

İskemi ve Reperfüzyon Sonrası İnce Barsak Mukozasında Malondialdehid Değeri ve Süperoksid Dismutaz Etkisi

MALONDIALDEHYDE CONTENT IN THE MUCOSA OF THE SMALL-INTESTINE AND EFFECT OF SUPEROXIDE DISMUTASE AFTER ISCHEMIA AND REPERFUSION

Yard.Doç.Dr.Ertuğrul ERTAŞ*, Dr.S.Selçuk ATAMANALP*,
Dr.Türker BULUT***, Dr.Sevinç KUŞKAY**, Doç.Dr.Durkaya ÖREN*

* Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Genel Cerrahi, "Biyokimya ABD, ERZURUM
•"Mareşal Çakmak Askeri Hastanesi Genel Cerrahi Kliniği, ERZURUM

ÖZET

Bu deneysel çalışmada isketni ve reperfüzyon uygulanan barsak mukozasındaki hasarın bir göstergesi olarak, bir lipid peroksidasyon ürünü olan malondialdehid (MDA)'in mukozal miktarı ve bir oksijen serbest radikal temizleyicisi olan süperoksid dismutaz (SOD)'ın etkisi araştırıldı. İnce barsakların yaklaşık %50'si bağlanarak bir saat süre ile iskemi, daha sonra 30 dakika süre ile reperfüzyon uygulanan deneysel bir kobay modeli kullandık. Mukozal MDA miktarı, yalnız iskemi ve reperfüzyon uygulanan grupta (n = 10) ortalama 3.42 ± 0.83 nmol/gr yaş doku olarak bulundu ($t = 2.08$, $p > 0.05$). Bu veriler intravasküler SOD injeksiyonunun, mukozal MDA birikimini azalttığı ve iskemi reperfüzyona bağlı mukozal hasarı önlediği görüşünü desteklemektedir.

Anahtar Kelimeler: İntestinal iskemi-reperfüzyon, Lipid peroksidasyonu, Süperoksid dismutaz

TKlin Gastroenterohepatoloji 1991,2:160-164

İçinde iskeminin de bulunduğu değişik patolojik durumlarda ortaya çıkan doku hasarının, oksijen serbest radikalleri (OSR) ile ilişkili olduğu bilinmektedir (1,2,3,4,5,6,7). Oksijen serbest

Geliş Tarihi: 22.3.1991

Kabul Tarihi: 23.5.1991

Yazışma Adresi: Yard.Doç.Dr.Ertuğrul ERTAŞ
Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Genel
Cerrahi ABD, ERZURUM

SUMMARY

In this experimental study the mucosal content of malondialdehyde (MDA), a lipid peroxidation product, as a parameter of ischemia and reperfusion-induced intestinal mucosal damage, and the effect of superoxide dismutase (SOD), an oxygen free radical scavenger were investigated. We used a guinea pig experimental model in which ligated about 50% of the small-intestine was subjected to ischemia for 1 hour, and then reperfusion for 30 minutes. The MDA content in the mucosa was found mean 4.46 ± 1.36 nmol/g wet tissue in the group in which ischemia and reperfusion were subjected alone (n = 10), while mean 3.42 ± 0.83 nmol/g wet tissue in the group in which intraaortic injection of SOD was subjected together with ischemia and reperfusion (n = 10) ($t = 2.08$, $p < 0.05$). These data support a concept that intravascular injection of SOD may reduce the mucosal MDA accumulation and may prevent the mucosal damage due to ischemia and reperfusion.

KeyWords: Intestinal ischemia-reperfusion. Lipid peroxidation. Superoxide dismutase

Turk J Gastroenterohepatol 1991, 2:160-164

radikalleri (OSR); hidrojen peroksid (H_2O_2), hidroksil (OH) ve süperoksid (O_2)'dir. Bunlar, iskemi sonrasında, moleküler oksijenin hücreye bol miktarda girdiği reperfüzyon esnasında, moleküler oksijenin suya indirgenmesi sonucu ortaya çıkan son derece toksik ve reaktif maddelerdir (1,3,4,6,8).

Organizmada OSR'nin birçok potansiyel kaynağı vardır (4). Hipoksantin (HX) ve ksantin oksidaz (XO), bunların başlıcalarıdır. İskemide

hücrede ATP hızla AMP'ye yıkılır. Bunu, AMP'nin adenosin, inozin ve HX katabolizması izler (4,8,9,10,11). Hücrede ATP azalması sonucu hücre içi kalsiyum konsantrasyonu artar ve kalsiyumun aktif ettiği protcaz, endojen ksantin dehidrogenazı, XO'a çevirir (8,12). Sonuçta XO, substratı olan HX ile birleşerek OSR oluşumuna neden olur (5,7,13,14,15,16). Bu konuda sözü edilen diğer bir faktör nötrofil infiltrasyonudur ve iskemide nötrofil infiltrasyonunun arttığı gösterilmiştir (17,18). Artan nötrofil aktivasyonu, trombosit aktive edici faktör (PAF) ve fosfolipaz A2 gibi diğer potansiyel ajanları da artırarak OSR yapımını hızlandırır (2,19).

OSR, organizmada protein, lipid ve nükleik asit gibi maddelerle etkileşerek hücre yapı ve fonksiyonlarında önemli hasarlara neden olur. Bunlar arasında OSR'nin hücre zar yapısındaki çok doymamış yağ asitlerini etkileyerek lipid peroksidasyonunu uyarması en önemlisidir. Lipid peroksidasyonu, lipid hidroperoksidlerinin, aldehid ve diğer karbonil bileşiklere dönüşmesi ile sona erer. Sonuçta ortaya çıkan aldehidlerin sitotoksik etkilerinin olduğu bilinmektedir (4). Malondialdehid (MDA)'de bunlardan biridir ve miktarı, tiobarbitürik asit testi ile tayin edilebilir (20).

OSR'nin meydana getirdiği doku hasarını önlemek için çok çeşitli ajanlar (oksijen serbest radikal temizleyicileri) kullanılmıştır. Bunların başlıcaları çeşitli enzimatik (süperoksid dismutaz, glutatyon peroxidaz, katalaz) ve non enzimatik (glutatyon, allopurinol, hidrokortizon, mannitol) antioksidanlardır. (1,2,3,4,5,6,7,8,9).

Bu çalışmada, kobay ince barsak mukozasında iskemi ve reperfüzyon sonrasında ortaya çıkan ve bir lipid peroksidasyon ürünü olan malondialdehid (MDA) değerleri, iskemik mukozal hasarın bir göstergesi olarak ölçülmekte ve bir OSR temizleyicisi olan süperoksid dismutaz (SOD)'ın buna etkisi araştırılmaktadır.

MATERYEL VE METOD

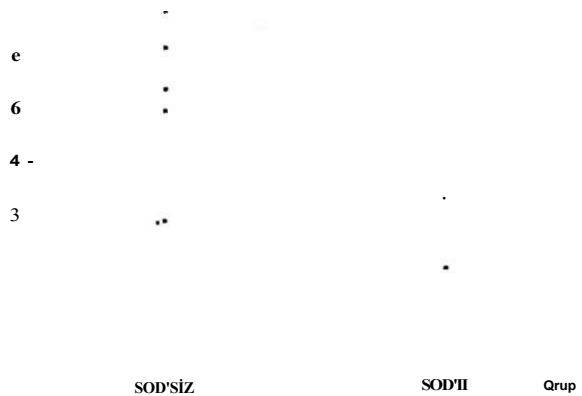
Bu çalışmada ağırlıkları 440-560 g arasında değişen 20 dişi kobay kullanıldı. Altı saatlik bir açlık süresini takiben kobaylara eter anestezisi altında median insizyonla laparotomi yapıldı. İnce barsaklar antimezenterik yüzden ölçülerek, yaklaşık %50'si devaskülarize edilecek şekilde mezenterdeki damarlar 2/0 ipek ile bağlandı. Bir saatlik devaskülarizasyonu takiben kontrol grubunu oluşturan 10 kobayda mezenter damarlardaki ipek açılarak revaskülarizasyon sağlandı. Çalışma grubunu oluşturan diğer 10 kobayda ise önce aorta

abdominalise, diafragmanın hemen altında olmak üzere 5000 U/kg hesabı ile süperoksid dismutaz (Sigma, USA) verildi ve daha sonra mezenter damarlardaki ipek açıldı. Otuz dakikalık bir revaskülarizasyondan sonra iskemi oluşturulan ince barsak segmenti rezeke edilerek çıkartıldı. İnce barsak segmenti buzla soğutulmuş serum fizyolojikle yıkılarak barsak muhtevası uzaklaştırıldı. Barsak lümeni mezenterden ayrıldı ve mukozaya kürete edildi. Mukozaya örneği buzda soğutulmuş triklorasetik asit (TCA) ile homojenize edildi (1 g doku + 1 ml %10 TCA + 8 ml %5 TCA). Oluşan süspansiyon, malondialdehid (MDA) tayini yapılmaya kadar -20°C'de saklandı. MDA tayininde tiobarbitürik asit (TBA) testi kullanıldı (20). TCA ile homojenize edilmiş doku süspansiyonu 15 dakika süre ile 4000 devir/dk'da santrifüje edildi. Çökeltiden 1 ml alınarak aynı miktarda %0.6 TBA ile karıştırıldı ve karışım 100°C'de 10 dakika ısıtıldı. Daha sonra spektrofotometrede 532 nm'de ölçümler yapıldı. Elde edilen değerlerin MDA miktarına çevrilmesinde 1.56×10^{-6} olan ekstinsiyon katsayısı kullanıldı. Sonuçların istatistiksel değerlendirilmesinde Student's t testi kullanıldı.

SONUÇLAR

Kontrol grubunu oluşturan 10 kobaya ince barsak mukozasındaki ortalama malondialdehid (MDA) değeri 4.46 ± 1.36 nmol/g yaş doku olarak bulunurken, çalışma grubunu oluşturan ve süperoksid dismutaz (SOD) verilen diğer 10 kobayda bu değer ortalama 3.42 ± 0.83 nmol/g yaş doku olarak bulundu. Aradaki fark istatistiksel olarak önemli derecede idi ($t = 2.08$, $p < 0.05$). Her iki grupta ince barsak mukozasındaki MDA değerleri Şekil 1'de gösterilmiştir.

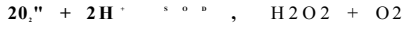
^ MDA (nmol/g yaş doku)



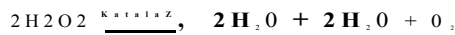
Şekil 1. SOD verilmeyen kontrol grubundaki ve SÜD verilen çalışma grubundaki kobayların ince barsak mukozasındaki MDA değerlerinin dağılımı.

TARTIŞMA

Süperoksid dismutaz (SOD), süperoksid (O₂)'e spesifik bir oksijen serbest radikal (OSR) temizleyicisidir ve süperoksid radikalini, hidrojen peroksid ile moleküller oksijene çevirir.



Dolayısıyla OSR birikimini ve lipid peroksidasyonunun başlamasını önler (8,21). İskemik dokuda bir yandan OSR yapım artarken, diğer yandan SOD'nin baskılandığı gösterilmiştir (8). Bu durum iskemide ortaya çıkan doku hasarının önlenmesi için eksojen olarak SOD verilmesi gerektiğini ortaya çıkarmaktadır. Nitekim Delmaestro ve ark. (13,22) tarafından yapılan deneysel çalışmalar, iskemide doku hasarının bir komponenti olan mikrovasküler perméabilité artışının, intravasküler SOD verilmesi ile azaltılabileceğini göstermiştir. Benzer şekilde Granger ve ark. (15)'nin yaptıkları deneysel çalışmada aynı sonuçlar bulunmuştur. Buna benzer bir başka deneysel çalışma Stein ve ark. (6)'da bu sonuçları doğrulayan çalışmalar yapmışlardır. Diğer yandan, ince barsak iskemisi ve reperfüzyonu üzerine deneysel bir çalışma yapan Olamiri (4), intravasküler SOD verilmesi ile lipid peroksidasyonunun azaltılabileceğini, bir yıkım ürünü olan malondialdehid (MDA)'in mukozal miktarındaki azalma ile ortaya koymuştur. Biz de yaptığımız bu çalışmada, iske mi ve reperfüzyon uyguladığımız ince barsak mukozasında, intravasküler SOD injeksiyonu ile, MDA miktarının önemli ölçüde azaltılabileceğini ve lipid peroksidasyonunun, dolayısı ile OSR'nin neden olduğu mukozal hasarın önenebileceğini gördük. Bilindiği gibi hidrojen peroksid (H₂O₂)'de bir OSR'dir ve hidroksil (OH)'e çevrilmek suretiyle zararlı etkiler yapabilmektedir. Bu nedenle SOD'nin tek başına her zaman yeterli olmayabileceği de düşünülmektedir (21). Dolayısıyla H₂O₂'i parçalayarak birikime engel olan katalaz ve glutatyon peroksidaz (GPO) enzimlerine de ihtiyaç duyabilir (2).



İskemide bu iki enzimin de baskılandığı gösterilmiştir (8,21). Nitekim Högsröm ve ark. (2)'nin yaptıkları deneysel bir çalışmada intravasküler SOD ile birlikte katalaz verilmesi sonucu, iskemik mukozada direncin %50 oranında arttığı gösterilmiştir. Benzer şekilde Delmaestro ve ark. (13,22),

yaptıkları deneysel çalışmalarda intravasküler katalaz verilmesi ile mikrovasküler perméabilité artışının azaltılabileceğini ortaya koymuşlardır. Aynı şekilde, glutatyon veya GPO verilmesi ile de iskemik hasarın azaltılabileceği bildirilmiştir (21).

Sonuç olarak, iske mi ve reperfüzyon sonrasında dokuda OSR yapımının arttığı ve SOD'nin baskılandığı bilinmektedir. Bu çalışmada, iske miye maruz bırakılan ince barsak mukozasındaki hasarın, reperfüzyon öncesi verilen İntravasküler SOD ile azaltılabileceği gösterilmiştir. Literatürde de desteklenen bu görüş, çeşitli nedenlere bağlı intestinal iske mi sonucu cerrahi tedavi geçiren hastalarda iskemik barsak anslarının canlılığının devamı ve iskemik barsak anastomozlarının direncinin artırılması konularında ilk adımlardan biri olabilir.

KAYNAKLAR

1. Bulkley GB: The role of oxygen free radicals in human disease process Surgery 1983, 94:407-11.
2. Högsröm II, Haglund Ü: Neutropenia prevents decrease in strength of rat intestinal anastomosis. Surgery 1986, 99:71J6-20.
3. McCord JM: The superoxide free radical: Its biochemistry and pathophysiology. Surgery 1983, 94:412-4.
4. Otamiri T: Oxygen radicals, lipid peroxidation, and neutrophil infiltration after small-intestinal ischemia and reperfusion. Surgery 1989,105:593-7.
5. Parks DA, Bulkley GB, Granger DN: Role of oxygen free radicals in shock, ischemia, and organ preservation. Surgery 1983, 94:428-32.
6. Parks DA, Granger DN, Bulkley CB: Superoxide radicals and mucosal lesions of the ischemic small intestine. Fed Proc 1982,41:1742.
7. Stein HJ, Esplugues J, Whittle BJR, Bauerfeind P, Hinder RA, Blum AL: Direct cytotoxic effects of oxygen radicals on the gastric mucosa. Surgery 1989,106:318-24.
8. McCord JM: Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. N Eng J Med 1985, 312:159-63.
9. Brawn K, Pridovich I: Superoxide radical and superoxide dismutases: Threat and defense. Acta physiol Scand 1980, 492:9-18.
10. Cunningham SK, Keaveny TV: Splanchnic organ adenine nucleotides and their metabolites in hemorrhagic shock. Ir J Med Sci 1977,146:136-43.
11. Smith SM, Grisham MB, Mancini EA, Granger DN, Kvietys PR: Gastric mucosal injury in the rat. Role of iron and xanthine oxidase. Gastroenterology 1987, 92:956.
12. Otamiri T, Sjudahi R, Tagesson C: Lysophosphatidylcholine potentiates the increase in mucosal permeability after small intestinal ischemia. Scand J Gastroenterology 1986,21:1131-6.

13. Delmaestro RF, Bjork J, Arfors KIE: Increase in microvascular permeability induced by enzymatically generated free radicals I. *Microvasc Res* 1981, 22:239-54.
14. Fridovich I: Quantitative aspects of the production of superoxide anion radical by milk xanthine oxidase. *J Biol Chem* 1970, 245:4053-7.
15. Granger DN, Rutili G, McCord JM: Superoxide radicals in feline intestinal ischemia. *Gastroenterology* 1981, 81:22-29.
16. Ley K, Arjos KE: Changes in macromolecular permeability by intravascular generation of oxygen deprived free radicals. *Microvascular Res* 1982, 24:25-33.
17. Grisham MB, Hernandez LA, Granger DN: Xanthine oxidase and neutrophil infiltration in intestinal ischemia. *Am J Physiol* 1986, 251:9567-74.
18. Otamiri T, Lindahl M, Tagesson C: Phospholipase A-2 inhibition prevents mucosal damage associated with small intestinal ischemia in rats. *Gut* 1988, 29:489-94.
19. Rossi F, Dri P, Bellavite P, Zabucchi B, Berton G: Oxidative metabolism of inflammatory cells. In Weissman G, Samuclsson B, Paoletti R. eds. *Advances in inflammation research*. V 1. New York. Raven press 1979, 139-55.
20. Pompelia A, Maellaro II, Cosini AF, Ferali M, Ciccoli C, Comporti M: Measurement of lipid peroxidation in vivo: A comparison of different procedures. *Lipids* 1987,22:206-11.
21. Maza S, Frishman WII: Therapeutic options to minimize free radical damage and thrombogenicity in ischemic/reperfused myocardium. *Ani Heart J* 1987, 114:1206-15.
22. Delmaestro RF, Bjork J, Arfors Kit: Increase in microvascular permeability induced by enzymatically generated free radicals I. *Microvasc Res* 1981, 22:255-70.