

HEMORAJİK ŞOKU İZLEYEN İSKEMİ- REPERFÜZYON HASARININ KARACİĞER OKSİDAN-ANTİOKSİDAN DURUMUNA ETKİSİ

Volkan KOCABAŞ¹ Sadık BÜYÜKBAŞ² Dursun Ali ŞAHİN³ Mustafa Kemal BAŞARILI⁴

¹T.C.S.B Konya Beyhekim Devlet Hastanesi Biyokimya Laboratuvarı, Konya

²Selçuk Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı, Konya

³Rize Üniversitesi Tıp Fakültesi Genel Cerrahi Anabilim Dalı, Rize

⁴Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı, Diyarbakır

Amaç: Çeşitli şekillerde oluşan hemoraji hipovolemik şoka neden olabilir. Hemorajik şoku önlemek için uygulanan volüm replasmanı ise reperfüzyona neden olmaktadır. Çalışmamızda 30 dakikalık iskemi sonrası yapılan reperfüzyonun karaciğer dokusu malondialdehit (MDA), ksantin oksidaz (XO), süperoksit dismutaz (SOD) ve antioksidan aktivite (AOA) düzeylerine olası etkisini değerlendirmeyi amaçladık. **Yöntem:** Çalışmamızda Sprague-Dawley cinsi 24 adet rat kullanıldı. Ratlar 4 gruba ayrıldı: A grubu kontrol, B, C, ve D grupları iskemi-reperfüzyon grupları olarak planlandı. İskemi-reperfüzyon gruplarında femoral venden kan alınarak 30 dakikalık iskemi oluşturuldu. İskemi süresinin sonunda alınan kan tekrar verilip reperfüzyon oluşturulmasını takiben, B, C ve D gruplarında sırası ile 1, 3 ve 24. saatin sonunda ratlar sakrifiye edilerek karaciğer doku örnekleri çıkarıldı. Kontrol grubunda ise sadece 60 dakika süreli anesteziyi takiben ratlar sakrifiye edilerek karaciğer doku örnekleri çıkarıldı. Karaciğer dokusunda MDA, XO, SOD ve AOA analizleri yapıldı. **Bulgular:** İskemi-reperfüzyon gruplarında karaciğer doku MDA düzeyleri ve XO aktivitesinin kontrol grubuna oranla önemli oranda ($p<0,05$) arttığı, SOD ve AOA değerlerinin ise önemli oranda ($p<0,05$) azaldığı görülmüştür. Bu artış ve azalmalar özellikle reperfüzyon sonrası birinci saatte en belirgin olmuştur. **Sonuç:** Bulgularımız göstermektedir ki; hipovolemik iskemi sonrası uygulanan volüm replasmanı reperfüzyon hasarına neden olmuştur. Reperfüzyonun birinci saatindeki MDA, XO, SOD ve AOA değişimlerinin üçüncü ve yirmidördüncü saatlerden daha belirgin olması nedeniyle volüm replasmanı uygulamasına ilaveten reperfüzyon hasarını azaltıcı antioksidan destek uygulanmasını öneriyoruz. Bunun için α -tokoferol, askorbik asit ve melatonin gibi antioksidanlar reperfüzyonun özellikle ilk saatinde tercih edilmelidir. **Anahtar kelimeler:** iskemi-reperfüzyon, malondialdehid, süperoksit dismutaz, ksantin oksidaz, antioksidan aktivite, karaciğer.

Selçuk Tıp Derg 2009;25 (4):203-210

THE EFFECT OF ISCHEMIA REPERFUSION INJURY AFTER HAEMORRHAGE ON LIVER OXIDANT-ANTIOXIDANT STATUS

Aim: Various types of haemorrhage can cause hypovolemic shock. Volume replacement for prevention of hypovolemic shock results with reperfusion. The aim of this study was to determine the hepatic tissue MDA, XO, SOD and AOA levels after reperfusion following ischemia with duration of 30 minutes. **Method:** Twenty four female Sprague-Dawley rats were divided into four groups of six rats in each. Group A was the control group and B, C, and D groups were ischemia-reperfusion groups which were reperfused for 1 hour, 3 hours and 24 hours after 30 minutes hemorrhagic ischemia, respectively. In the ischemia-reperfusion groups at the end of the reperfusion periods, rats were sacrificed and the liver tissue samples were collected. In group A rats were only anesthetized for one hour and then they were sacrificed and the liver tissue samples were collected. MDA, XO, SOD and AOA analyses were performed in liver tissues. **Results:** MDA and XO levels were significantly increased in the ischemia-reperfusion groups when compared with the control group ($p<0,05$). SOD and AOA levels were significantly decreased in ischemia-reperfusion groups when compared with the control group ($p<0,05$). These changes were most

obvious in the first hour. **Conclusion:** Our findings showed that volume replacement therapy after hypovolemic shock was lead to reperfusion injury. Because MDA, XO, SOD ve AOA changes were more significant in the first hour of the reperfusion than the 3th and 24th hours; we suggest maintenance of antioxidant supplements with replacement therapy to decrease the reperfusion injury. For the supplemental management antioxidants such as alpha tocopherol, ascorbic acid and melatonin can be preferred in the first hour of reperfusion especially.

Key words: ischemia-reperfusion, malondialdehyde, superoxide dismutase, xanthine oxidase, antioxidant activity, liver

GİRİŞ

Hepatik iskemi-reperfüzyon araştırmalarında basınç uygulaması (pnömoperiton), tam veya kısmi damar kan akımı engellenmesi (klempleme) ve kan volümünün azaltılması (uygun miktarda kanın damar dışına alınması) gibi yöntemler ile önce iskemi oluşturulmaktadır. Daha sonra basıncın kaldırılması (deflasyon), klemplemenin kaldırılması ve eksik kan volümünün yerine konulması ile ani kan akımı sağlanmakta (resüsitasyon) ve bu durum reperfüzyon sağlamaktadır.

İskemik hasarı azaltmak amacıyla uygulanan reperfüzyon; bazı hemodinamik düzenlemeler (kan volümü, hemoglobin düzeyi v.b.) sağlanmasına rağmen iskemi döneminde başlayan reaktif oksijen türleri (ROS) üretiminin azaltılmasında başarılı değildir. Aksine ROS üretimi reperfüzyon döneminde daha da artmaktadır. Bu iskemi-reperfüzyon hasarından özellikle karaciğer, böbrek ve ince barsak gibi dokular etkilenmektedir (1-5).

Daha önce birçok araştırmacı karaciğer iskemi-reperfüzyonu oluşturmak amacıyla; hepatik damar klemplemesi ile 30-90 dakika arası değişen (30, 45, 50, 60 ve 90 dakika) iskemi ve bu klemplemenin kaldırılması ile 45 dakika-24 saat arası değişen (45, 60, 90, 120,180 dakika ve 3, 6, 24 saat) reperfüzyon oluşturmuşlardır (4-12). Yine bazı araştırmacılar iskemi-reperfüzyon oluşturmak için femoral veya karotid arterden kan alarak 45-60 dakika arası değişen hipovolemik iskemi ve volüm replasmanı ile 10-90 dakika arası değişen reperfüzyon oluşturmuşlardır (6,13).

Hipovolemik şok özellikle kan kaybının ön planda olduğu travmatik durumlarda

oldukça önemli kritik bir durumdur. Trafik kazaları, delici-kesici ve ateşli silah yaralanmaları, yüksekten düşme, iç kanama gibi durumlarda çoklu organ hasarları açısından ilk saatler oldukça önemlidir. Özellikle karaciğer ve böbrek bu durumdan daha çok etkilenmektedirler. Bu nedenle hızla volüm replasman tedavisi uygulanmaktadır. Hızlı sıvı tedavisi ile hemodinamik problemler düzenlenmesine rağmen reperfüzyon hasarı için aynı başarı elde edilememiştir.

Bu tedavi ile sağlanan resüsitasyona bağlı olarak oluşabilecek reperfüzyon hasarının şiddeti, zamanlaması ve zamana bağlı seyri önemlidir. Bu araştırmada; karaciğer doku malondialdehit (MDA), ksantin oksidaz (XO), süperoksit dismutaz (SOD) ve antioksidan aktivite (AOA) düzeyleri reperfüzyonun 1. 3. ve 24. saatlerinde ölçülerek reperfüzyon hasarının hangi zamanda daha etkili olduğunun belirlenmesi amaçlandı.

GEREÇ VE YÖNTEM

Yerel Etik Kurulu onayı (Selçuk Üniversitesi Yerel Etik Kurulu 2005/10 nolu kararı) alındıktan sonra, Helsinki Deklarasyonu Laboratuvar Hayvanları Komitesi tarafından yayınlanan "Laboratuvar Hayvanlarının Kullanım ve Bakım İlkeleri Bildirisinin" ilgili maddelerine ve Selçuk Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurulu tarafından hazırlanmış olan "Laboratuvar Hayvanlarının Kullanım ve Bakım Kılavuzu" ilgili maddelerine uyularak ağırlıkları 250-300 gr olan toplam 24 adet Spraque-Dawley cinsi dişi ratlarda çalışma gerçekleştirildi. Ratlar çalışma öncesinde 24-26 °C ısı, %55-60 nem ve 12 saat ışık-12 saat karanlık ortamında Selçuk Üniversitesi Laboratuvar Hayvanı

Üretim Ünitesinin standart beslenme koşullarında bir hafta süreyle muhafaza edildi.

Çalışma grupları her bir grupta altışar rat bulunacak şekilde dört grup olarak planlandı: A grubu (kontrol: 60 dakika anestezi), B grubu (30 dakika iskemi+ reperfüzyon, 1 saat sonra sakrifikasyon), C grubu (30 dakika iskemi+ reperfüzyon, 3 saat sonra sakrifikasyon) D grubu (30 dakika iskemi+ reperfüzyon, 24 saat sonra sakrifikasyon) olarak planlandı.

Ratlar çalışma öncesi 6 saat aç bırakıldı. Anestezi ve analjezi için ketamin hidroklorür 50 mg/kg dozda kas içine verildi. Hemorajik şok oluşturmak için ratların femoral venleri No: 24 branül ile kateterize edilerek; monitörize edildiler. Arteriyel kan basıncı 35 ± 5 mmHg olana kadar heparinli enjektör ile femoral venden kan alındı ve oda sıcaklığında bekletildi. Reperfüzyon için, alınan kan femoral venden geri verildi. Kontrol grubu anestezi altında 60 dakika bekletildi. Şok gruplarında reperfüzyonda alınan kan 30 dakika sonra aynı yoldan geri verildi. Gruplarda belirtilen saatlere göre intrakardiyak potasyum verilerek ötenazi uygulandı. Ötenaziyi takiben karaciğer doku örnekleri alınıp -80°C de derecede saklandı.

Doku örnekleri biyokimyasal analiz öncesinde soğuk zincire dikkat edilerek homojenize edildi. Homojenizasyonu takiben dokularda protein, MDA, XO, SOD ve AOA analizleri yapıldı.

Cam tüpe aktarılan yaklaşık 0,5 gramlık doku üzerine 2 ml Tris - HCl tamponu eklendi. Buz doldurulmuş plastik kap içerisine yerleştirilen cam tüpteki doku tam bir homojenizasyon sağlanıncaya kadar yaklaşık olarak 2-5 dakika süreyle ultrasonik homojenizatörle homojenize edildi. Bu süre içerisinde son hacim doku ağırlığının 10 katı olacak şekilde tampon ilaveleri yapıldı. Homojenattan MDA ve protein analizleri için yeterli olacak kadar numune alındıktan sonra kalan homojenat $+4^{\circ}\text{C}$ 'de 30 dakika süre ile santrifüj edildi. Supernatandan XO ve AOA analizleri için yeterli olacak kadar miktar alındıktan sonra kalan supernatan eşit hacimde 3/5 oranında hazırlanan Kloroform/Etanol karışımı ile karıştırılıp $+4^{\circ}\text{C}$ 'de 3220 devirde 40 dakika süreyle

santrifüj edildi. Üstte oluşan etanol fazından SOD enzim aktivite tayini yapıldı.

Protein ölçümü Lowry Metodu ile gerçekleştirildi(14). Protein standardından seri dilüsyonlarla standart grafiği elde edildi ve dokuların protein konsantrasyonları standart grafiği kullanılarak mg/dl olarak hesaplandı.

MDA seviyeleri Hammouda A el-R ve arkadaşlarının geliştirdiği tiobarbitürik asit (TBA) reaktivitesi esasına dayanan yöntem kullanılarak ölçüldü (15). MDA düzeyleri nmol / gr yaş doku ağırlığı olarak hesaplandı.

XO aktivitesi Prajda ve arkadaşlarının metodu ile çalışıldı(16). Sonuçlar IU/mg protein olarak hesaplandı.

SOD aktivitesi Sun ve arkadaşlarının metoduna(17) ve Durak ve arkadaşlarının önerdiği modifikasyona(18) göre analiz edildi. Sonuçlar U/mg protein olarak hesaplandı.

Antioksidan aktivite (AOA) Koracevic ve arkadaşlarının metodu ile ölçüldü(19). Sonuçlar $\mu\text{mol/gr}$ protein olarak verildi.

Analiz sonuçları ile ilgili istatistiksel analiz ve hesaplamalar, SPSS 10.0 for Windows programı ile gerçekleştirildi. Gruplar arasındaki farkın anlamlılık derecesi Kruskal-Wallis ve Bonferroni Düzeltmeli Mann Whitney U testleri ile değerlendirildi ve $p < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Sonuçlar Ortalama. \pm SD olarak verildi.

BULGULAR

Çalışmamızda elde edilen MDA, XO, SOD ve AOA değerlerinin gruplara göre aritmetik ortalama \pm SD değerleri ve tüm gruplara ait One-Way ANOVA çoklu karşılaştırma istatistik sonuçları Tablo 1 'de gösterilmiştir.

Sonuçlar incelendiğinde hemorajik şok grubu ratların karaciğer doku MDA ve XO düzeylerinde kontrol grubuna oranla önemli oranda artış, SOD ve AOA düzeylerinde ise azalma görülmektedir. Bu farklar istatikselsel açıdan önemlidir (Tablo 1).

Çalışmamızda 1, 3 ve 24 saatlik gruplar kontrol grubuna göre yüksek MDA seviyeleri göstermişlerdir. Kontrol grubu ile kıyaslandığında B grubunda MDA artışı % 58 iken, C grubunda % 84, D grubunda

Tablo 1. İskemi-Reperfüzyon grubunda saatlere göre antioksidan-oksidan sistemde değişiklikler

	Kontrol	1 saat	3 saat	24 saat
MDA (nmol/g yaş doku)	23,15±6,75	36,61±3,78 ^a	42,73±4,02 ^a	51,81±2,88 ^{a b c}
XO (U/gr protein)	2,44±0,38	3,58±0,56 ^a	3,35±0,29 ^a	3,09±0,27 ^a
SOD (U/mg protein)	0.34±0.03	0,24±0,03 ^a	0,19±0,04 ^a	0,16±0,04 ^{a b}
AOA (µmol/g protein)	1.22±0.07	0,77±0,35 ^a	0,74±0,21 ^a	0,84±0,25

^aKontrol ile kıyaslandığında P<0,05^b1. saat grubu ile kıyaslandığında P<0,05^c3. saat grubu ile kıyaslandığında P<0,05

% 123 artış saptanmıştır. C grubunda B grubuna göre % 16'lık artış varken, D grubu C grubuyla kıyaslandığında %21 artış olduğu tespit edilmiştir. Bu bulgular açıkça göstermektedir ki MDA oranlarındaki ani artış özellikle 1. saatte en belirgin olmaktadır (Tablo 1).

Gruplar XO düzeyleri açısından kıyaslandığında yine kontrol grubuna göre diğer gruplar daha yüksek XO değerleri göstermişlerdir. Kontrol grubuyla kıyaslandığında B grubunda % 46, C grubu % 37, D grubunda ise % 26'lık artışlar kaydedilmiştir. Ancak iskemi reperfüzyon grupları birbiri ile kıyaslandığında 1. saatteki ani XO artışının ardından C grubunda B grubuna göre % 6'lık, D grubunda da C grubuna oranla % 7'lik bir artış mevcuttur. Bu bulgular iskemi reperfüzyon sonrası XO düzeylerindeki değişimlerin özellikle 1. saatte ani artış şeklinde olduğunu ancak ilerleyen saatlerde bu artışı takip eden bir azalma olduğunu göstermektedir (Tablo 1).

SOD seviyelerindeki değişimler incelendiğinde, kontrol grubuyla kıyaslandığında B grubunda %29'lük bir azalma varken, C grubunda %44, D grubunda ise %53'lük bir azalma olduğu tespit edilmiştir. SOD değişimleri için iskemi reperfüzyon grupları kıyaslandığı zaman B grubuna göre C grubunda %20 oranında bir azalma varken, C grubuna göre ise D grubunda %15'lik azalma olduğu tespit edilmiştir. Sonuçlarımıza göre SOD enzim aktivitelerindeki azalmanın en hızlı şekilde iskemi reperfüzyonun 1. saatlik grubunda

meydana geldiği görülmektedir (Tablo 1).

Gruplar, AOA değerleri açısından karşılaştırıldığında kontrol grubuna göre B grubunda %38, C grubunda %39, D grubunda ise %31 oranında bir azalma olduğu görülmüştür. Yine B grubuna göre 3 saatlik grupta %3 lük azalma varken, C grubuna göre D grubunda ise %13 lük artış olmuştur (Tablo 1).

TARTIŞMA

Karaciğeri de içeren farklı organlardaki reperfüzyon sonrası oksidatif stresin başlaması ve yayılmasında reperfüzyonun erken fazındaki ROS oluşumunun önemli rolünün olduğu genel kabul gören bir fikirdir. İskemi sürecinde hücreler membran bütünlüklerini koruyamazlar ve bu poliansatüre yağ asidi ve yağ asidi radikallerinin salınımına neden olur. İskemi aşamasında reoksijenasyon tekrar sağlanırsa yağ asidi radikalleri oksijenle reaksiyona girer ve lipid peroksidasyonu reaksiyonları husule gelir. Bu reaksiyon membran permeabilitesini artırır ve aktive olduğu zaman serbest oksijen radikalleri ve proteolitik enzimleri salgılayabilen lökosit kemotaksisini stimüle eder(20-21).

Karaciğer, iskemi-reperfüzyon hasarına yüksek oranda duyarlı olan bir organdır. Karaciğer iskemi reperfüzyon hasarı özellikle dolaşım bozukluğu olan haller, dissemine intravasküler koagülasyon (DIC), karaciğer transplantasyonu ve karaciğer cerrahisi gibi durumlarda oluşan klinik bir durumdur(3,6). Bu hasar karaciğer yetmezliği ve çoklu organ

yetmezliğinin patogeneğinde anahtar rol oynamaktadır(4). Bu duruma eşlik eden organ fonksiyon bozuklukları genellikle artmış kapiller permeabilite, interstisyel ödem, bozulmuş vazoregülasyon, dokuya inflamatuvar hücre infiltrasyonu, parankimal hücre disfonksiyonu ve nekrozla ilişkilidir(9). Hepatik iskemi-reperfüzyon hasarı serbest oksijen radikallerinin, sitokinlerin ve nötrofillerin reaksiyonunu kapsayan kompleks multifaktöryel fizyopatolojik bir süreçtir (7).

Reperfüzyonun 1. saatinde oksidan sistem hasarı daha belirgindir. Bu durum bulgularımızdaki MDA ile XO artışlarındaki ve SOD ile AOA azalmalarındaki yüzde oranlarıyla ortaya konulmuştur. Reperfüzyonun 3. ve 24. saatlerinde oksidan sistem hasarı daha yavaş olarak sürmüştür. Bu yavaşlama MDA ve XO değerlerinin 1. saat- 3. saat artış yüzdesi ve 3. saat- 24. saat artış yüzdesinden anlaşılmaktadır. SOD aktivitesindeki azalış, 1. saatte daha ani iken 3. ve 24. saatlerde azalmanın daha yavaş olarak devam ettiği görülmektedir. Bu durum zamana bağlı olarak reperfüzyon etkisinin azalması olarak yorumlanabilir. AOA' daki azalış ise 1. saatte ani iken 3. saatte azalma hızı yavaşlamış ve 24. saatte ise azalma yerine artış olmuştur. Fakat 24. saatte bu artışla geline düzey kontrol grubunun altında bir değer olmakla beraber istatistiksel olarak kontrol grubundan farksızdır. Bu durum 24 saat sonra reperfüzyon etkisinin azalması nedeniyle AOA' nın kendini düzeltmeye başlaması olarak yorumlanabilir (Tablo 1).

Tüm bu bulgularımız literatürdeki iskemi-reperfüzyon bulguları ile genellikle uyumludur (4, 5, 7, 8,10, 13, 24).

Hemorajik şokta hızlı sıvı replasmanı ile sistemik hemodinamik düzelmeye sağlanırken karın içi organların mukozal kan akımı düzeltilememektedir. Patofizyolojik olaylar; persistan mukozal iskemi, mukozal bütünlük kaybı ve proinflamatuvar/antiinflamatuvar maddelerin salınımı ile sonuçlanır. Laboratuvar ve klinik araştırmalara göre; hemorajik şok klasik resüsitasyonu sonrasındaki sistemik inflamatuvar cevapta

ana faktör splanknik hipoperfüzyondur. Çünkü volüm eksikliğinin yerine konulması ile, doku perfüzyonu tam olarak düzeltilememektedir(6).

Hemorajinin yol açtığı mikrovasküler bozukluk; mikrosirkülasyonun üç segmenti olan arteriyelleri (taşıyıcı sistem), kapillerleri (dağıtıcı sistem) ve venülleri (Drenaj sistemi) etkilemiştir. Perfüzyon zamanla parankim hücrelerinin metabolik ihtiyacı altına düşerse; doku düzeyindeki dolaşımsal yetmezlik yıkıcı olur. Şok özellikle; kapiller kan akımı azalmasına (perfüzyon basıncında azalmayla), endotelial hattın ödemine ve kapillerlerin tıkanmasına (aktif lökositler tarafından) sebep olur. Hemorajik şokta uygulanan klasik resüsitasyon; şok sendromundaki kapiller perfüzyon/fonksiyon bozukluklarının çok yönlü fizyopatolojisini düzeltmede genellikle yetersizdir. Ayrıca klasik resüsitasyon, reperfüzyon hasarı oluşturma yönünden zamanla ilişkilidir. Reperfüzyon hasar genişliğini dokuların iskemisi belirliyor olmasına rağmen, bu hasarın klasik intravasküler sıvı resüsitasyonu esnasında olduğu ve bu hasarın zamanla immun sistem aktivasyonu ile ilişkili olduğu yönündeki deliller artmaktadır. Bu immun sistem aktivasyonu; nötrofilleri ve dolayısıyla mikrosirkülasyonu etkileyen abartılı bir sistemik inflamatuvar cevaba neden olur. Tüm dokularda TNF alfa ve IL-6 gibi proinflamatuvar maddelerin üretimi artar (6)

Karaciğer iskemi-reperfüzyon hasarına sebep olan çeşitli mekanizmalar vardır. Bu mekanizmalardan birisi de ROS üretimidir. ROS kaynakları olarak, karaciğer Kupffer hücreleri ve nötrofil aktivasyonu, hem proteinlerinin oksidasyonu (iskemiyle oluşan asidik durumda) ve ksantin/XO reaksiyonu kabul edilmektedir (10).

ROS aşırı üretimi muhtemelen önemli oranda MDA artışı oluşturacaktır. Karaciğer dokusunda artmış MDA düzeyi ile ilgili bulgumuz; iskemi-reperfüzyon sonrasında karaciğer lipid peroksidasyonunun kupffer hücreleri ve polimorfonükleer lökosit (PMN) kaynaklı ROS ile tetikleneceği hipotezini desteklemektedir. Lipid peroksidasyonunun ana hedefi poliansatüre yağ asitlerinin bulunduğu

hücre membran fosfolipidleridir. Özellikle araşidonik asit metabolizması üzerine olan etkiler mikrosirkulatuvar fonksiyon bozukluğuna yol açabilir. Kupffer hücre aktivasyonu TNF alfa, IL-1 ve ROS salınımı ile sonuçlanabilir. TNF- α üretiminin, iskemi-reperfüzyon hasarı başlangıcında merkezi rolü olduğu düşünülmektedir. TNF- α 'nın; endotelial hücreler ve lökositler üzerine adezyon moleküllerinin fazla gönderilmesine neden olduğu, nötrofil aktivitesi üzerine farklı etkileri olduğu (ROS üretim artışı, nötrofil birikiminde artış ve endotel hücrelerine yapışma) ve hepatosit nekrozu ve apoptozise yol açtığı çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir (25-27). Bizim bulgularımızdaki MDA artışı indirekt olarak TNF- α 'ya bağlı ROS artışını işaret edebilir.

İskemi esnasında PMN'ler endotelde birikebilir ve bu birikme reperfüzyon döneminde belirgin olarak artabilir. Daha sonra iskemik lezyonlara PMN infiltrasyonu gerçekleşir. Bu durumda PMN'lere bağlı hasar mekanizmaları çeşitlidir. Birinci mekanizma, aktif PMN hücrelerinin çeşitli sitotoksik maddeler (proteaz, kollajenaz, sitokinler, lökotrienler, katyonik proteinler gibi) salgılayarak doku hasarı oluşturmalarıdır. İkinci mekanizma, PMN aktivasyonunun, bizzat PMN hücrelerinin bağlanma özelliklerini ve hücre iskelet sertliğini arttırmasıdır. Bu nedenle oluşan PMN toplanmasındaki artış, fiziksel olarak kapiller akışı engelleyebilir. Bu engelleme ek bir iskemi oluşturarak hücre ölümüne yol açabilir. Üçüncü mekanizma ise, PMN hücrelerinin ROS'ları fazla miktarlarda salgılayabilmesidir(4). Bu mekanizmalarla nötrofiller vasküler hasara neden olmasının yanı sıra proteazlar ve ROS salınması ile karaciğer parankim hücrelerine saldırabilir.

İskemi sonrası dokuya nötrofillerin toplanmasında reaktif oksijen metabolitlerinin (ROM) rol oynadığı ve aynı zamanda aktif nötrofillerin ROM üretiminde önemli bir kaynak olduğu literatürde bildirilmektedir(9). Aynı zamanda aktive nötrofiller iskemi reperfüzyon hasarının temel tetikleyicisi olan ROS ve sitotoksik proteinlerin sentezi ve akstrasellüler sıvıya salınımına yol açarak doku hasarını indüklerler(28).

Bu nedenle nötrofillerin birikimi ve aktivasyonu, reperfüzyon hasarının etkisi mi veya sonucu mu sorusu ortaya çıkmıştır. Bu durum ilginçtir ve tartışmalıdır.

Karaciğer iskemi-reperfüzyon hasarına neden olan mekanizmalardan ROS üretim mekanizmasının ana kaynaklarından birisi de XO oluşumudur. İskemi esnasında ksantin dehidrogenaz (XD) ksantin oksidaza (XO) dönüşür. Reoksjenasyonda XO, ROS üretmek üzere moleküler oksijenle reaksiyona girer. XO artışının yanı sıra XO'nun substratı olan ksantin de birikimi vardır. Hepatik iskemi sonrası ksantin birikimi ve XO'ya bağlı olarak ROS üretim artışı, iskemi-reperfüzyon hasarını arttırabilir. Ksantin ve XO'nun karaciğerden dolaşıma salınması sistemik komplikasyonların, mesela akciğere nötrofil infiltrasyonunun patogeneğinde de önemli olabilir (10).

İskemi esnasında anaerobik metabolizma nedeniyle hücre içi pH'nın asit yönde değişimi, hücre membranlarında fonksiyon bozukluğuna yol açar. Bu fonksiyon bozukluğu, kalsiyum ve diğer katyonlarda değişim ve ATP'nin inozin ve hipoksantine indirgenmesini sağlar. İntrasellüler Ca değişikliği ve hipoksantin ortamda bulunması, reperfüzyon süresince ROS'ların üretimine neden olur (24).

Oksidan strese karşı korumada endojen serbest radikal yakalayıcı sistemler önemlidir ve SOD bunlardan biridir. Süperoksit dismutaz enzimi süperoksit radikallerini hidrojen peroksit'e çevirerek temizler. Sitolik antioksidanlardan katalaz ve glutatyon peroksidaz hidrojen peroksiti suya indirger. Karaciğer iskemi-reperfüzyonu esnasında SOD düzeyi azalabilir. SOD düzeyindeki azalma, Kanko ve Sare gibi araştırmacılara göre genellikle ROS'ların yüksek seviyelerinin SOD üzerindeki toksik etkisine bağlanabilir(23,24). Ya da bizim tahminimize göre bilinmeyen bir nedenle SOD aktivitesinde azalma olur ve buna bağlı olarak süperoksit radikallerinin temizlenmesi yeterince sağlanamaz. Bu durumda da lipid peroksidasyonu ve peroksidasyon ürünleri artar.

Sonuç olarak; çalışmamızda bulduğumuz MDA ve XO düzeylerinde

artış ile SOD ve AOA düzeylerindeki azalmanın nedeni; hemorajik şok ve volüm replasmanı ile oluşan iskemi-reperfüzyondur. Bu değişimde resüsitasyon yani reperfüzyon döneminin daha etkin olduğunu düşünüyoruz. Özellikle 1. saatteki ani MDA ve XO artışları ile SOD ve AOA azalması bu düşüncemizi teyit etmektedir. Trafik kazaları, delici, kesici ve ateşli silah yaralanmaları, yüksekte düşmeler, iç kanamaları vb. kanamalı olgularda çoklu organ hasarları açısından ilk saatler; özellikle hipovolemiye bağlı iskemi yönünden önemlidir. Acil Tıp hekimliğinin bu vakalardaki temel ve önemli uygulaması volüm replasmanıdır. Bu kaçınılmaz klasik resüsitasyon uygulaması reperfüzyon hasarı göz önüne alınarak düşünüldüğünde istenmeyen durumlara yol açabilmektedir. Bu durum tüm hastalar açısından önemli olup bu aşamada volüm replasmanının yanı sıra reperfüzyon hasarını da önleyici veya azaltıcı ek tedavi uygulamaları düşünülmelidir. Özellikle α - tokoferol ve askorbik asit gibi bilinen antioksidanlar ve halen antioksidan etkisi olabileceği düşüncesi ile üzerinde çalışılmakta olan CAPE, melatonin v.b. ajanlar reperfüzyonun ilk saatlerinde tercih edilmeli ve bu yönde yeni çalışmalar planlanmalıdır(29,30).

KAYNAKLAR

1. Scafer M, Krahenbuhl L. Effect of laparoscopy on intraabdominal blood flow. *Surgery*. 2001;129(4):385-9.
2. Eleftheriadis E, Kotzampassi K, Heliadis N, Sarris K. Gut ischemia, oxidative stress, and bacterial translocation in elevated abdominal pressure in rats. *World J Surg*. 1996;20(1):11-6.
3. Yilmaz S, Koken T, Tokyol C, Kahraman A, Akbulut G, Serteser M, et al. Can preconditioning reduce laparoscopy-induced tissue injury? *Surg Endosc*. 2003;17(5):819-24.
4. Liu Z, Xu Z, Shen W, Li Y, Zhang J, Ye X. Effect of pharmacologic preconditioning with tetrandrine on subsequent ischemia/reperfusion injury in rat liver. *World Journal Of Surgery* 2004;28(6):620-4.
5. Cheng F, Li YP, Cheng JQ, Feng L, Li SF. The protective mechanism of Yisheng Injection against hepatic ischemia reperfusion injury in mice. *World journal of gastroenterology* 2004;10(8):1198-203.
6. Garrison RN, Conn AA, Haris PD, Zakaria ER. Direct peritoneal resuscitation as adjunct to conventional resuscitation from hemorrhagic shock: a better outcome. *Surgery* 2004;136(4):900-8.
7. Aydemir EO, Var A, Uyanik BS, Ilkgul O, Aydede H, Sakarya A. The protective mechanisms of defibrotide on liver ischaemia-reperfusion injury. *Cell Biochem Funct*. 2003;21(4):307-10.
8. Giakoustidis D, Papageorgiou G, Kostopoulou E, Iliadis S, Giakoustidis A, Kontos N, et al. High dose intravenous immunoglobulin pretreatment: effect on lipid peroxidation and reperfusion injury to the liver. *World J Surg*. 2003;27(12):1300-5.
9. Sener G, Tosun O, Sehirli AO, Kacmaz A, Arbak S, Ersoy Y, et al. Melatonin and N-acetylcysteine have beneficial effects during hepatic ischemia and reperfusion. *Life Sci* 2003;72(24):2707-18.
10. Peralta C, Bulbena O, Xaus C, Prats N, Cutrin JC, Poli G, et al. Ischemic preconditioning: a defense mechanism against the reactive oxygen species generated after hepatic ischemia reperfusion. *Transplantation*. 2002;73(8):1203-11.
11. Erdogan O, Yildiz S, Basaran A, Demirbas A, Yesilkaya A. Effect of intraportal verapamil infusion on hepatic ischemia-reperfusion injury. *Pol J Pharmacol*. 2001;53(2):137-41.
12. Yuan GJ, Ma JC, Gong ZJ, Sun XM, Zheng SH, Li X. Modulation of liver oxidant-antioxidant system by ischemic preconditioning during ischemia/reperfusion injury in rats. *World J Gastroenterol*. 2005;11(12):1825-8.
13. Bertuglia S, Giusti A. Influence of ACTH-(1-24) and plasma hyperviscosity on free radical production and capillary perfusion after hemorrhagic shock *Microcirculation*. 2004;11(3):227-38.
14. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 1951;193(1):265-75.
15. Hammouda A el-R, Khalil MM, Salem A. Lipid peroxidation products in pleural fluid for separation of transudates and exudates. *Clin Chem* 1995;41(9):1314-5.
16. Prajda N, Weber G. Malignant transformation-linked imbalance: decreased xanthine oxidase activity in hepatomas. *FEBS Lett* 1975;59(2):245-9.
17. Sun Y, Oberley LW, Li Y. A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clin Chem*. 1988;34(3),497-500.

18. Durak I, Yurtaslanı Z, Canbolat O, Akyol O. A methodological approach to superoxide dismutase (SOD) activity assay based on inhibition of nitrobluetetrazolium (NBT) reduction. *Clin Chim Acta* 1993;214:103-4.
19. Koracevic D, Koracevic G, Djordjevic V, Andrejevic S, Cosic V. Method for the measurement of antioxidant activity in human fluids. *J Clin Pathol*. 2001;54(5): 356-61.
20. Gedik E, Girgin S, Obay BD, Ozturk H, Ozturk H, Buyukbayram H. Iloprost, a prostacyclin (PGI₂) analogue, reduces liver injury in hepatic ischemia-reperfusion in rats. *Acta Cir Bras*. 2009;24(3):226-32.
21. Baltalarlı A, Ozcan V, Bir F, Aybek H, Sacar M, Onem G, et al. Ascorbic acid (vitamin C) and iloprost attenuate the lung injury caused by ischemia/reperfusion of the lower extremities of rats. *Ann Vasc Surg*. 2006;20:49-55.
22. Zulfikaroglu B, Koc M, Soran A, Isman F, Cinel I. Evaluation of oxidative stress in laparoscopic cholecystectomy. *Surg Today*. 2002;32(10):869-74.
23. Sare M, Yilmaz I, Hamamci D, Birincioglu M, Özmen M, Yesilada O. The effect of carbon dioxide pneumoperitoneum on free radicals. *Surg Endosc*. 2000;14(7): 649-52.
24. Kanko M, Maral H, Akbas MH, Ozden M, Bulbul S, Omay O, et al. Protective effects of clopidogrel on oxidant damage in a rat model of acute ischemia. *Tohoku J Exp Med*. 2005;205(2):133-9.
25. Issekutz TB. Effects of six different cytokines on lymphocyte adherence to microvascular endothelium and in vivo lymphocyte migration in the rat. *J Immunol*. 1990;144(6):2140-6.
26. Tsujimoto M, Yokota S, Vilcek J, Weissmann G. Tumor necrosis factor provokes superoxide anion generation from neutrophils. *Biochem Biophys Res Commun*. 1986;137(3):1094-100.
27. Meyer JD, Yurt RW, Duhaney R, Hesse DG, Tracey KJ, Fong YM, et al. Tumor necrosis factor-enhanced leukotriene B₄ generation and chemotaxis in human neutrophils. *Arch Surg*. 1988 Dec;123(12):1454-58.
28. Guneli E, Cavdar Z, Islekel H, Sarioglu S, Erbayraktar S, Kiray M, Sokmen S, et al. Erythropoietin protects the intestine against ischemia/ reperfusion injury in rats. *Mol Med*. 2007;13(9-10):509-17.
29. Kart A, Cigremis Y, Ozen H, Dogan O. Caffeic acid phenethyl ester prevents ovary ischemia/reperfusion injury in rabbits. *Food Chem Toxicol*. 2009;47(8): 1980-4.
30. Xu GX, Xiao ZY, Xie MS, Feng YL, Guo J, Fu LX. Protective effects of melatonin on cultural human retinal pigment epithelial cells against oxidative damage in vitro. *Zhonghua Yan Ke Za Zhi*. 2009;45(6): 528-32.