

Ratlarda Oluşturulan Endotoksemide Glutasyon Eksikliğinin Karaciğer Histopatoloji ve Fonksiyonlarına Etkisi

THE EFFECTS OF GLUTATHIONE DEPLETION ON LIVER FUNCTION AND HYSTOPATHOLOGY IN ENDOTOXEMIC RATS

Betül BOZKURT*, Mahmut KOÇ*, Faruk COŞKUN*, Ömer CENGİZ*, Aydın BİLGİN*, Ediz DEMİRPENÇE**, Kamer KILINÇ**, Fehmi AKSOY***

* Dr.,Ankara Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi 2. Genel Cerrahi Kliniği,

** Dr.,Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya AD,

*** Dr.,Ankara Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi Patoloji Laboratuvarı, ANKARA

Özet

Bu deneysel çalışmada; intraperitoneal olarak endotoksemi yaratılan ratlarda, majör antioksidan olan glutasyonun eksikliği durumunda, karaciğerde oluşan patolojik ve fonksiyonel bozukluklar araştırıldı. Sadece endotoksemi yaratılan ratlara göre, farklı derecede glutasyon eksikliği ile beraber endotoksemimin oluşturduğu hasar patolojik ve biyokimyasal olarak incelendi. Biyokimyasal incelemeler iki aşamalı olarak yapıldı. Medikasyon öncesi ve sonrası serum SGOT, SGPT, ALP, LDH, GGT, Total bilirubin ve Direkt bilirubin düzeyleri gruplar arası ve her denek için istatistiksel karşılaştırmalar yapılarak değerlendirildi. Biyokimyasal olarak doku redükte, okside, total glutasyon; laktik asit, hipoksantin ve lipid peroksidasyon düzeyleri gruplar arasında tek yönlü varyans analizi, Duncan testi, Paired T testi, Khi kare testi ve korelasyon analizi ile karşılaştırıldı. Tüm patolojik ve biyokimyasal incelemeler tek kör olarak yapıldı. Sonuçta glutasyon eksikliğinin endotoksemimin yarattığı hücrel hasarı, biyokimyasal ve patolojik eksikliğin derecesi ile ilişkili artırdığı; aşırı glutasyon eksikliği yaratılan deneklerde hücre hasarı ve iskeminin göstergeleri olan lipid peroksidasyon, hipoksantin ve laktik asit düzeylerinde istatistiksel olarak belirgin yükselme olduğu saptandı. Bu çalışma ile serbest oksijen radikallerinin yarattığı hücrel hasarın önlenmesi, hücrel bütünlüğün devamı ve metabolizmanın sürdürülmesi için, glutasyonun endotoksemide klinik önemi patolojik ve biyokimyasal sonuçlarla desteklenerek kanıtlanmaya çalışılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Endotoksemi, Glutasyon eksikliği, Serbest oksijen radikalleri

T Klin Tıp Bilimleri 1998, 18:388-397

Summary

In this experimental study; pathological and functional disorders occurred in liver are inspected at rats at which intraperitoneally endotoxemia created in deficiency of major antioxidant of glutathione. The harmful effect of different level of glutathione deficiency with endotoxemia is observed pathologically and biochemically according to endotoxemia created rats. Biochemical observations are done in two stages. Serum SGOT, SGPT, ALP, LDH, GGT, total bilirubin and direct bilirubin between groups and individuals are statistically compared and evaluated before and after medication. Tissue reducted, oxidized, total glutathione; lactic acid, hypoxanthine and lipid peroxidation levels compared between groups utilizing one way anova, Duncan's test, paired T test, khi square test. All pathological and biochemical observations are done by one blind method. As a result deficiency of glutathione increases the cellular injury created by endotoxemia proportional with the level of absence biochemically and pathologically. Lipid peroxidation, lactic acid and hypoxanthine levels are the indicators of cellular injury and ischemia at rats with glutathione deficiency are observed to have a statistically significant increase. The clinical importance of glutathione in endotoxemia for preventing the cellular injury created by free oxygene radicals; for the maintenance of cellular integrity and metabolism are proved by the supporting results of pathological and biochemical in this study.

Key Words: Endotoxemia, Glutathione depletion, Free oxygene radicals

T Klin J Med Sci 1998, 18:388-397

Geliş Tarihi: 26.04.1998

Yazışma Adresi: Dr.Betül BOZKURT
Ankara Numune Eğitim ve
Araştırma Hastanesi
2. Genel Cerrahi Kliniği, Opera, ANKARA

Serbest oksijen radikalleri, pekçok hastalıkta doku harabiyetinde ve doku fonksiyonlarının bozulmasında, özellikle şok sonrası ve iskemi reperfüzyonunda rol oynayan önemli nedensel ajanlardır (1-3).

Glutasyon ise, bu serbest radikal hasarına karşı dokuyu koruyan ve regülasyonu sağlayan endojen majör antioksidandır (1,4-12).

Bu çalışmada; deneysel olarak endotoksemi oluşturulan ratlarda, majör sellüler antioksidan olan glutasyon düzeyinin çeşitli seviyelerde azaltılmasıyla; endotoksemi oluşturulan deneklerde glutasyon düzeyinin karaciğer histolojisi ve fonksiyonlarını endotoksemide ne derecede etkilediği araştırılacaktır. Genel cerrahide sıklıkla karşılaşılabilen ve çoğunlukla barsak bakterileri, özellikle de *Escherichia coli* (E.coli) endotoksemisi sonucu oluşan septik olayların fizyoloji ve patolojisini anlamaya ve tedavi modalitelerinin geliştirilmesine katkıda bulunmak amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem

Ankara Tıp Fakültesi Hayvan Laboratuvarında yapılan bu çalışma için adult erkek, Wistar albino ratlar kullanıldı. Denekler ortalama 200 gr ağırlığında (150-350 gr) idi.

Deney için 10 ratlık 4 grup kullanıldı. Tüm ratlar deney öncesi ve deney sırasında standart rat yemi ve su ile beslendi. Tüm ratlardan medikasyon öncesi serum SGOT, SGPT, LDH, ALP, GGT, Total bilirubin, direkt bilirubin düzeyleri için 22 G iğne ile kardiak kan alındı ve ratlar tartılarak numaralandı.

Grup I (Sham Grup): Bu gruptaki deneklere hiçbir medikasyon uygulanmadı.

Grup II (Kontrol Grubu): 0. Saatte intraperitoneal olarak insülin enjektörü ile 2 cc serum fizyolojik verildi. 2. Saatte intraperitoneal olarak insülin enjektörü ile 1 µg/gr E. Coli O26:B6 (Sigma Chemical Company St. Louis L -8274) pürifiye endotoksini intraperitoneal olarak uygulandı.

Grup III: 0. Saatte 1 mg/gr Diethyl Maleate* (DEM) ve

2. saatte 1mg/gr E. Coli O26:B6 endotoksini intraperitoneal olarak uygulandı.

Grup IV: 0. Saatte 2 mg/gr DEM* ve

2. saatte 1mg/gr E. Coli O26:B6 endotoksini intraperitoneal olarak uygulandı.

*Bu dozda DEM karaciğer üzerine toksik etki yaratmamaktadır.

Tüm denekler 24 saat sonra servikal dislokasyonla sakrifiye edildi ve tekrar serum SGOT, SGPT, LDH, ALP, GGT, Total bilirubin, direkt bilirubin düzeyleri için 22 G iğne ile kardiak kan alındı. Biyokimyasal olarak serum düzeylerini saptamak üzere alınan kanlar 3000 devirde 10 dakika santrifüj edilerek serumları ayrıldı ve Olympus otoanalizatörde serum SGOT, SGPT, LDH, ALP, GGT, Total bilirubin, direkt bilirubin düzeyleri saptandı.

Servikal dislokasyonla sakrifiye edilen deneklere otopsi yapılarak patolojik ve biyokimyasal inceleme için karaciğer (Kc.) doku örnekleri alınarak doku lipid peroksidasyon, laktik asit, hipoksantin, redükte, okside ve total glutasyon düzeyleri araştırıldı.

Patolojik İnceleme

Patolojik inceleme için alınan karaciğer dokuları %96'lık alkolde fikse edildi. Dokulardan alınan kesitler parafinde bloklandı. 5 m kalınlıkta kesitler alındı. Hazırlanan preparatlar hematoksilen eozinle boyanarak ışık mikroskopunda incelendi. Tüm patolojik değerlendirmeler Ankara Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi Patoloji Laboratuvarı'nda aynı patolog tarafından tek kör metotla yapıldı.

Biyokimyasal İnceleme

Tüm biyokimyasal değerlendirmeler Hacettepe Üniversitesi Biyokimya Anabilim Dalında tek kör metotla yapıldı.

Biyokimyasal inceleme için alınan karaciğer doku örnekleri cam şişeler içinde etiketlenerek -20°C derecede derin dondurucuda dondurularak saklandı.

Dokunun Homojenizasyonu

150 mM soğuk KCl ile cam teflon homojenizör kullanılarak karaciğer dokularından %10'luk homojenatlar hazırlandı. Bu homojenattan hemen 2 ml pipetle 2 ml soğuk (v/v) HClO₄ içeren tüpe kondu ve karışım vorteksenerek, santrifüj edilene kadar soğukta saklandı.

Lipid Peroksid Tayini

Doku lipid peroksid düzeyleri Uchiama ve Mihara metoduyla saptandı. 3 ml %1'lik H₃PO₄ (fosforik asit) ve %0.6'lık 1 ml TBA (Thiobarbituric acid) solüsyonu %10'luk 0.5 ml doku homojenati

ile karıştırıldı. Karışım 45 dakika süreyle kaynar su banyosunda tutuldu. Çeşme suyunda soğutuldu. 4 ml n-butanol eklendi. Vortekslendi. Absorbans $\lambda:532$ 'de butanole karşı ($\epsilon=1.56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) okundu. Lipid peroksitlerin miktarı, tiobarbütirik asit reaktif ürünleri olarak ölçüldü ve nanomol/gram yaş doku cinsinden ifade edildi (13-16).

Laktik Asit Tayini

Dokudaki laktat konstrasyonu enzimatik olarak laktat dehidrogenaz ve nikotinamid adenin dinükleotid kullanılarak saptandı. Laktat standardı olarak lityum-laktat kullanıldı. %8'lik HClO_4 üzerine, 1:1 (v/v) homojenat eklendi. Vortekslenip santrifüjlenildikten sonra, süpernatant direkt olarak kullanıldı. Reaksiyon ortamı 500 μl tampon, (Tris 79 mM, Hirozin 400 mM pH : 9,6) 400 ml örnek, 100 μl 1:5 oranında seyreltilmiş LDH eklendikten sonra yaklaşık 15 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi ve tekrar okundu. Doku laktat miktarları gram yaş doku başına mmol cinsinden hesaplandı (15-17).

Hipoksantin Tayini

Hipoksantin tayini için 0.1 ml deproteinize edilmiş süpernatant, 0,5 ml K_3PO_4 (0.7 M) ile nötrale edildi. Tüpler 0°C derecede saklandı ve KClO_4 çöktürüldü ve santrifüjle ayrıldı. 0.5 ml "aliquot clear" süpernatant, 2 ml 0,1 M Tris-HCl ile karıştırıldı (pH: 7.4), 3 mM EDTA ile tamponlandı. Son karışımın absorbansı 37°C derecede 293 nm'de okundu. Daha sonra 0.04 ünite ksantin oksidaz 20 μl volüme eklendi (enzimin katkıda bulunduğu absorbans 0.200'dür). Tüpler 37°C derecede 10 dakika inkübe edildi ve absorbans tekrar 293 nm'de okundu. Hipoksantin 5-6 dakika da tamamen ürik asite dönüştüğü izlendi. Absorbans değişiklikleri, ürik asitin molar absorbtivitesi $12200 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ kabul edilerek hipoksantin konsantrasyonunu hesaplamada kullanıldı. Dokudaki hipoksantin konsantrasyonu standart olarak hipoksantin kullanılarakta saptanabilir. Standartlar hızlanır ve aynı şartlar altında çalışır. İki metodda aynı sonuçları verir. Dokulardaki hipoksantin seviyeleri, gram yaş doku başına nanomol olarak verildi (13,15-17).

Redükte Glutasyon Tayini

Glutasyon için 2 ml %8'lik soğuk HClO_4 içeren tüpler hazırlandı. 2 ml homojenat eklenerek vortekslendi. Soğuk odada 10-15 dakika santrifüjlendi. (1000 g'de) 1.5 ml süpernatant, 0.9 ml 0.7 M K_3PO_4 eklenerek nötrale edildi. 5-10 dakika içinde

KClO_4 tamamen çöker (Bu çökmeyi sağlamak için soğuğa da konabilir). Süpernatant kullanıldı. Glutasyon için reaksiyon ortamı; 0.5 ml 100 mM tampon Tris-HCl'ye 3 mM EDTA (pH:7,8) eklendi. 0.5 ml süpernatant ve 0.1 ml 2 mM DTNB (Dithrobis nitrobenzoic acid) eklendi ve $\lambda:412$ 'de yaklaşık 5 dakika sonra okundu. Gram yaş doku başına mmol olarak ifade edilmek üzere hesaplandı (18).

Total Glutasyon Tayini

Glutasyon için olduğu gibi deproteinize edilip, nötrale edilmiş homojenat kullanıldı. 100 ml homojenat, 500 ml tampon (Tris 200 mM, EDTA 3 mM pH:7.5) 50 μl NADP (2 mM) (Sigma Chemical Company St. Louis SN-1630-3.25 mg), 10 μl glutasyon redüktaz (Sigma Chemical Company St. Louis Kod:G-4751 1000 Ünite) (1:5) ile reaksiyon ortamında yaklaşık 15 dakika 37°C derecede inkübe edildi. Daha sonra 100 μl 1.25 mM DTNB eklenir ve yaklaşık 5 dakika sonra A 412'de okundu. Sonuç hesaplanarak gram yaş doku başına mmol olarak ifade edildi (18,19).

**Okside Glutasyon Tayini*

$\frac{\text{Total glutasyon} - \text{redükte glutasyon}}{2}$ formülüyle hesaplandı.

2

(Okside glutasyon molekülünde iki glutasyon birleşmiştir.)

İstatistiksel Değerlendirme:

İstatistiksel Değerlendirmeler Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyoistatistik kürsüsünde "SPSS for windows" istatistik paket programı kullanılarak yapıldı. Verilerin istatistiksel olarak değerlendirilmesinde; tek yönlü varyans analizi ve buna bağlı olarak Duncan testi, Paired T testi, Khi kare testi ve korelasyon analizi kullanıldı.

Sonuçlar

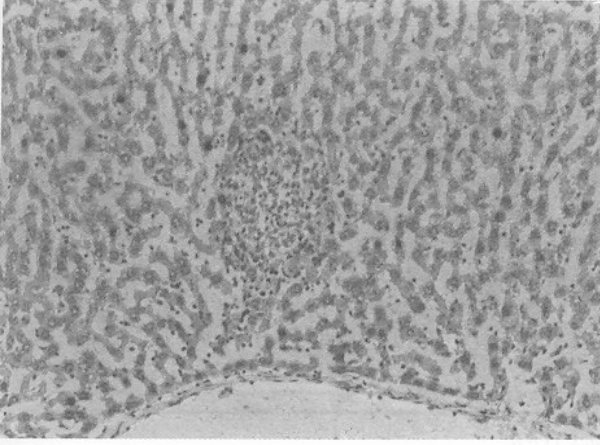
Histopatolojik Değerlendirme

Grup I'in (Sham Grubu) histopatolojik değerlendirme sonuçları

Bu gruptaki deneklerin histopatolojisi düzenli olarak değerlendirildi.

Grup II'nin histopatolojik değerlendirme sonuçları

Sadece endotoksemi yaratılan bu grupta, 4 denekte karaciğerin histopatolojisi normal olarak



Şekil 1. Karaciğer parankimi içinde granülom yapıları (H.E.X100)

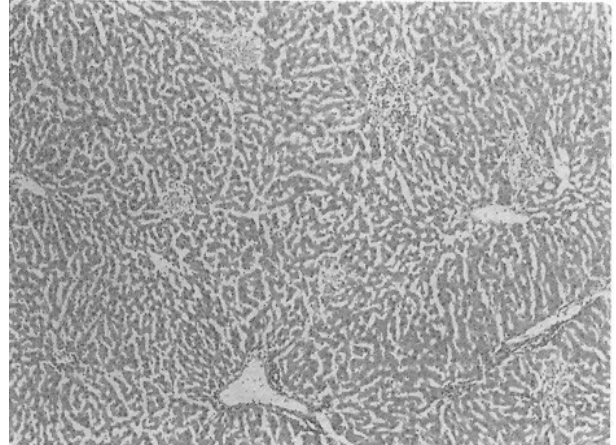
değerlendirildi. Diğer deneklerde; mononükleer iltahabi hücre kümelerini çevreleyen büyük hepatositler ve bu hücre kümelerinin yer aldığı artmış reaktif bağ dokusu alanları "granülom" olarak değerlendirildi. Saptanan bu granülomlar endotoksemi için tipikti ve parankim içinde değişik sayıda idi (Şekil 1). 1 denekte ise parankimde mononükleer iltahabi hücre kümeleri saptandı.

Grup III'ün histopatolojik değerlendirme sonuçları

Düşük doz glutatyon eksikliği ve standart endotoksemi oluşturulan bu grupta saptanan ortak patolojik özellikler; portal damarlarda ve "vena centralis" lerde genişleme, hafif derecede aktif hipere mi, hafif derecede "Kupffer" hücre hiperplazisi, perivasküler hafif derecede mononükleer hücre infiltrasyonudur. Bu grupta bir denekte akut hepatotoksite için tipik olan "Counsellman" cisimcikleri ve bir denekte de intrasitoplazmik mikrosteatozis saptandı.

Grup IV'ün histopatolojik değerlendirme sonuçları

Yüksek doz DEM verilerek glutatyon eksikliği ve standart endotoksemi oluşturulan bu gruptaki deneklerin ortak histopatolojik özellikleri; sinüsoidal dilatasyon, hepatositlerde daha bazofilik boyanan, düzensiz yapıda (büyüklük ve şekillerde farklılık), rejeneratif görünümde nükleuslar, intraparakimal ve sinüsoidal dağınmış yaygın mononükleer iltahabi hücre infiltrasyonu, "Kupffer" hücre hiperplazisi, intrasitoplazmik granüllerde belirgin-



Şekil 2. Karaciğer içinde fokal nekroz, sinüsoidal dilatasyon, intrasitoplazmik granüllerde belirginleşme ve artma, intrasitoplazmik vakuolizasyon (H.E.X40)

leşme ve artma idi. Bu grupta 3 denekte intrasitoplazmik mikrosteatozis (vakuolizasyon) izlendi. 2 denekte yoğun intraparakimal iltahabi hücre odakları, iki denekte fokal nekroz görüldü (Şekil 2).

Mortalitenin Değerlendirilmesi

Grup IV' de mortalite II ve III nolu gruplardan istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksektir ($\chi^2=14.15$) (Tablo 1).

Biyokimyasal Değerlendirme Sonuçları

Lipid peroksidasyon düzeyleri Grup IV' de diğer gruplardan istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksektir ($p<0.001$). Sayısal olarak Grup III, Grup I ve II'den yüksek düzeyde lipid peroksidasyon göstermesine rağmen istatistiksel olarak anlamlı fark saptanamamıştır ($p>0.05$) (Tablo 2).

Laktik asit düzeyleri Grup III ve IV'de Grup I ve II'den istatistiksel olarak anlamlı derecede küçüktür ($p<0.001$) (Tablo 2).

Hipoksantin düzeyleri Grup II, III ve IV'de Grup I'e göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksektir ($p<0.001$). Grup III ve IV'de hipoksantin

Tablo 1. Mortalitenin değerlendirilmesi

Gruplar	Sağ Denek	Ölü Denek	Toplam Denek
Grup II	11	2	13
Grup III	11	12	23
Grup IV	9	27	36

Tablo 2. Lipid peroksit, laktik asit ve hipoksantin düzeylerinin değerlendirilmesi

Gruplar	Lipid Peroksidasyon (nmol/gr yaş doku) Ortalama ± SD	Laktik Asit (µmol/gr yaş doku) Ortalama ± SD	Hipoksantin (µmol/gr yaş doku) Ortalama ± SD
Grup I	93.2024 ± 49.7710	6.6848 ± 1.1694	0.4616 ± 0.2392
Grup II	93.8379 ± 23.5808	7.0746 ± 1.7557	1.1974 ± 0.2923
Grup III	134.9435 ± 47.5350	3.6456 ± 0.6695	1.4731 ± 0.1151
Grup IV	184.8993 ± 56.2892	3.7011 ± 1.5819	1.6470 ± 0.1924

Tablo 3. Redükte, okside ve total glutatyon değerlerinin incelemesi

Gruplar	Redükte Glutatyon (nmol/gr yaş doku) Ortalama ± SD	Okside Glutatyon (µmol/gr yaş doku) Ortalama ± SD	Total Glutatyon (µmol/gr yaş doku) Ortalama ± SD
Grup I	10.1656 ± 1.4137	20.4552 ± 0.7457	51.0760 ± 0.4057
Grup II	4.2876 ± 0.6337	16.6566 ± 5.9678	42.0065 ± 10.4544
Grup III	5.2551 ± 1.6266	16.6316 ± 5.7336	41.2073 ± 12.7270
Grup IV	3.1741 ± 1.2974	20.9154 ± 14.3975	34.1435 ± 10.5127

Tablo 4. Medikasyon uygulanan üç grubun birbiriyle karşılaştırılması

Gruplar	SGOT 1 Ortalama ± SD	SGPT 1 Ortalama ± SD	ALP 1 Ortalama ± SD
Grup II	259.2000 ± 24.2187	56.2000 ± 10.1412	123.2000 ± 33.2960
Grup III	251.2000 ± 26.1568	51.0000 ± 8.4591	138.2000 ± 38.0023
Grup IV	237.5000 ± 85.1642	42.2000 ± 16.8180	114.7000 ± 45.6632

Grup II'den istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksektir ($p < 0.001$) (Tablo 2).

Redükte glutatyon düzeyleri (GSH) Grup I'de (Sham Grubu) diğer gruplardan istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksektir ($p < 0.001$). Grup III'de redükte glutatyon düzeyi Grup IV'den istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksektir ($p < 0.001$) (Tablo 3). Okside glutatyon düzeyleri 4 grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark göstermemektedir ($p > 0.05$) (Tablo 3). Total glutatyon düzeyi istatistiksel olarak anlamlı derecede Grup IV'de Grup I'den daha düşüktür ($p < 0.05$) (Tablo 3).

Serum Biyokimyasal Analizinin Değerlendirilmesi

Bu değerlendirmede sham grup sonuçları verilmemiştir, çünkü bu gruptaki deneklere hiçbir medikasyon uygulanmadan sakrifiye edildiklerinden, sakrifikasyon öncesi ve sonrası arasında biyokimyasal bir fark saptanmamıştır.

Grup II, III ve IV arasında deneye başlarken serum biyokimyasal analizlerinde istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu ($p > 0.05$) (Tablo 4 ve 5).

Grup II, III ve IV arasında SGOT 2 değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı fark izlenmiştir ($p < 0.001$) (Tablo 6). SGOT fark değerleri incelendiğinde Grup III'de SGOT'deki azalma istatistiksel olarak anlamlı derecede daha düşüktür ($p < 0.001$) (Tablo 6).

SGPT 2 düzeyleri Grup IV'de istatistiksel olarak anlamlı derecede Grup II ve III'den daha yüksektir ($p < 0.001$) (Tablo 6). Grup II ve III arasında istatistiksel fark saptanmamıştır ($p > 0.05$). SGPT fark düzeyleri incelendiğinde de SGPT'deki artış fark miktarı Grup IV'de diğer gruplardan istatistiksel olarak anlamlı derecede daha yüksektir ($p < 0.001$) (Tablo 6).

ALP 2 düzeyleri Grup IV'de Grup III'den istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksektir

Tablo 5. Medikasyon uygulanan üç grubun birbiriyle karşılaştırılması

Gruplar	LDH 1 Ortalama ± SD	Total Bilirubin 1 Ortalama ± SD	Direkt Bilirubin 1 Ortalama ± SD
Grup II	2053.3000 ± 205.2868	9.3000 ± 2.4967	8.1200 ± 2.1353
Grup III	2132.2000 ± 143.0950	9.3500 ± 1.8265	8.1000 ± 1.6786
Grup IV	1918.9000 ± 694.8650	8.3000 ± 3.4010	6.8600 ± 2.7953

Tablo 6. Sakrifikasyonu izleyerek alınan kan örneklerinin serum biyokimyasal analizinin değerlendirilmesi

Gruplar	SGOT 2 Ortalama ± SD	SGOT Fark SGOT2 - SGOT1 Ortalama ± SD	SGPT 2 Ortalama ± SD	SGPT Fark SGPT2 - SGPT1 Ortalama ± SD
Grup II	56.60 ± 29.2050	-205.3 ± 43.5662	172.2 ± 25.0768	116.0 ± 43.5431
Grup III	160.90 ± 25.9077	-90.3 ± 26.1196	150.2 ± 25.0768	99.2 ± 21.0175
Grup IV	5.10 ± 2.8848	-232.4 ± 83.7247	234.7 ± 87.3385	192.5 ± 72.7603

Tablo 7. Sakrifikasyonu izleyerek alınan kan örneklerinin serum biyokimyasal analizinin değerlendirilmesi

Gruplar	ALP 2 Ortalama ± SD	ALP Fark ALP 2 - ALP 1 Ortalama ± SD	LDH 2 Ortalama ± SD	LDH Fark LDH 2 - LDH 1 Ortalama ± SD
Grup II	167.80 ± 52.7169	44.60 ± 49.8023	23.9630 ± 163.6134	343.00 ± 158.9913
Grup III	105.20 ± 55.6333	33.00 ± 82.8305	2664.80 ± 189.8080	532.60 ± 118.3537
Grup IV	245.4 ± 103.5613	130.7 ± 73.4182	3053.8 ± 1140.7516	1134.9 ± 585.5965

Tablo 8. Sakrifikasyonu izleyerek alınan kan örneklerinin serum biyokimyasal analizinin değerlendirilmesi

Gruplar	Total Bil. 2 Ortalama ± SD	Total Bil. Fark T.Bil2 - T.Bil.1 Ortalama ± SD	Direkt Bil. 2 Ortalama ± SD	Direkt Bil. Fark D.Bil2 - D.Bil 1 Ortalama ± SD	GGT2 Ortalama ± SD
Grup II	20.9 ± 10.2464	11.60 ± 9.1433	13.66 ± 6.7014	5.54 ± 5.5650	3.00 ± 1.4142
Grup III	35.4 ± 9.8342	26.05 ± 9.4176	33.24 ± 10.2043	25.14 ± 9.831	8.60 ± 2.7162
Grup IV	61.7 ± 22.9252	53.4 ± 20.3645	59.28 ± 22.2243	5242 ± 20.1236	12.2 ± 5.9029

($p < 0.001$) (Tablo 7). ALP fark değerleri tüm gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark göstermektedir ($p < 0.001$) (Tablo 7).

LDH 2 düzeyleri Grup IV' de grup II' den istatistiksel olarak anlamlı derecede daha yüksek düzeydedir ($p < 0.05$) (Tablo 7). LDH fark düzeyleri Grup IV' de grup II ve III' den istatistiksel olarak anlamlı derecede daha yüksek düzeydedir ($p < 0.001$) (Tablo 7).

GGT 2 düzeyleri gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark göstermektedir ($p < 0.001$) (Tablo 8).

Total bilirubin 2 düzeyleri üç grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark göstermektedir ($p < 0.001$) (Tablo 8). Total bilirubin fark düzeyleri üç grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark göstermektedir ($p < 0.001$) (Tablo 8).

Direkt bilirubin 2 düzeyleri üç grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark göstermektedir ($p<0.001$) (Tablo 8). Direkt bilirubin fark değerleri üç grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark göstermektedir ($p<0.001$) (Tablo 8).

Medikasyon Öncesi ve Sakrifikasyon Sonrası Serum Biyokimyasal Analiz Değerlerinin Karşılaştırılması:

Grup II için

SGOT, SGPT, ALP, LDH, Total bilirubin ve Direkt bilirubin değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı artma vardır. SGOT, SGPT ve LDH için $p<0.001$; ALP ve direkt bilirubin için $p<0.05$; Total bilirubin için $p<0.01$ düzeyindedir.

Grup III için

SGPT, LDH, Total bilirubin ve direkt bilirubin değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı derecede artma; SGOT değerinde azalma vardır ($p<0.001$); ALP düzeyinde medikasyon öncesi ve sakrifikasyon sonrası serum değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı artma yoktur ($p>0.05$).

Grup IV için

SGPT, LDH, ALP, Total bilirubin ve direkt bilirubin düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı derecede artma, SGOT değerinde azalma vardır ($p<0.001$). Serum LDH düzeylerindeki yükselme ile doku laktik asit düzeyleri arasında her üç grup içinde istatistiksel olarak korelasyon bulunmamıştır. Grup II $r=0.056$, $p>0.05$; Grup III $r=-0.32$, $p>0.05$; Grup IV $r=0.37$, $p>0.05$.

Tartışma

Normal insan intestinal traktüsünde, çok geniş sayıda aerobik ve anaerobik bakteri kolonizedir. Bu bakteri konsantrasyonu duodenumdan kolona doğru artar. Bakterilerin veya ürünlerinin, iskemide mukozal hasarda rol oynadıkları görüşü yeni değildir (20). Endotoksin (Lipopolisakkarid : LPS), gram negatif bakterilerin hücre duvarında yer alan, polisakkarid zinciri, çekirdek bölgesi lipid A' dan oluşan heterojen bir moleküldür ve gram negatif enfeksiyonun pek çok etkisinden sorumludur (21,22). Endotoksemi klinik olarak belirgin gram negatif bakteri yokluğunda da oluşabilir ve sepsise neden olabilir.

Hayvan deneylerinde ve gönüllü insanlarla yapılan çalışmalarda tek doz endotoksinin, ciddi

bakteriyel enfeksiyonlarda gözlenen pek çok fizyolojik cevaba yol açtığı gösterilmiştir (23). Endotoksinler intravasküler koagülasyonu indükler. İlk önce hiperkoagülabilité, bunu izleyerek birkaç saat içinde hipokoagülabilité durumu gelişir. Plazma fibrinojeni azalır ve trombositopeni gelişir (21,24). İnsanlara ve çeşitli laboratuvar hayvanlarına endotoksin verilmesini izleyerek ateş ortaya çıkar (21,24). İntravenöz enjeksiyondan hemen sonra granülositopeni görülür ve 3-6 saat devam eder. Bunu izleyerek belirgin lökositoz ortaya çıkar (24). Hipotansiyon görülür (25). Bizim çalışmamızda, deneklere intraperitoneal endotoksin enjeksiyonunu izleyerek ratların hareketlerinde yavaşlama, taşipne titreme ve çevreye olan ilgilerinde azalma meydana geldi. Bu durum oluşan endotoksemi'nin yarattığı ateş ve hipotansiyona bağlı olarak açıklanabilir. Ayrıca endotoksemide histamin salımı ile hepatik venlerde konstrüksiyon meydana gelmesi sonucu, kan portal sistemde göllenir, kalbe venöz dönüş azalır. Sadece endotoksemi oluşturulan Grup II'deki ratlarda histopatolojik incelemede saptadığımız, portal venlerde genişleme ve aktif hiperemi muhtemelen bu mekanizmayla ortaya çıkmaktadır. Deneklerde gözlenen taşipne doku kan akımının dağılımında bozukluk sonucu, kompensasyon nedeniyle olabilir (25).

Hayvan deneyleri LPS' in direkt ve/veya indirekt etki ile ilerleyici karaciğer hasarında rol oynayabilen bir hepatotoksin olduğunu göstermiştir (26). LPS normal şartlar altında karaciğer "Kupffer" hücreleri tarafından temizlenir (17,20,24,27-31). Deneysel olarak yapılan çalışmalarda endotoksinin hepatotoksik etkisinin "Kupffer" hücre sisteminin depresyonuyla artırıldığı kanıtlanmıştır (26-29). Bizim deneysel çalışmamızda da histopatolojik incelemede saptanan "Kupffer" hücre hiperplazisi intraperitoneal olarak verilen endotoksini temizleme amacıyla olabilir ve fagositik aktivitede artmayı düşündürmektedir.

Yapısal ve fonksiyonel sellüler bozukluk oluşturan, tek yüksek doz LPS belirgin hepatik hücre harabiyeti yapmaz. LPS' lerin hücre harabiyeti yapıcı etkisi doz bağımlıdır ve/veya başka faktörlerle indüklenebilir (22,26,29,31-33). Bizim çalışmamızda verilen endotoksin miktarı, endotoksemi oluşturmak için yeterli düzeydedir (34) ve bu miktarda endotoksinin oluşturduğu karakteristik aşırı mononükleer infiltrasyon ve granülomlar (34) bi-

zim modelimizde sadece endotoksemi yaratılan Grup II'deki deneklerin bir kısmında da görülmektedir.

İskemik ATP katabolizmasının en belirgin ve en önemli ürünü hipoksantindir. Oluşan hipoksantin miktarı, iskemi-reperfüzyon ve açığa çıkan serbest oksijen radikalleri ile ilişkilidir. Bizim çalışmamızda, endotoksemi oluşturulan kontrol grubunda oluşan hipoksantin sham grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı artma göstermiştir ($p<0.001$). Bu endotokseminin dokuda iskemi oluşturucu ve hasarı başlatıcı etkisini açıklar. Glutasyon eksikliği yaratılan Grup III ve IV'de ise hipoksantin düzeyi sadece endotoksemi yaratılan Grup II'den anlamlı derecede yüksektir ($p<0.001$). Bu, hipoksantin metabolizması sırasında açığa çıkan serbest oksijen radikallerinin ortadan kaldırılmasında, glutasyonun ne kadar kuvvetli bir antioksidan olduğunu göstermesi bakımından önemlidir.

Oksidatif hasarın iyi bilinen sonuçlarından biri de lipid peroksidasyondur ve serbest radikallerin hücre duvarında yarattığı hasar nedeniyle oluşan hücre ölümünü gösterir. Bu çalışmada da yüksek dozda DEM ile glutasyon eksikliği yaratılan grupta endotoksemide, lipid peroksidasyon diğer tüm gruplardan anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. Bu gruptaki deneklerde mortalite de anlamlı derecede hücre hasarı ile ilişkili olarak yüksek bulunmuştur. Bu grupta histopatolojik incelemede saptanan daha yaygın mononükleer infiltrasyon ve hücre nükleuslarında görülen rejeneratif değişiklikler, yer yer mikrosteatozis, yoğun intraparakimal iltahabi hücre odakları ve fokal nekroz odakları lipid peroksidasyonla saptanan hücre hasarını doğrulamaktadır. Grup IV'de ölen deneklerin karaciğerleri histopatolojik olarak incelendiğinde, sağ kalan deneklere göre, çok daha aşırı hücre nekroz ve harabiyet saptanmıştır ve bu, deneklerde ölüme yol açmıştır. Cassini ve arkadaşları da (35) glutasyon düzeyi azaltılmış hayvanlarda, lipid peroksidasyonda artma saptamışlardır. Glutasyon hücre membranının, peroksidatif destrüksiyonuna karşı koruyucudur. Hem H_2O_2 gibi aktive oksijen ürünlerini detoksifiye eder, hem de lipid peroksidleri azaltır (5,9,35,36). Grup III'de ortaya çıkan harabiyet ve lipid peroksidasyon düzeyi istatistiksel olarak anlamlı olmamakla beraber, grup II'den belirgin derecede yüksektir (Tablo 2).

Reaktif oksijen ara ürünlerinin direkt hasarına maruz kalan primer alanlardan biride sinüsoidal epitelidir. Sinüsoidal kan akımındaki değişiklik, karaciğer iskemisi ve sekonder hepatosellüler hasara yol açabilir (29). Bu, Grup IV'de görülen sinüsoidal dilatasyonu açıklar görünmektedir. Ancak bunu destekleyen direkt kanıt yoktur.

Doku hipoksisinin güvenilir indikatörlerinden biri de laktik asittir (13,15-17). Laktik asit molekülü hücre membranını kolaylıkla geçer, ayrıca hasarlı hücreden de kolay bir şekilde ekstrasellüler alana salınır. Deneyde Grup III ve IV'de dokuda oluşan hasarla ilişkili olarak anlamlı derecede laktik asit, ekstrasellüler alana bırakılmış ve doku düzeyleri düşmüştür (Tablo 2). Bu glutasyon eksikliğinde Grup III ve IV'de oluşan harabiyetin, Grup II'den istatistiksel olarak anlamlı derecede fazla olduğunu gösterir. Bunu klinik olarakta saptayabilmek için, laktik asit düzeyindeki bu düşme ile serum LDH yüksekliği arasında korelasyon aradık, ancak bu istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. Ancak hücre harabiyetinin fazla olarak saptandığı Grup IV'de LDH düzeyinin anlamlı derecede yükseldiği ve bu yükseklik farkının diğer gruplardan anlamlı olarak fazla olduğu görülmektedir ($p<0.001$) (Tablo 7). Klebanoff ve arkadaşları (38) yaptıkları çalışmada, sitoplazmik bir belirleyici olarak kabul edilen LDH salınımındaki artmanın hücrede litik etkiyi yansıttığına dikkat çekmişlerdir. Bu anlamda LDH artışı hücredeki hasarın bir göstergesidir.

Tablo 3 incelendiğinde deneklerde, redükte glutatyonda yeterli düzeyde düşme olduğu görülmektedir. Hasarın yüksek olduğu Grup III ve IV'de kontrol ve sham grubuna göre anlamlı derecede düşme olması, serbest oksijen radikallerinin detoksifikasyonu için, yeterli glutasyon kalmaması nedeniyle oluşan, hasarın büyüklüğünü açıklar. Keller ve arkadaşları da (37) septik şokta glutasyon düzeyinin düştüğünü göstermişlerdir. Bu, Grup II'de de gözlenen redükte glutasyon düzeyindeki düşüşün endotokseminin yarattığı oksidatif strese bağlı olduğu görüşünü destekler (Tablo 3).

DEM tiol grubu üzerinden hepatik glutasyonu bağlayarak etki eden bir ajandır (35,36). SGOT değerlerinde doz bağımlı düşme, muhtemelen DEM'in bu enzim üzerindeki inhibitör etkisine bağlıdır (Tablo 6). SGOT değerlerinde gruplar arasında anlamlı düşme olması, DEM'in artan dozuyla in-

hibisyonunun artmasının kanıtı olabilir. Ancak aynı etki SGPT'de oluşmamıştır. Bizim çalışmamızda serbest radikal hasarının en fazla olduğu Grup IV'de SGPT değerlerindeki yükseklik istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0.001$) ve bu yükseklik serbest radikallerin yükselmesi ile ilişkili olarak hasardaki fazlalık nedeniyle olabilir.

Alkalin fosfataz (ALP) değerleri incelendiğinde, tüm gruplarda başlangıç değerine göre anlamlı artma gözlenmiş, aynı zamanda bu artış doku hasarının en fazla olduğu Grup IV'de diğer gruplara göre daha fazla bulunmuştur ($p<0.001$) (Tablo 7). Ayrıca serum GGT, total bilirubin ve direkt bilirubin değerleri incelenirse (Tablo 8) her üç değerde de gruplar arası hasarın farklılığıyla ilişkili olarak anlamlı derecede yükselme saptanmıştır ($p<0.001$).

Tüm gruplarda, her denek için serum biyokimyasal analizleri yapılan parametrelerin medikasyon sonrası değerlerinde yükselme saptanmasının, hücre harabiyetini göstermesi bakımından önemli olduğu düşünülmüştür.

Sonuç olarak; endotoksemik ratlarda glutatyon eksikliğinde saptanan hücre harabiyet, endotokseminin oluşturduğu hücre hasardan daha fazla düzeydedir. Doku glutatyon düzey düşüklüğü ile endotoksemik hasarın arttığı, doku lipid peroksid ve hipoksantin düzeylerinin artışının gösterilmesiyle desteklenmiştir. Bu serbest radikal hasarın önlenmesinde, karaciğerde glutatyonun hücre için ne kadar önemli bir antioksidan olduğunu göstermesi bakımından önemlidir. Böylece endotoksemik hastalarda, glutatyon düzeyinin yeterli seviyede tutulabilmesi için, glutatyon prekürsörlerinin zengin olduğu bir beslenme rejimi uygulanması, ya da bu hastalarda ortaya çıkan starvasyonun önlenerek hasarın önüne geçmek için önlem alınmasının ne kadar önemli olduğu düşünülebilir. Sonuçta bu çalışma ile serbest oksijen radikallerinin yarattığı hücre hasarın önlenmesi, hücre bütünlüğün devamı ve metabolizmanın sürdürülmesi için glutatyonun endotoksemide klinik önemi biyokimyasal ve patolojik sonuçlarla desteklenerek kanıtlandığı düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- Konukoğlu Dildar, Akçay Tülay, Glutatyon Metabolizması ve Klinik Önemi. T Klin Tıp Bilimleri 1995; 15: 214-8.
- Goris R.JA. Mediators of Multiple Organ Failure. Intensive Care Med 1990; 16: S192- S196.
- Reed Donald J. Regulation of Reductive Processes by Glutathione. Biochemical Pharmacology 1986; 35 (1): 7-13.
- Austgen Thomas R., Dudrick Paul s., Sitren Harry, et al. The Effects Of Glutamine-Enriched Total Parenteral Nutrition On Tumor Growth And Host Tissues. Ann Surg 1992; 215: (2) : 108 - 113.
- Deneke Susan M, Fangburg Barry L. Regulation Of Cellular Glutathione. Am J Physiol 1989; 257 : L163-L173.
- Comporti Mario. Lipid Peroxidation And Cellular Damage In Toxic Liver Injury. Laboratory Investigation 1985; 53 (6): 599-623.
- Farber John L, Kyle Marlene E, Coleman John B. Biology Of Disease Mechanisms Of Cellular Injury By Activated Oxygen Species. Laboratory Investigation 1990; 62 (6): 670-9.
- Dahm Lawrence J, Jones P. Dean. Secretion Of Cysteine And Glutathione From Mucosa To Lumen In Rat Small Intestine. Am J Physiol 1990; 267: G292-G300.
- Hong Roy W., Rounds Jan D., Helton William S, et al. Glutamine Preserves Liver Glutathione After Lethal Hepatic Injury. Ann. Surg 1992; 215 (2): 114-9.
- Pacht Eric R., Timerman Anthony P., Lykens Michael G., et al. Deficiency Of Alveolar Fluid Glutathione In Patients With Sepsis And The Adult Respiratory Distress Syndrome. Chest 1991; 100 (5): 1397-1403.
- Situnayake RD, Crump BJ, Thurham DI, et al. Lipid Peroxidation And Hepatic Antioxidants In Alcoholic Liver Disease. Gut 1990; 31: 1311-7.
- Mandel Lazaro J, Schnellmann Rick G, Jacobs William. Intracellular Glutathione In The Protection From Anoxic Injury In Renal Proximal Tubules. J Clin Invest 1990; 85 : 316-24.
- Akgür FM, Kılınç K, Aktuğ T. Reperfusion Injury After Detortion Of Unilateral Testicular Torsion. Urol Res 1993; 21: 395-9.
- Akgür FM, Kılınç K, Aktuğ T., et al. Teh Effect Of Allopurinol Pretreatment Before Detorting Testicular Torsion. The Journal of Urology 1994; 151 : 1715-7.
- Akgür FM., Kılınç K, Tanyel CF, et al. Ipsilateral And Contralateral Testicular Biochemical Changes After Unilateral Testicular Torsion And Detortion. Urology 1994; 44 (3): 413-8.
- Akgür FM, et al. Is Ipsilateral Testis Mandatory For Contralateral Biochemical Changes Seen After Unilateral Spermatic Cord Torsi. European Urology, In Press.
- Karagüzel G, Tanyel FC, Kılınç K, et al. The Preventive Role Of Chemical Sympathectomy On Contralateral Testicular Hypoxic Parametres Encountered During Unilateral Testicular Torsion. British Journal Of Urology, 1994; 74: 507-10.
- Tietze Frank. Enzymic Method of Quantitative Determination Of Nanogram Amounts of Total And Oxidized Glutathione : Applications To Mammalian Blood And Other Tissues. Analytical Biochemistry 1969; 27: 502-22.

19. Roberts Stanley A, Price Verovica F, Jollow David J. The Mechanism Of Cobalt Chloride-Induced Protections Against Acetaminophen Hepatotoxicity. The American Society For Pharmacology And Experimental Therapeutics 1986; 14 (1): 25-33.
20. Peters Jeffry H, Reilly Patrick M, Merine Dimitri S, Bulkley Gregory B. Vascular Insufficiency: Reperfusion Injury, Bacteria And Toxin. In: Yamada Tadataka, ed. Textbook Of Gastroenterology. 1st ed. Philadelphia: JB Lippincott Co, 1991: 2194-5.
21. Deventer SJH, Van Cate JW, Ten Tytgat GNJ. Intestinal Endotoxemia Clinical Significance. Gastroenterology 1988; 94 (3): 825-31.
22. McClain C, Hill D, Schmidt J, et al. Cytokines And Alcoholic Liver Disease. Seminars In Liver Disease 1993; 13 (2) : 170-82.
23. Austgen Thomas R, Chen Mike K, Moore Wendy, et al. Entoxin And Renal Glutamine Metabolism. Arch Surg 1991; 126: 23-7.
24. Weinstein Louis, Swartz Morton N. İnfeksiyon Etkeni Mikroorganizmaların Patojenik Özellikleri: Endotoksinler In: Sodeman William A, Sodeman Thomas M, eds. Sodeman's Pathological Physiology Mechanism Of Disease. 7th ed. Philedelphia: WB Saunders Co, 1985: 588-90.
25. Novotny Mark J, Laughlin Harold M, Adams Richard H. Evidence For Lack Of Importance Of Oxygen Free Radicals In Echerichia Coli Endotoxemia In Dogs. Am J Physiol 1988; 254: H954-H962.
26. Bhagwandeem Bramdutt S., Apte Minoti, Manwarring Lynette, Et Al. Endotoxin Induced Hepatic Necrosis In Rats On An Alcohol Diet. Journal Of Pathology 1987; 151: 47-53.
27. Levy Emmanuel, Path FC, Ruebner Boris H, et al. Hepatic Changes Produced By A Single Dose Of Endotoxin In Mouse. Am J Pathol 1967; 51 (2): 269-85.
28. Nolan James P. Intestinal Endotoxins As Mediators Of Hepatic Injury - An Idea Whose Time Has Come Again. Hepatology 1989; 10 (5): 887-91.
29. Arthur MJP, Kowalski-Saunders P, Wright Ralph. Effect Of Endotoxin On Release Of Reactive Oxygen Intermediates By Rat Hepatic Macrophages. Gastroenterology 1988; 95: 1588-94.
30. Clements Barry WD, Halliday Isla M, Mc Caigne Mervyn D, et al. Effects Of Extrahepatic Obstructive Jaundice On Kupffer Cell Clearance Capacity. Arch Surh 1993; 128: 200-5.
31. Pain JA, Bailey ME. Measurment Of Operative Plasma Endotoxin Levels In Jaundiced And Non Jaundiced Patients. Eur Surg Res 1987; 19: 207-16.
32. Ghezzi Pietro, Saccardo Beatrice, Bianchi Marina. Role Of Reactive Oxygen Intermediates In Hepatotoxicity Of Endotoxin. Immunopharmacology 1986; 12: 241-4.
33. Arthur MJP, Bentley IS, Tanner AR, et al. Oxygen-Derived Free Radicals Promote Hepatic Injury In The Rat. Gastroenterology 1985; 89: 1114-22.
34. Mitchell JR, Jollow DJ, Potter WZ, et al. Acetaminophen-Induced Hepatic Necrosis. IV. Protective Role Of Glutathione. The Journal Of Pharmacology And Experimental Therapeutics 1973; 187: 211-7.
35. Casini Alessandro F, Pompella Alfonso, Comporti Mario. Liver Glutathione Depletion Induced By Bromobenzene, Iodobenzene And Diethylmaleate Poisoning And Its Relation To Lipid Peroxidation And Necrosis. AJP 1985; 118 (2) : 225-37.
36. Robinson Malcolm K, Rounds Jan D, Hong Roy W, et al. Glutathione Deficiency Increases Organ Dysfunction After Hemorrhagic Shock. Surgery 1992; 112: 140-9.
37. Keller Gary A, Barke Roderick, Harty John T, et al. Decreased Hepatic Glutathion Levels In Septic Shock. Arch Surg 1985; 120: 941-5.
38. Klebanoff Seymour J, Vadas Mathew A, Harlan John M, et al. Stimulation Of Neutrophils By Tumor Necrosis Factor. The Journal Of Immunology 1990; 136: 4220-5.