

Deneyisel Olarak Iskemi ve Reperfüzyon Oluşturan Kobaylarda Desferrioksamin (Deferoksamin) ve Süperoksit Dismutaz Kombinasyonunun Karaciğer Dokusu Malondialdehid Düzeyine Etkisi

THE EFFECT OF DESFERRIOXAMINE (DEFEROXAMINE) AND SUPEROXIDE DISMUTASE COMBINATION ON THE LEVELS OF MALONDIALDEHYDE IN THE LIVER TISSUES OF GUINEA PIGS AFTER ISCHEMIA AND REPERFUSION AND EXPERIMENTAL STUDY

Dr.Murat POLAT*, Dr.K.Yalçın POLAT*, Dr.M.Ramazan YİĞİTOĞLU**,
Dr.Müfide AKÇAY*, Dr.Fatih AKÇAY", Dr.Tahsin DEMİRTAŞ*

Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi *Genel Cerrahi ABD, "Biyokimya ABD, ERZURUM

ÖZET

Bu çalışma kapsamına 35 kobay alındı. Kobaylar, herbiri 7 hayvandan oluşan 5 gruba ayrıldı. I. Grupta (kontrol) karaciğer dokusu normal malondialdehid (MDA) düzeyi tespit edildi. II. Gruptaki kobaylarda porta hepatis bağlanılarak 1 saat iskemi + 30 dakika reperfüzyon oluşturulduktan sonra karaciğer dokusunda MDA düzeyi tespit edildi. III. Grupta kobaylarda iskeminin 45. dakikasında 50mg/kg desferrioksamin (deferoksamin-DFR); IV. Gruptaki kobaylarda ise iskeminin 55. dakikasında 5.000 ü/kg süperoksit dismutaz (SOD) vena porta içine verildi. V. Gruptaki hayvanlara aynı dozlarda DFR (45. dakika) + SOD (55. dakika) kombinasyonu uygulandı.

Karaciğer dokusu ortalama MDA düzeyleri (nmol/g. yaş doku) I. Grupta 2.18±0.93, II. Grupta 9.92±1.94, III. Grupta 6.46±2.38, IV. Grupta 5.93±1.25 ve V. Grupta 4.74±1.35 olarak bulundu.

Sonuç olarak karaciğerde oluşan iskemik değişikliklere karşı DFR + SOD kombinasyonunun sadece DFR + SOD kullanımından daha yararlı sonuç verdiği gözlemlendi.

Anahtar Kelimeler: iskemi, Reperfüzyon,
Süperoksit dismutaz

T Klin Gastroenterohepatoloji 1993 4:126-129

Travmadan dolayı yapılan bazı cerrahi müdahalelerde, tümör ameliyatlarında ve karaciğer transplantasyonlarında karaciğere giden kan akımının tam olarak kesilmesi ve cerrahi müdahaleden sonra reper-

Geliş Tarihi: 13.12.1991

Kabul Tarih: 26.11.1992

Yazışma Adresi: Dr.Murat POLAT
Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi
Genel Cerrahi ABD, ERZURUM

SUMMARY

This study was done on 35 guinea pigs. The animals were divided into five groups each of which consisted of 7 animals. In the control group (Group I) normal levels of malondialdehyde (MDA) were determined in the liver tissues of guinea pigs. In Group II, after one-hour ischemia by tying porta hepatis, plus 30 minute-reperfusion the malondialdehyde levels were measured. Desferrioxamine (Deferoxamine-DFR) at a dose of 50 mg/kg (Group III) and superoxide dismutase (SOD) at a dose of 5000 u/kg (Group IV) were administered on the 45th and the 55th min. of ischemia respectively. In Group V, desferrioxamine plus superoxide dismutase were administered on the 45th and the 55th min. of ischemia, respectively. These substances were injected into the portal vein.

Liver MDA levels (nmol/g/wet liver tissue) were found to be 2.18±0.93, 9.92±1.94, 6.46±2.38, 5.93±1.25 and 4.74±1.35 from Group I to V, respectively.

The results have shown that DFR + SOD combination is more effective than only DFR or SOD therapy in the prevention of ischemic liver injury.

Key Words: Ischemia, Reperfusion,
Superoxide dismutase

Turk J Gastroenterohepatol 1993, 4:126-129

füzyonun sağlanması gerekmektedir, iskemi ve reperfüzyonun zararlı etkileri hücre ve hücre elemanlarının fonksiyonlarının bozulmasıyla ilişkilidir, iskemi ve reperfüzyon karaciğer hücre zedelenmesi yapan en önemli nedendir (1-4).

İskemi esnasında ATP; AMP, adenosin, inozin ve sonuça hipoksantine çevrilir. İskemide hipoksantin ve hücre içi kalsiyumda artış olur. Hipoksantin ksantin oksidaz tarafından irreversibl olarak ksantine çevrilir. Kalsiyum endojen ksantin dehidrogenazı ksantin oksidaza

çevirir. Reperfüzyon esnasında reaksiyona oksijenin katılmasıyla son derece toksik ve reaktif maddeler olan oksijen serbest radikalleri (OSR) meydana gelir. Bunlar süperoksit, hidrojen peroksit ve hidroksil maddelerdir (2,3,5,6). Süperoksit normal respiratuar metabolizma esnasında belirdir bir miktarda meydana gelir ve "super-oxide dismutase" (SOD) enzimi tarafından hidrojen peroksit'e çevrilir. Bu ise, glutatyon peroksitaz ve katalaz enzimleriyle suya çevrilir (7). Oksijen serbest radikalleri hücre membranındaki doymamış yağ asitlerini etkileyerek lipid peroksidasyonunu uyarır. Lipid peroksidasyonu esnasında malondialdehid (MDA) bir major yan ürün olarak meydana gelir. Böylece oksijen serbest radikalleri ve doku zararının tesbiti için kullanılabilir (2).

OSR'in meydana getirdiği karaciğer hücre zedelenmesini önlemek için etki mekanizmaları birbirine benzeyen veya farklı olan çeşitli maddeler tek tek veya kombine şekilde kullanılmıştır. Bunlar; katalaz, peroksitaz, α tokoferol, askorbik asit, E vitamini, allopurinol, CV6209, glutatyon, siklosporin ve bazı başka maddelerdir. SOD, OSR temizleyici olarak ve "desferrioxamine-DFR" demiri inhibe etmek için kullanılmıştır (1, 3, 4, 8, 9, 10). Literatürde DFR+SOD kombinasyonunun bu amaçla kullanıldığını belirten çalışma tesbit edilemedi.

Çalışmamızın amacı deneysel olarak iskemi ve reperfüzyon oluşturulan kobaylarda DFR ve SOD ile bu maddelerin birlikte kullanımının karaciğer hücre zedelenmesini önlemeye karşı etkilerini araştırmaktı.

MATERYEL VE METOD

Çalışmamızda 480-640 gr ağırlığında 35 kobay kullanıldı. Oniki saat aç ve susuz bırakıldıktan sonra kobayların tümü eter anestezisiyle uyutuldu ve median insizyonla laparotomi yapıldı. Sağ lobektomi yapılarak inceleme için gerekli olan karaciğer dokusu elde edildi. Çalışma esnasında oda ısısı 5-10 °C arasında tutuldu. Deney hayvanlarını herbih 7 kobaydan oluşan 5 gruba ayırdık.

I. Grupta (kontrol grubu) laparotomiden sonra herhangi bir işlem yapılmadan, normal karaciğer MDA değerlerini tesbit için sağ lobektomi yapıldı.

Diğer dört grupta (grup II-V) porta hepatis ipekle bağlanıp bir saatlik iskemi ve bunu takiben ipek açılıp 30 dakika reperfüzyon yapıldı. Sonra sağ lobektomi yapılarak MDA değerleri tesbit edildi. SOD ve DFR verilen gruplarda (grup III-V) bu maddeler vena portaya, bağlanan kısmın karaciğer tarafından verildi.

II. Grupta 1 saat iskemi ve 30 dakika reperfüzyon uygulanıp, ilaç verilmedi.

III. Grupta iskemi başlangıcından 45 dakika sonra 50 mg/kg DFR (Ciba-Geigy limited Basle, Switzerland) serum fizyolojikle sulandırılarak verildi.

IV. Gruba iskemi başlangıcından 55 dakika sonra 5000 ü/kg SOD (sigma Chemical Co. ST. Louis, MO USA) serum fizyolojikle sulandırılarak verildi.

V. Gruba iskemi başlangıcından 45 dakika sonra 50 mg/kg DFR, 55 dakika sonra 5000 ü/kg SOD verildi.

Karaciğer dokusu soğuk serum fizyolojikle yıkandı. Kapsülü çıkarıldı. Doku soğuk triklorasetik asit (TCA) ile homojenize edildi (1 gr doku + 1 ml / %10 TCA + 8 ml %5 TCA). Bu MDA çalışılana kadar -20 °C'de saklandı. MDA tayininde tiobarbitürik asit (TBA) testi kullanıldı (11). TCA ile homojenize edilmiş doku süspansiyonu 15 dakika süre ile 4000 devir/dk'da santrifüje edildi. Süpernatandan 1 ml alınarak aynı miktarda %0.6 TBA ile karıştırıldı. Bu 100 °C'de 10 dakika ısıtıldı. Buz içinde 5 dak. müddetle soğutuldu ve sonra spektrofotometrede 532 nm'de ölçümler yapıldı. Değerlerin MDA miktarlarına çevrilmesinde 1.56×10^{-4} olan ekstinsiyon katsayısı kullanıldı (2). İstatistiksel değerlendirme için eşleşmez t testi kullanıldı.

SONUÇLAR

Gruplarda tesbit edilen MDA değerleri Tablo T'de ve bu değerlere ait istatistiksel sonuçlar Tablo 2'de sunulmuştur.

Tablo 2'de görülebileceği gibi normal dokuya göre (I. Grup), iskemi + reperfüzyon yapılanlarda (II. Grup) MDA değerlerinde anlamlı bir yükselme tesbit edildi ($p < 0.001$). Grup H'ye göre; Grup III (DFR verilenler), grup IV (SOD verilenler) ve Grup V'de (DFR+SOD ve

Tablo 1. Kontrol ve çalışma grubu kobaylarının karaciğer dokusundan elde edilen MDA değerleri (nmol/g yaş doku)

	I	II	III	IV	V
Kobay No	Normal Karaciğer	iskemi+ Reperfüzyon	iskemi+DFR +Reperfüzyon	iskemi+SOD +Reperfüzyon	iskemi+DFR+ SDO+Reperfüzyon
1	1.38	11.20	2.94	3.12	3.91
2	1.94	7.91	7.63	4.23	3.73
3	2.28	8.52	7.82	6.76	4.52
4	2.46	13.30	9.82	7.23	5.63
5	4.07	9.86	3.97	8.21	6.20
6	1.78	10.30	5.80	6.14	2.81
7	1.35	8.32	7.28	5.85	6.35
x±SD	2.18±0.93	9.92±1.94	6.46±2.38	5.93±1.75	4.74±1.35

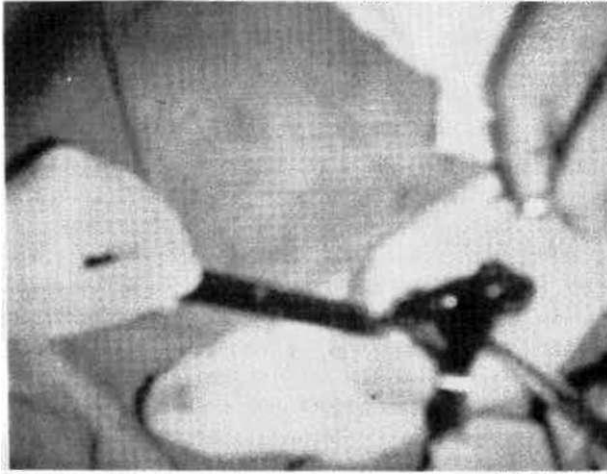
Tablo 2. Çeşitli grupların ortalama MDA değerleri arasında yapılan Student's t-testi sonuçları

Karşılaştırılan Gruplar	t	p
I-II	8.82	<0.001
II-III	2.77	<0.01
II-IV	3.74	<0.001
II-V	5.37	<0.001
III-IV	0.44	>0.05
III-V	1.54	<0.05
IV-V	1.32	>0.05

p>0.05: Anlamsız
p<0.001: Çok anlamlı

p<0.05: Az anlamlı

p<0.01: Anlamlı



Şekil 1.

rlenler) MDA'da anlamlı düşüşler görüldü (sırasıyla p<0.01, p<0.001, p<0.001). Grup IV'de MDA değerleri Grup III'e göre daha düşük bulunmasına rağmen fark istatistik olarak anlamsızdı (p>0.05). Grup V ile III arasında MDA farkı mevcut olup, bu sınırdan anlamlıydı (p<0.05). Grup IV ile V arasındaki MDA değerlerinde anlamsız bir fark vardı (p>0.05). İskemi oluşturulan hayvanlarda en düşük MDA değerini grup V'de tesbit ettik.

TARTIŞMA

İskemi, karaciğer hücre hasarının en sık nedenlerinden birisidir. Karaciğer hasarında reperfüzyon esnasında meydana gelen OSR'nin fonksiyonu hakkında bir çok çalışma vardır (1-7). Bir çalışmada İskemi ve reperfüzyon sonucu karaciğer hücre zedelenmesinin göstergesi olarak serum aspartat transferaz (AST) ve alanin transferaz (ALT) enzimlerinde yükselme, ATP'de düşüş olduğu ve OSR temizleyicisi olarak SOD verilen grupta AST ve ALT'de daha az yükselme, ATP'de daha az düşüş tesbit edilmiştir (13). İskemi ve reperfüzyonla ilgili olarak yapılan diğer çalışmalarda da SOD verilen gruplarda MDA seviyesi daha düşük bulun-

muştur. Böylece hücre zedelenmesinin azaldığı tesbit edilmiştir (3,12,14).

MDA'daki yükselme demir şelat formundaki artışla beraberdir. Hipoksi esnasında ferritinden demir serbestleşmesi artar. İskemi ve reperfüzyon esnasında bunun katalizör etkisi vardır. Desferrioksamin OSR oluşumunda demiri inhibe etmede en etkili maddedir. DFR ile bağlanan demir etkisiz haldedir ve ortamda yeterli DFR varsa demire bağımlı olarak lipid peroksidasyonu oluşmaz (2). OSR ile ilgili çalışmalarda beyin ve myokard iskemi ve reperfüzyonlarında da DFR kullanılarak iyi sonuçlar alınmıştır (1,15,16). Omar ve arkadaşları (12) raflarda karaciğer iskemli-reperfüzyonu yaparak çalışmanın çeşitli dönemlerinde değişik dozlarda DFR vermişlerdir. En iyi sonucu iskemi esnasında 60 mg/kg verince tesbit etmişlerdir.

SOD tek olarak veya diğer ajanlarla birlikte kombine olarak verilebilmektedir (3,14,17).

Biz çalışmamızda bir saatlik iskemi ve 30 dakikalık reperfüzyondan sonra MDA seviyesinde çok anlamlı bir yükselme tesbit ettik. DFR ve SOD ayrı ayrı verildiğinde yalnız iskemi-reperfüzyon yapılan gruba göre MDA'da anlamlı bir düşüş vardı. Bu bulgular literatürde uyumluydu. DFR ve SOD kombinasyonunun tek başına DFR veya SOD verilmesine göre karaciğer dokusu MDA düzeyini daha çok düşürdüğü görüldü. Yaptığımız literatür taramasında karaciğer iskemi ve reperfüzyonlarında sadece DFR veya SOD kullanılmasına rastlamamıza rağmen bu iki maddenin kombinasyonunu kullanan herhangi bir yayına rastlayamadık. Çalışmamızda DFR ve SOD'nin karaciğer iskemileri üzerine sinerjistik etkiye sahip oldukları saptadık.

KAYNAKLAR

1. Nodström G, Seeman T, Hasselgren P. Beneficial effect of allopurinol in liver ischemia. *Surgery* 1985; 97 (6):679-83.
2. Omar R, Nomikos I, Piccorelli G, Savino J, Agarwal N. Prevention of postischaemic lipid peroxidation and liver cell injury by iron chelation. *Gut* 1989; 30:510-14.
3. Flye MW, Yu S. The synergistic effect of superoxide dismutase and adenosine triphosphate-MgCfe on acute hepatic ischemia. *Transplant Proc* 1987; 19:1324-26.
4. Fukuoka T, Nakajima Y, Matsumoto M, Segawa M, Kanehira H, Hisanaga M, Wada T, Nakano H. Effect of a platelet activating factor antagonist (CV6209) on shock caused by temporary hepatic inflow occlusion. *Life Sciences* 1990; 47(6):565-70.
5. Ak A, Oto A. Oksijen serbest radikalleri ve kalp hastalıkları. *Türkiye Klinikleri Kardiyoloji Dergisi* 1988; 1:35-39.
6. McCord JM. Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. *N Eng J Med* 1985; 312 (3):159-163.
7. Omar RA, Yano S, Kikkawa Y. Antioxidant enzymes and survival of normal and SV40-transformed mouse embryo cells after hyperthermia. *Cancer Res* 1987; 47:3473-76.

8. Höglström H, Haglund U: Neutropenia prevents decrease in strength of rat intestinal anastomosis: Partial effect of oxygen free radical scavengers and allopurinol. *Surgery* 1986; 99 (6):716-720.
9. Hayashi T, Nagasue N, Kohno H, Chang YC, Galizia G, Nakamura T: Evidence that cyclosporine pretreatment protects lysosomal membrane in liver ischemia in dogs. *Transplantation* 1988; 47(5):924-6.
10. Nordstrom G, Säljö A, Li S, Haseigren PO. Effects of ischemia and reperfusion on protein synthesis in livers with different glutathione levels. *Ann Surg* 1990; 211 (1):97-102.
11. Pompelia A, Maellaro E, Casini AF, Feralli M, Ciccolli L, Comporti M. Measurement of lipid peroxidation in vivo. *Lipids* 1987; 22:206-11.
12. Ertaş E, Atamanalp SS, Bulut T, Polat KY, Kuşay S, Ören D. İskemi ve reperfüzyon sonrası karaciğer dokusunda malondialdehid değeri ve süperoksid dismutazın etkisi. *T Klin Gastroenterohepatoloji* 1991 ; 2(2):139-142.
13. Romani F, Vertemati M, Frangi M, Aseni P, Monti R, Codeghini A, Belli L. Effect of superoxide dismutase on liver ischemia reperfusion injury in the rat: A biochemical monitoring. *Eur Surg Res* 1988; 20:335-340.
14. Atalla S, Toledo PLH, Mac Kenzie GH, Gadero JP. Influence of oxygen-driven free radical scavengers on ischemic livers. *Transplantation* 1985; 40:584-590.
15. Yağ ME. İzole sıçan kalbinde hipotermik, şimik kardioplejik ile uygulanan deforoksamini myokardı korumaya katkısı. Uzmanlık tezi, İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi Göğüs Kalp Damar Cerrahisi ABD, 1989.
16. Holt S, Gunderson M, Joyce K. Myocardial tissue iron delocalization and evidence for lipid peroxidation after two hours of ischemia. *Ann Emerg Med* 1986; 15:1155-59.
17. Weisiger RA. Oxygen radicals and ischemic tissue injury. *Gastroenterology* 1986; 90:494-496.