

DeneySEL Ülseratif KOLITte Selenyumun Etkinliği

Effect of Selenium in Experimental Ulcerative Colitis

Ahmet ASLAN¹, Gürbüz POLAT², Esin ATİK³, Muhyittin TEMİZ¹, Özlen Tubay BAĞDATOđLU²,
Nedim ABAN¹

¹Mustafa Kemal Üniversitesi Tıp Fakültesi, Genel Cerrahi Anabilim Dalı, Hatay

²Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, Mersin

³Mustafa Kemal Üniversitesi Tıp Fakültesi, Patoloji Anabilim Dalı, Hatay

Özet

Amaç: Selenyum hücre membranını peroksidlerden koruyarak antioksidan etki gösteren esansiyel bir mineraldir. Oksidatif stres ve hücre hasarının özellikle ülseratif kolitte önemli olduğu bilinmektedir. Selenyumun sıçanlardaki deneysel ülseratif kolit modeli üzerine etkilerinin araştırılması hedeflendi.

Yöntem: Çalışma Mustafa Kemal Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Deneysel Araştırma Laboratuvarında yapılmıştır. Sıçanlarda distal kolit, kolon içine 2 ml %4'lük asetik asit verilmesi ile oluşturulmuştur. Sıçanlar rastgele üç gruba dağıtılmıştır: Grup I sham, (GI, n=8); Grup II kolit model, hiçbir tedavi almadı (GII, n=8); Grup III, kolit+selenyum (GIII, n=8) (0.2 mg/kg/gün intaperitoneal). Bütün sıçanlar yedinci gün sakrifiye edildi ve distal kolonun 8 cm'lik kısmı rezeke edildi. Bütün hayvanlardan alınan kolon biyopsileri biyokimyasal ve histopatolojik olarak incelendi.

Bulgular: Nitrik oksit düzeyleri GII ile GI ve GIII arasında anlamlı olarak farklı idi (p=0.017 ve p=0.004). Malondialdehit düzeyleri GI ile GII ve GIII arasında anlamlı olarak farklı idi (p=0.001 ve p=0.001). Miyeloperoksidaz düzeyleri GI ile GII ve GIII arasında anlamlı farklılık gösterdi (p=0.001 ve p=0.001). Gruplar arasında katalaz düzeyleri açısından anlamlı bir fark yoktu (p>0.05). Kolon dokusunun histolojik değerlendirilmesi sonucu GI'de normal mukoz, GII'de mukozal hemoraji, ciddi inflamatuvar hücre infiltrasyonu, submukozal ödem ve fokal ülserasyon görüldü. GIII'de orta derecede nötrofil hücre infiltrasyonu ile üç sıçanda ülserasyon ve diffüz ödem gözlemlendi.

Sonuç: Selenyumun deneysel kolit modelinde iyileşme sürecine olumlu etkileri olduğu sonucuna varıldı.

Anahtar Sözcükler: selenyum, deneysel ülseratif kolit, nitrik oksit, malondialdehit

Mersin Univ Sağlık Bilim Derg, 2008;1(2):7-11

Geliş Tarihi : 27.12.2007

Kabul Tarihi : 28.02.2008

Yazışma Adresi:

Dr. Ahmet ASLAN

Mustafa Kemal Üniversitesi Tıp Fakültesi,

Genel Cerrahi Anabilim Dalı, Hatay

Tel : 0-326-2140649

Faks : 0-326-2144977

E-posta : aslan@mku.edu.tr

Abstract

Objective: Selenium is an essential biological element which has been shown to have antioxidant effects by protecting the cell membrane from peroxides. It is well known that oxidative stress and cell damage are important especially in ulcerative colitis. We aimed to investigate the effect of selenium in experimental ulcerative colitis on rats.

Method: The study was performed at Mustafa Kemal University Veterinary Faculty Experimental Research Laboratory. Distal colitis of rats was induced by intracolonic instillation of 2 ml of 4% acetic acid. The animals were randomly assigned into three groups: group I as sham, (GI, n=8); group II as colitis model, received no treatment (GII, n=8); group III, colitis+Selenium (GIII, n=8) (0.2 mg/kg /day intaperitoneal). Rats were sacrificed on the 7th day, and the distal 8 cm of the colon was resected. Colonic biopsies from each animal were taken for histopathological examination and biochemical studies.

Results: Nitric oxide levels were statistically significant when GII was compared to GIII and GII was compared to GI (p=0.017 and p=0.004). Malondialdehyde levels were significantly different when GI was compared to GII, GI and GIII (p=0.001 and p=0.001). Myeloperoxidase levels were significantly different when GI was compared to GII, GI and GIII (p=0.001 and p=0.001). There was not a statistically significant difference between the groups in catalase levels (p>0.05). Histological evaluation of colonic tissues revealed essentially normal mucosa in GI, in contrast with mucosal haemorrhage, severe inflammatory cell infiltration, submucosal oedema and focal ulceration in GII. In GIII, there was a moderate neutrophil infiltration with diffuse edema and ulceration in 3 of the 8 rats.

Conclusion: It is concluded that selenium has some beneficial effects on wound healing in experimental colitis.

Keywords: selenium, experimental ulcerative colitis, nitric oxide, malondialdehyde

Giriş ve Amaç

Selenyum (Se) önemli bir antioksidan ve antikarsinojen etkinliği gösterilmiş esansiyel bir elementtir (1,2). Selenoprotein ailesinin bir bileşeni olarak Se'un yapısal ve enzimatik görevleri vardır. Enzimatik görevlerinden en iyi bilineni aktif tiroid hormonu üretimindeki antioksidan ve katalitik rolüdür. Se bir yükseltgenme-indirgenme merkezi olarak görev yapar ve hücre içi yükseltgenme-indirgenmenin kontrolüne yardım eder (3).

Se, E vitamini ile etkileşerek hücre membranını lipid metabolizmasının bir ürünü olan peroksidlerin oksidatif etkisinden korur (3,4). Bu fonksiyonu, membran bütünlüğünün korunmasına yardım eder, prostatiklin oluşumunu engeller ve daha ileri oksidatif hasar gelişmesini önler (3). İntraperitoneal (i.p.) uygulanan 0.2 mg/kg Se'un intestinal iskemi ve reperfüzyon hasarını onarabildiği ve gastrik lavaj ile verilen Se'un karbon tetrakloride bağlı karaciğer hasarı ile enzimatik ve histopatolojik değişiklikleri geri döndürebildiği gösterilmiştir (5,6).

İnflamatuvar barsak hastalıklarının (İBH) etiolojisinden enfeksiyöz ajanlar, alerji, beslenme ile ilgili faktörler, psikosomatik faktörler, bakteriyel antijenler ve otoantijenlere karşı gelişen immün yanıt sorumlu tutulmaktadır (7,8). Epidemiyolojik bulgular düşük Se düzeyinin nörodejeneratif ve kardiyovasküler hastalıkların yanı sıra artmış kanser riski ile birlikte olduğunu göstermiştir (1,2). Akciğer, kolon veya prostat kanseri prevalansı ve bunlara bağlı ölüm riskinin, Se'dan zengin gıda ile beslenenlerde çok daha düşük olduğu gösterilmiştir. İstatistiksel analizler Se alan hastalarda rölatif akciğer, kolon ve prostat kanseri insidansının daha düşük olduğunu göstermiştir (9,10).

Yakın geçmişte insanlarda İBH üzerine yapılan çalışmalarda 20'den fazla kolit modeli oluşturulmuştur. Bazı çalışmalarda rektal yolla %4-6 asetik asit verilerek kolit modeli oluşturulmuştur (11). Bu çalışmada Se'un deneysel ülseratif kolit modeli üzerinde histopatolojik ve biyokimyasal değişkenler üzerine etkisini araştırmayı hedefledik.

Yöntem

Çalışma Mustafa Kemal Üniversitesi (MKÜ) Veterinerlik Fakültesi Deneysel Araştırma Laboratuvarında yapıldı. 200-250 gr ağırlığında 24 erişkin erkek Wistar Albino sıçan kullanıldı. Denekler 1 hafta boyunca laboratuvar şartlarına alıştırdı. Standart laboratuvar yemi ve suya serbest erişimleri sağlandı. Çalışma MKÜ Veterinerlik Fakültesi Etik Kurulu tarafından onaylandı.

Sıçanlarda distal kolit 2 ml %4 asetik asitin intrakolonik verilmesi ile oluşturuldu. Bir gecelik açlığı takiben sıçanlara eter anestezisi uygulandı. 5F

polipropilen kateter anüsten kolona gönderildi. Kateter ucu anüsün 8 cm proksimaline yerleştirildikten sonra asetik asit verildi. İşlem Al Moutaery (12) tarafından tarif edilen yöntemle göre uygulandı. Son olarak her sıçan 2 ml serum fizyolojik (SF) ile yıkandı.

Denekler rastgele 3 gruba dağıtıldı. Grup I, sham, (GI, n=8); grup II, kolit, hiçbir tedavi almadı (GII, n=8); grup III (GIII, n=8), kolit+Se (Sodium selenate, Aldrich, USA; 0.2 mg/kg /gün i.p.) olarak 1 hafta boyunca takip edildi. Grup I'e sadece bir defa SF ile kolon yıkandı ve başka bir tedavi verilmedi.

Sıçanlar rektal yolla SF veya asetik asit verildikten 7 gün sonra sakrifiye edildi. Daha sonra kolonun 8 cm'lik distal kısmı çıkarıldı. Her sıçandan histopatolojik ve biyokimyasal inceleme için kolon biyopsisi alındı.

Deneyin sonunda nitrit ve nitrat düzeylerinin ölçümü için doku örnekleri alındı. Örnekler analizler yapılabildiği kadar -70°C de muhafaza edildi. Nitrit ve nitrat düzeyleri nitrat redüktaz kullanarak ve Greiss reaktifi kullanılarak ölçüldü. Eşit miktarda homojenat ile potasyum fosfat çözeltisi 4000 d/dk'da 45 dk santrifüj edildi. Ultrafiltrat toplandı. Nitratlar analiz için kantitatif olarak nitrite dönüştürüldü. Nitratın enzimatik olarak nitrite dönüştürülmesi NADPH ve FAD kullanılarak (inkübasyon aşamasında nitrat redüktaz) yapıldı. N-1-(naftil) etilendiamin dihidroklorit, sülfanilamid ve inkübasyon çözeltileri 1:1:2 (v/v) oranında karıştırıldı. Bu karışım oda sıcaklığında loş ışıkta 5 dk inkübasyondan sonra 540 nm'de ölçüm yapıldı. 1 mM sodyum nitrit ve 80 mM potasyum nitrat, nitrat belirlenmesinde standart olarak kullanıldı (NO colorimetric assay, 1-756-281, Roche Diagnostics, Mannheim, Almanya) (13). Dokular ayrıldıktan sonra soğuk %1.15'lik KCl ile homojenize edilerek %10'luk homojenat oluşturuldu. Yağ peroksidasyonunun bir göstergesi olarak doku malondialdehit (MDA) konsantrasyonu Yagi (14) tarafından tarif edilen yöntemle ölçüldü. Aebi (15) tarafından tarif edilen yöntemle de doku katalaz aktivitesi ölçüldü. Değerler ıslak doku ağırlığında gram başına IU olarak ölçüldü.

Dokular ayrıldıktan sonra 0.02 M EDTA (pH=4.7) ile homojenize edildi ve 20000 d/dk'da 15 dk süre ile santrifüj edildi. İkinci basamakta supernatant ayrıldı ve KPO₄ (pH=6) ve %0.5 HETAAB ile homojenize edildikten sonra 20000 d/dk'da 15 dk süre ile santrifüj edildi. Supernatantlar enzim aktivitesinin ölçümünde kullanıldı. Doku miyeloperoksidaz (MPO) aktivitesinin ölçümü için Grisham ve ark. (16) ve Glowick ve Kaplan (17) tarafından tarif edilen metod uygulandı. Değerler ıslak doku ağırlığında gram başına IU olarak ölçüldü (16,17).

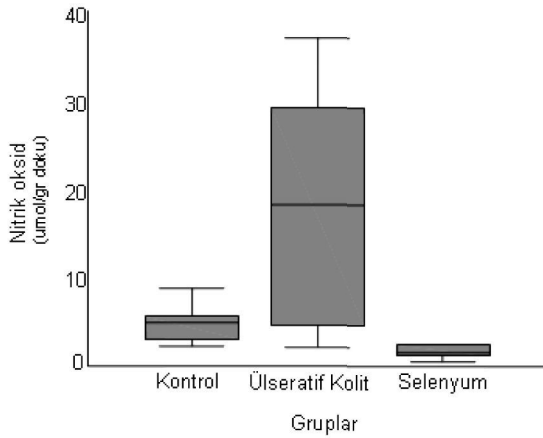
Kolondan alınan örnekler anüsün 2-4 cm proksimalinden alındı. Daha sonra dokular fosfatlı tampon ile tespit edilip, parafine gömüldü ve daha sonra 5 µm'lik kesitler hazırlandı. Dokular Hematoksilin-Eozin ile boyandı ve Olympus BX51 ışık mikroskobu ile

değerlendirildi. İncelenen değişkenler: İnflamatuar hücre infiltrasyonu, hemoraji, ödem ve ülserasyondur. Değişikliklerin derecesi subjektif olarak değerlendirilip kontrol grubu ile karşılaştırıldı.

Bulgular ortalama ve standart sapma (SS) olarak verildi. İstatistiksel karşılaştırmalar varyans analizi ve Tukey's test kullanılarak yapıldı. İstatistiksel anlamlılık düzeyi $p < 0.05$ olarak kabul edildi.

Bulgular

Nitrik oksit (NO) düzeyleri grup II ile III arasında ($p=0.004$) anlamlı olarak farklı idi (Tablo 1). Grup I ile II arasında da anlamlı fark saptanırken ($p=0.017$), grup I ile III arasında anlamlı fark saptanmadı ($p=0.8$) (Şekil 1).



Şekil 1. Grupların doku NO miktarlarının dağılımı (Ort ± SS değerleri)

MDA ölçümlerinde GI ile GII ve GI ile GIII arasında anlamlı fark vardı ($p=0.001$ ve $p=0.001$), ancak GII ile GIII arasında anlamlı fark yoktu ($p=0.9$) (Tablo 1).

Tablo 1. Grupların NO, MDA, katalaz ve MPO seviyeleri (Ortalama ± SS değerleri)

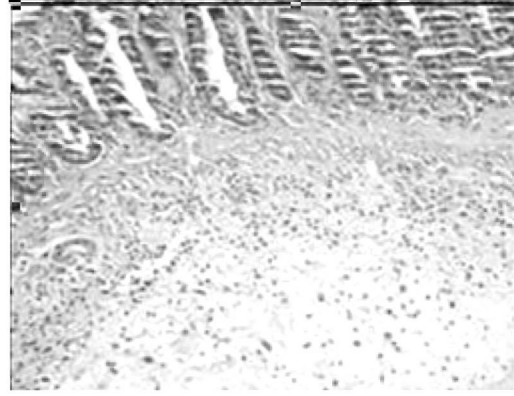
n	NO (µmol/gr doku)	MDA (nmol/gr doku)	Katalaz (U/gr doku)	MPO (U/gr doku)
GI	4.70±2.22	77.30±17.26	15.03±11.76	77.38±45.68
GII	17.83±13.43	206.12±21.40	24.00±19.22	225.97±71.08
GIII	1.91±1.21	208.70±15.50	29.81±44.29	228.24±57.06

Grup I, sham; grup II, kolit; grup III, kolit+Se

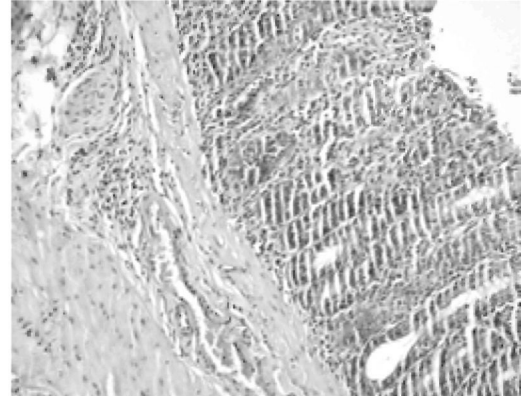
MPO ölçümlerinde ise GI ile GII ($p=0.001$) ve GI ile GIII ($p=0.001$) arasında anlamlı fark varken, GII ile GIII arasında anlamlı fark saptanmadı ($p>0.05$).

Gruplar arasında katalaz ölçümleri açısından anlamlı fark bulunmadı ($p>0.05$).

Kolon dokularının histolojik incelemesinde tedavi almayan kontrol grubunda mukozanın yapısının normal olduğu izlendi. Ancak GII'de hemoraji, şiddetli inflammatuar hücre infiltrasyonu, submukozal ödem ve fokal ülserasyon varlığı görüldü (Şekil 2a). GIII'de 3 sıçanda orta şiddette nötrofil infiltrasyonu ve diffüz ödem saptandı (Şekil 2b).



Şekil 2a. Grup II, mukozal hemoraji, inflammatuar hücre infiltrasyonu, fokal ülserasyon (Hematoxylin Eosin X200)



Şekil 2b. Grup III, ülserasyon, ödem ve orta derecede nötrofil infiltrasyonu (Hematoxylin Eosin X100)

Tartışma ve Sonuç

Bu çalışmada Se'un deneysel kolit modeli üzerindeki etkileri NO, MDA, MPO ve katalaz aktivitesi ölçümü ile histopatolojik ve biyokimyasal olarak araştırıldı.

Aktif İBH'nın karakteristik özelliği intestinal mukozada yapısal hasar meydana gelmesidir. Bu hasarın sebebi tam olarak bilinmemektedir. Ancak masif polimorfonükleer ve mononükleer fagositer hücre infiltrasyonunun büyük miktarda reaktif oksijen türleri (ROT) oluşumuna katkıda bulunduğunu düşündürmektedir (8,18). ROT'un bazı farklı fizyolojik ve patofizyolojik olaylarda yer aldığı düşünülmektedir.

Bu durum bağımsız veya NO ailesi bileşiklerine bağımlı olarak gerçekleşiyor olabilir. Özellikle superoksit ve NO arasındaki reaksiyon sonucu oluşan peroksinitrit oldukça reaktif bir ROT olup tüm hücrelere ve doku bileşenlerine hasar verebilir (19). Antioksidanların düzeyinin ve dengesinin İBH'lı hastalarda normal bireylerle karşılaştırıldığında ciddi bir şekilde bozulduğu gösterilmiştir (20). Kolit grubu ile kontrol grubu arasında NO ölçümlerinde anlamlı fark saptandı.

Se'un önemi bazı anahtar antioksidanların yapısında yer almasına ve selenosisteinin başka bir yerde olmayan yükseltgeyici-indirgeyici özelliğine ve tiyoredoksin gibi bazı antioksidan enzimler tarafından kullanımına bağlıdır. ROT metabolitlerinin glutatyon peroksidazlar tarafından indirgenmesi membran bütünlüğünün korunmasına yardımcı olur. Hidroperoksit ve peroksinitritlerin selenosistein içeren enzimlerce indirgenmesi selenik asite oksitlenmesi ile olur (1). Bu çalışmada NO ölçümleri Se ile tedavi edilen grup ile kolit grubu arasında anlamlı olarak farklıydı. Bu anlamlı fark Se'un antioksidan etkisine bağlı olabilir. Histopatolojik değerlendirmenin sonuçları da bu bulguları desteklemektedir.

Lipid membranlarının peroksidasyonu serbest radikal patolojilerinden sorumlu olan peroksitlerin ve diğer radikallerin üretimi ile sonuçlanır. Lipid peroksidasyonu doymamış yağ asitlerinin herhangi bir radikale dönüşümünü tetikleyen temel mekanizma olup MDA düzeylerinin ölçümü ile değerlendirilebilir (21). Kruindenier ve ark. (8) İBH mukozasının kontrol grubuna (88 ± 13 nmol/g doku) göre bariz olarak daha yüksek MDA (137 ± 13 nmol/g doku) ($p=0.002$) düzeyi olduğunu göstermiştir. Öztürk ve ark. (5) intestinal reperfüzyon hasarında MDA düzeylerinde bariz bir artış olurken Se tedavisi ile bu düzeyde bariz bir düşüş olduğunu göstermiştir. Çalışmamızda kolit grubunda MDA düzeylerinde anlamlı artış saptandı. Fakat Se tedavisi ile anlamlı bir düşüş izlenmedi.

MPO ve katalaz enzimleri nötrofillerde ve çok daha düşük düzeylerde monosit ve makrofajlarda bulunur. MPO aktivitesi doğrudan inflame dokudaki nötrofil konsantrasyonu ile ilişkilidir (20). Yapılan bir çalışmada, İBH'nda noninflame ve inflame barsak mukozasında katalaz aktivitesinin kontrol grubuna göre 2.5 kat arttığı bildirilmiştir (22). Çalışmamızda ise MPO ve katalaz aktivitesi açısından gruplar arasında anlamlı bir fark saptanmadı. Ancak doz ve süre bağımlı daha ileri çalışmaların, bu faktörlerin olası özelliklerini anlamada katkısı olacaktır.

Sonuç olarak, NO düzeylerine ilişkin sonuçlara göre Se'un deneysel kolit modelinde iyileşme üzerine olumlu etkisi olduğu kanısına varıldı.

Kaynaklar

1. Brenneisen P, Steinbrenner H, Sies H. Selenium, oxidative stress, and health aspects. *Mol Aspects Med* 2005;26(4-5):256-67.
2. Stapleton SR. Introduction: the selenium conundrum. *Cell Mol Life Sci* 2000;57(13-14):1823-4.
3. Rayman MP. The importance of selenium to human health. *Lancet* 2000; 356(9225):233-41.
4. Ip C. Lessons from basic research in selenium and cancer prevention. *J Nutr* 1998;128(11):1845-54.
5. Ozturk C, Avlan D, Cinel I, Cinel L, Unlu A, Camdeviren H, Atik U, Oral U. Selenium pretreatment prevents bacterial translocation in sıçan intestinal ischemia/reperfusion model. *Pharmacol Res* 2002;46(2):171-5.
6. Ozardali I, Bitiren M, Karakilcik AZ, Zerim M, Aksoy N, Musa D. Effects of selenium on histopathological and enzymatic changes in experimental liver injury of rats. *Exp Toxicol Pathol* 2004;56(1-2):59-64.
7. Podolsky DK. Inflammatory bowel disease. *N Engl J Med* 2002;347(6):417-29.
8. Kruidenier L, Kuiper I, Lamers CB, Verspaget HW. Intestinal oxidative damage in inflammatory bowel disease: semi-quantification, localization, and association with mucosal antioxidants. *J Pathol* 2003;201(1):28-36.
9. Schrauzer GN. Anticarcinogenic effects of selenium. *Cell Mol Life Sci* 2000;57(13-14):1864-73.
10. McPherson A. Selenium vitamin E and biological oxidation. In: Cole DJ, Garnsworthy PJ editors. *Recent Advances in Animal Nutrition*. Oxford: Butterworth and Heinemann's;1994:3-30.
11. Popov SV, Markov PA, Nikitina IR, Petrishev S, Smirnov V, Ovodov YS. Preventive effect of a pectic polysaccharide of the common cranberry *Vaccinium oxycoccos* L. on acetic acid-induced colitis in mice. *World J Gastroenterol* 2006;12(41):6646-51.
12. Al Moutaery A. Proglumide attenuates experimental colitis in rats. *Exp Toxicol Pathol* 2005;56(4-5):327-32.
13. Aksoyek S, Cinel I, Avlan D, Cinel L, Ozturk C, Gurbuz P, Nayci A, Oral U. Intestinal ischemic preconditioning protects the intestine and reduces bacterial translocation. *Shock* 2002;18(5):476-80.
14. Yagi K. Simple procedure for specific enzyme of lipid hydroperoxides in serum or plasma. *Methods Mol Biol* 1998;108:107-10.

-
15. Aebi H. Catalase. In: Bergmayer HV ed. *Methods of Enzymatic Analysis*. NY and London, Academic Press Inc 1974:673-7.
 16. Grisham MB, Hernandez LA, Granger DN. Xanthine oxidase and neutrophil infiltration in intestinal ischemia. *Am J Physiol* 1987;251:649-53.
 17. Glowick SP, Kaplan SP. *Methods in Enzymology*. New York, Academic Press, 1955:769-82.
 18. Kruidenier L, Verspaget HW. Oxidative stress as a pathogenic factor in inflammatory bowel disease radicals or ridiculous? *Aliment Pharmacol Ther* 2002;16(12):1997-2015.
 19. Murphy MP, Packer MA, Scarlett JL, Martin SW. Peroxynitrite: a biologically significant oxidant. *Gen Pharmacol* 1998;31:179-86.
 20. Kruidenier L, Kuiper I, van Duijn W, Marklund SL, van Hogezaand RA, Lamers CB, Verspaget HW. Differential mucosal expression of three superoxide dismutase isoforms in inflammatory bowel disease. *J Pathol* 2003;201(1):7-16.
 21. Tuzun A, Erdil A, Inal V, Aydin A, Bagci S, Yesilova Z, Sayal A, Karaeren N, Dagalp K. Oxidative stress and antioxidant capacity in patients with inflammatory bowel disease. *Clin Biochem* 2002;35(7):569-72.
 22. Kruidenier L, Kuiper I, Van Duijn W, Mieremet-Ooms MA, van Hogezaand RA, Lamers CB, Verspaget HW. Imbalanced secondary mucosal antioxidant response in inflammatory bowel disease. *J Pathol* 2003;201(1):17-27.