

Hiperbarik Oksijen ve Oksidatif Stres: Sıçan Akciğerinde Yapılan Karşılaştırmalı Bir Çalışma

HYPERBARIC OXYGEN AND OXIDATIVE STRESS: A COMPARATIVE STUDY IN RAT LUNG

Şükür ÖTER*, Ahmet KORKMAZ*, Muhittin A. SERDAR**, Cüneyt GÖKSOY***,
Fatih ÖZÇELİK****, Hayati BİLGİÇ*****

* Yrd.Doç.Dr., Gülhane Askeri Tıp Akademisi Fizyoloji AD,
** Yrd.Doç.Dr., Gülhane Askeri Tıp Akademisi Biyokimya AD,
*** Doç.Dr., Gülhane Askeri Tıp Akademisi Biyofizik BD,
**** Dr., Gülhane Askeri Tıp Akademisi Biyokimya AD,
***** Prof.Dr., Gülhane Askeri Tıp Akademisi Fizyoloji AD, ANKARA

Özet

Amaç: Bazı araştırmacılar, endikasyon alanını her geçen gün genişleten Hiperbarik oksijen (HBO₂) uygulamalarının, bilinen faydalarının yanında, lipid peroksidasyonuna neden olarak oksidatif stres oluşturabileceğini bildirmiştir. Bu iddialara rağmen literatürde HBO₂'nin ne oranda oksidatif stres oluşturduğuna yönelik kapsamlı bir araştırmaya rastlanmamıştır. Bu araştırmada HBO₂ uygulamalarının oksidatif stres oluşturup oluşturmadığı, şayet oluşturmuşsa bunun ciddi düzeylerde olup olmadığı konusuna açıklık getirilmeye çalışıldı.

Yöntem: Araştırma için HBO₂ uygulamalarına en açık organ olan akciğerler seçilerek, meydana gelen lipid peroksidasyonunu saptamak amacıyla tiyobarbitürik asit reaktif substans (TBARS) düzeyi ve antioksidan savunma mekanizmalarının ne ölçüde harekete geçtiğini görmek açısından süperoksit dismutaz (SOD) ve katalaz (CAT) aktiviteleri ölçüldü.

Bulgular: CAT aktivitesi irdelendiğinde, gerek HBO₂, gerek normobarik O₂, gerekse hiperbarik havanın uygulandığı gruplarda anlamlı artışlar görüldü. SOD aktivitesinin ise bu artışa eşlik etmediği gözlemlendi. TBARS düzeylerinde ise hem hiperbarik O₂, hem de normobarik O₂ grubunda anlamlı artışlara rastlandı. Ayrıca HBO₂'nin hiperbarik havaya göre anlamlı derecede fazla peroksidasyona yol açtığı görüldü.

Sonuç: HBO₂'nin oluşturmuş görüldüğü oksidatif strete uygulanan saf O₂'nin oldukça büyük bir rolü olduğu, hiperbarik havanın ise HBO₂ ile oluşan etkilere hiç bir katkısı olmadığı veya böyle bir katkının ihmal edilebilir derecede düşük seviyede olduğu kanısına varıldı.

Anahtar Kelimeler: Hiperbarik Oksijen, Süperoksit Dismutaz, Katalaz, TBARS

T Klin Tıp Bilimleri 2001, 21:449-454

Summary

Purpose: Nearby the known benefits of hyperbaric oxygen (HBO₂) therapy, some investigators have notified that HBO₂ may cause oxidative stress by inducing lipid peroxidation. In spite such of suggestions, a comprehensive investigation, which inquires the amounts of HBO₂ induced oxidative stress, couldn't be found in literature. This study was performed to investigate whether HBO₂ may induce oxidative stress at serious levels or not.

Methods: The lung was chosen as the target organ which is most affected by HBO₂ exposure, TBARS (thiobarbituric acid reactive substans) test was used to measure lipid peroxidation and superoxide dismutase (SOD) plus catalase (CAT) activity were determined to define the state of antioxidant defense systems.

Results: All three groups, including hyperbaric O₂, normobaric O₂ and hyperbaric room air resulted with significant increases of CAT activity. TBARS levels also showed significant increases in both, hyperbaric and normobaric O₂ groups. In addition, it was observed that hyperbaric O₂ caused significantly more lipid peroxidation than hyperbaric room air. On contrary, SOD activity didn't increase significantly.

Conclusion: As a result, these findings suggest that pure O₂ has a more considerable role in oxidative stress, caused by HBO₂, than hyperbaric conditions.

Key Words: Hyperbaric Oxygen, Superoxide Dismutase, Catalase, TBARS

T Klin J Med Sci 2001, 21:449-454

Geliş Tarihi: 16.10.2000

Yazışma Adresi: Dr.Şükür ÖTER
Gülhane Askeri Tıp Akademisi
Fizyoloji AD,
06018 Etlik, ANKARA

Çalışma Dr. Şükür Öter'in uzmanlık tezinden alınmıştır.

T Klin J Med Sci 2001, 21

Aerobik yaşam, serbest radikallerin devamlı olarak üretilmesi ve bunların benzer bir hızla antioksidanlar tarafından ortadan kaldırılmasıyla karakterizedir. Sürekli devam eden bu oluşum-inaktivasyon dengesi oksidanlar lehine bozulacak olursa, serbest radikaller organizmada akla gelebilecek hemen her yapı ile etkileşerek zararlı etkilere yol açarlar (1).

Günümüz tıbbında hiperbarik oksijen (HBO₂) uygulamaları, birçok hastalığın tedavi ve yardımcı tedavisinde yaygın olarak kullanıma girmiş bulunmaktadır (2). HBO₂'nin bu yaygın kullanımı ve bildirilen yararlarına rağmen, 2 ATA'nın ('atmosphere absolute') üzerindeki hiperbarik şartların - zaten aerobik hayatın bir zorunluluğu olan - serbest oksijen radikali üretiminde artışa yol açarak, oksidatif strese neden olduğu yönünde görüşler de mevcuttur (3,4). Genel olarak 1.5-2 ATA'daki HBO₂ güvenilir bir doz olarak kabul edilmekte ve gerek deney hayvanları gerekse insanlar tarafından iyi tolere edilmektedir. 1.5 ATA'da ve 40-60 dakikalık uygulamalarda hiç bir zararlı etki görülmemiştir. Bununla birlikte çoğu endikasyon alanları 2 ATA'dan yüksek ve 1 saatten uzun süreli uygulamalar gerektirmektedir (5,6). Dolayısıyla bazı vakalarda HBO₂ uygulamaları sonucu serbest radikal oluşumuna bağlı değişiklikler bildirilmiştir (7,8).

Bu bilgiler ışığında görülüyor ki, tıp dünyasında kullanımını gittikçe yaygınlaşan HBO₂ tedavisi, uygulama sırasında oluşan reaktif oksijen türevleri ve bunlar tarafından indüklenen lipid peroksidasyonu gibi bazı zararlı yan etkiler nedeniyle halen araştırılmaya açık bir saha oluşturmaktadır. Ve belki de HBO₂ konusunda araştırılması gereken en önemli nokta, söz konusu serbest oksijen radikalleri ile bunların doku düzeyleri ve etkileşimleridir.

HBO₂ tedavisi sonucu serbest radikal üretiminde oluşabilecek olan artışın direkt olarak ölçümü, radikallerinin son derece kısa ömürlü bileşikler olmaları nedeniyle oldukça zordur. Doğrudan ölçüm yerine tercih edilen yöntemler, genel olarak oksijen radikallerinin yer aldıkları mekanizmalarda rol alan çeşitli bileşiklerin düzeyindeki değişikliklerin incelenmesine dayanmaktadır. Süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), hemoglobin, sitokromlar gibi çeşitli serbest radikal tutucuların düzeylerindeki değişiklikler serbest radikallerin düzeyi ile ilgili dolaylı bilgi sağlar (9,10). Serbest radikallerin neden olduğu biyolojik hasar ile ilgili çalışmaların büyük bir çoğunluğu ise lipid peroksidasyonu üzerinde yoğunlaşmıştır. Lipid peroksidasyonu ile ilgili yöntemlerde çeşitli ara bileşiklerin ve son ürünlerin düzeyleri ölçülür (11).

Bu çalışmada, HBO₂'nin sıçanlarda oluşturduğu oksidatif stresin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla, çalışmanın yapılacağı dokunun, HBO₂ uygulamalarına en açık ve en çok etkilenen doku olan akciğer olması kararlaştırıldı (12); yukarıdaki bilgiler doğrultusunda, HBO₂'ye maruz bırakılan sıçanlarda, akciğerde oluşan lipid peroksidasyonu düzeyinin tayini için tiyobarbitürik asit reaktif substans (TBARS), antioksidan cevabın derecesinin belirlenmesi için ise süperoksit radikale (O₂⁻) karşı oluşan SOD ve hidrojen peroksit (H₂O₂) ile savaşılan CAT düzeylerinin ölçümü ile, HBO₂ kaynaklı oksidatif stres konusunun iyi bir ölçüde aydınlatılabileceği görüşü kuvvet kazandı.

Gereç ve Yöntem

Araştırmaya objektif bir bakış açısı kazandırmak için halen hiperbarik tedavi merkezlerinde uygulanmakta olan

Tablo 1. Uygulama Grupları

	Grup A	Grup B	Grup C	Grup D
Hayvan sayısı	n = 8	n = 8	n = 8	n = 8
Uygulanan gaz	%100 O ₂	Hava	%100 O ₂	-
Basınç	3 ATA	3 ATA	1 ATA	-
Seans süresi	120 dk	120 dk	120 dk	-

en uzun süreli ve en yüksek basınca [2 saat süreyle 3 ATA (5,6)] maruz bırakılan deney grubundan elde edilen bulgular, naive, normobarik oksijen ve hiperbarik hava uygulamalarını kapsayan üç ayrı kontrol grubu ile karşılaştırılarak, HBO₂ ile oluşabilecek olası bir oksidatif streste hiperbarik ortam ve saf oksijene bağlı değişiklikler elimine edilmeye çalışıldı.

Deney Grupları: Çalışmada 32 adet Sprague-Dawley (SD) türü yetişkin erkek sıçan kullanıldı. Sıçanlar 'basit rastgele örnekleme' yöntemiyle 4 eşit gruba ayrıldı (Tablo-1).

1) DENEY GRUBU (Grup A): Bu gruba 3 ATA basınç altında, 2 saat süreyle, tek seans %100 oksijen uygulandı. Gerek 3 ATA'lık basınç, gerekse 2 saatlik süre, tedavide uygulanmakta olan HBO₂ prosedürlerinin maksimum sınırlarını oluşturmaktadır (5,6). Bu grup ile normal bir tedavi seansı sırasında maruz kalmabilecek en üst düzeydeki HBO₂'nin oluşturabileceği oksidatif stres derecesinin ortaya çıkarılması amaçlandı.

2) BİRİNCİ KONTROL GRUBU (Grup B): Yine 3 ATA basınç altında, 2 saat süreyle, tek seans, fakat bu defa oksijen yerine normal atmosfer havası uygulanarak, bir önceki grupta belirlenebilecek olası bir oksidatif stres varlığında, bu durumun daha çok oksijenden mi yoksa hiperbarik ortamdaki mi kaynaklandığını ayırt etmemize olanak sağlayacak olan grup.

3) İKİNCİ KONTROL GRUBU (Grup C): 2 saat süreyle tek seans %100 oksijen uygulamasına maruz bırakılarak, Grup B'deki olası bir oksidatif stresin, hiperbarik şartlardan bağımsız olarak, yalnızca saf oksijene bağlı olup olmadığının değerlendirilmesi amacıyla oluşturulan grup.

4) ÜÇÜNCÜ KONTROL GRUBU (Grup D): Normal düzeylerin belirlenmesi için hiç bir uygulamaya maruz bırakılmayan 'naive' grup.

Yüksek Basınç Uygulamaları: Hiperbarik uygulamalar için 6 ATA basınca dayanıklılığı test edilmiş silindirik biçimdeki bir yüksek basınç odası ('hyperbaric chamber') kullanıldı. Hayvanlar chamber'e yerleştirildikten sonra ortam öncelikle verilecek gaz ile yıkandı. Bu arada, hayvanların ventilasyonu sonucunda ortamda birikebilecek karbondioksiti tutması için, chamber içine 'soda lime' olarak adlandırılan absorbe edici granüller konuldu (13). Daha sonra chamber kapatılarak iç basıncın uygulanacak değere

kadar dakikada 1 atm basıncı geçmeyecek hızda yükselmesi sağlandı (14). Uygulama basıncına ulaşıncaya chamber'e giren ve çıkan gaz miktarı 1.5-2 l/dk'lık bir akım şiddetinde sabitlenerek süre tutulmaya başlandı (15). Normobarik oksijen verilen C grubu hayvanları da yine aynı akım şiddeti altında, fakat bu sefer chamber içerisindeki basınç sabit tutularak, tarif edilen uygulamaya tabi tutuldu. Seans bitiminde basınç yine aynı hızda düşürülerek normal atmosfer basıncı ile eşitlendi ve hayvanlar chamber'den çıkarıldı.

Anestezi ve Doku Preparasyonu: İntraperitoneal ketamin (20-40 mg/kg) + ksilazin (4-8 mg/kg) anestezisi altında (15), hayvanların göğüs boşluğu açılarak akciğerlerin ortaya çıkması sağlandı. Akciğer çıkarıldıktan sonra soğuk SF içerisinde yıkanarak dışındaki kan artıklarından arındırıldı ve önceden etiketlenmiş ependorf tüpleri içerisine konularak -40°C'de saklanmak üzere derin dondurucuya yerleştirildi.

Dokuların Homojenizasyonu: Derin dondurucudan çıkarılan dokuların çözünmeleri sağlandıktan sonra 50 mM 'fosfat tampon' ile 1/9 hacim oranında karıştırılarak "IKA - Ultra-Turrax T25" model homojenizatör ile homojenize edildi. Elde edilen homojenat, +4°C'de ve 7000 devirde 10 dakika süreyle, santrifüj edilerek süpernatantları alındı ve spontan oksidasyonu engellemek için, 1/50 oranında EDTA (etilen-diamin-tetra-asetik asit) eklenerek yeniden temiz ependorflara kondu. [Fosfat tampon; distile sudaki 6.8 g/l oranındaki KH₂PO₄ çözeltisi üzerine, pH 7.4 olana kadar yine distile suda 7.1 g/l oranında çözünmüş Na₂HPO₄ ilave edilerek hazırlandı.]

Biyokimyasal Analizler: CAT aktivitesi, CAT'ın hidrojen peroksiti (H₂O₂) nötrale etme özelliğine dayanan, Aebi'nin yöntemi ile hesaplandı (16). SOD aktivitesi ise Heikkilä ve ark'ın, SOD'un substratı olan 6-hidroksidopaminin inhibisyon hızının ölçümüne dayanan, yöntemi ile ölçüldü (17). Bu yöntem ağırlıklı olarak sitozolik fraksiyonda bulunan 'Cu,Zn SOD' düzeylerini göstermektedir.

Meydana gelen lipid peroksidasyonunun belirlenmesi için, bu amaçla yaygın olarak kullanılan, 'tiyobarbitürik asit reaktif substans' (TBARS) testi kullanıldı [sekronize fluorimetrik yöntem (18)].

Bunlara ek olarak Lowry'nin yöntemiyle doku protein düzeyleri de ölçülerek (19) CAT aktivitesi k/mg-protein, SOD aktivitesi U/mg-protein, TBARS konsantrasyonu ise nM/mg-protein olarak ifade edildi.

İstatistiksel Analizler: Önce 'One Way Anova' testi ile varyans analizi yapılarak, uygulama gruplarının ikişerli karşılaştırmaları için, gruplardaki denek sayısı 10'un altında olduğundan, nonparametrik bir yöntem olan 'Mann Whitney U Test' kullanıldı. Buna göre, yanılma düzeyi %5 olarak seçildiğinde, 8'er denekli iki grubun karşılaştırılmasında tablo 'U' değeri 49 olup, bu değer aşıldığında p<0.05 olarak değerlendirilerek sonuç anlamlı olarak kabul edildi (20).

Bulgular

A) Katalaz Aktivitesi: Hem 3 ATA basınç altında HBO₂ uygulanan grupta (A), hem aynı doz ve sürede normal hava uygulanan grupta (B), hem de normal atmosfer basıncında %100 O₂ solutulan grupta (C) CAT aktivitesi naive kontrol grubuna (D) göre anlamlı olarak artmış bulundu (sırasıyla U; 64, 49, 51, hepsi için p<0.05). Hiperbarik şartlarda uygulanan O₂'nin (A) CAT aktivitesini normobarik O₂'ye göre de (C) anlamlı düzeyde daha çok artırdığı dikkat çekerken (U=55, p<0.05), hiperbarik hava uygulanan grup (B) ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılığa rastlanmadı (U=47, p>0.05).

B) Süperoksit Dismutaz Aktivitesi: Hafif artmış görünmekle beraber, CAT aktivitesinden farklı olarak, ne hiperbarik O₂ (A) ya da hava (B), ne de normobarik O₂ (C), SOD düzeylerinde naive gruba (D) göre anlamlı bir farklılık oluşturmadı (sırasıyla U; 44, 46, 45, hepsi için p>0.05).

C) Tiyobarbitürik Asit Reaktif Substans: Naive kontrol grubu (D) ile karşılaştırıldığında, uygulanan HBO₂ (A) lipid peroksidasyon ürünlerini anlamlı düzeyde artırdı (U=64, p<0.05). Bu artış hiperbarik hava uygulanan gruba (B) göre de anlamlı olarak yüksek bulundu (U=55, p<0.05). Bunların yanında normobarik O₂ grubunda (C) da naive kontrol grubuna (D) göre anlamlı bir artış izlenirken (U=54, p<0.05), hiperbarik hava grubu (B) naive hayvanlara (D) göre anlamlı bir farklılık göstermedi (U=44, p>0.05).

Ek olarak; yüksek dozlarda uzun süreli hiperbarik oksijen uygulaması ile bazı makalelerde görüldüğü bildirilen (12,24) konvülsiyonlar, bu çalışmada gözlenmemiştir.

Akciğer CAT, SOD ve TBARS düzeyleri toplu olarak Tablo 2'de özetlenmiş, elde edilen verilerin anlamlılık yönünden irdelenmesi ise Tablo 3'de yapılmıştır.

Tartışma

Hiperbarik oksijen (HBO₂) tedavisi, yüksek plazma

Tablo 2. Akciğer Katalaz, SOD ve TBARS Düzeyleri (Ortalama ± Standart Hata)

Gruplar	Katalaz (k/mg protein)	SOD (U/mg protein)	TBARS (nM/mg protein)
A (n=8)	0.328 ± 0.06 *	0.306 ± 0.035	55.2 ± 7.8 *
B (n=8)	0.227 ± 0.03 *	0.37 ± 0.053	33.2 ± 4.9 **
C (n=8)	0.196 ± 0.02 *, **	0.326 ± 0.05	46.1 ± 10.0 *
D (n=8)	0.138 ± 0.02	0.236 ± 0.04	25.8 ± 3.1

*D grubuna (naive) göre, **A grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı (p<0.05)

Tablo 3. Çeşitli Prosedürler Arasında İstatistiksel Yönden Anlamlılık

Uygulama Şekli	Naive gruba göre (D)	HBO ₂ 'ye göre (A)
HBO ₂ (A)	CAT ↑, TBARS -	---
Hiperbarik hava (B)	CAT ↑	TBARS ↓
Normobarik O ₂ (C)	CAT ↑, TBARS -	CAT ↓

↑ istatistiksel olarak anlamlı yüksek (p<0.05),

↓ istatistiksel olarak anlamlı düşük (p<0.05)

oksijen konsantrasyonları oluşturmak amacıyla kullanılan bir tedavi yöntemidir. Kan oksijen içeriğindeki artış, azalmış doku oksijenizasyonundan kaynaklanan pek çok hastalığı tedavi etmek için klinik kullanım alanı olan bir modeldir (5,6,21). Günümüz tıbbında HBO₂ uygulamaları, birçok hastalığın tedavi ve yardımcı tedavisinde yaygın olarak kullanıma girmiş bulunmaktadır. HBO₂'nin bu yaygın kullanımı ve bildirilen yararlarına rağmen, 2 ATA'nın üzerindeki hiperbarik şartların oksidatif strese neden olduğu yönünde görüşler bildirilmiştir (3,4). Oysa ki tedavide kullanılan HBO₂ dozları genellikle 2-3 ATA arasında yer almaktadır (5,6).

Literatürde, HBO₂ kaynaklı oksidatif stresin boyutlarını ortaya çıkarmaya yönelik çalışmalardan çok antioksidan savunma sistemlerini kuvvetlendiren çeşitli maddeler verilmesi yoluyla HBO₂'nin zararlı etkilerinin bertaraf edilmesinin amaçlandığı, ya da tam aksine antioksidan enzimleri inhibe ederek oksijen toksisitesinin ne ölçüde arttığını araştıran çalışmalar yer almaktadır. Bu çalışmalar, HBO₂'nin bir oksidatif stres etkeni olduğunu baştan kabul etmiş görünmektedir ve genellikle 3 ATA'nın üzerindeki toksik dozlarda gerçekleştirilmiştir:

Pablos ve ark, 90 dk süreyle ve 4 ATA basınç altında %100 O₂ uyguladıkları sıçanların beyin ve akciğer dokularında - lipid peroksidasyon ürünleri olan - MDA ile 4-HDA (4-hidroksialken) düzeylerinde ve total ile okside glutatyon seviyelerinde artış, GR ve glutatyon peroksidaz (GPx) aktivitelerinde ise düşme görmüşlerdir (22). Buna karşılık Boadi ve ark, 4.5 ATA'da 30 dk süreyle uyguladıkları HBO₂ sonucu sıçan akciğer, karaciğer, beyin ve kan örneklerinde GSH, GR, GPx ve SOD düzeylerinde artış görüldüğünü, diete bazı antioksidan maddelerin ilave edilmesiyle de (vitamin E, riboflavin, selenyum) bu artışın daha da yüksek seviyelere ulaştığını tespit etmişlerdir (14,23). Konuya farklı bir açıdan yaklaşan Puglia ve ark, 2.8 ATA'dan yüksek basınçlardaki HBO₂'nin ciddi santral sinir sistemi toksisitesine yol açabileceğini belirtmiş ve SOD'un inhibe edilmesi durumunda bu toksisitenin çok daha hızlı bir şekilde meydana geldiğini ortaya çıkarmışlardır (24). Crapo ve ark'ın yaptığı bir çalışmada ise, normobarik şartlarda %100 O₂ verilen sıçanlarda dahi akciğer SOD aktivitesinin arttığı gösterilmiştir (25).

Görülüyor ki, tüm bu araştırmalar HBO₂'nin oksidatif stres oluşturduğu ve bu durumun antioksidan savunma sis-

temlerini takviye edilerek azaltılabileceği görüşünde birleşmişken, tek başına HBO₂'nin antioksidan kapasiteyi ne yönde etkilediği konusunda ise kısmen farklı sonuçlar elde edilmiştir. Bu konuda yapılmış belki de en kapsamlı araştırma ise Harabin ve ark tarafından gerçekleştirilmiştir: Bu çalışmada 2.8 ATA'daki HBO₂'nin devamlı ve aralıklı (birbirini takip eden 10 dk'lık HBO₂ ve 2.5 dk'lık hava periyotları) uygulamaları sonucunda sıçan ve kobayların akciğer ve beyinlerinde GPx, SOD ve katalaz aktivitelerinde meydana gelen değişikliklere bakılmış; sonuçta akciğer SOD aktivitesinde artış, GPx ve katalaz aktivitelerinde ise düşme gözlenmiştir (12).

Tüm bunlara karşın, HBO₂'nin organizmanın antioksidan savunma kapasitelerini aşacak düzeyde yok oksidatif stres kaynağı olmadığını savunan görüşler de yok değildir. Jamieson ve ark, bir makalelerinde HBO₂'nin - özellikle süperoksit ve H₂O₂ olmak üzere - ROT oluşturduğunu ve lipid peroksidasyonuna yol açtığını kabul etmekte (7); ancak yaptıkları bir araştırmada 30 dk süreyle ve 445, 515 ile 585 kPa basınç altında (100 kPa = 1 ATA) HBO₂ uyguladıkları farelerin akciğer ve beyin MDA seviyelerinde kayda değer bir artışa rastlanmadığı bildirilmektedir (4).

GATA - Fizyoloji Anabilim Dalı'nda yapılan bir araştırmada sıçanlarda kaldırılan deri fleplerinin iyileşme oranına HBO₂ ve antioksidan vitaminlerin etkisi araştırılmış; sonuçta HBO₂'nin vitaminlerin iyileştirici etkisini anlamlı derecede olumsuz yönde etkilemesi akla oksidradikal etkiyi getirmiştir (26). Bundan yola çıkarak gerçekleştirilen bir araştırmada ise HBO₂ ile flep dokusu lipid peroksidasyonunda anlamlı artışlar tespit edilmiş (27) ve bu çalışmanın zemini hazırlanmıştır.

Görülüyor ki, HBO₂'nin serbest radikal oluşturma potansiyeli konusunda yapılan araştırmalar farklı görüşlerin ortaya atılmasına sebep olmuş; buna rağmen literatürde hangi doz HBO₂'nin ne oranda oksidatif strese neden olduğunu araştıran kapsamlı bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu bakımdan, kullanımı gittikçe yaygınlaşan ve endikasyon alanlarına her geçen gün bir yenisini katan HBO₂ tedavisinin yararlılık-zararlılık yönünden irdelenmesi bir zorunluluk olarak görünmektedir. İşte bu çalışma ile, bu konuya bir ölçüde açıklık getirilmesi hedeflenmiştir. Bu amaçla HBO₂ uygulamasının iki bileşeni olan 'yüksek basınç' ve 'saf oksijen', ayrı ayrı değerlendirilerek, ikisi bir araya geldiğinde - oksidatif stres yönünden - tek başlarına yol açmaları muhtemel değişikliklerden ne ölçüde farklı bir etki oluşturduğu ortaya çıkarılmaya çalışılmış, 'normobarik O₂' ve 'hiperbarik hava' grupları bu amaca yönelik oluşturulmuştur.

CAT aktivitesine bakıldığında, gerek HBO₂, gerek normobarik O₂, gerekse hiperbarik havanın uygulandığı gruplarda istatistiksel olarak anlamlı artışlar görüldü. Bunlar arasında en yüksek seviyeye HBO₂ grubunda ulaşılrken, bu gruptaki artış normobarik O₂ grubuna göre de anlamlı derecede fazla bulundu. Sonuçta CAT aktivitesi bakımından 3 ATA basınç altında 2 saat süreyle uygulanan

tek seans HBO₂ ile naive gruba göre 2.5 kata varan artış H₂O₂ düzeyinde önemli sayılabilecek bir yükselmeye işaret ederken, ancak 1.5 kat kadar artmış görünen diğer uygulamalardan da anlamlı şekilde farklılık gösterdi.

Elde edilen bulgular SOD aktivitesi yönünden değerlendirildiğinde, ne hiperbarik, ne de normobarik O₂ ile - istatistik olarak değeri bulunamayan hafif bir artış görülmekle beraber - kayda değer bir değişikliğe rastlanmadı. Bununla birlikte, SOD aktivitesi yönünden O₂-hava ve hiperbarik ortam-normobarik ortam arasında da herhangi bir istatistiksel anlam bulunamaması tüm gruplarda birbirine yakın değerlerdeki bir artışa işaret etmekteydi.

Antioksidan enzim aktivitelerinde görülen artışlar serbest radikal üretiminde artışa işaret etmekle beraber, serbest radikal seviyelerindeki bu artış özellikle sözkonusu enzimlerin kapasitesini aştığı zaman önem kazanır. Bunu değerlendirmek amacıyla, bir diğer ifade ile serbest radikallerin en önemli zararlı etkilerinden biri olan lipid peroksidasyonunun ne ölçüde meydana geldiğinin saptanması için, bakılan TBARS düzeyleri naive kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, hem hiperbarik O₂, hem de normobarik O₂ grubunda anlamlı artışa rastlandı; HBO₂ sonucu görülen artış 2 katı aşan bir seviyede gerçekleşirken, normobarik O₂ de yine 2 kata yakın bir yükselmeye neden olmuştu. Bunun yanında, HBO₂'nin hiperbarik havaya göre anlamlı derecede fazla peroksidasyona yol açtığı görüldü.

Bu sonuçlara genel olarak bakıldığında, HBO₂ grubunda TBARS düzeyleri ile CAT aktiviteleri arasında bir paralellik görülmekte, bu paralellik normobarik O₂ grubundaki benzer sonuçlar ile desteklenmektedir. Buna karşılık, SOD aktivitesi hafif artmış görünse de anlamlı değerlere ulaşamamıştır. Buna göre, HBO₂ uygulamaları sonucu oluşan lipid peroksidasyonunda süperoksit radikalinden daha çok oluşan H₂O₂'nin rolü olduğu söylenebilir. Ne var ki, bu çıkarımı desteklemek açısından, H₂O₂'ye karşı CAT ile birlikte savaşım veren, GPx aktivitesinin de ölçülmüş olması çok daha iyi yorumlanabilir bir sonuca varmamızı sağlayacaktır.

Normobarik O₂ grubu TBARS seviyesinde kontrol grubuna göre 2 kata yaklaşan artış, HBO₂ grubunda görülen zararlı etkinin büyük çoğunluk itibarıyla %100 O₂ maruziyetine bağlı olduğunu akla getirdi. Bu yorum normobarik O₂ grubunun CAT aktivitesi düzeylerinde de görülen anlamlı yükselme ile destek bulmaktadır. Buna karşılık hiperbarik hava grubunda CAT aktivitesinde görülen artışa rağmen lipid peroksidasyonunda önemli bir artış oluşmaması, hatta HBO₂ grubuna göre anlamlı olarak düşük seviyelerde kalması, yoruma açık olmakla birlikte, salt hiperbarik ortamın HBO₂ ile oluşan oksidatif etkilerde tek başına bir etken olmadığını yönünde değerlendirildi.

Oksijen toksisitesi ile ilgili olarak yapılan araştırmalarda, kriter olarak kullanılan bir başka veri de hayvanlarda konvülsiyonların görülmesidir. 2.8 ATA'dan yüksek basınçlarda uygulanan HBO₂'nin konvülsiyonlara yol açtığı

yaygın bir görüştür, ancak Harabin ve ark'ın siçan ve kobaylarda kullandığı bu basınç aralığında en erken konvülsiyon görülme zamanı 4-4.5 saat olarak gerçekleşmiştir (12). Puglia ve ark ise, 4 ATA'lık bir uygulama basıncı ile gerçekleştirdikleri araştırmada ilk konvülsiyonu 2 saat 15 dakika sonra gözlemişler (24). Çalışmamızda 3 ATA'da 2 saat süreli hiperbarik oksijen grubu oluşturulmasının en önemli nedeni, bunun halen acil endikasyonlarda (dekompresyon hastalığı, karbonmonoksit zehirlenmesi gibi) kullanılan doz aralığı olması (5,6) ve aynı zamanda toksisite sınırına da oldukça yakın yer alması idi. Konvülsiyon takibi çalışmanın başlıca amacını oluşturma bile, bu yönde herhangi bir gözlem olmamasının uygulama basıncı ve süresi ile yakından ilişkili olması, dolayısıyla terapötik sınırlarda ciddi bir tehlike oluşturması olasıdır.

Sonuç

Bu çalışmadan elde edilen bulgular, HBO₂ uygulamalarının büyük ölçüde zararlı olduğunu ispat etmeye yetmemekle birlikte tam anlamıyla akladığı da söylenemez. Benzer çalışmaların akciğer ile beraber HBO₂'den en çok etkilenen organ olan beyin (12) ve bu iki doku arasındaki alışverişi düzenleyen kan (eritrosit) (15) ile tekrarlanması, ayrıca denek sayısının da artırılarak SOD düzeylerinde meydana gelen ve istatistiksel bakımdan anlam göstermeyen artışların yeniden değerlendirilmesi, konuya daha bir yaklaşım sağlayacaktır. Ek olarak, bu çalışmanın, antioksidan savunma sistemlerinin diğer önemli bir bileşeni olan okside ve redükte glutatyon düzeyleri ile H₂O₂'ye karşı CAT ile birlikte savaşım veren glutatyon peroksidaz aktivitesinin ölçümleri yoluyla da, daha zengin içerikli araştırmalara öncülük ettiği söylenebilir.

Sonuç olarak; HBO₂'nin oluşturmuş görüldüğü oksidatif streste uygulanan saf O₂'nin oldukça büyük bir rolü olduğu kanaatine varıldı. Günümüzün vazgeçilmez bir tedavi yöntemi olan HBO₂'nin, oksidatif stres oluşturma potansiyeli var olmakla beraber, meydana getirdiği bu oksidatif stres düzeyinin organizmaya zarar verecek boyutlarda olup olmadığı konusu ise halen araştırmaya açık bir saha olarak mevcudiyetini korumaktadır.

KAYNAKLAR

1. Feher J, Cosmos G, Vereche A: Free Radical Reactions in Medicine. Berlin - Heidelberg: Springer Verlag, 1987.
2. Cohn GH. Hyperbaric oxygen therapy. Promoting healing in difficult cases. Postgrad Med 1986; 79(2):89-92.
3. Monstrey ST, Mullick P, Narayanan K, Ramasastry SS. Hyperbaric oxygen therapy and free radical production: An experimental study in doxorubicin (adriamycin) extravasation injuries. Ann Plast Surg 1997; 38:163-8.
4. Jamieson DD. Lipid peroxidation in brain and lungs from mice exposed to hyperoxia. Biochem Pharmacol 1991; 41(5):749-56.
5. Mader JT. Hyperbaric oxygen therapy, a committee report. Bethesda: Undersea & Hyperbaric Medical Society, 1989.
6. Hyperbaric oxygen therapy: a committee report. Kensington: Undersea & Hyperbaric Medical Society, 1996.

7. Jamieson D, Chance B, Cadenas E, Boveris A. The relation of free radical production to hyperoxia. *Ann Rev Physiol* 1986; 48:703-19.
8. Nylander G, Otamiri T, Lewis DH, Larsson J. Lipid peroxidation products in postischemic skeletal muscle and after treatment with hyperbaric oxygen. *Scand J Plast Recons Surg* 1989; 23:97-103.
9. Farber JL, Kyle ME, Coleman JB. Mechanisms of cell injury by activated oxygen species. *Lab Invest* 1990; 62(6):670-679.
10. Halliwell B. Reactive oxygen species in living systems. *Am J Med* 1991; 91 (3C):14S-22S.
11. Nielsen F, Mikkelsen BB, Nielsen JB, Andersen HR, Grandjean P. Plasma malondialdehyde as biomarker for oxidative stress: reference interval and effects of life-style factors. *Clin Chem* 1997; 43(7):1209-14.
12. Harabin AL, Braisted JC, Flynn ET. Response of antioxidant enzymes to intermittent and continuous hyperbaric oxygen. *J Appl Physiol* 1990; 69(1):328-35.
13. Lutz J, Stark M. Administration of perfluorochemicals under hyperbaric oxygen pressure and treatment with free oxygen radical scavengers. *Biomater Art Cells Art Org* 1988; 16:395-402.
14. Boadi WY, Thaire L, Kerem D, Yannai S. Effects of dietary factors on antioxidant enzymes in rats exposed to hyperbaric oxygen. *Vet Hum Toxicol* 1991; 33(2):105-9.
15. Etlik O, Tomur A, Dündar K, Erdem A, Gündogan NU. The effect of antioxidant vitamins E and C on lipoperoxidation of erythrocyte membranes during hyperbaric oxygenation. *J Basic Clin Physiol Pharmacol* 1997; 8(4):269-77.
16. Aebi H. Catalase. In: Bergmeyer HU, ed. *Methods of Enzymatic Analysis*. Second English Edition, Volume 2. New York and London: Academic Press. 1974: 673-84.
17. Heikkilä RE, CaBbAt F. A sensitive assay for superoxide dismutase based on the autoxidation of 6-hydroxydopamine. *Anal Biochem* 1976; 75:356-62.
18. Özbaş Ö. Lipid peroksidasyonu ürünü malondialdehit'in senkronize flourimetrik ölçüm yönteminin irdelenmesi ve klinik önemi. Uzmanlık Tezi. İstanbul: GATA Haydarpaşa Eğitim Hastanesi, Biyokimya ve Klinik Biyokimya Şefliği. 1995.
19. Scopes RK. Solutions for measuring protein concentration. In: *Protein Purification. Principles and Practice*. Appendix B, Second Edition. New York, Berlin, London, Paris, Tokyo: Spinger-Verlag, 1982: 305-6.
20. Sümbüloğlu K, Sümbüloğlu V. *Biyoistatistik*. Ankara: Hatiboğlu Yayınevi, 1990.
21. Grim PS, Gottlieb LJ, Boddie A, Batson E. Hyperbaric oxygen therapy. *JAMA* 1990; 263:2216.
22. Pablos MI, Reiter RJ, Chuang JI, Ortiz GG, Guerrero JM, Sewerynek E, Agapito MT, Melchiorri D, Lawrence R, Deneke SM. Acutely administered melatonin reduces oxidative damage in lung and brain induced by hyperbaric oxygen. *J Appl Physiol* 1997; 83(2):354-8.
23. Boadi WY, Thaire L, Kerem D, Yannai S. Effects of supplementation with vitamin E, riboflavin and selenium on central nervous system oxygen toxicity. *Pharmacol Toxicol* 1991; 68:77-82.
24. Puglia CD, Loeb GA. Influence of rat brain superoxide dismutase inhibition by diethyldithiocarbamate upon the rate of development of central nervous system oxygen toxicity. *Toxicol Appl Pharmacol* 1984; 75(2):258-64.
25. Crapo JD, Tierney DF. Superoxide dismutase and pulmonary oxygen toxicity. *Am J Physiol* 1974; 226:1401-7.
26. Öter Ş, Korkmaz A. Hiperbarik oksijen ve antioksidan vitamin kombinasyonunun deneysel random-patern deri fleplerindeki canlı doku alanına etkisi. *Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri Dergisi* 1998; 18(5):299-303.
27. Öter Ş, Korkmaz A, Göksoy C, Bilgiç H. Rat epigastrik ada deri flebinde hiperbarik oksijen ve/veya antioksidan vitamin kombinasyonunu tedavisinin malondialdehit düzeyleri ile ilişkisi. XVI Gevher Nesibe Tıp Günleri Özet Kitabı: Kayseri, 1998: P47.