



## İNTESTİNAL İSKEMİ/REPERFÜZYON SONRASI DİĞER ORGANLARDAKİ OKSİDAN STRESİN ARAŞTIRILMASI

Fatma ÇAĞLAYAN<sup>1</sup>, Osman ÇAĞLAYAN<sup>2</sup>, Engin GÜNEL<sup>3</sup>, Murat ÇAKMAK<sup>1</sup>

### INVESTIGATION OF THE OXIDANT STRESS ON THE OTHER ORGANS, AFTER INTESTINAL ISCHEMIA/REPERFUSION

**Summary:** Reactive oxygen metabolites those accused of triggering the ischemia/reperfusion injury lead to tissue damage in the organ in which they are produced primarily. On the other hand they affect the other organs and systems. These effects in the lungs, liver, heart and bone marrow have been demonstrated in the intestinal ischemia/reperfusion studies. In our study; oxidant stress in liver, lungs and kidneys was investigated during intestinal ischemia/reperfusion. Totally 18 rabbits were divided into three groups. The first group was an hour of ileal ischemia, the second group was an hour of ischemia and an hour of reperfusion, the third one was sham group. Tissue samples from liver, lungs and kidneys were obtained when the procedures finished. Malondialdehyde and glutathione levels were measured in tissue homogenates. The results of the groups were compared with those of each others. Malondialdehyde levels of the reperfusion groups were significantly higher than those of sham groups in all tissues ( $p<0.05$ ). There were no difference on the glutathione levels of the lungs tissue samples between the groups. Glutathione levels of the liver and kidneys tissue samples in the reperfusion group were significantly lower than that of sham group ( $p<0.05$ ). These results revealed that, these three tissues are exposed to oxidant stress after intestinal ischemia/reperfusion.

**Key Words:** Intestinal ischemia/reperfusion, Liver, Lung, Kidney, Malondialdehyde, Glutathione

**Özet** İskemi/reperfüzyon hasarlanmasında tetikleyici olarak sorumlu tutulan reaktif oksijen metabolitleri primer olarak meydana geldikleri organda hasarlanmaya neden olurken aynı zamanda diğer organ ve sistemleri de etkilemektedir. İntestinal iskemi reperfüzyon çalışmalarında akciğer, karaciğer, kalp ve kemik iliğinde bu etkiler gösterilmiştir. Çalışmamızda intestinal iskemi reperfüzyonda karaciğer akciğer ve böbrekte oksidan stres ölçüldü. Toplam 18 adet tavşan üç gruba ayrıldı. 1. grup (n=6) bir saatlik ileum iskemisi, 2. grup (n=6) bir saat iskemi + bir saat reperfüzyon, 3. grup (n=6) sham grubu olarak çalışıldı. Deney sonunda tüm gruplardan karaciğer, akciğer ve böbrek doku örnekleri alındı. Doku homojenatlarında malondialdehid ve glutatyon düzeyleri ölçüldü. Her üç grubun sonuçları birbirleriyle karşılaştırıldı. Tüm dokularda reperfüzyon grubu malondialdehid düzeyleri sham grubundan anlamlı yüksekti ( $p<0,05$ ). Glutatyon düzeyleri akciğer dokusunda gruplar arasında farksızken, karaciğer ve böbrek dokularında reperfüzyon grubunda sham grubundan anlamlı düşüktü ( $p<0,05$ ). Bu sonuçlar her üç dokunun da intestinal iskemi reperfüzyon sonrası oksidan stres altında kaldığını göstermektedir.

**Anahtar Kelimeler:** İntestinal iskemi/reperfüzyon, Karaciğer, Akciğer, Böbrek, Malondialdehid, Glutatyon

### GİRİŞ

Fizyolojik olarak reaktif oksijen metabolitleri (ROM) çeşitli reaksiyonların sonucu olarak meydana gelirler. Bu zararlı moleküller endojen ve eksojen

antioksidanlarla detoksifiye edilirler. ROM'leri üretiminin artması veya antioksidan kapasitenin azalması çeşitli patolojilerin ortaya çıkmasına neden olur. İskemi reperfüzyon (I/R) süreci ROM'ni artıran, antioksidanları azaltan bazı mekanizmaları tetikler.

1 Kırıkkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Cerrahisi Anabilim Dalı  
2 Kırıkkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı  
3 Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Cerrahisi Anabilim Dalı

İntestinal iskemi reperfüzyonda önemli bir patoloji mukozal bariyerin bozulmasıdır (1,2). Bunun sonucu olarak destrüktif enzimler, bakteriler ve ürünleri intestinal doku ve sistemik sirkülasyona geçerek patolojik sürece katkıda bulunurlar. Fosfolipaz A2 ve lökosit aktivasyonu, ROM ve lümen kaynaklı ajanlar bir yandan intestinal hasara neden olurken öte yandan diğer organları da etkilerler. Özellikle kalp, karaciğer ve akciğerde bu etkiler gösterilmiştir (3-9). İntestinal iskemi reperfüzyon, portal kan akımının azalması ve kardiyotoksik ajanların etkisiyle sistemik hipoperfüzyona, akciğerler üzerine olan etkisiyle de solunum sıkıntısına neden olmaktadır (4). Bu etkilerle sistemik bir hipoperfüzyon tablosu ortaya çıkmaktadır. Kemik iliğinde meydana gelen yetersizlik, intestinal İ/R'un bir diğer yan etkisidir (10). Mukozal bariyerin bozulması ve translokasyonla iç içe giren bu olay sepsis gelişiminde rol oynayabilmektedir. Sonuçta bu tür dolaylı etkileriyle de İ/R çoğul organ yetmezliğine giden bir süreci tetikleyebilmektedir. Çoğul organ yetmezliğine en hassas organların akciğer, karaciğer ve intestinal sistem olduğu bilinir.

Bu çalışmamızda, intestinal İ/R sonrasında karaciğer, akciğer, ve böbrek dokularındaki oksidan stresi, malondialdehid (MDA) ve glutatyon (GSH) ölçümleri ile ortaya koymayı amaçladık.

## MATERYAL VE METOD

Literatürde, tesbit edilebilir reperfüzyon hasarı oluşturan çeşitli modellerde iskemi süresi 15 dakika (11) ile 6 saat (12) arasında değişmektedir. Biz bu çalışmada daha önce kullandığımız deney modelini (13) esas aldık.

Aynı beslenme rejimi alan, ağırlıkları 1500-3000 g arasında değişen 18 adet Yeni Zellanda tipi tavşan kullanıldı. Tavşanlar üç gruba ayrıldı. Hayvanlar operasyon öncesi altı saat aç bırakıldı. İnteramyusküler 25 mg /kg Ketalar yapıldıktan sonra kulak veninden damar yolu açıldı. 1-2 ml/kg/saat gidecek şekilde % 0,9 NaCl verildi. Operasyon sırasında 25 mg/kg pentotal üç eşit dozda intravenöz uygulandı. Orta hat

abdominal kesi yapıldı. Eksploratif laparotomi sonrası 30 cm lik terminal ileum ansı çalışma için hazırlandı. Bu barsak ansını besleyen mezenter arter klempe edildi. İnteramyural anastomozlar için her iki uçtan barsak ansı; vasküler anastomozları önlemek için de arcuat arter ve venler, hasarlanmayacak şekilde 0/0 krome katgütle bağlandı. Bu işlemin sonunda barsaklar dikkatli bir şekilde karın içine yerleştirildi. Karın 2/0 ipekle sütüre edildi. Bir saatlik iskemi sonunda sütürler açılıp barsak dışarı alındı. İskemi grubunda (1. grup) deney bu aşamada sonlandırıldı. Reperfüzyon grubunda (2. grup) tüm bağlar ve klemp açılıp reperfüzyon sağlandıktan sonra barsak yerine yerleştirilip batın tekrar sütüre edildi. Bir saatlik reperfüzyon sonunda bu grupta da deneye son verildi. Sham grubunda (3. grup) yalnız laparotomi ve relaparotomi işlemleri uygulandı. İkinci saatte deney sonlandırıldı. Tüm operasyon boyunca vücut ısısı korunmaya çalışıldı. Tüm gruplarda deney sonlarında tavşanlardan karaciğer böbrek ve akciğer doku örnekleri alındı.

Tüm hayvanlarda aynı bölgelerden alınmış 0,4-0,6 g ağırlığındaki doku örnekleri serum fizyolojikle yıkandıktan sonra önce mekanik, daha sonra ultrasonik olarak fosfat tampon içinde homojenize edildi. Homojenatlarda biüret metoduyla protein, Yagi (14) metoduyla MDA ve Beutler ve arkadaşlarının (15) metoduyla GSH çalışıldı. Doku MDA ve GSH düzeyleri  $\mu\text{mol/g}$  protein olarak hesaplandı.

Verilerin istatistiksel değerlendirmesinde SPSS for Windows 6.0 programı kullanıldı. Kruskal-Wallis 1-Way Anova testi ile bir dokuda elde edilen her 3 grup değerinin karşılaştırması yapıldı. Test sonucu grup değerleri arasında anlamlı fark tesbit edildiğinde bu farkın kaynağı Mann-Whitney U testi ile araştırıldı.

## BULGULAR

Her üç gruptaki doku örneklerinin MDA ve GSH değerleri Tablo I'de gösterilmiştir. Hiçbir dokuda, iskemi grubu değerleri diğer iki gruptan anlamlı



Tablo I: Doku MDA ( $\mu\text{mol/g protein}$ ) ve GSH ( $\mu\text{mol/g protein}$ ) değerleri. Ortalama  $\pm$  standart sapma

Doku (n:6)	Sham		İskemi		İ/R	
	MDA	GSH	MDA	GSH	MDA	GSH
Karaciğer	1,89 $\pm$ 0,22	96,44 $\pm$ 22,28	2,10 $\pm$ 0,41	82,63 $\pm$ 22,47	2,76 $\pm$ 0,71*	72,58 $\pm$ 19,99*
Akciğer	2,39 $\pm$ 0,21	45,05 $\pm$ 9,49	2,59 $\pm$ 0,38	41,10 $\pm$ 9,30	2,97 $\pm$ 0,41*	35,95 $\pm$ 8,51
Böbrek	2,26 $\pm$ 0,29	60,89 $\pm$ 7,77	2,68 $\pm$ 0,37	51,69 $\pm$ 9,27	2,97 $\pm$ 0,40*	45,77 $\pm$ 9,86*

\*: Sham grubundan anlamlı ölçüde yüksek ( $p<0,05$ ).

+: Sham grubundan anlamlı ölçüde düşük ( $p<0,05$ ).

farklılık göstermiyordu. Reperfüzyon grubu MDA düzeyleri tüm dokularda anlamlı olarak sham grubundan yüksekti ( $p<0,05$ ). Karaciğer ve böbrek dokusu GSH düzeyleri reperfüzyon grubunda shamden anlamlı düşüktü ( $p<0,05$ ), akciğer dokusunda gruplar arasında anlamlı bir fark yoktu.

## TARTIŞMA

Yalnız arteriyel oklüzyon yapılan, venöz akımın engellenmediği intestinal iskemi reperfüzyon modelinde iskemi döneminde venöz ve lenfatik drenaj mevcuttur. Bu dönemde açığa çıkan radikaller, bakteriler, enzimler ve aktif lökositler bu yollarla sistemik dolaşıma karışarak diğer sistemleri de etkilemektedir (1,16). Portal kan akımının azalması, splanik konjesyon diğer organlarda, özellikle de karaciğerde hipoperfüzyon ve nonobstrüktif iskemiyi neden olmaktadır. Karaciğerin hipoperfüzyona duyarlılığı bilinmektedir. Turnage ve arkadaşları yaptıkları çalışmada intestinal İ/R'da akut hepatik yaralanma, hepatosellüler enzim salgılanması, safra akımında azalmaya neden olan metabolik disfonksiyonları göstermişlerdir (6,7). Bu patolojinin gelişiminde portal kan akımının azalması yanı sıra aktif mediatörlerin önemli rolü de vurgulanmıştır (7,16,17). İntestinal iskemi, kardiyotoksinlerin salgılanmasıyla hemodinamik değişikliklere neden olmaktadır (7,16). Buna yönelik kardiyovasküler sistemi destekleyici ajanlar, bakteriyel translokasyona karşı antibiyotiklerin kullanımı gündemdedir. İntestinal İ/R'da enfeksiyonun nedeni sadece bakteriyel translokasyon değildir. Fontes ve

arkadaşları yaptıkları intestinal İ/R çalışmasında splenik hipoperfüzyonun hemorajik şoktaki gibi kemik iliği yetmezliğine neden olarak enfeksiyona hassasiyetin artışı, sepsis ve çoğul organ yetmezliğine neden olacağını belirtmişlerdir (10). İskemi reperfüzyon olayının tetiklediği lökosit aktivasyonu ve inflamatuvar mediatörler; akciğerde ödem oluşumu, vasküler permeabilite artışı ve alveoler geçirgenlikte artış gibi çeşitli patolojilere neden olmaktadır. Karaciğer ve intestinal iskemi reperfüzyon modellerinde bu tür akciğer problemleri ortaya konulmuştur (5,9,16,17). Son çalışmalarda intestinal İ/R'da akciğeri korumaya yönelik başta lökosit aktivasyonunu önleyiciler olmak üzere çeşitli ajanlar kullanılmaktadır (4,8,17-19). Bu mediatörler ve aktif lökositlerin akciğerlerde olduğu gibi böbreklerde de birikerek inflamatuvar süreçleri başlatmaları muhtemeldir. Öte yandan böbrekler, kardiak ve portal sistemdeki etkilere bağlı gelişen hipoperfüzyondan en fazla etkilenen organların başında gelmektedir (20). Bunların sonucunda böbreklerde de oksidan stres artışı beklenmelidir.

İskemi reperfüzyon hasarlanmasının değerlendirilmesinde MDA ve GSH ölçümleri, çalışmalarda yaygın olarak kullanılan güvenilir basit yöntemlerdir. MDA, lipid peroksidasyonu son ürünü, GSH, etkili bir antioksidandır. Bir ortamdaki lipid peroksidasyon reaksiyonu MDA birikimine yol açarken GSH'da azalmaya neden olur. Çalışmamızda, intestinal İ/R'da diğer organların oksidan stresini değerlendirmek için akciğer, karaciğer, böbrek dokusunda bu parametrelerin

ölçümleri yapıldı. İskemi grubundaki doku örneklerinde MDA ve GSH değerleri gerek sham gerekse reperfüzyon grubu değerlerinden anlamlı farklılık göstermedi. Reperfüzyon grubunda ise karaciğer, akciğer, ve böbrek MDA düzeyleri sham grubuna göre anlamlı yüksek, karaciğer, böbrek dokusu GSH değerleri anlamlı düşük bulunmuştur. Bu bulgular diğer çalışmalarda da ortaya konulan ilgili dokulardaki oksidan stres artışıyla uyumludur. Ancak Turnage ve ark. ratlarda yaptıkları benzer bir çalışmada karaciğerde lipid peroksidasyon artışı veya GSH azalışı tesbit edememişlerdir (6). İ/R çalışmalarında bunun gibi birbirleriyle çelişen bulgulara oldukça sık rastlanmaktadır. Bu çelişkilerin bir kısmı kullanılan deney hayvanı ve model farklılıklarıyla açıklanabilirken bir kısmında mantıklı bir açıklama bulunamamaktadır. Buna rağmen, reperfüzyon hasarının, yalnız İ/R olayının gerçekleştiği organla sınırlı olmayıp diğer organları da etkileyen sistemik bir patoloji olduğu yaygın kabul gören bir gerçektir. O halde reperfüzyon hasarını önlemeye yönelik tedavi yaklaşımları planlanırken tüm organizma göz önünde bulundurulmalıdır. Uzak doku hasarlanmalarında özellikle aktif lökositlerin ve inflamatuvar mediatörlerin rolü iyi gösterilmiştir. Bu nedenle gerek reperfüzyon başlangıcında lökosit aktivasyonunun önlenmesi, gerekse aktifleşmiş lökositlerin diğer organlarda birikerek inflamatuvar reaksiyonları başlatmalarını önleyici girişimler başarılı olacaktır. Ayrıca hedef organlardaki antioksidan moleküllerin düzeyini artırıcı yaklaşımlar da savunma sistemine olan katkıları nedeniyle olumlu sonuçlar doğuracaktır.

### KAYNAKLAR

1. Bounous, G. (1986) Pancreatic proteases and oxygen derived free radicals in acute ischemic enteropathy. *Surgery*. 90, 92-94.
2. Hebra, A., Hong, J., McGowan, K.L., Smith, C., McKernan, M.L., Ross, A.J. (1994) Bacterial translocation in mesenteric ischemia-reperfusion injury: Is dysfunctional motility the link? *J Pediatr Surg*. 29, 280-287.
3. Haglund, E., Haglund, U., Lundgren, O. (1981) Graded intestinal vascular obstruction. IV Analysis of the development of refractory shock. *Circ Shock*. 8, 635-646.
4. Koike, K., Moore, E.E., Moore, F.A., Kim, F.J.W., Carl, V.S., Banerjee, A. (1995) Gut phospholipase A2 mediates neutrophil priming and lung injury after mesenteric ischemia-reperfusion. *Am J Physiol*. 268, G397-403.
5. Koike, K., Yamamoto, Y., Hori, Y., Ono, T. (2000) Group IIA phospholipase A2 mediates lung injury in intestinal ischemia-reperfusion. *Ann Surg*. 232, 90-97.
6. Turnage, R.H., Bagnasco, J., Berger, J., Guice, K.S., Oldham, K.T., Hinshaw, D.B. (1991) Hepatocellular oxidant stress following intestinal ischemia-reperfusion injury. *J Surg Res*. 51, 467-471.
7. Turnage, R.H., Kadesky, K.M., Myers, S.I., Guice, K.S., Oldham, K.T. (1996) Hepatic hypoperfusion after intestinal reperfusion. *Surgery*. 119, 151-160.
8. Turnage, R.H., Wright, J.K., Iglesias, J., LaNoue, J.L., Nguyen, H., Kim, L., Myers, S. (1998) Intestinal reperfusion-induced pulmonary edema is related to increased pulmonary inducible nitric oxide synthase activity. *Surgery* 124, 457-462; discussion 462-463.
9. Borjesson, A., Norlin, A., Wang, X., Andersson, R., Folkesson, H.G. (2000) TNF-alpha stimulates alveolar liquid clearance during intestinal ischemia-reperfusion in rats. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 278, L3-12.
10. Fontes, B., Moore, F.A., Moore, E.E., Koike, K. (1994) Gut ischemia induces bone marrow failure and increases risk of infection. *J Surg Research*. 57, 505-509.
11. Boros, M., Takaichi, S., Hatanaka, K. (1995) Ischemia time dependency of reperfusion injury following complete arterial occlusion of the rat small intestine. *Transplantation Proceedings* 27, 2789-2790.
12. Akgür, F.M., Olguner, M., Yenici, O., Gökden, M., Aktuğ, T., Yılmaz, M., Ataç, G. (1996) The effect of allopurinol pretreatment on intestinal hypoperfusion encountered after correction of intestinal volvulus. *J Pediatr Surg*. 31, 1205-1207.
13. Günel, E., Çağlayan, F., Çağlayan, O., Dilsiz, A., Duman, S., Aktan, M. (1998) Treatment of intestinal reperfusion injury by antioxidative agents. *J Pediatr Surg*. 33, 1536-1539.



14. Yagi K. (1994) Lipid peroxides in hepatic, gastrointestinal and pancreatic diseases, s. 165-169. In: Armstrong D, ed. Free Radicals in Diagnostic Medicine, Plenum Press, New York.
15. Beutler, E., Duron, O., Kelly, B.M. (1963) Improved method for the determination of blood glutathione. J Lab Clin Med. 61, 882-888.
16. Schoenberg, M.H., Beger, H.G. (1993) Reperfusion injury after intestinal ischemia. Critical Care Medicine. 21, 1376-1386.
17. Colletti, L.M., Kunkel, S.L., Walz, A. (1995) Chemokine expression during hepatic ischemia/reperfusion induced lung injury in the rat. J Clin Invest. 95, 134-141.
18. Hill, J., Lindsay, T., Valeri, C.R., Shepro, D. (1993) A CD18 antibody prevents lung injury but not hypotension after intestinal ischemia-reperfusion. J Appl Physiol. 74, 659-664.
19. Koike, K., Moore, F.A., Moore, E.E., Read, R. (1993) Gut ischemia mediates lung injury by a xanthine oxidase-dependent neutrophil mechanism. J Surg Research. 54, 469-473.
20. Harrison's Principles of internal medicine. 14. ed. Fauci, A.S. (et al) ed. Acute renal failure. Brady, H.R., Brenner, B.M. 1504-1513. McGraw-Hill New York USA 1998