

İnce Barsak İskemisi ve Serbest Radikal Metabolizması

INTESTINAL ISCHEMIA AND FREE RADICAL METABOLISM

Muammer KARAAVAZ*, H.Serdar ÖZTÜRK**, Serenay ELGÜN**,
Murat KAÇMAZ**, Orhan CANBOLAT***, Hikmet AKGÜL ****

* Dr.Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Cerrahi Onkoloji BD,
** Dr.Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya ABD,
*** Doç.Dr.Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya ABD,
**** Prof.Dr.Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Cerrahi Onkoloji BD, ANKARA

ÖZET

Bu çalışmada mezenterik iskemi oluşturularak antioksidan defans sisteminin durumu araştırılmış, allopurinol ve antioksidan karakterli E ve C vitaminlerinin koruyucu etkileri tesbit edilmeye çalışılmıştır. İskemi sonrasında intestinal dokudaki Süperoksit dismutaz ve Katalaz enzim aktivitelerinde artış görülmesine karşılık, Glutatyon peroksidaz enzim aktivitesinde herhangi bir değişiklik gözlenmemiştir. Ayrıca iskemi sonrası Malondialdehit seviyesinin arttığı buna karşılık allopurinol ve antioksidan kombinasyonunun MDA seviyesini düşürdüğü görülmüştür. Bu durum, antioksidan tedavinin iskemideki önemini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: İncebarsak iskemisi, Serbest radikaller

T Klin Tıp Bilimleri 1996, 16:437-439

SUMMARY

In this study, antioxidant defense system was investigated in the intestinal tissue samples after mesenteric ischemia and establishment of protective roles of allopurinol plus antioxidant vitamins combination was attempted. In the ischemic intestinal tissues, it has been established that CAT and SOD activities increased but GSH-Px activity unchanged relative to control tissue values. It has also been found that MDA levels significantly increased in the intestinal tissues after ischemia. This increase in the MDA levels was eliminated by antioxidant treatment. This shows the importance of antioxidant treatment in the prevention of ischemic injury.

Key Words: Intestinal ischemia, Free radicals

T Klin J Med Sci 1996, 16:437-439

Mezenterik iskemi ve reperfüzyon esnasında ince barsak mukozasında önemli derecede hücre hasar meydana gelmektedir (1,2). Bu hücre hasarın derecesi, mortalite oranıyla korelasyon göstermektedir. İskemik ince barsak mukozasında patolojik değişikliklerin meydana gelmesinde rol oynayan en etkili mekanizmalardan bir tanesi serbest radikaller ile ilişkili olanıdır.

Serbest radikaller, üzelerinde ortaklanmamış elektron taşıyan ve bu özelliklerinden dolayı çok reaktif olan yapılardır. Serbest radikal reaksiyonları sonucunda hücre ve organellerin membranları, DNA, protein yapısındaki moleküller hasar görmekte ve bu hasarın derecesiyle ilişkili olarak hücre hasar ortaya çıkmaktadır. Günümüzde kanser, romatoid artrit, beyin iskemisi ve kronik böbrek yetmezliği gibi çok değişik hastalık gruplarının etyolojisinde bu metabolizma sorumlu tutulmaktadır (3,4). Özellikle iskemi ve reperfüzyon esnasındaki hasardan oksijen türevi radikaller sorumlu tutulmaktadır. İskemi olayında, solunum zincirinde, sitokrom c oksidaz reaksiyonunda oksijen radikali (O₂⁻) üretimi artar, ATP yıkımı artar. ATP yıkımının artışına bağlı olarak

adenozin metabolizması hızlanır, hipoksantin ve ksantin miktarı artar. Ksantin oksidaz (XO) enziminin artmasına bağlı olarak hücre içi oksijen radikali üretimi hızlanır. Anaerobik metabolizmadan dolayı hücre içi asidoz oluşur, bundan zararlı yapılar zarar görür. Na-K ATP'az ve diğer taşıyıcı sistemler inhibe olur. Hücreye kalsiyum girişi artar, hücrenin zar yapısı bozulur. Bu durum kompleman faktörlerinin aktivasyonuna ve nötrofillerin zara adezyonuna yol açarak radikal üretimini daha da hızlandırır. Reperfüzyon olayında ise, iskemi sonrası meydana gelen hiper-oksijenasyondan dolayı özellikle solunum zincirinin son reaksiyonunda oksijenin kısmi redüksiyonu hızlanarak, oksijen radikali üretimi önemli derecede artar (5). Ayrıca ksantin dehidrojenaz (XD) enzimi XO şekline dönerek hücre içi oksijen radikali üretimini artırır (6). İskemi ve reperfüzyon olayında anlaşılacağı üzere serbest radikal metabolizması hasardan sorumlu önemli bir faktör olarak görülmektedir. Hücre içinde oluşan serbest radikal hasarına karşın enzimatik ve non-enzimatik savunma mekanizmaları mevcuttur. A, C ve E vitaminleri ile glutatyon nonenzimatik savunma mekanizmaları arasında önemli yer tutarken, süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GSH-Px) ve katalaz (CAT) enzimleri, hücre içinin enzimatik savunma mekanizmalarıdır.

Çalışmamızda, mezenterik iskemik esnasında ortaya çıkan serbest radikallerden hücreyi korumada rol aldığı bilinen bazı enzimlerin aktiviteleri ve lipid peroksi-

Geliş Tarihi: 12.03.1996

Yazışma Adresi: Dr.Orhan CANBOLAT
Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi
Biyokimya ABD (Dekanlık Binası),
Sıhhiye, ANKARA

dasyonunun göstergesi olan malondialdehid (MDA) miktarı tayin edilmiştir. Ayrıca bu metabolizma üzerine C ve E vitaminleri ile allopürinolün etkisi araştırılmıştır.

MATERYEL VE METOD

Çalışma, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi deneysel araştırma laboratuvarında gerçekleştirildi. Biyokimyasal ölçümler, A.Ü. Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı'nda yapılmıştır. Çalışmada ağırlıkları 1400-1600 gram arasında olan 9 adet tavşan kullanıldı. Denekler 3 gruba ayrıldı. Birinci grup kontrol, ikinci grup iskemi, üçüncü grup ise iskemi+vitamin (C+E)+allopürinol grubu olarak seçildi. Üç gün önceden 3 no'lu gruba 50 mg/kg/gün allopürinol (oral), 100 mg/kg/gün E vitamini (i.m.), 200 mg/kg/gün C vitamini (i.m.) verildi. Sekiz saat aç bırakılan deneklere, 80 mg/kg (i.m.) ketamin hidroklorid anestezisi altında median laparotomi uygulandı. Hayvanlar servikal dislokasyonla öldürüldü. Birinci grubun dışındakilerde A.mesenterica superior, aorta'dan çıktığı yerden 4/0 ipekle bağlanarak, 25 dakika süreyle iskemi oluşturuldu. Daha sonra deneklerin tümünden ince barsak doku örnekleri alındı. Alınan örnekler buz dolu kapta korunarak laboratuvara getirildi ve hemen dokuların hazırlanması ve analizlere geçildi.

Dokuların Hazırlanması ve Analizler: Barsak dokuları önce, kanı uzaklaştırmak amacıyla deiyonize suyla yıkandı. Bundan sonra 1000 U'da yaklaşık 3 dakika süreyle homojenizatörle (B.Braun Melsunger model) homojenize edildi. Elde edilen homojenat 60 dakika süre ile 10.000 g'de santrifüj edilerek süpernatant alındı. Protein konsantrasyonu, SOD, GSH-Px, ve CAT aktiviteleri ile MDA seviyeleri bu fraksiyonda ölçüldü (7-10). Bütün deneyler +4°C'de yapıldı. Bir ünite SOD aktivitesi, nitroblue tetrazolium tuzunun (NBT) redüksiyon hızında %50 inhibisyona yol açan protein miktarı olarak alındı. CAT ve GSH-Px aktiviteleri IU/mg protein (spesifik aktivite) olarak verildi. Malondialdehid konsantrasyonu tiyobarbitürik asit reaksiyonu kullanılarak ölçüldü (11).

İstatistiksel analizler student-t testi ile yapıldı.

SONUÇLAR

Tablo 1'den de görüldüğü gibi: kontrol grubu ile iskemi grubu karşılaştırıldığında SOD ve CAT aktiviteleri iskemi grubunda, kontrol grubuna göre yüksek olarak bulunmuştur. Buna karşılık GSH-Px aktivitesinde istatistiksel bir anlamlılık gözlenmemiştir. MDA seviyesi ise iskemi grubunda kontrole göre yüksek olarak bulunmuştur. İskemi+vitamin (C+E)+allopürinol grubu kontrol grubuyla karşılaştırıldığında, SOD ve GSH-Px aktivitelerinde ve MDA seviyesinde bir değişiklik gözlenmemesine karşın CAT aktivitesi yüksek olarak bulunmuştur. İskemi grubu ile iskemi+vitamin (C+E)+allopürinol grubu karşılaştırıldığında SOD aktivitesi ve MDA seviyesi iskemi grubunda yüksek olarak bulunurken, GSH-Px ve CAT değerleri arasında istatistiksel olarak bir anlam bulunmamıştır.

Tablo 1. Kontrol (I), iskemi (II) ve iskemi+vitamin (C+E)+allopürinol (III) gruplarında ölçülen SOD (U/mg), GSH-Px (IU/mg), CAT (IU/mg) aktiviteleri ve MDA (ppm) konsantrasyonunun ortalama±SD değerleri ve istatistiksel anlamlılıkları

| Gruplar | SOD | GSH-Px | CAT | MDA |
|---------|--------------|-----------|-------------|-------------|
| I | 249.34±57.76 | 0.19±0.09 | 29.97±10.80 | 26.82±5.11 |
| II | 483.14±33.78 | 0.15±0.08 | 48.74±5.04 | 48.28±17.41 |
| III | 284.69±98.78 | 0.17±0.04 | 55.95±10.93 | 22.94±0.80 |
| | | Student-t | testi | |
| I-II | p<0.005 | * | p<0.05 | p<0.1 |
| I-III | * | * | p<0.025 | * |
| II-III | p<0.025 | * | * | p<0.05 |

*Anlamsız

TARTIŞMA

Günümüzde gelişmiş tanı ve tedavi metodlarına rağmen, mezenter iskemisinin morbidite ve mortalitesi yüksektir. Bu nedenle günümüzde önemini korumaktadır. Bu hasara yol açan mekanizmaların anlaşılması ve yeni tedavi modellerinin geliştirilmesi için yoğun çaba harcanmaktadır. İskemik doku hasarından birçok faktör sorumlu tutulmasına rağmen, günümüzde serbest oksijen türevi radikalleri (O₂⁻, OH⁻), bu hasarın esas kaynağı olarak kabul edilmektedir (3,4,6). Hücre içinde oluşan oksijen türevi radikaller, iskeminin derecesine bağlı olarak çeşitli derecede hücre hasarına yol açmaktadır. Bu hasardan etkilenen yapılar ise hücre ve organellerin membranları, DNA ve enzimlerdir. İskemi olayında serbest radikallerin bu derecede önem kazanması, araştırmacıları değişik dokularda iskemi-serbest radikal metabolizmasını araştıran çalışmalara yönlendirmiştir (12-15). Biz de bu çalışmada ince barsak iskemisinin patolojisinde önemli yeri olduğunu düşündüğümüz, serbest radikal metabolizmasıyla ilgili olan enzim aktivitelerini tayin ettik. Ayrıca, C ve E vitaminleri ile -önemli bir hücre içi oksijen radikali kaynağı olarak rol oynayan ksantin oksidaz (XO) enziminin inhibitörü olan- allopürinolün iskemik doku üzerine olan etkisini inceledik.

Çalışmamızda, iskemi grubunda SOD ve CAT aktivitelerinin yükselmesi ince barsak dokusunda serbest radikal üretimi artışının bir göstergesi olabilir. MDA seviyesinin iskemik dokudaki artışı ise, lipid peroksidasyonunun bir göstergesi olarak kabul edilebilir. İskemik dokuda enzim aktivitelerindeki artış serbest radikallere karşı enzimatik savunma mekanizmasının artırılması çabalarını gösteriyorsa da, MDA artışı bu çabaların yetersizliğine işaret etmektedir. Çalışmamızdaki bu bulgular, Southard ve arkadaşlarının çalışmalarındaki bulguları desteklemektedir (16). Bu araştırmacılar iskemi durumunda SOD artışına rağmen XO/SOD oranının arttığını tespit etmişlerdir. Bu durum XO aktivitesindeki artışın SOD'ye göre daha fazla olduğunu, dolayısıyla oksijen türevi serbest radikallerin oluşumunun arttığını göstermektedir. Bu araştırmacılar sonuç olarak iskemi ile oluşan doku hasarından bu serbest radikallerin sorumlu olabileceğini ileri sürmüşlerdir.

İskemik barsak dokusunda yapılan çalışmalarda genelde redükte glutatyon (GSH) azalışı ve okside glutatyon (GSSG) artışı gözlenmektedir (1,17). Araştırmacılar bu olayı, GSH'nin serbest radikaller tarafından oksitlendiği veya artan H₂O₂'yi kullanan GSH-Px aktivitesindeki atışın GSH'ı tüketebileceği şeklinde açıklamaktadır. Bizim çalışmamızda iskemik dokuda GSH-Px aktivitesi CAT'ın aksine, bir değişiklik göstermemiştir. Bu bulgu diğer araştırmacıların elde ettiği sonuçlar ile zıtlık göstermektedir. Aynı substratı kullanan fakat hücresele kompartmanları farklı olan bu iki ezimin böyle farklı davranış göstermesi kinetik incelemeler açısından anlamlılık ifade edebilir. Bu bulgular CAT ve GSH-Px için daha detaylı araştırmalar yapma gereğini ortaya koymaktadır.

Bir XO inhibitörü olan allopurinol, iskemik olaylarda invitro olarak kullanılmaktadır. İlacın iskemide dokuyu hasardan koruyabileceği öne sürülmektedir (2). Çalışmamızda allopurinol ve vitamin kullanılan grupta SOD aktivitesi iskemik gruba göre düşük bulunmuştur. Buna karşılık bu grupta GSH-Px ve CAT aktivitelerinde anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir. SOD aktivitesindeki azalma allopurinolün oksijen radikallerinin üretimini engellemede, vitaminlerin ise ortamdaki radikalleri söndürmede başarılı olduğunun bir göstergesi olabilir. Hücre içindeki oksijen radikallerinin üretimindeki azalma bu grupta SOD aktivitesinin kontrol grubu düzeylerine gelmesine yol açabilir. Bu bulgu MDA düzeylerinin allopurinol+vitamin grubunda da kontrol grubu seviyelerine düşmesiyle desteklenmektedir. MDA seviyelerinin bu şekilde değişiklik göstermesi allopurinol ve antioksidan vitaminlerin hücreyi oksijen radikallerinden koruduğu ve membranların lipid peroksidasyonunu engellediği yorumunu yapmamıza yardımcı olmaktadır.

Allopurinol+vitamin grubunda CAT aktivitesinin iske-mi grubundaki seviyelerde devam etmesi, GSH-Px ise kontrol grubuna göre bir değişiklik gözlenmemesi bu konuda daha ileri araştırmaların gerektiğini ortaya koymaktadır. Allopurinol ve antioksidan vitaminlerin H₂O₂ üretimi üzerine olan etkisinin incelenmesi bu konuya açıklık getirecektir. Çalışmamızdan elde ettiğimiz bulguların ışığı altında iskemide hücre membran hasarı ve lipid peroksidasyonunun ortaya çıkışında oksijen türevi serbest radikallerin rol aldığını söylemek mümkündür, ayrıca bu metabolizmada rol alan enzimatik savunma mekanizmalarının iskemiden etkilendiği gözlenmiştir. Hücreyi serbest radikal hasarından korumada allopurinol ve vitaminlerin koruyucu etkilerinin olduğu, çalışmamızda sonuç olarak elde edilmiştir. İskemi gibi doku hasarına yol açan olayların biyokimyasal mekanizmalarını açıklamak için bu konuyla ilgili daha fazla ve daha detaylı çalışmalar yapılmasının faydalı olacağı düşüncesindeyiz.

KAYNAKLAR

1. Weixiong H, Aneman A, Nilsson U, Lundgren O. Quantification of tissue damage in the feline small intestine during ischaemia-reperfusion: the importance of free radicals. *Acta Physiol Scand* 1994; 150:241-50.
2. Schoenberg MH, Fredholm BB, Haglund U, Jung H, Sellin D, Younes M, Schildberg FW. Studies on the oxygen radical mechanism involved in the small intestinal reperfusion damage. *Acta Physiol Scand* 1985; 124:581-9.
3. Halliwell B, Gutteridge JMC. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and diseases. *Biochem J* 1984; 219:1-14.
4. Freeman BA, Crapo JD. Biology of disease, free radicals and tissue injury. *Lab Invest* 1982; 47:412-6.
5. Halliwell B, Gutteridge JMC. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: An overview, in ed. *Methods in Enzymology*, Academic Press Inc. 1990: 186:1-85.
6. Della Corte E, Stirpe F. The regulation of rat xanthine oxidase. *Biochem J* 1972; 126:739-45.
7. Lowry O, Rosenbraugh N, Farr L, Randall R. Protein measurement with folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 182:265.
8. Durak I, Canbolat O, Kavutcu M, Öztürk HS, Yurtarlanı Z. Activities of total, cytoplasmic and mitochondrial superoxide dismutase enzymes in sera and pleural fluids from patients with lung cancer. *J Clin Lab Analysis* 1996; 10:17.
9. Paglia DE, Valentine WN. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med* 1967; 70:158-69.
10. Aebi H. Catalase. In: Bergmeyer HU, ed. *Methods of enzymatic analysis*. Newyork: Academic Press, London, 1974: 673.
11. Dahle KL, Hill GE, Holman RT. The thio barbituric acid reaction and autooxidations of polyunsaturated fatty acid methyl esters. *Arch Biochem Biophys* 1962; 98:253-61.
12. Baker GL, Corry RJ, Autor AP. Oxygen free radical induced damage in kidneys subjected to warm ischemia and reperfusion. Protective effect of superoxide dismutase. *Ann Surg* 1985; 202:628-41.
13. Gardner TJ, Stewart JR, Casale AS, Downey JM, Chambers DE. Reduction of myocardial ischemic injury with oxygen-derived free radical scavengers. *Surgery* 1983; 94:423-7.
14. Nilsson UA, Aberg J, Aneman A, Lundgren O. Feline intestinal ischemia and reperfusion; relation between radical formation and tissue damage. *Eur Surg res* 1993; 25:20-9.
15. Parks PO, Haglund U, Bulkley GB, Falt K. The sequence of development of itestinal tissue injury after strangulation ischemia and reperfusion. *Surgery* 1990; 107:574-80.
16. Southard JH, Marsh DC, McNulty JF, Belzer FO. Oxygen-derived free radical dmage in organ preservation: Activity of superoxide dismutase and xanthine oxidase. *Surgery* 1987; 101:566-70.
17. Gibson DD, Brackett DJ, Squires RA, Balla AK, Lerner MR, McCay PB, Pennington LR. Evidence hat the large loss of glutathione observed in ischemia/reperfusion of the small intestine is not due to oxidation to glutathione disulfide. *Free Radical Biology & Medicine* 1993; 14:427-33.