

Hepatik İskemik Önkoşullamanın İnce Bağırsak İskemi-Reperfüzyon Hasarı Üzerine Etkisi

[The Effect of Hepatic Ischemic Preconditioning on Intestinal Ischemia/reperfusion Injury]

İ. Cenk Soğukpınar¹,
Duygu Şahin²,
Alp Demirağ³,
Aylin Sepici-Dinçel²,
Mustafa Kısakürek¹,
M. Ali Akkuş¹,
Nilgün Altan²

¹Genel Cerrahi Kliniği, Sağlık Bakanlığı Ankara Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Ankara

²Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Ankara

³Yeditepe Üniversitesi Hastanesi Genel Cerrahi ve Organ Nakli AD, İstanbul

Yazışma Adresi
[Correspondence Address]

Aylin Sepici DİNÇEL

Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, Ankara
Adres: Bilkent 2 Blokları G2 No:14
Bilkent, Ankara
e-mail: asepic@yaho.com
Faks: 0 312 266 70 51

Kayıt tarihi : 10 Mart 2008, Kabul tarihi: 13 Ağustos 2008

[Received: 10 March 2008, Accepted: 13 August 2008]

ÖZET

Amaç: Bu çalışmada hepatic iskemik önkoşullamanın intestinal iskemik-reperfüzyon hasarındaki lokal etkisinin yanı sıra, akciğer ve karaciğer gibi uzak doku hasarının incelenmesi amaçlandı.

Gereç ve Yöntem: Deney hayvanları Wistar tipi albino ratlar 3 gruba ayrıldı. Grup 1, kontrol grubu olarak kabul edildi. Grup 2'de superior mezenterik arter 1 saat klemplenerek iskemik oluşturuldu, klempe açıldıktan sonra 0, 2, 24, ve 48 saatlik reperfüzyonun ardından sakrifiye edilerek doku örnekleri alındı. Grup 3' te hepatic pedikül 2 kez 5'er dakika klemplenip iskemik sağlandıktan sonra 10'ar dakika reperfüzyon yapılarak iskemik ön koşullama yapıldı. Ardından superior mezenterik arter 1 saat klemplenip iskemik sağlandı, klempe açıldıktan sonra 0., 2., 24. ve 48. saatlerde doku örnekleri alındı. Karaciğer, bağırsak, akciğer dokularında malondialdehit düzeyleri, akciğer ve bağırsak dokusunda miyeloperoksidaz aktivitesi incelendi.

Bulgular: Araştırma sonucunda karaciğer dokusunda 2. ve 24. saatte, ince bağırsak dokusunda tüm saatlerde, akciğer dokusunda 2., 24. ve 48. saatlerde malondialdehit düzeyleri ve akciğer dokusunda tüm saatlerde MPO düzeyleri, Grup 2'de grup 3 e göre anlamlı şekilde yüksek bulundu. Grup 2, malondialdehit düzeyleri ince bağırsak ve akciğer dokusunda 2. saatte, karaciğer dokusunda 24. saatte en yüksek düzeye ulaştı ve daha sonra azalma eğilimi gösterdi, aynı şekilde akciğer dokusu MPO düzeyinin de 2. saatte en yüksek düzeyde olduğu gözlemlendi. İnce bağırsak MPO düzeylerinde ise her iki grupta da 48. saatte başlangıç değerlerine göre anlamlı azalma gözlemlendi.

Sonuç: Hepatic iskemik önkoşullamanın intestinal iskemik-reperfüzyon hasarının lokal ve sistemik etkilerine karşı koruyucu etki gösterdiği düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Hepatic iskemik önkoşullama; iskemik-reperfüzyon; lipid peroksidasyon; miyeloperoksidaz; ince bağırsak

ABSTRACT

Aim: The aim of this study was to investigate the effects of hepatic ischemic preconditioning on the intestinal ischemia/reperfusion injury.

Methods: Wistar albino rats were used in this experiment and randomly assigned into three groups: (i) Group I (sham); (ii) Group II: hepatic ischemia was formed by clamping on the superior mesenteric artery for 1 hour and reperfusion for 0, 2, 24, 48 hours and then subjects were sacrificed. (iii) Group III: preconditioning ischemia was obtained by clamping on hepatic pedicles twice for 5 min. and reperfusion for 10 min. Then, the clamping and reperfusion processes used in Group II were repeated. Liver, intestine and lung malondialdehyde levels, lung and small intestine myeloperoxidase activities were evaluated.

Results: Experimental data revealed significantly elevated levels of malondialdehyde in liver, intestine and lung tissues in Group II compared to Group III. In addition to these results, the myeloperoxidase activity of lung tissue was increased in Group II compared to Group III. In all tissues just like lung myeloperoxidase activity, malondialdehyde levels also reached to the highest level at reperfusion period of 2 h and then a tendency to decrease was observed. The decreased malondialdehyde levels were measured in Group II and Group III after 24 h.

Conclusions: It can be suggested that the hepatic ischemic preconditioning may have protective effects against intestinal ischemia/reperfusion injury.

Key Words: Hepatic ischemic preconditioning; ischemia-reperfusion; lipid peroxidation; myeloperoxidase; small intestine

Giriş

Solid organların vericiden çıkarılması sırasında oluşan iskemik-reperfüzyona (İR) bağlı doku yaralanması ince bağırsak transplantasyonunun başarılı bir şekilde uygulanmasının önünde engel teşkil etmektedir.

İntestinal İR'nin sebep olduğu bölgesel sorunlara ek olarak, sistemik bir olaya dönüşerek pek çok organın hasarlanmasına yol açtığı bilinmektedir (1). Erken dönemde ise özellikle akciğer ve karaciğer hasarının ortaya çıktığı gözlenmiştir (2). Hepatik İR hasarı ise travma, karaciğer transplantasyonu, parsiyel hepatik rezeksiyon gibi cerrahi işlemlere bağlı olarak istenmediği halde sıklıkla görülmektedir.

İskemik önkoşullamanın faydalı etkisi ilk kez Murry ve ark. tarafından 1986 yılında köpek kalbi üzerinde kısa süreli iskemik ve reperfüzyonu takiben oluşturulan uzun süreli iskemiyeye bağlı modelde yapılan çalışmalar sonucunda iskemik önkoşullama sayesinde doku kaybının % 70 azaldığı tespit edilmiştir (3). Benzer şekilde iskemik önkoşullamanın beyin, karaciğer, retina, spinal kord ve akciğerde de etkili olduğu gösterilmiştir (4).

İskemik süresince meydana gelen hücre hasar ürünleri reperfüzyon sırasında değişime uğramakta ve retikuloendotelial sistemdeki birçok reaksiyondan sonra, asıl ciddi hasarı reperfüzyon sırasında oluşturmaktadır (5,6,7). Reperfüzyon hasarına direkt veya indirekt yoldan katkıda bulunan birçok kimyasal madde birbirleriyle etkileşerek sonuçta serbest radikallerin açığa çıkmasını sağlamaktadırlar. Oluşan bu hasardan oksijen türevi serbest radikaller sorumlu tutulmaktadır. Birçok serbest oksijen radikal ürünleri üretilirken, lipid peroksidasyonunu da başlatmaktadır (8).

Yapılan deneysel çalışmalarda, sadece 4 saatlik intestinal iskeminin, 3 saatlik iskemik ve 1 saatlik reperfüzyondan daha az hasar verdiği gösterilmiştir (9). Reperfüzyon hasarını tetikleyen asıl olayın endotel hücrelerindeki zedelenme olduğu düşünülmektedir (10). Son yıllarda yapılan deneysel çalışmalar, intestinal iskemik ve özellikle reperfüzyon esnasında ortaya çıkan serbest radikallerin hücre hasarına ve hücre ölümüne başlatarak endojen inflamatuvar yanıtla doku hasarlanmasına neden olduğunu göstermiştir (11,12,13).

İskemik önkoşullamanın erken döneminde adenozin, bradikinin, katekolaminler ve opioidler aracılığı ile erken koruyucu cevap meydana gelirken önkoşullamanın geç etkilerinin genetik yeniden düzenleme ile sağlandığı bildirilmiştir. Buna ilave olarak nörojenik mekanizmalarda koruyucu uyarıların iletilmesinde rol oynadığı ve İR hasarlanmasının sistemik etkilerinin iskemik önkoşullama ile en aza indirildiği gösterilmiştir (14).

İnce bağırsakta İR hasarının önlenmesi için iskemik önkoşullamanın yanında farmakolojik önkoşullama yöntemleri olan antioksidanlar, serbest radikal süpürücüler, nitrik oksit, glutamin, glisin, leptin, perflorokarbon, hiperoksijene solüsyonlar, enteral beslenme tedavileri deneysel olarak uzun süredir başarıyla uygulanmaktadır (11,15).

Hasarlanma, lokal ve uzak dokuların hafif tahribi şeklinde olduğu gibi, bazen ölümlü sonuçlanabilen multiple organ yetmezliğine neden olmaktadır. İntestinal İR hasarı çalışmalarında özellikle nötrofillerin aktivasyonu sonucu böbrek, karaciğer ve akciğer gibi uzak organlarda da doku hasarlanmaları gösterilmiştir (13,16,17).

İR'ye bağlı oluşan organ hasarının hepatik iskemik önkoşullama (HİK) sayesinde önlenildiği veya en aza indirildiğine dair çalışmalar mevcuttur (4). Ancak HİK'in ince bağırsaklarda meydana gelen İR'ye bağlı doku yaralanmasındaki önleyici etkisi tam olarak bilinmemektedir.

Bu bilgiler ışığında, çalışmamızda HİK'in intestinal İR hasarında erken ve geç dönemdeki koruyucu etkisini belirlemekle birlikte akciğer ve karaciğer dokusunda meydana gelebilecek hücre hasarına olası koruyucu etkisini değerlendirmeyi amaçladık.

Gereç ve Yöntem

Çalışma, T.C. Sağlık Bakanlığı Ankara Eğitim ve Araştırma Hastanesi deney hayvanları laboratuvarında, 2005 yılında etik kurul onayı alındıktan sonra gerçekleştirilmiştir. Çalışmada ağırlıkları 180-200 gr arasında değişen, Wistar tipi 45 adet erkek albino rat kullanıldı. Ratlar özel kafeslerde üç ya da dörtlü gruplar halinde bir arada olacak biçimde standart rat yemi ve su ile beslendiler. Ameliyat öncesinde hayvanlar 12 saat aç bırakıldılar ancak sadece su içmelerine izin verildi. Ameliyatların tamamı intraperitoneal tiyopenton sodyum 40 mg/kg anestezisi altında yapıldı. Anesteziyi takiben karın ön duvarı % 10'luk povidon-iyot ile temizlendi. Bütün ameliyatlar orta hat laparotomi ile gerçekleştirildi. Ameliyat sırasında mevcut ısı kaybı ısıtıcı lambalar ve sıcak su içeren torbalar yardımı ile önlenmeye çalışıldı. Denekler 3 gruba ayrıldı; Grup 1 (n=5): Kontrol grubu olarak kabul edildi. Bu grupta sadece orta hat laparotomi yapıldı. Hepatik pedikül ve Süperior Mezenterik Arter (SMA) disseke edilip ortaya kondu, klempe edilmedi. Grup 2 (n=20): Bu grupta orta hat laparotomiyi takiben hepatik önkoşullama olmaksızın intestinal iskemik ve reperfüzyon oluşturuldu. Ratlar 5'erli gruplara ayrılarak laparotominin ardından SMA bulunup 1 saat klemplenerek iskemik oluşturuldu, klempe açıldıktan sonra 0., 2., 24., ve 48. saat reperfüzyonun ardından doku örnekleri alındı. 24. ve 48. saatte tekrar ameliyat edilecek olan ratlar ilk laparotomiyi takiben karın duvarı ve cilt ayrı ayrı olacak biçimde anatomik olarak kapatılmıştır. Ardından ratlar ikinci ameliyata kadar geçen süre içerisinde ayrı kafeslerde tek başlarına tutulmuş, su ve gıda almalarına izin verilmiştir. 24 ve 48. saatte tekrar laparotomi uygulanarak doku örneği alınacak ratlara ilk ameliyatta olduğu gibi benzer anestezi uygulandı. Grup 3 (n=20): Bu grupta hepatik iskemik önkoşullama literatürde tarif edildiği biçimde uygulandı (18). Laparotominin ardından hepatik pedikül bulunarak 2 kez 5'er dakika klempe edilerek iskemik sağlandı, ardından klempe açılarak 10'ar

dakikalık reperfüzyon sağlandı. Ardından SMA bulunarak 1 saat klempe edildi ve klemp açıldıktan sonra ratlar 5'erli gruplara ayrılarak 0., 2., 24. ve 48. saatlik reperfüzyonun ardından doku örnekleri alındı. 24. ve 48. saatte tekrar ameliyat edilecek olan ratlar ilk laparotomiyi takiben karın duvarı ve cilt ayrı ayrı olacak biçimde anatomik olarak kapatılmıştır. Ardından ratlar ikinci ameliyata kadar geçen süre içerisinde ayrı kafeslerde tek başlarına tutulmuş, su ve gıda almalarına izin verilmiştir. 24 ve 48. saatte laparotomi uygulanarak doku örneği alınacak ratlara ilk ameliyatta olduğu gibi benzer anestezi uygulanmıştır.

Karaciğer, ince bağırsak ve akciğer dokusu malondialdehit (MDA) ölçümü: % 1.15'lik KCI solüsyonu ile % 10'luk hazırlanan homojenatlarda Mihara ve Uchiyama (1978) 'nın tiyobarbitürik asit metodu ile spektrofotometrik olarak çalışıldı. Yağ asidi peroksidasyonunun bir son ürünü olan MDA'nın, TBA ile reaksiyona girerek 532 nm'de maksimum absorbans veren renkli bir kompleks oluşturması, metodun prensibidir. Oluşan renkli kompleksin absorbans miktarı MDA ile doğru orantılıdır. Sonuçlar nmol MDA/g doku olarak hesaplandı (19). Miyeloperoksidaz (MPO) aktivitesi için akciğer dokusu ise pH 4.7 olacak şekilde hazırlanan 20 mM soğuk EDTA solüsyonu ile 60 saniye homojenize edildikten sonra (1/10 w/v), akciğer homojenatı 5 dk 10000 x g'de +4 °C'de ince bağırsak homojenatı 20000 x g de 15 dakika +4 °C'de santrifüj edildi. Her iki doku için de süpernatant atılıp, akciğer dokusu için pellet % 0.5 heksadesil trimetilamonyum bromid (HETAB) içeren, 50 mM potasyum fosfat tamponu (pH: 6.0) ile süspansiyon haline getirilerek -20 °C de dondurulup, oda ısısında eritildikten sonra, 30 saniye homojenize, 2 saat 60 °C'de inkübe ve 5 dk 10000xg'de +4 °C santrifüj edildi (20). İnce bağırsak homojenatına ait pellet potasyum fosfat tamponu (% 0.5 HETAB içeren 50 mM'lık tampon olarak ve pH'sı 5.4'e fosforik asit kullanılarak ayarlanmıştır) ile süspanse edildikten sonra, 20000 x g de 15 dakika +4 °C'de santrifüj edildi (21). Her iki dokuya ait süpernatandan o-dianisidin redüksiyonu metoduna göre MPO aktivitesi çalışıldı. Bu metodun prensibi H₂O₂'nin homojenattaki MPO tarafından oksitlenirken reaksiyon karışımında bulunan o-dianisidinin redüklenmesi esasına dayanır. Enzim aktivitesi, 37 °C de 410 nm dalga boyunda MPO miktarının neden olduğu absorbans değişikliğine göre U/g doku olarak ifade edildi (22).

Veriler, *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS, version 11.5, Chicago, IL, USA) programı kullanılarak değerlendirildi. Gruplar arasındaki fark Kruskal Wallis Varyans analiziyle incelendi, ikişerli karşılaştırmalar Mann-Whitney U testi ile yapıldı. Grup içindeki zamana bağlı değişimler ise Friedman testiyle değerlendirilip, ikişerli karşılaştırmalar Wilcoxon testi ile yapıldı. P değeri 0.05'den küçük olan tüm sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

Bulgular

Karaciğer MDA bulguları: Kontrol grubu ile grup 2 ve 3'ün 0. saat değerleri arasında istatistiksel olarak fark saptanmamıştır (p>0.05). Grup 2 ile grup 3 karşılaştırıldığında; Grup 2'de 2. ve 24. saatte istatistiksel olarak anlamlı düzeyde artma saptanmıştır (p<0.05). Grup 2, 2., 24. ve 48. saat sonuçları 0. saate göre anlamlı düzeyde artmıştır (p<0.05). Grup 2'de 24. saatte 2.saate göre istatistiksel olarak artma saptanmıştır (p<0.05) (Tablo 1).

İnce bağırsak MDA bulguları: Grup 2 ve grup 3, 0. saat değerleri kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı olarak yüksek bulundu (p<0.05). Grup 2 ile grup 3 karşılaştırıldığında tüm zamanlar için grup 2 değerlerinde anlamlı bir artış gözlenmiştir (p<0.05) (Tablo 1).

Akciğer MDA bulguları: Grup 2, 0. saat değeri kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksektir (p<0.05). Grup 2 ile grup 3 arasında başlangıç hariç 2., 24. ve 48. saat ölçümleri bakımından fark vardır (p<0.05). Grup 2 ölçümleri grup 3'e göre daha yüksek bulunmuştur (Tablo 1).

Akciğer MPO bulguları: Kontrol grubu ile grup 2 arasında 0. saate fark vardır (p<0.05). Grup 2 ile grup 3 arasında başlangıç, 2., 24. ve 48. saat ölçümleri bakımından fark vardır (p<0.05). Tüm zamanlarda grup 2 ölçümleri grup 3'e göre daha yüksek bulunmuştur (Tablo 2).

İnce bağırsak MPO bulguları: Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında grup 3, 0. saat değeri anlamlı olarak yüksek bulunmuştur (p<0.05). Grup 2 ile grup 3 arasında tüm zaman aralıklarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmemiştir. Her iki grubunda 48. saat değerleri kendi içinde başlangıç değerleri; 0. saat değerlerinden anlamlı olarak düşük bulunmuştur (p<0.05) (Tablo 2).

Tartışma

İskemi bir dizi kimyasal reaksiyonun bütünü olarak değerlendirilmektedir. Hipokside sitozol içi kalsiyum iyonlarının artmasıyla proteazlar aktive olur ve reperfüzyonla bağırsak mukozasında bol miktarda bulunan ksantin dehidrogenazın (XDH); ksantin oksidaza (XO) dönüşümü ile ATP'nin kullanımı sonucu ortaya çıkan serbest elektronların nikotinamid adenin dinükleotid'e değil de oksijene aktarımı ile serbest oksijen radikalleri oluşur. Yapılan çalışmalar ile, doku iskemisinde bağırsak dahil birçok organda XDH'nin XO'ya dönüştüğü gösterilmiştir (5,23).

İntestinal İR'nun oluşturduğu bölgesel hasar, hasarlanmayı başlatan tetik mekanizmasının geri dönüşümsüz olması sonucu, erken dönemde akciğer ve karaciğer hasarıyla ortaya çıkabilen çoklu organ yetmezliğine sebep olabilmektedir (2,24). Optimal tedavi stratejisi; mümkün olduğu kadar reaktif oksijen oluşumunu engellemek ve oluşmuş olan reaktif oksijenleri mümkün olduğu kadar çabuk ortadan kaldırmaktır. Bu stratejilerden biri ise iskemik önkoşullamadır.

Tablo 1. Laparotomi sonrası hepatik önkoşullama yapılmayan grup 2 ve yapılan grup 3'te iskemi reperfüzyonu takip eden tüm saat aralıklarında karaciğer, ince bağırsak ve akciğer dokularında MDA (nmol/g doku) değerleri. Sonuçlar (Ortalama ± Std Sapma) olarak verilmiştir.

	0. saat	2. saat	24. saat	48. saat
Karaciğer Dokusu				
Kontrol Grubu	1.2 ± 0.3			
Grup 2	0.9 ± 0.2	3.4 ± 1.1 ^{a*}	7.0 ± 1.0 ^{ab*}	2.1 ± 0.8 ^a
Grup 3	1.2 ± 0.6	0.8 ± 0.4	2.8 ± 0.9	1.2 ± 0.2
İnce bağırsak Dokusu				
Kontrol Grubu	1.9 ± 0.2			
Grup 2	3.1 ± 0.1 ^{c*}	6.0 ± 0.3 [*]	5.4 ± 0.3 [*]	3.6 ± 0.2 [*]
Grup 3	2.3 ± 0.1 ^c	3.2 ± 0.2	2.2 ± 0.1	2.1 ± 0.1
Akciğer Dokusu				
Kontrol Grubu	1.4 ± 0.3			
Grup 2	2.3 ± 0.3 ^c	6.1 ± 0.3 [*]	3.6 ± 0.8 [*]	3.2 ± 0.1 [*]
Grup 3	1.7 ± 0.8	3.1 ± 0.1	2.1 ± 0.1	1.9 ± 0.1
* p<0.05, Grup 3, 2., 24., 48. saat ile karşılaştırıldığında				
^a p<0.05, Grup 2, 0. saate göre; ^b p<0.05, Grup 2, 2. saate göre				
^c p<0.05, kontrol grubuna göre				

Tablo 2. Laparotomi sonrası hepatik önkoşullama yapılmayan grup 2 ve yapılan grup 3'te iskemi reperfüzyonu takip eden tüm saat aralıklarında akciğer ve ince bağırsak dokularında MPO (U/g doku) değerleri. Sonuçlar (ortalama ± Std Sapma) olarak verilmiştir.

	0. saat	2. saat	24. saat	48. saat
Akciğer Dokusu				
Kontrol Grubu	1.52 ± 0.70			
Grup 2	2.27 ± 0.21 ^a	6.36 ± 0.33 [*]	5.64 ± 0.12 [*]	4.36 ± 0.22 [*]
Grup 3	1.76 ± 0.08	2.78 ± 0.12	2.47 ± 0.08	2.01 ± 0.10
İnce bağırsak Dokusu				
Kontrol Grubu	0.38 ± 0.06			
Grup 2	0.55 ± 1.17	0.46 ± 0.13	0.24 ± 0.08	0.22 ± 0.03 ^{**}
Grup 3	0.64 ± 0.08 ^a	0.45 ± 0.12	0.23 ± 0.14	0.16 ± 0.08 ^{**}
* p<0.05, Grup 3, 0., 2., 24., 48. saat ile karşılaştırıldığında				
^a p<0.05, kontrol grubuna göre				
^{**} p<0.05, Grup içinde, 0. Saate göre				

Çalışmamızda, intestinal İR sonrası bölgesel olarak ince bağırsaklarda oluşan ve uzak organ hasarını gösterebilmek amacıyla karaciğer ve akciğerde, lipid peroksidasyonunun göstergesi olan MDA düzeyleri iskemik ön koşullama uygulanan ve uygulanmayan gruplarda ölçüldü. Ayrıca dokularda meydana gelen inflamatuvar cevabın gücü ve dolayısıyla meydana gelen hasarın büyüklüğünü gösterebilmek için ise, fagositik hücrelerde bulunan lizozomal bir enzim olan, dokuya polimorfonükleer lökosit (PMNL) toplanmasını göstermede oldukça etkili olan MPO aktivitesinin ölçümü yapıldı.

Önkoşullama uygulanan dokuda enerji ihtiyacında azalma ve değişiklik, asit-baz ve iyon dengesinin korunması, genetik yeniden düzenlenme gibi değişik mekanizmalarla iskemik tolerans meydana gelmektedir. Önkoşullama yapılan grupta, önkoşullama yapılmayan gruba göre oksijen radikallerinin yapımında, aktive edilmiş nötrofil salınımında, sitokinlerin üretiminde, ve apoptosiste azalma meydana gelirken mikrosirkülasyonda belirgin düzelme ve buna ilave olarak mitokondri yapısının korunduğu tespit edilmiştir. Bu durum reperfüzyon tolerans olarak adlandırılmıştır. İskemik önkoşullamanın uzak organlar üzerine koruyucu etkisinin değişik organlarda değişik mekanizmalar aracılığı ile olduğu da bildirilmiştir (4).

Yapılan bu çalışmada karaciğer dokusunda 2. ve 24. saatte, ince bağırsak ve akciğer dokusunda ise 2., 24. ve 48. saatlerde grup 2 ve grup 3 arasında MDA düzeylerinde fark vardır. İskemik önkoşullama yapılmayan grup 2 de 2. ve 24. saatler de belirgin olarak gözlenen artışlar önkoşullama yapılan grup 3 de görülmemektedir. Bu sonuçlar reperfüzyonun özellikle erken dönemlerinden itibaren biyomembranlarda lipid peroksidasyonunun meydana geldiğini göstermiştir. Çalışmadan çıkan sonuçlar Çağlayan ve ark.larının çalışması ile de örtüşmektedir. İntestinal İR sonrası 1. saatte karaciğer, akciğer ve böbrek dokularında gözlenen MDA düzeyi sham grubuna göre anlamlı şekilde yüksek bulunmuş ve reperfüzyon hasarının sadece İR olayının gerçekleştiği organ ile sınırlı kalmayıp sistemik bir patoloji olduğu ve tedavi yaklaşımlarında tüm organizmanın göz önünde bulundurulması fikri savunulmuştur (25).

İskemik önkoşullama yapılan grup 3'te de orta derecede bir biyomembran hasarı olmakla beraber bu hasar grup 2'ye göre anlamlı olarak azalmıştır. HİK hem lokal olarak ince barsağı hem de karaciğer ve akciğeri biyomembran hasarından korumuştur. MDA düzeyleri karaciğer dokusunda her iki grupta 24. saatten itibaren, ince bağırsak ve akciğer dokularında ise 2. saatten sonra düşüş eğilimine girmiştir. Bu bize hasarın geri dönüşümlü olduğunu ve iyileşme sürecine girdiğini düşündürmektedir.

İnce bağırsak üzerinde yakın organ iskemik önkoşullama yöntemi deneysel olarak kullanılan ve başarısı ispat edilmiş bir yöntemdir ve ilk kez Hotter tarafından tarif edilmiştir (26). Bu yöntemle ince barsağın iskemik önkoşullamanın ardından uygulanan uzun iskemik hasara karşı direnç kazandığı ve ince bağırsak morfolojik

yapısının korunduğu, hiperpermeability ve bakteriyel translokasyonu, nötrofil adezyon ve infiltrasyonunu önlediği tespit edilmiştir. Hepatik önkoşullama konusunda ise deneysel çalışmalarda selektif ve total oklüzyon (portal triad) olmak üzere iki yöntem literatürde başarıyla uygulanmaktadır. Klinik uygulamalarda ise total oklüzyon yani Pringle manevrası özellikle karaciğer rezeksiyonu ve kadavra ya da canlıdan karaciğer transplantasyonunda tercih edilen yöntemdir (3,11,27,28,29). Nötrofil ve monositler, primer lizozomal granüllerinde bir hem enzimi olan, oksijen bağımlı mekanizmalarla ilişkilendirilebilen MPO ihtiva ederler. Fagositoz sonrasında lökosit hücre membranında yerleşmiş olan NADPH oksidaz sistemi, çevre dokulardaki moleküller oksijeni süperokside dönüştürebilir ve sonrasında spontan olarak H₂O₂ meydana gelir. Hidrojen peroksit bir serbest radikal olmadığı halde, reaktif oksijen türleri içine girer ve serbest radikal biyokimyasında önemli bir rol oynar. Süperoksit ile reaksiyona girerek, en reaktif ve en zarar verici serbest oksijen radikali olan hidrosil radikali oluşturmak üzere kolaylıkla yıkılabilir (1). MPO'nun varlığında ise oluşan peroksit ve klorür iyonları hipokloröz aside dönüştürülür. İskemi reperfüzyon hasarının tetiklediği lökosit aktivasyonu ve inflamatuvar mediatörler; akciğerde ödem oluşumu, vasküler permeabilite artışı ve alveolar geçirgenlikte artışa neden olmaktadır. MPO düzeylerine bakılarak akciğer hasarı gösterilebilmektedir. Çalışmamızda grup 2 ve grup 3 de akciğer dokusu MPO düzeyleri 2. saatte en yüksek düzeye ulaşmıştır, daha sonra düşme eğilimine girmiştir ama başlangıç düzeylerine göre yüksek kalmıştır. Grup 2 ile Grup 3 karşılaştırıldığında ise tüm saatlerde Grup 2'deki MPO düzeyleri daha yüksek bulunmuştur (p<0.05). Bu sonuçlar bize akciğer dokusu gibi uzak bir organda nötrofil adezyon ve infiltrasyonunun iki saat gibi kısa bir sürede en yüksek düzeye ulaşabildiğini ve önkoşullama yapılmayan grup 2'de bu cevabın daha şiddetli olduğunu göstermiştir. HİK'in akciğeri İR hasarından koruduğunu düşündürmüştür.

Çalışmamızı destekleyecek nitelikte Ateş ve ark.'ın 2002'de yaptıkları bir çalışmada karaciğerde portal triad oklüzyonu ile 10 dk iskemi 10 dk reperfüzyon şeklinde önkoşullama yapıp ardından 45 dk renal iskemi oluşturulan grupta renal hasarlanmanın, önkoşullama yapılmadan 45 dk renal iskemi yapılan gruba göre daha az olduğu biyokimyasal ve patolojik olarak gösterilmiştir (4). Brozowski ve ark.'ın yaptığı bir çalışmada ise, 2 kez 5'er dakika iskemi 10 dakika reperfüzyon ile hepatik önkoşullama yapıp ardından 30 dakika çöliak arter klempe edilmiş ve 3 saat reperfüzyon uygulanmıştır. Hepatik önkoşullamanın mide mukozasını İR hasarına karşı belirgin derecede koruduğu gösterilmiştir (30). İnce bağırsak dokusu MPO düzeylerinde ise grup 2 ve grup 3 karşılaştırıldığında gruplar arasında fark görülmemiştir. Artmış nötrofil adezyon ve infiltrasyonunun artan MPO değerleri ile uzak organ olarak değerlendirilebilecek akciğer dokusunda gösterilmiş olmasına rağmen, esas

İR'a maruz kalan ince bağırsak dokusunda önkoşullama yapılan ve yapılmayan gruplarda MPO değerleri yönünden fark olmaması, İR'a maruz kalan dokuya yakın bir dokuda yapılan önkoşullamanın İR'un oluştuğu esas dokudaki destekleyici etkilerinden bahsetmeyi zorlaştırmaktadır. Her iki grup 48. saat düzeyleri, 0. saat ile karşılaştırıldığında gözlenen düşüş ise İR hasarının uzak organda oluşturduğu hasar üzerine yoğunlaşmamız gerektiğini düşündürmüştür.

Sonuç olarak, HİK'in ince bağırsak İR yaralanmasını belirli metabolik yollardan azaltılabileceği gibi uzak organ hasarını büyük bir olasılıkla azalttığı ve bu nedenle vericiden solid organ çıkarılması sırasında da faydalı bir yöntem olabileceği düşünülmektedir.

Bu çalışma İ.Cenk Soğukpınar'ın uzmanlık tezinin bir kısmını içermektedir. XXXIII FEBS Congress & XI IUBMB Conference, 28 June - 3 July 2008 Athens, Greece kongresinde poster olarak sunuldu.

Kaynaklar

- [1] Durakbasa CU, Dagli TE, Mouni H, Haklar G, Bilsel AS, Yuksel M, Aktan AO. (1998) Nitric oxide and endothelin relationship in intestinal ischemia/reperfusion injury. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids. 59(6):379-83.
- [2] McMillen MA, Sumpio BE. (1995) Endothelins: Polyfunctional cytokines. J Am Coll Surg. 180(5):621-637.
- [3] Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. (1986) Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. Circulation 74(5):1124-1136.
- [4] Ateş E, Genç E, Erkasap N, Erkasap S, Akman S, Firat P, Emre S, Kiper H. (2002) Renal protection by brief liver ischemia in rats. Transplantation 74 (9):1247-51.
- [5] Schoenberg MH, Beger HG. (1990) Oxygen radicals in intestinal ischemia and reperfusion. Chem Biol Interact. 76(2):141-61.
- [6] Bremer C, Bradford BU, Hunt KJ, Knecht KT, Connor HD, Mason RP, Thurman RG. (1994) Role of Kupffer cells in pathogenesis of hepatic reperfusion injury. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 267:630-636.
- [7] Hasselgren PO. (1987) Prevention and treatment of ischemia of the liver. Surg Gynecol Obstet. 164(2): 187-96.
- [8] Grace PA. (1994) Ischemia-reperfusion injury. Br J Surg. 81(5): 637-47
- [9] Parks DA, Granger DN. (1986) Contributions of ischemia and reperfusion to mucosal lesion formation. Am J Physiol. 250 (6 Pt 1): G749-53.
- [10] Lefer AM, Lefer DJ. (1993) Pharmacology of the endothelium in ischemia-reperfusion and circulatory shock. Annu Rev Pharmacol Toxicol. 33:71-90.
- [11] Mallick IH, Yang W, Winslet MC, Seifalian AM. (2004) Ischemia-reperfusion injury of the intestine and protective strategies against injury. Dig Dis Sci. 49(9): 1359-77.
- [12] Cizová H, Lojek A, Kubala L, Ciz M. (2004) The effect of intestinal ischemia duration on changes in plasma antioxidant defense status in rats. Physiol Res. 53(5):523-31.
- [13] Stallion A, Kou TD, Latifi SQ, Miller KA, Dahms BB, Dudgeon DL, Levine AD. (2005) Ischemia/reperfusion: a clinically relevant model of intestinal injury yielding systemic inflammation. J Pediatr Surg. 40(3):470-7.
- [14] Pasupathy S, Homer-Vanniasinkam S. (2005) Ischaemic preconditioning protects against ischaemia/reperfusion injury: emerging concepts. Eur J Vasc Endovasc Surg. 29(2):106-15.
- [15] Gao C, Chai W, Xu L, Zhang G, Zhang H, Han L, Sun X. (2006) Protective Effects of Hyperoxygenated Solution Preconditioning on Intestinal Ischemia-Reperfusion Injury in Rabbits J Surg Res 135(2):268-274.
- [16] Mura M, Andrade CF, Han B, Seth R, Zhang Y, Bai XH, Waddell TK, Hwang D, Keshavjee S, Liu M. (2007) Intestinal ischemia-reperfusion-induced acute lung injury and oncotic cell death in multiple organs. Shock. 28(2):227-38.
- [17] Giakoustidis AE, Giakoustidis DE, Iliadis S, Papageorgiou G, Koliakou K, Kontos N, Taitzoglou I, Botsoglou E, Papanikolaou V, Atmatzidis K, Takoudas D, Antoniadis A. (2006) Attenuation of intestinal ischemia/reperfusion induced liver and lung injury by intraperitoneal administration of (-)-epigallocatechin-3-gallate. Free Radic Res. 40(1):103-10.
- [18] Rehman H, Connor HD, Ramshesh VK, Theruvath TP, Mason RP, Wright GL, Lemasters JJ, Zhong Z. (2008) Ischemic preconditioning prevents free radical production and mitochondrial depolarization in small-for-size rat liver grafts. Transplantation. 85(9):1322-31.
- [19] Mihara M, Uchiyama M. (1978) Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. Analytical Biochemistry. 86(1):271-278.
- [20] Koike K, Moore E, Moore F, Read R, Carl V, Banerjee A. (1994) Gut ischemia/reperfusion produces lung injury independent of endotoxin. Crit. Care Med. 22(9): 1438- 44.
- [21] Grisham MB, Hernandez LA, Granger DN. (1986) Xanthine oxidase and neutrophil infiltration in intestinal ischemia. Am. J Physiol. 251(4 Pt 1):G567-74.
- [22] Maehly AC. (1955) Myeloperoxidase, Methos Enzymol., p.794-801, Academic Press, New York.
- [23] Granger DN. (1988) Role of xanthine oxidase and granulocytes in ischemia-reperfusion injury. Am J Physiol. 255 (6 Pt 2): H1269-75.
- [24] Deitch EA. (1992) Multiple organ failure. Pathophysiology and potential future therapy. Ann Surg. 216(2): 117-134.
- [25] Çağlayan F, Çağlayan O, Günel E, Çakmak M. (2000) İntestinal iskemi/reperfüzyon sonrası diğer organlardaki oksidan stresin araştırılması. Turk J Bioch. 25(3):104-108.
- [26] Hotter G, Closa D, Prados M, Fernández-Cruz L, Prats N, Gelpí E, Roselló-Catafau J. (1996) Intestinal preconditioning is mediated by a transient increase in nitric oxide. Biochem Biophys Res Commun. 222(1):27-32.
- [27] Centurion SA, Centurion LM, Souza ME, Gomes MC, Sankarankutty AK, Mente ED, Castro e Silva O. (2007) Effects of ischemic liver preconditioning on hepatic ischemia/reperfusion injury in the rat. Transplant Pro. 39(2): 361-364.
- [28] Smyrniotis V, Theodoraki K, Arkadopoulos N, Fragulidis G, Condi-Pafiti A, Plemenou-Fragou M, Voros D, Vassiliou J, Dimakakos P. (2006) Ischemic preconditioning versus intermittent vascular occlusion in liver resections performed under selective vascular exclusion: a prospective randomized study. Am J Surg. 192(2): 669-674.
- [29] Clavien PA, Selzner M, Rüdiger HA, Graf R, Kadry Z, Rousson V, Jochum W. (2003) A prospective randomized study in 100 consecutive patients undergoing major liver resection with versus without ischemic preconditioning. Ann Surg. 238(6): 843-852.
- [30] Brzozowski T, Konturek PC, Konturek SJ, Pajdo R, Kwiecien S, Pawlik M, Drozdowicz D, Sliwowski Z, Pawlik WW. (2004) Ischemic preconditioning of remote organs attenuates gastric ischemia-reperfusion injury through involvement of prostaglandins and sensory nerves. Eur J Pharmacol. 499(1-2):201-213.