

MH Közegészségügyi és Katonaorvosi Kutató Intézet  
Semmelweis Orvostudományi Egyetem, Kóréletani Kutató Intézet\*  
Haynal Imre Egészségtudományi Egyetem, Sebészeti Klinika\*\*

## A Trental<sup>®</sup> hatásának vizsgálata a szuperoxid dizmutáz enzim (SOD) aktivitásra vastagbél műtött patkányokban

Dr. Schweitzer Katalin,  
Dr. Ender Ferenc\* az orvostudomány kandidátusa,  
Dr. Pittner János\*\*,  
Dr. Fűrész József orvosezredes, a hadtudomány kandidátusa

Közlésre érkezett: 1997. október 1.

*Kulcsszavak: anasztomózis, patkány colon, SOD, pentoxiphyllinum.*

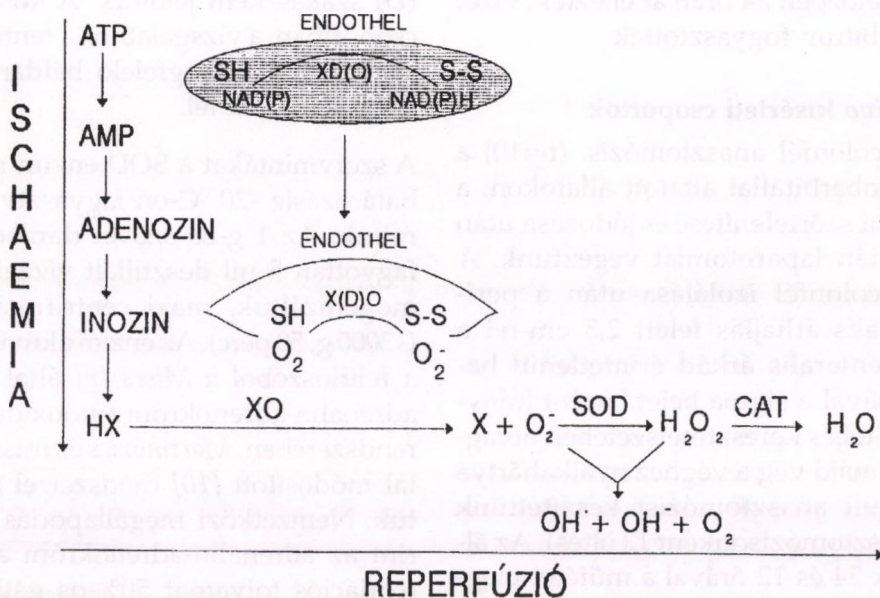
A szerzők megállapították, hogy a colon descendens és a sigma bél határán készített anasztomózis hatására a SOD aktivitás a kontrollhoz ( $9.16 \pm 1.7$ ) képest az anasztomózis területén igen alacsony ( $1.9 \pm 0.65 \text{U/g}$ ), míg a disztális végen ez utóbbinál magasabb ( $3.1 \pm 1.9 \text{U/g}$ ), a proximális szektorban pedig a kontroll értékének kb. a fele ( $4.9 \pm 2.3 \text{U/g}$ ). A  $2.5 \text{ mg/tskg}$  dózisú Trental<sup>®</sup> előkezelés hatására azonban a műtött állatokban mindhárom bélszakasz SOD aktivitása magasabbnak bizonyult (proximális  $15.5 \pm 3.4 \text{U/g}$  – anasztomózis  $5.7 \pm 3.4 \text{U/g}$  – disztális  $8.9 \pm 1.0 \text{U/g}$ ). A Trental<sup>®</sup> kezelés a nem műtött állatok azonos bélszakaszában nem okozott SOD aktivitás változást.

Szöveti sérüléskor a mikrocirkulációs rendszerben az aktív oxigén származékok részben a gyulladáshoz vezető területet infiltráló, aktivált fehérvérsejtek (makrofágok, granulociták) reakcióiban [1], másrészt a kapilláris endothel sejtek sérülésekor, a xantin-xantinoxidáz rendszerben termelődnek [2]. A szabadgyökök szerepe kétélű, egyrészt a szervezet védekezési mechanizmusában van jeletőségük, másrészt fokozzák a mikrovaskuláris károsodást [3]. Ez utóbbi hatást jelentős mértékben képes kivédeni, vagy csökkenteni a szervezet nem-enzi-

matikus (A, -E,- és C-vitamin) [4] ill. enzimatis (szuperoxid dizmutáz: SOD, kataláz: CAT, glutation peroxidáz: GSH-Px) antioxidáns rendszere [5]. Bélműtétet követően a sikeres műtét ellenére is gyakoriak a beteg gyógyulását lassító szövődények, mint a varrat-elégtelenség, összenövés, gyulladás. A kialakult károsodás egyik oka lehet, hogy az anasztomózis vonalában kialakuló nagy mértékű keringési elégtelenség miatt viszonylag széles hipoxiás zóna jön létre, amelyben emelkedett a szabadgyök képződés. A hipoxiás terü-

letet ellátó erek megnyílásával a szabadgyökök produkció átmenetileg tovább fokozódik, amelynek háttérében egyrészt a xantin dehidrogenáz-xantin oxidáz (XD-XO) átalakulás, másrészt a fehérvérsejtek aktiválódása húzódik meg. A folyamatot jól tükrözi a Granger [6], Jarasch [7] féle folyamat ábra (1. ábra).

ban nem tudjuk, hogy a Trental® kedvező hatása a reaktív oxigéngyökök termelésének csökkentése, vagy az elsődlegesen keletkező szuperoxid aniont eltakarító endogén SOD enzim aktivitás fokozódása révén jön-e létre. Első lépésben azt vizsgáltuk, hogy a kísérletes bal colonfél anasztomózis gyógyuláskor hogyan alakul a bél-



**1. ábra:** Ischemiás fázisban az energia gazdag nukleotidok hipoxantinná degradálódnak. A reperfúziós szakaszban a NAD(P)+függő xantin dehidrogenáz enzim az oxigén függő xantin oxidázzá konvertálódik, amely a hipoxantin xantin átalakulást katalizálja, primeren O<sub>2</sub> képződés mellett, amelyet a szekunder gyökök megjelenése követ (6, 7).

Trental® kezelés hatására javul a patkány vastagbél mikrocirkulációja, fokozódik a vörösvértest (vvt) filtrabilitás, csökken a peritoneum gyulladós reakciója, csökken a fehérvérsejt (fvs) adhézio, a tumornekrózis faktor (TNF-alfa) termelés, javul az anasztomózis szakítási szilárdság értéke (bursting pressure BP) [8] és csökken a lipidperoxidáció mértéke [9]. Azt azon-

szakaszban az anasztomózis ill. környékének SOD enzim aktivitása Trental®-al kezelt ill. nem kezelt állapotokban.

#### Anyagok és módszer

Az állatok kezeléséhez a CHINOIN gyártól beszerzett pentoxifyllinum (Trental® inj.)-t használtuk 2.5 mg/tskg ip. dózisban. Az altatás 50 mg/tskg

Pentobarbitallal történt. Az *in vitro* kísérletben alkalmazott szuperoxid dismutáz enzim (mg/3300 U) marhamájából készült, felhasználás előtt 40 ml fiziológiás konyhasóban lett feloldva. A készítmény a Diagnostic Data Inc. (USA) terméke, Orgotein néven van forgalomban. A vizsgálatokat 200-250g súlyú, hím, wistar patkányokon végeztük, az állatok a műtétet megelőzően 24 órán át éheztek, vizet ad libitum fogyasztottak.

### *In vivo* kísérleti csoportok

Bal colonszűrtelenítés: (n=10) a pentobarbitállal altatott állatokon, a hasfal szőrtelenítése és jódozása után medián laparotomiát végeztünk. A bal colonszűrtelenítése után a peritonealis áthajlás felett 2,5 cm-rel a mezenterális árkád érintetlenül hagyásával a sigma belet haránt irányban, teljes keresztmetszetében átvágtuk, majd vég a véghez nyálkahártya nélküli anasztomózist készítettünk (anasztomózisonként 12 öltés). Az állatok 24 és 12 órával a műtétet megelőzően, intraperitoneálisan (ip.) 1 ml/tskg fiziológiás sóoldatot kaptak.

Trental kezelés, majd bal colonszűrtelenítés: a következő csoportban (n=12) az előzőekben leírt módon anasztomózist készítettünk az állatokat 24 és 12 órával a műtétet megelőzően ip. 2.5 mg/tskg Trental®-al kezeltük.

A kontroll csoport állatait a műtétre kerülő állatokkal egyidőben 1 ml/tskg fiziológiás konyhasóval kezeltük ip. n=20.

1 órával a műtétet követően, pento-

barbitál narkózisban a hasfal felnyitása után mind a proximális, mind az anasztomózis, mind a disztalis szakaszból és egy a műtét helyétől távolabbi, sértetlennek tekinthető szakaszból is 1 cm-es nagyságú darabokat metszettünk ki. A vizsgált mintákat az anasztomózishoz viszonyítva: anasztomózistól távoli (O), proximális (P), anasztomózis (A), disztalis (D) szakaszként jelöltük. A kontroll csoportban, a vizsgálathoz a fenti bélszakaszoknak megfelelő béldarabokat használtuk fel.

A szervmintákat a SOD enzim meghatározásig -20 °C-on fagyasztva tároltuk. Az 1 g-os szövet darabokat, fagyottan 5 ml desztillált vízzel homogenizáltuk, majd centrifugáltuk (13000 g, 50 perc). Az enzim aktivitását a felülészórból a Misra [9] által leírt adrenalin-adrenokrom autooxidációs rendszerében, Martinovics és mtsai által módosított [10] módszerrel mértük. Nemzetközi megállapodás szerint az adrenalin-adrenokrom autooxidációs folyamat 50%-os gátlását tekintettük egységnyi SOD aktivitásnak. A patkány bél homogenátum értéket U-g nedves szövetre számolva adtuk meg. A statisztikai analízist ANOVA (statgraphics 4.0 Inc.) post hoc szelektált párok összehasonlításával végeztük, a p-0.05 értéket fogadtuk el szignifikáns változásnak.

### *In vitro* kísérleti csoportok

– vizsgálatokat végeztünk annak meghatározására, hogy a pentoxifyllin közvetlenül milyen mértékben befolyásolja az enzim aktivitását. Ezért a szöveti homo-

genátum 1300 g-s felülúszójából 100 µl-nyi mennyiséget 10 percig a 100 mg/5 ml pentoxifyllin hatóanyagtartalmú injekciós oldat 5 µl (100 µg), 25 µl (500 µg), vagy 30 µl (600 µg)-vel inkubáltuk, majd mértük a minta SOD aktivitását

- annak meghatározására, hogy az enzim milyen mértékben károsodik a homogenizálás során, megmértük 100 µl (8.25U) SOD referencia oldattal együtt homogenizált minták aktivitását.

### *In vitro* Eredmények, értékelés

Trental® kezelés hatása a szöveti homogenátum SOD aktivitására

Annak eldöntésére, hogy a pentoxifyllinum közvetlenül milyen mértékben befolyásolja a SOD enzim aktivitását, referencia SOD enzim preparátumot és a szöveti homogenátumot különböző koncentrációjú Trental®-al inkubáltuk 10 percig, majd meghatároztuk az enzim aktivitását. Eredményeink szerint a Trental®-nak ön-

MINTA			
	SOD	homogenizátum	homogenizátum +SOD
U/ml	82	9.2	94

MINTA			
	homogenizátum +Trental® 5µl	homogenizátum +Trental® 25µl	homogenizátum +Trental® 30µl
U/ml	9.2	9.2	9.2

**I. táblázat:** *In vitro* Trental®-al SOD enzim preparátummal inkubált bélszövet homogenátum SOD aktivitás változása

csoport	U/g	U/g (O)	U/g (P)	U/g (A)	U/g (D)
kontroll+NaCl kezelt	9.1±1.7				
bal colónfél anaszt +NaCl kezelés		13.4±4.2	4.8±2.3	1.9±0.65	3.1±1
bal colónfél anaszt. +Trental kezelés		12.8±1.5	15.5±3.4	5.7±1.9	8.8±1

**II. táblázat:** SOD aktivitás változása a fiziológiás NaCl kezelt+operált és a Trental®-al kezelt+operált csoportban

magában nincs SOD aktivitása és sem a tisztított SOD, sem a homogenizált szövet SOD aktivitására nem gyakorol közvetlen hatást (I. táblázat).

### A minta előkészítés hatása a szöveti SOD aktivitására

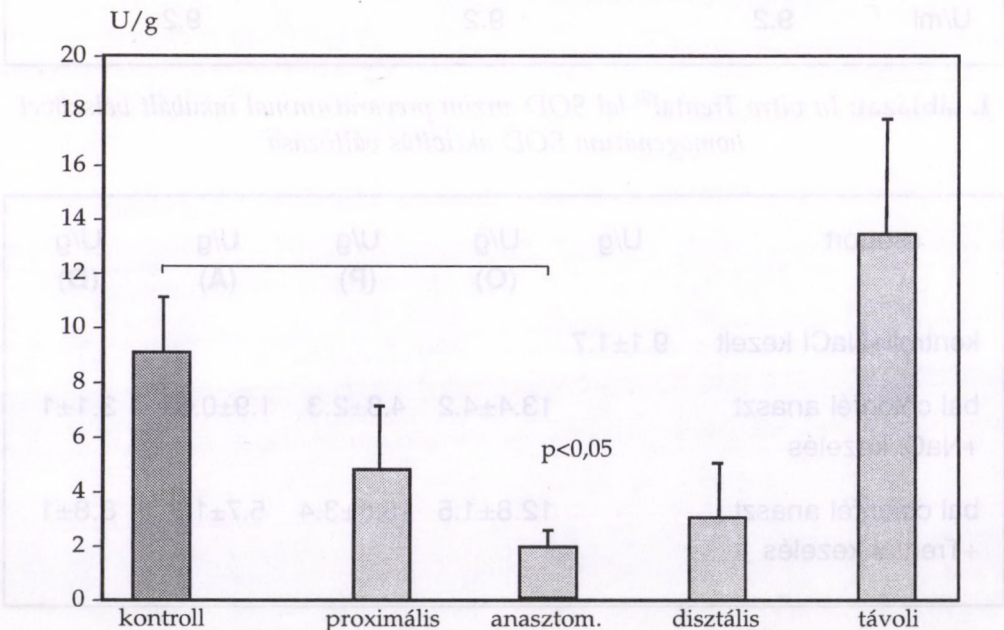
Annak eldöntésére, hogy a minta előkészítése során károsodik-e a szöveti minta SOD aktivitása, a standard aktivitású (82 U/ml) enzim oldatot a bélmintával együtt homogenizáltuk és centrifugáltuk, az első táblázatban feltüntetett eredmények alapján megállapítottuk, hogy a procedúra során a standard aktivitású (82 U/ml) enzim oldat a bélmintával együtt történő homogenizálás és centrifugálás során veszített aktivitásából (I. táblázat).

### In vivo Trental® kezelés hatása a bél-szövet SOD aktivitására

– a műtét után kimetszett és feldol-

gozott minták adatait és a statisztikai értékelést a II. táblázatban és a 2. ábrán tüntettük fel.

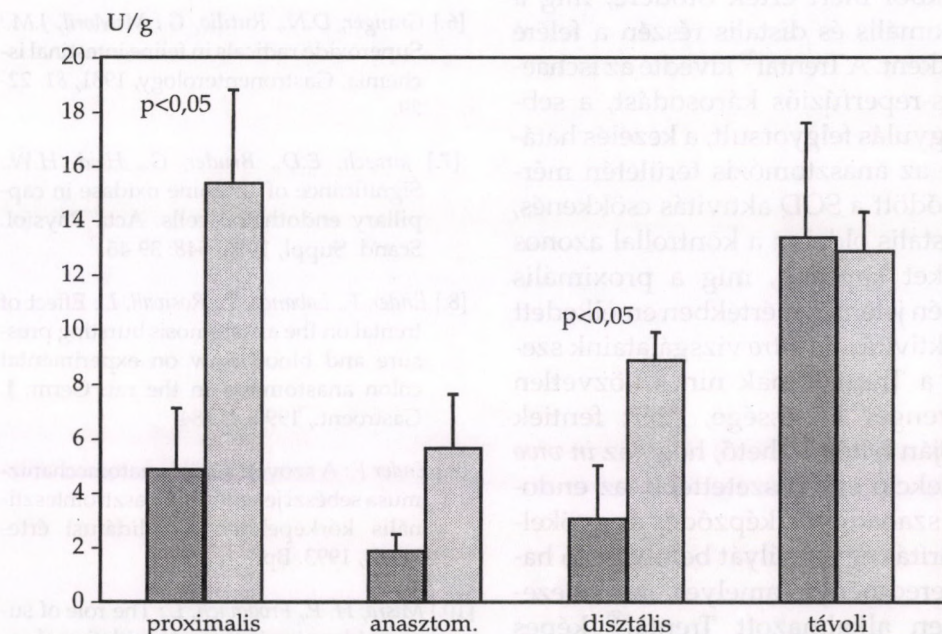
A kontroll értékéhez képest (ld. kontroll) a műtött állatok bélszakaszaiból nyert minták SOD aktivitása, az anasztomózis és a disztális ill. proximális területeken minden esetben csökkent (2. ábra). A legkisebb aktivitást az anasztomózis területéről nyert mintánál mértük. A Trental®-al kezelt és műtött állatokban a kontrollhoz képest csak az anasztomózis területéről vett bélszakaszban tapasztaltunk SOD aktivitás csökkenést, míg a disztális szakaszban a kontrollhoz képest nem volt változás, a proximális végén pedig 75%-kal magasabb értéket kaptunk. Érdekes tapasztalat, hogy az anasztomozistól nagy távolságra kiemelt bélszakaszban, ahol nem volt károsodás, a kontrollhoz képest 50%-kal magasabb SOD aktivitást mérünk, mind a műtött, mind a Trental®-



2. ábra: Bal colonefél anasztomózis után 1 órával kimetszett minták SOD aktivitása

		% műtött	% műtött+Trental
anasztomózistól távoli	(O)	150	144
proximális	(P)	55	175
anasztomózis	(A)	22	40
distális	(D)	40	100

III. táblázat: SOD aktivitás változása mértéke a kontroll százalékában



3. ábra: Bal colonfél anasztomózis illetve Trental kezelés és bal colonfél anasztomózis után 1 órával kimetszett bél minták SOD aktivitása

lal kezelt és műtött állatt csoport esetében (III. táblázat).

### Megbeszélés

O<sub>2</sub> anion a szervezetben a molekuláris oxigén metabolizációja során a mitokondriumokban, a kapilláris endothel sejtekben és a fehérvérsejtekben képződik [12]. A mitokondriális me-

tabolizáció során közvetlenül vízzé alakulva nem károsítja a szervezetet. Az ischeemiás-reperfúziót követően viszont nagy szerepe van a xantin-xantinoxidáz és a NAD(p)H-oxidáz katalizálta *in situ* szabadgyök (elsősorban O<sub>2</sub>) ill. aktív oxigén származék képződésének (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-nak). Ezt igazolják azok a vizsgálatok, ahol exper-

imentális úton kiváltott pancreatitis [13] és más különböző szervekben előidézett, experimentális ischaemiás-reperfüziós károsodás jelentősen csökkenthető, vagy kivédhető szuperoxid dizmutáz, vagy kataláz, vagy SOD+kataláz előkezeléssel [14]. Saját vizsgálataink során úgy találtuk, hogy a vastagbél anasztomózist követően 60 perc múlva, az egyébként is SOD szegény bél, endogén SOD aktivitása az anasztomózis területén a kontroll állatokból mért érték ötödére, míg a proximális és distalis részén a felére csökkent. A Trental® kivédte az ischaemiás-reperfüziós károsodást, a sebgyógyulás felgyorsult, a kezelés hatására az anasztomózis területén mérseklődött a SOD aktivitás csökkenés, a distalis oldalon a kontrollal azonos értéket kaptunk, míg a proximális részén jelentős mértékben emelkedett az aktivitás. *In vitro* vizsgálataink szerint a Trental®-nak nincs közvetlen scavenger képessége, ezért fentiek alapján feltételezhető, hogy az *in vivo* protekció egy összetettebb, az endogén szabadgyök képződés és gyökeltakarítás egyensúlyát befolyásoló hatás eredménye, amelyet az előkezelésben alkalmazott Trental® képes kiváltani.

## IRODALOM

- [1.] Wakeyama, J., Takeshige, K., Takayanagi, R., Minakami, S.: Superoxide-forming NADPH oxidase preparation of pig PMNLs. *Biochem. J.* 1982, 205: 593-595.
- [2.] Fűrész J., Schweitzer K., Pállinger É., Lakatos Zs., Hideg J.: A PMNL és a monocitamakrofág rendszer szerepe a szöveti sérülésekben. *Honvédtorvos*, 1993, (45) 2: 158-163.
- [3.] Adkinson, D., Höllwarth, M. E., Benoit, J.N., Parks, D.A., McCord, J.M., Granger, D.N.: Role of free radicals in ischemia-reperfusion injury to the liver. *Acta Physiol. Scand.*, 1986, Suppl. 548: 101-107.
- [4.] Packer, J.E., Slater, T.F., Willson, R.L.: Direct observation of free radical interaction between vitamin E and C. *Nature*, 1979, 278: 737-738.
- [5.] Nayak, M.S., Kita, Marmor, M.F.: Protection of rabbit retina ischemia injury by SOD and catalase. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 1993. 34(6): 2018-2022.
- [6.] Granger, D.N., Rutilio, G., McMord, J.M.: Superoxide radicals in feline intestinal ischemia. *Gastroenterology*, 1981, 81: 22-29.
- [7.] Jarasch, E.D., Bruder, G., Heid, H.W.: Significance of xanthine oxidase in capillary endothelial cells. *Acta Physiol. Scand. Suppl.*, 1986, 548: 39-46.
- [8.] Ender, F., Labancz, T., Rosivall, L.: Effect of trental on the anastomosis bursting pressure and blood flow on experimental colon anastomosis in the rat. *Germ. J. Gastroent.*, 1992, 4: 284.
- [9.] Ender F.: A szöveti sérülés patomechanizmusa sebészi jelentőségű gasztrointesztinális kórképekben Kandidátusi értekezés, 1993. Bp.
- [10.] Misra, H. P., Frodovich, L.: The role of superoxide anion in the autooxidation of epinephrine: a simple assay for SOD. *J. Biol. Chem.*, 1972, 247: 3170-3175.
- [11.] Matkovic B., Novák R., Szöllősi L., Nagy L. A.: Quantitative determination of peroxidase metabolism enzymes SOD, peroxidase and catalase into laboratory materials. *Lab. Diagn.*, 1977, 91: 4-8.
- [12.] Roos, D., Schaik, M.L.J., Weening, R.S., Wever, R.: Superoxide generation in relation other oxidative reactions in human PMNL. In. *Superoxide and superoxide dismutases* Ed. Michelson, A. M., McCord, J. M., Fridovich, I. Academic Press. London, N.Y., San Francisco 1977, 307-316.

- [13.] *Sanfey, H., Sarr, M.G., Bulkeley, G.B., Cameron, J.L.*: Oxygen - direved free radicals and acute pancreatitis: a reviw. *Acta Physiol. Scand.* 1986, Suppl. 548: 109-118.
- [14.] *Minor, T., Chung, C.W., Yamamoto, Y., Omara, M., Saad, S., Isselhard, W.*: Evaluation of antioxidant treatment with Sod in rat liver transplantation after warm ischemia. *Eur Surg Res*, 1992, 24(6): 333-338.

---

**Katalin Schweitzer,**  
**F. Ender M.D., PhD,**  
**J. Pittner M.D.,**  
**Col. J. Fürész M.D.M.C., PhD.**

**Effect of pentoxifyllin (Trental®) on the activity of superoxid dismutase (SOD) enzyme in rats with experimental colonic anastomosis**

Pre-treatment with pentoxifyllinum (Trental®) increases anastomosis bursting pressure and decreases healing time of experimental colonic anas-

tomosis in rats. Does the free radical scavenging system play role in this protective mechanism? In a recent study the effects of Trental® pre-treatment on SOD activity was investigated on different parts of the colon after surgical colonic anastomosis. 60 min. after the operation the SOD activity was 4.9 U/wweight proximal (P) to the anastomosis, 1.9 U/ww at the anastomosis (A) and 3.1 U/ww the corresponding. In animals pre-treated with Trental® the corresponding distal (D), while SOD activity of the colon in control animals was 9.2 U/w. figures for the same parts of the colon were 15.5 U/ww, 5.7 U/ww and 9 U/ww respectively. This means that after Trental® administered in a dose of 2.5 mg/body weight the SOD enzyme activity increased.

*Dr. Schweitzer Katalin*  
 1555 *Budapest, Pf. 68.*