

DeneySEL İskemi-Reperfüzyon Hasarının Etkileri

THE EFFECTS OF INTESTINAL ISCHEMIA-REPERFUSION INJURY IN RATS

Orhan USLU*, Yücel ARİTAŞ*, Figen ÖZTÜRK**, Sabahattin MUHTAROĞLU***, Abdullah SAĞLAM*, Ziya ÇETİNKAYA

* Dr.Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Genel Cerrahi ABD,

** Dr.Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji ABD,

*** Dr.Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya ABD, KAYSERİ

ÖZET

Bu deneysel araştırma; sıçanlarda barsak iskemisi ve reperfüzyonu (I/R) ile oluşan hasarın çeşitli organlarda ortaya çıkabilecek organ yetmezliklerini (MOY) tesbit için yapıldı. Materyel, Wistar-Albino tipi biri hasar, diğeri kontrol 20'şer hayvanlı iki gruptan oluşmaktadır. Metod olarak; hasar grubunda laparatomili hayvanlarda a.mesenterica superior'un 60 dakikalık klempajı ile iskemisi ve sonra 30 dakikalık reperfüzyon, kontrol grubunda ise sadece laparotomi uygulanmıştır. Bu 90 dakika sonrası kanda Hb, lökosit ve bazı biyokimlik değerler, eritrosit içi ve karaciğer dokusunda lipid peroksit seviyeleri, portal ven ile mezenter lenf bezlerinde bakteriyel bulaşma ve ileum, karaciğer, böbrek ve akciğerde histolojik doku değişiklikleri araştırılmıştır. Bulgular; I/R hasarı ile barsaklarda oluşan biyokimlik-patolojik değişikliklerin konak bariyerinin de zedelenmesi ile, açığa çıkan serbest radikaller ve bakteriyel translokasyon aracılığı ile diğer organları da etkilediğini düşündürmektedir.

Anahtar Kelimeler: Barsak iskemisi ve reperfüzyon hasarı, Multipl organ yetmezliği, Serbest oksijen radikalleri

T Klin Gastroenterohepatoloji 1996, 7:127-130

Birden fazla organ veya sistemin spontan olarak fonksiyonlarını yerine getiremediği durumlarda Multipl-Organ Yetmezliğinden (MOY) söz edilir (1). MOY'nin nedenleri üzerinde birçok çalışma yapılmıştır. Bu nedenlerin en önemlileri arasında; iskemisi-reperfüzyon hasarı, sepsis, doku nekrozu, multisistemik hasar veya bunların kombinasyonları gelmektedir (1). Bunlardan bir veya birkaç tanesinin olayı başlatarak, toksik mediatörler denilen bir dizi faktörün açığa çıkmasına neden olduğu anlaşılmıştır (1-3). Birçok yazar MOY gelişiminde, iskemisi-reperfüzyon hasarı ile azalmış gastrointestinal bariyer fonksiyonu üzerinde ısrarla durmuştur, iskemisi ile bariyer

Geliş Tarihi: 25.07.1996

Yazışma Adresi: Dr.Yücel ARİTAŞ
Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi
Genel Cerrahi ABD
38039 KAYSERİ

TKlin J Gastroenterohepatoloji 1996, 7

SUMMARY

This experimental study was performed to determine the relation between multiple organ failure (MOF) and intestinal ischemia-reperfusion (I/R) deterioration. Two groups, consisting of 20 rats for each, were studied. In the study group, blood flow in superior mesenteric artery was closed with a microvascular clamp for 60 minutes and then reperfused for 30 minutes. No procedure apart from laparotomy was carried out for the control group. Animals were killed after obtaining blood and tissue samples. Since the released free oxygen radicals in MOF after intestinal I/R destruction play important role, MDA levels were measured to determine the lipid peroxidation in the liver tissue and erythrocytes. MDA levels within erythrocytes and in the liver tissue were found to be higher than those of the control group (p<0.05). In the analysis of biochemical changes; BUN, Creatinine, AST, ALT and LDH levels were found higher in the study group. As a result, intestinal I/R destruction can cause development of MOF through released free oxygen radicals and bacterial translocation.

Key Words: Intestinal ischemia-reperfusion injury, Multiple organ failure, Oxygen free radicals.

T Klin J Gastroenterohepatoloji 1996, 7:127-130

fonksiyonu arasındaki ilişkiyi aydınlatmanın, oluşan barsak iskemisi-reperfüzyon hasarının tedavisinde önemli bir adım olacağı tartışılmaz bir gerçektir. Bu bilgiler ışığında deneysel bir model hazırlayarak, barsak iskemisi-reperfüzyon hasarının MOY gelişimindeki rolünü, diğer organlar üzerindeki etkilerini araştırmayı planladık.

MATERYEL VE METOD

Bu deneysel çalışmada ağırlıkları 250-300 g arasında değişen erkek Wistar-Albino tipi ratlar kullanıldı. Ratlar çalışma ve kontrol grubu olarak ikiye ayrıldı. Her grup 20'şer rattan oluşmaktaydı. Bu ratlara ameliyat öncesi 25-30 mg/kg dozunda Ketamin-HCl intraperitoneal verilerek anestezileri sağlandı. Kontrol grubundaki ratlar laparatomiyi takiben 90.dakikada kan örnekleri ve doku biyopsileri alındıktan sonra öldürüldü. Çalışma grubunda ise orta hat laparotomi ile çöliak trunkus üzerinde a.Mesenterika superior bulunarak nazik bir şekilde disseke edildi ve mikrovasküler klemp yardımıyla

kan akımı 60 dak. süre ile durduruldu. Ardından klemp kaldırılarak kan akımı 30 dak. süre ile yeniden sağlandı. 60 dak.'lık iskemisi ve 30 dak.'lık reperfüzyon sonrası abdominal aortaya girilerek kan alındı. Sitratsız tüpe alınan 2 ml kan Hb, lökosit ve eritrosit içi lipid peroksidasyonuna bakılmak üzere saklandı. Sitratsız tüpe alınan 2 ml'lik kan ise BUN, kreatinin, bilirubin, AST, ALT, LDH, alkalin fosfat ve amilaz bakılmak üzere saklandı. Aynı anda portal venden kan örnekleri alınarak aerobik ve anaerobik besiyerlerine ekimler yapıldı. Yine 30 dak.'lık reperfüzyondan sonra çekum altında bulunan mezenter lenf nodu alınıp, ezildikten sonra aerob ve anaerob lenf nodu kültürleri yapıldı. Karaciğer, böbrek, akciğer ve ileumdan histopatolojik inceleme için biyopsiler alındı. Karaciğer dokusunda lipid peroksidasyonu tayininde tiyobarbitürik asit (TBA) reaksiyonu kullanıldı ve lipid peroksid seviyeleri nmol/g (yaş dokuda) Malondialdehid (MDA) olarak ifade edildi (4). Eritrosit içi lipid peroksidlerin tayininde Hunter ve ark.'nın modifiye ettiği yöntem kullanılarak lipid peroksid ürünlerinden olan MDA'nın tiyobarbitürik asit ile verdiği reaksiyon ölçüldü (5).

İ/R sonucu oluşan intestinal değişiklikler Simpson ve ark.'nın histolojik değerlendirmesine göre yapıldı (6). Işık mikroskopu altında yapılan bu histolojik sınıflamaya göre: Grade 0: Mukoza villusları normal, Grade I: Özellikle villusların tepesinde konjesyon ve subepitelyal mesafelerin oluşması, Grade II: Epitelyal tabakanın orta derecede kabalaşmasına bağlı villus tepelerinde subepitelyal mesafenin genişlemesi, Grade III: Villusların yan tarafında da subepitelyal mesafede şiddetli genişleme olması, Grade IV: Villusların üzerindeki epitellin tamamen harabiyeti, lamina proprianın ortaya çıkması ve kapiller konjesyon, lamina propriada belirgin lökosit infiltrasyonu, Grade V: Lamina proprianın ayrılarak parçalanması, kanama ve ülserasyon göstermesi.

BULGULAR

Karaciğer, böbrek ve akciğerin H+E'le elde edilen kesitlerinde çalışma ve kontrol grupları arasında önemli bir fark bulunmazken barsak örneklerinin incelenmesinde çalışma grubundaki 20 hayvanın hepsinde de kontrol grubundan farklı olarak, Grade I'den Grade IV'e kadar değişen oranlarda barsak hasarı tesbit edilmiştir.

İskemi-reperfüzyon hasarı sonucu, eritrosit içi ve karaciğer dokusundaki MDA değerleri çalışma grubunda, kontrol grubuna göre yüksek bulundu ($p<0.05$) (Tablo 1,2).

Biyokimyasal testlerden BUN, kreatinin, LDH, amilaz, ALT, AST seviyeleri çalışma grubunda kontrol grubuna oranla daha yüksek bulunurken ($p<0.05$) bilirubin ve alkalin fosfat değerleri her iki grup arasında fark göstermiyordu.

İskemi-reperfüzyon hasarı sonrası sıçanlarda bakteriyel translokasyonu göstermek amacıyla her iki grupta da portal ven kanından ve mezenterik lenf nodu (MLN) örneklerinden aerobik ve anaerobik vasatlara ekimler yapıldı. Çalışma grubunda 3 hayvandan alınan kültür-

Tablo 1. Barsak İskemi/Reperfüzyonu sonrası elde edilen eritrosit içi lipid peroksidasyonu

Sayı	Çalışma Grubu (MDA) nmol/g Hb	Kontrol Grubu (MDA) nmol/g Hb
1	2.05	1.45
2	1.50	1.35
3	2.06	0.63
4	2.06	0.84
5	2.64	1.87
6	1.78	0.97
7	2.42	1.06
8	3.69	1.02
9	4.04	0.89
10	1.05	1.14
11	1.58	1.24
12	1.14	0.56
13	1.67	0.79
14	2.56	1.25
15	1.67	1.45
16	4.08	0.87
17	1.98	0.69
18	2.81	1.41
19	2.12	1.12
20	3.03	0.56
x	2.30	1.06
x±Sx	2.30±0.88	1.06±0.35
t=5.89		

Tablo 2. Barsak İskemi-Reperfüzyonu sonrası elde edilen karaciğer dokusu lipid peroksidasyonu

Sayı	Çalışma Grubu (MDA) nmol/g Hb	Kontrol Grubu (MDA) nmol/g Hb
1	120	92
2	169	67
3	112	79
4	112	94
5	168	86
6	126	94
7	98	104
8	125	115
9	124	63
10	158	84
11	168	69
12	102	78
13	178	85
14	98	87
15	78	92
16	165	68
17	104	105
18	106	67
19	147	87
20	94	98
x	127.60	85.70
x±Sx	127.60±30.61	85.70±14.24
t=5.50		

lerde kontaminasyon olduğu için bunlar çalışma dışı bırakıldı. Geri kalan 17 sıçanın, aerobik kan kültürlerinin 7'sinde (%42), aerobik MLN kültürlerinin 5'inde (%30),

anaerobik kan kültürlerinin 3 tanesinde (%18), anaerobik MLN kültürlerini 3'ünde (%18) üreme saptandı. Üreyen mikroorganizmaların E.Coli, pseudomonas ve nonfermantatif aerobik bakterilerle, B.fragilis ve peptococci gibi anaerobik bakteriler olduğu anlaşıldı.

Çalışma grubundaki kan lökosit değerleri, kontrol grubundan daha yüksekti ($p<0.05$). Hemogloblin ve eritrosit değerleri açısından gruplar arasında fark yoktu.

TARTIŞMA

Multipl organ yetmezliği çok değişik fizyopatolojik olaylar sonucunda birden fazla organda veya sistemde gelişen disfonksiyonla karakterizedir (1). MOY'ü hastaların dikkatli gözlemleri sonucu, klinik olarak tesbit edilsin veya edilmesin, sepsisle birlikte ARDS ile başlayan ve ardından karaciğer, böbrek, merkezi sinir sistemi (MSS) yetmezliğine giden birçok sistem disfonksiyonunun söz konusu olduğu anlaşılmıştır (1,3). MOY ve barsak ilişkisinde, barsağın olayı başlatan primer sistem olduğu kadar aynı zamanda hedef organ olduğu da anlaşılmıştır (6).

Nuytinck ve ark. MOY nedeniyle kaybedilen yoğun bakım hastalarının otopsi çalışmalarında karaciğerde hepatosit nekrozu, dalakta sinusitlerde lökosit infiltrasyonu bulguları, böbreklerde vakuoler tubulonefropati, beyinde interstisyel ödem ve barsakta iskemik odaklar tesbit ettiler (7). Marshall ve ark. ise MOY'deki hastaların kan ve doku kültürlerinde gastrointestinal kaynaklı mikroorganizmalar ürettikleri (8). Pape ve ark. yoğun bakım hastalarından multipl travma nedeniyle MOY gelişenlerde en önemli ölüm sebebinin GİS'ten bakteriyel translokasyon sonucu oluşan sepsis olduğunu gösterdiler (9). Le Vöyer (10) ve Zelnger (11) ise yanıklı hastalarda normalde intestinal kanaldan absorbe olmayan Laktuloz-Mannitol karışımının hastalara verilmesiyle üriner itrahinin arttığını, yani barsaktaki mukozal bariyer fonksiyonunun azaldığını gösterdiler.

Barsak bariyer fonksiyonu ve çalışma mekanizması ile bu fonksiyonu bozan birçok mekanizma tarif edilmiştir. Burada en önemli patolojik mekanizma İ/R hasarıdır (12-20). İ/R'nun önemi, bu olay esnasında açığa çıkan serbest radikalleri ve toksik mediatörlerden ileri gelmektedir. İskeminin dokuda yaptığı zarar, dokunun reperfüze edilmesiyle oluşan hasara kıyasla daha azdır (21). İskemi ile birlikte dokuda oluşan enerji açığını kompanse etmek için dokuda depo edilen ATP hızla parçalanmaya başlar. Parçalanmış ATP'nin İskemi süresince oluşan son ürünü hipoksantindir. Dokunun reperfüzyonuyla birlikte, oluşan hipoksantinden ksantin oksidaz enzimi aracılığıyla ksantin ve serbest radikaller açığa çıkar (14).

Serbest radikaller sistemik dolaşıma da geçerek yakın ve uzak bütün organ ve sistemlerde hasara neden olur (22). Kunimoto ve ark. sıçanlara öldürücü olmayan dozda intravenöz yolla E.Coli endotoksini verildiğinde karaciğer, böbrek, barsak ve akciğerlerde ksantin oksidaz ve ksantin seviyelerinde kontrol grubuna oranla anlamlı derecede yükselme ve aynı zamanda MOY oluştuğunu gözlediler (23).

Çalışmamızda barsak İ/R sonrası açığa çıkan serbest radikalleri, TBA üzerinden ölçülen MDA seviyelerine bakarak ölçtük. Serbest radikaller açığa çıktıktan sonra doku ve hücrelerin bazı spesifik bölgelerinde hasara neden olurlar. Bundan dolayı serbest radikaller eritrosit içinde ve karaciğer dokusunda ölçüldü. Sonuç olarak hem eritrosit içi, hem de karaciğer dokusundaki MDA seviyeleri çalışma grubunda kontrol grubuna oranla daha yüksek bulundu ($p<0.05$) (Tablo 1,2).

Granger, kedilerde İ/R hasarı sonrası intestinal mukozada ATP, AMP, hipoksantin, ksantin oksidaz ve MDA seviyelerini kontrol grubuna oranla yüksek bulurken, ksantin oksidaz inhibitörleri verilmesiyle bunlarda azalma tesbit etti (24). Benzer çalışmalarda literatürde rastlamak mümkündür (25-28).

Çalışmamızda barsak İ/R hasarının karaciğer gibi uzak bir organda yaptığı biyokimyasal değişiklikler AST, ALT ve LDH'nin kontrol grubuna göre yüksek olduğu şeklinde kendini gösterdi. Beber ve ark. da sıçanlarda deneysel oluşturulan MOY sonrasında, araştırmamızda da vurgulandığı üzere, karaciğer dokusunda lipid peroksit miktarının ve AST, ALT gibi enzimlerin yükseldiğini gösterdiler (26). Benzer sonuçlar diğer yazarlar tarafından da tarif edilmiştir (28-31).

Simpson ve ark. barsak İ/R hasarı sonrası karaciğer, akciğer, barsak ve böbrekte çalışmamıza benzer histopatolojik değişimlere rastladılar (6).

Çalışmamız sırasında sıçanların bir kısmında GİS florasında bulunan mikroorganizmaları üretmek mümkün olmuştur. Bunu bariyer fonksiyonunun kaybına bağlı olarak gelişen bakteriyel translokasyon olarak yorumlamak mümkündür.

Alexander ve ark. sıçanlarda oluşturdukları yanık modellerinde radyoaktif işaretli C.albicans ve E.coli'nin periferik kanda ve lenfoid dokuda arttığını göstererek bakteriyel translokasyon üzerinde önemli sonuçlar almışlardır (32). Bu konuda literatürde başka çalışmalara da rastlamak mümkündür (8,10,11,22).

Sonuç olarak barsak İskemi-reperfüzyon hasarı MOY fizyopatolojisinde çok önemli rol oynamaktadır. İ/R hasarı ile açığa çıkan oksijen kökenli serbest radikaller ve PNL lökosit kaynaklı mediatörler ile barsağın bariyer fonksiyonu arasında sıkı bir ilişki söz konusudur. Bu nedenle özellikle yoğun bakım hastalarında MOY'den korunma amacıyla deneysel çalışmalardan da esinlenerek, nötrofillerden kaynaklanan serbest oksijen radikalleri ve proteazların, İskemi-reperfüzyonun olduğu organda ve uzak organlarda meydana getireceği hasarı önlemek için endojen enzimatik koruyucu mekanizmalar (Superoksit Dismutaz=SOD, katalaz, Glutatyon peroksidaz), enzimatik olmayan koruyucu mekanizmaları (Vit C, Vit E, beta karoten), ekzojen antioksidan ajanlar (Ksantin oksidaz inhibitörleri, kalsiyum kanal blokörleri, SOD, Katalaz, Mannitol) ve pankreatik enzim salınımını azaltan ajanlar (Somatostatin, oktreotid) dikkate alınmalıdır. Bu ajanlardan bazıları şu anda kullanılmakta olup, gelecekte bunların ve benzeri ajanların kullanım alanı genişleyecektir.

KAYNAKLAR

1. Carrico CJ. The elusive pathophysiology of the multiple organ failure syndrome. *Ann Surg* 1993; 218:109-10.
2. Borzotta PA, Polk CH. Multiple organ failure. *Surg Clin North Am* 1983; 63:315-35.
3. Demling R, La Londe C, Saldinger P. Multiple organ dysfunction in the surgical patients. In *Current Problems in Surgery*. Mosby Year Book, 1993; 4:347-417.
4. Okhawa H, Ohishi N, Yagi AK. Assay for lipid peroxides in animal tissues by tiobarbituric acid reaction. *Analytical Biochemistry* 1979; 95:351-8.
5. Stocks J, Dormandy TL. The autooxidation of human red cell lipids induced by hydrogen peroxide. *Br J Haematol* 1971; 20:95-111.
6. Simpson R, Alón R, Kobzlk L, et al. Neutrophil and nonneutrophil-mediated injury in Intestinal ischemia-reperfusion. *Ann Surg* 1993; 218:444-54.
7. Nuytinck SK, Offermans WM, Kubat K. Whole-body inflammation in trauma patients. *Arch Surg* 1988; 123:1519-24.
8. Marshall CJ, Christou VN, Horn R, et al. The microbiology of multiple organ failure. *Arch Surg* 1988; 123:309-15.
9. Pape CH, Dwenger A, Regel G, et al. Increased gut permeability after multiple trauma. *Br J Surg* 1994; 81:850-2.
10. Le Voyer T, Clofi WG, Pratt L, et al. Alterations In intestinal permeability after thermal injury. *Arch Surg* 1992; 127:26-9.
- H. Zeinger TR, Smith RJ, O'Dwyer ST, et al. Increased Intestinal permeability associated with infection in burn patients. *Arch Surg* 1988; 123:1313-8.
12. Livingston HD. Management of the surgical patient with multiple system organ failure. *Am J Surg* 1993; 165:8-12.
13. Halliwell B. Free radicals, antioxidants and human disease. Curiosity, cause or consequence? *Lancet* 1994; 344:721-4.
14. Grace AP. Ischemia-reperfusion injury. *Br J Surg* 1994; 81:637-47.
15. Mitsudo S, Brandt JL. Pathology of Intestinal ischemia. *Surg Clin North Am* 1992; 72:43-64.
16. Powell RS, Tortolani JA. Recent advances in the role of reactive oxygen intermediates in ischemic injury. *J Surg Res* 1992; 53:417-29.
17. Langer CJ, Sohal SS. Increased mucosal permeability after intestinal ischemia-reperfusion injury is mediated by local tissue factors. *J Pediatr Surg* 1992; 27:329-31.
18. Zimmerman JB, Granger ND. Reperfusion injury. *Surg Clin North Am* 1992; 72:65-84.
19. Patel A, Kaleya NR, Sammartano JB. Pathophysiology of mesenteric ischemia. *Surg Clin North Am* 1992; 72:31-81.
20. Wilson C, Gupta R, Gilmaur DG, et al. Acute superior mesenteric ischemia. *Br J Surg* 1987; 74:279-81.
21. Udassin R, Vromen A, Haskel Y. The time sequence of injury and recovery following transient reversible intestinal ischemia. *J Surg Res* 1994; 56:221-5.
22. Medich SD, Lee KT, Melhem FM, et al. Pathogenesis of pancreatic sepsis. *Am J Surg* 1993; 165:46-52.
23. Kunimoto F, Morita T, Fujita L, et al. Inhibition of lipid peroxidation improves survival rate of endotoxemic rats. *Circulatory Shock* 1987; 21:15-22.
24. Granger DN. Role of xanthine oxidase and granulocytes in ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol* 1988; 255(H):1269H-75.
25. Yalçın O, Köse H, Köksay F ve ark. Deneysel kolitte, superoksid dismutaz, katalaz, verapamil ve hidrokortizonun etkileri. *Klinik ve Deneysel Cerrahi Dergisi* 1993; 1:21-3.
26. Bebbler PT, Boekholz WK, Gorls RJ, et al. Neutrophil function and lipid peroxidation in a rat model of multiple organ failure. *J Surg Res* 1989; 47:471-5.
27. Gerkin TM, Oldham KT, Guice KS, et al. Intestinal ischemia-reperfusion injury causes pulmonary endothelial cell depletion. *J Crit Care* 1992; 8:48-56.
28. Antas Y. Şokta ve multipl sistem organ yetmezliğinde barsağın rolü. *Erciyes Tıp Dergisi* 1992; 14:36-45.
29. Romanı F, Vertamati M, Frangi M, et al. Effect of superoxide dismutase on liver ischemia-reperfusion injury in the rat. A biochemical monitoring. *Eur Surg Res* 1988; 20:335-40.
30. Şakrak Ö, Sağlam A, Paşaoğlu H, ve ark. Ratiarda triiodotironinin karaciğer iskemik hasarında lipid peroksidasyonu ve karaciğer enzim değerlerine etkisi. *Gastroenteroloji* 1994; 5:470-7.
31. Ertaş E, Atamanalp S, Bulut T, ve ark. iskemik ve reperfüzyon sonrası karaciğer dokusunda malondialdehid değeri ve superoksid dismutazın etkisi. *T Klin Gastroenterohepatoloji* 1991; 2:160-4.
32. Alexander WJ, Boyce TS, Babcock FG, et al. The process of microbial translocation. *Ann Surg* 1990; 212:496-509.