu sayede nitrostatif ve oksidatif stresi de uyarmaktadır [12]. Akut pankreatit gelişiminde kemokinler tarafından inflamasyon bölgesine çekilen nötrofillerin rolü büyüktür. Nötrofiller inflamasyondaki etkisini MPO, proteazlar ve reaktif oksijen türleri üzerinden göstermektedir [13]. Daha önce yapılan çalışmalarda kurkuminin MAPK sinyal yolağını inaktifleştirdiği bu sayede inflamasyonu baskıladığı gösterilmiştir. MAPK yolağının aktifleşmesi NF-kβ aktivasyonuna

yol açarak inflamatuvar yanıtın tetiklendiği bilinmektedir [14, 15].

NF-kβ aktivasyonu AP gelişiminde kilit role sahiptir. Patolojik kalsiyum geçişi ve reaktif oksijen türlerinin üretimi NF-kβ aktivasyonunda önemli bir aracıdır. NF-kβ aktivasyonu TNF-α, interleukin (IL)-1b, IL-2, IL-6 ve IL-18 gibi çeşitli sitokinlerin üretimini uyarmaktadır [16]. Çalışmamızda da AP grubunda NF-kβ ekspresyonu belirgin olarak yüksek izlendi. Kaempferolün ve kaempferol-kurkumin kombinasyonunun uygulanması NF-kβ ekspresyonunu azaltıcı etkiye sahipti. Ancak bu azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. IL-6 düzeyleri gruplar arasında farklı bulunmazken TNF-α pankreatit grubunda belirgin yüksek saptandı. TNF-α başlıca makrofajlardan salınmakta ve organ hasarlarında patofizyolojik mekanizmadan sorumlu başlıca sitokin rolünü üstlenmektedir [17]. Wang ve ark. [18] tarafından yapılan bir çalışmada da kurkuminin AP modelinde TNF-α düzeyini belirgin olarak azaltırken, IL-6 düzeylerinde değişiklik yapmadığı gösterilmiştir. Bu nedenle kurkuminin akut pankreatitte inflamasyonun erken döneminde ise antiinflamatuvar etkilerinin yeterli olduğu ileri dönemde yetersiz kaldığını öne sürmüşlerdir. İnflamasyonla birlikte ortaya çıkar serbest oksijen radikalleri membran yapısındaki lipidleri peroksidasyona uğratmakta ve buda membran hasarı sonrasında otokatalitik reaksiyonları

uyarmaktadır. Lipid peroksidasyonunun ölçümü MDA düzeyleri ile yansıtılmaktadır. Pankreas dokusundaki inflamasyonla birlikte MDA'nın arttığı daha önce yapılan çalışmalarda gösterilmiştir [19]. Çalışmamızda da MDA değerinin pankreatit grubunda diğer gruplardan yüksek olduğu ancak bunun anlamlı düzeyde olmadığı saptandı. SOD'da oksijen ve hidrojen peroksidin ters değişimini kontrol eden bir enzimdir. SOD hücre yapısında bulunan önemli bir antioksidandır ve inflamasyonla birlikte azalması beklenmektedir [20]. Çalışmamızda sadece pankreatit grubunda SOD düzeylerinin düşük bulunması, hasarın antioksidan mekanizmaları baskıladığını ve oksidatif stresin hakim olduğunu göstermektedir. Bir diğer antioksidan enzim olan katalaz çalışmamızda sadece kurkumin uygulanan grupta anlamlı olarak düşük tespit edilmiştir. Kim ve arkadaşları tarafından yapılan araştırma kaempferolün pankreatitteki etkilerini araştırma yegane çalışmadır. Bu çalışmada pankreatit modeli oluşturmak için serülein ve lipopolisakkarit kombinasyonu kullanılmış ve kaempferol ratlara oral olarak uygulanmıştır. Hipotez olarak çalışmamızdan belirgin farklılıklar içeren bu çalışmada da IRAK4 yolağı üzerinden kaempferolün inflamasyonu azaltıcı etkileri olduğu gösterilmiştir [21]. Çalışmamızda histopatolojik olarak ödemin, inflamasyonun ve nekrozun en yoğun olduğu grup pankreatit oluşturulan ve herhangi bir ajan verilmeyen gruptu. NF- $\kappa$ B ekspresyonu da en yoğun bu grubun pankreas dokularında izlendi. Kurkumin ve kaempferolün tek başına uygulanması pankreastaki ödemi azaltmakta iken kombine uygulandıklarında ödemi azaltıcı etkisinin olmadığı görüldü. Kaempferol ve kaempferol-kurkumin kombinasyonunun inflamasyonu belirgin azalttığı görüldü. İlginç olarak DMSO uygulanan grupta da pankreas dokusunda inflamasyonun arttığı izlendi. Kaempferol ve kurkuminin kombine uygulanmasının pankreas dokusunda nekrozu azaltıcı etkisi olmadığı izlenirken tek tek uygulanmaları dokudaki nekrozu azaltmaktaydı.

Çalışmamızın başlıca kısıtlılığı olan iki deney grubundan ikişer rat olmak üzere toplam 4 ratın deney sırasında ölmesi ve histolojik olarak doğrulansa da biyokimyasal olarak pankreatitin gösterilememesiydi. Deneyde kullandığımız DMSO isimli çözücünün de pankreas dokusunda bir miktar inflamasyon ve ödeme yol açması çalışmamızın bir başka

kısıtlılığını oluşturmaktaydı. Çalışmamızın güçlü yönü ise kaempferol ve kurkumin gibi iki farklı antiinflamatuvar ajanın deneysel akut pankreatit modelinde bildiğimiz kadarıyla ilk kez uygulanmış çalışma olmasıdır.

Sonuç olarak L-arjinin ile oluşturulan deneysel AP'de kaempferolün ve kaempferol-kurkumin kombinasyonunun özellikle histopatolojik olarak inflamasyonu ve nekrozu azalttığı bu sayede koruyucu etkileri olduğu görülmüştür. Daha çok sayıda rat üzerinde ve farklı bir çözücü kullanılarak yapılacak çalışmalarda bu etkin iki bitkisel ajanın akut pankreatitteki etkilerini gösteren araştırmalar bu konuda yol gösterici olacaktır.

**Çıkar ilişkisi:** Yazarlar bu yazının hazırlanması ve yayınlanması aşamasında herhangi bir çıkar çatışması olmadığını beyan etmişlerdir.

## Kaynaklar

1. Yadav D, Lowenfels AB. Trends in the epidemiology of the first attack of acute pancreatitis: a systematic review. *Pancreas* 2006;33:323-330. <https://doi.org/10.1097/01.mpa.0000236733.31617.52>
2. Cavestro GM, Leandro G, Di Leo M, et al. A single-centre prospective, cohort study of the natural history of acute pancreatitis. *Dig Liver Dis* 2015;47:205-210. <https://doi.org/10.1016/j.dld.2014.11.003>
3. Criddle DN, McLaughlin E, Murphy JA, Petersen OH, Sutton R. The pancreas misled: signals to pancreatitis. *Pancreatology* 2007;7:436-446. <https://doi.org/10.1159/000108960>
4. Lundberg AH, Eubanks JW III, Henry J, et al. Trypsin stimulates production of cytokines from peritoneal macrophages in vitro and in vivo. *Pancreas* 2000;21:41-51. <https://doi.org/10.1097/00006676-200007000-00050>
5. Cuthbertson CM, Christophi C. Disturbances of the microcirculation in acute pancreatitis. *Br J Surg* 2006;93:518-530. <https://doi.org/10.1002/bjs.5316>
6. Rakonczay Z Jr, Hegyi P, Takacs T, McCarroll J, Saluja AK. The role of NF-kappa B activation in the pathogenesis of acute pancreatitis. *Gut* 2008;57:259-267. <https://doi.org/10.1136/gut.2007.124115>
7. Forsmark CE, Vege SS, Wilcox CM. Acute pancreatitis. *N Engl J Med* 2016;375:1972-1981. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1505202>
8. Phillip V, Steiner JM, Algul H. Early phase of acute pancreatitis: assessment and management. *World J Gastrointest Pathophysiol* 2014;5:158-168. <https://doi.org/10.4291/wjgp.v5.i3.158>

9. Vallianou NG, Evangelopoulos A, Schizas N, Kazazis C. Potential anticancer properties and mechanisms of action of curcumin. *Anticancer Res* 2015;35:645-651.
10. Chen X, Yang X, Liu T, et al. Kaempferol regulates MAPKs and NF-kappaB signaling pathways to attenuate LPS-induced acute lung injury in mice. *Int Immunopharmacol* 2012;14:209-216. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2012.07.007>
11. Van Laethem JL, Marchant A, Delvaux A, et al. Interleukin-10 prevents necrosis in murine experimental pancreatitis. *Gastroenterol* 1995;108:1917-1922. [https://doi.org/10.1016/0016-5085\(95\)90158-2](https://doi.org/10.1016/0016-5085(95)90158-2)
12. Biczó G, Hegyi P, Berczi S, et al. Inhibition of arginase activity ameliorates L-arginine-induced acute pancreatitis in rats. *Pancreas* 2010;39:868-874. <https://doi.org/10.1097/MPA.0b013e3181d371f8>
13. Vonlaufen A, Apte MV, Imhof BA, Frossard JL. The role of inflammatory and parenchymal cells in acute pancreatitis. *J. Pathol* 2007;213:239-248. <https://doi.org/10.1002/path.2231>
14. Kim D, Haynes CL. The role of p38 MAPK in neutrophil functions: single cell chemotaxis and surface marker expression. *Analyst* 2013;138:6826-6833. <https://doi.org/10.1039/c3an01076g>.
15. Yu S, Wang M, Guo X, Qin R. Curcumin attenuates inflammation in a severe acute pancreatitis animal model by regulating TRAF1/ASK1 signaling. *Med Sci Monit* 2018;24:2280-2286. <https://doi.org/10.12659/msm.909557>
16. Jakkampudi A, Jangala R, Reddy BR, Mitnala S, Nageshwar Reddy D, Talukdar R. NF-kappaB in acute pancreatitis: mechanisms and therapeutic potential. *Pancreatol* 2016;16:477-488. <https://doi.org/10.1016/j.pan.2016.05.001>
17. Grewal HP, Mohey el Din A, Gaber L, Kotb M, Gaber AO. Amelioration of the physiologic and biochemical changes of acute pancreatitis using an anti-TNF-alpha polyclonal antibody. *Am J Surg* 1994;167:218-219. [https://doi.org/10.1016/0002-9610\(94\)90076-0](https://doi.org/10.1016/0002-9610(94)90076-0)
18. Wang Y, Chanyuan B, Kangkang W, Rui W, Jiayong W. Curcumin protects the pancreas from acute pancreatitis via the mitogenactivated protein kinase signaling pathway. *Molecular medicine reports* 2019;20:3027-3034. <https://doi.org/10.3892/mmr.2019>
19. Tekin SO, Teksoz S, Terzioğlu D, Arıkan AE, Özcevik H, Uslu E. Use of infliximab in treatment of acute pancreatitis. *Bratisl Lek Listy* 2015;116:167-172
20. Mylroie AA, Collins H, Umbles C, Kyle J. Erythrocyte superoxide dismutase activity and other parameters of copper status in rats ingesting lead acetate. *Toxicol Appl Pharmacol* 1986;82:512-520. [https://doi.org/10.1016/0041-008x\(86\)90286-3](https://doi.org/10.1016/0041-008x(86)90286-3)
21. Kim SH, Park JG, Sung GH, et al. Kaempferol, a dietary flavonoid, ameliorates acute inflammatory and nociceptive symptoms in gastritis, pancreatitis, and abdominal pain. *Molecular nutrition & food research* 2015;59:1400-1405. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201400820>

### Teşekkür

Bu çalışma, Pamukkale Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 2018TIPF026