

163600

**T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ ÇOCUK CERRAHİSİ
ANABİLİM DALI**

Tez Yöneticisi
Prof. Dr. Mehmet PUL

163600
**N-ASETİLSİSTEİNİN İNTESTİNAL İSKEMİ-
REPERFÜZYON HASARINA ETKİSİ**

(Uzmanlık Tezi)

Dr. Süleyman AYVAZ

EDİRNE-2005



Cerrahi sanatını bana öğreten ve tez yazımımın her aşamasında bilgi ve deneyimini esirgemeyen Çocuk Cerrahisi Anabilim Dalı Başkanı hocam, Sayın Prof. Dr. Mehmet PUL'a, yardımlarından dolayı Sayın Prof. Dr. Selçuk BİLGİ ve Sayın Doç. Dr. Hafize UZUN'a teşekkürü bir borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
GENEL BİLGİLER.....	3
İNTESTİNAL İSKEMİ REPERFÜZYON HASARI.....	3
SERBEST OKSİJEN RADİKALLERİNİN OLUŞUMU.....	5
SERBEST RADİKALLER.....	6
FOSFOLİPAZ A₂ AKTİVASYONU.....	8
SERBEST RADİKALLERİN HÜCRESEL ETKİLERİ.....	10
ANTIOKSİDAN SAVUNMA MEKANİZMALARI.....	11
N-ASETİLSİSTEİN.....	13
GEREÇ VE YÖNTEMLER.....	17
BULGULAR.....	26
TARTIŞMA.....	40
SONUÇLAR.....	45
ÖZET.....	47
İNGİLİZCE ÖZET.....	49
KAYNAKLAR.....	51
EKLER	

SİMGE VE KISALTMALAR

AMP	: Adenozin monofosfat
ATP	: Adenozin trifosfat
Ca⁺⁺	: Kalsiyum
DNA	: Deoksiribonükleik asit
DTNB	: 5, 5'- di tio bis - 2-nitro benzoik asit
GPx	: Glutatyon peroksidaz
GSH	: Glutatyon
GSSG	: Okside glutatyon
H₂O₂	: Hidrojen peroksit
HE	: Hemotoksilen eosin
HO₂⁻	: Hidroperoksil radikali
IL-1	: İnterlökin-1
İ	: İskemi
İ/R	: İskemi/reperfüzyon
KAT	: Katalaz
LTB₄	: Lökotrien B 4
MDA	: Malondialdehit
MPO	: Miyeloperoksidaz
NADP	: Nikotinamid adenindinükleotid fosfat
NAS	: N-Asetilsistein
NO	: Nitrik oksit
O₂[·]	: Süperoksit radikali

OH[·]	: Hidroksil radikali
PGI₂	: Prostosiklin
RNA	: Ribonükleik asit
SMA	: Süperior mezenterik arter
SOD	: Süperoksit dismutaz
TBARS	: Thiobarbitürik asitle reaksiyon veren substratlar
TXA₂	: Tromboksan A 2
VWF	: Von Willebrand faktör



GİRİŞ VE AMAÇ

İskemi/reperfüzyon (I/R) hasarı cerrahi uygulamalarda sık karşılaşılan klinik bir tablodur. Örneğin, kronik invaginasyon, tekrarlayan strongüle hernisi olan çocuklar, sık brid ileus atağı geçiren hastalarda olduğu gibi, dokulara yeterli miktarda oksijen ve diğer metabolik gereksinimlerin ulaştırılamaması sonucunda oksidatif stres ortaya çıkar. Bu hem lokal, hem de sistemik bazı mekanizmaları harekete geçirir. Dolayısıyla da serbest oksijen radikallerinin sorumlu olduğu bir dizi kaskat sistemlerinin aktive olmasıyla multipl organ yetmezliğine varan ciddi klinik sonuçlar ortaya çıkarabilir (1). Çocuklarda görülen invaginasyon, intestinal volvulus, inkarsere herni, bağırsağın fibröz adhezyonarı ve mezenter arter tıkanıklığı sonucunda iskemik hasar meydana gelmektedir (2). Özellikle dokuların beslenmesi ve oksijenizasyonu bozulduktan sonra serbest oksijen radikelleri ortaya çıkar. Reperfüzyonu takiben de ortaya çıkan bu serbest oksijen radikalleri sistemik dolaşıma katılarak periferde yıkıcı etkisini gösterir. Bu etkiyi önlemek için tanımlanan bazı antioksidan ajanlar; C vitamini, E vitamini, mannitol, melatonin, bilirubin, allopurinol, cafeik asit fenil etil ester olup deneysel ve klinik birçok çalışmada kullanılmışlardır. Son yıllarda N-asetilsistein (NAS)'in de antioksidan özelliği ortaya konmuştur (1). Sistein, elektron vererek organik molekülleri indirgeyen, sülfür içerikli, tiol grubu bir antioksidandır. Tiol grubu antioksidanlar myogloblin oksiferil kompleksini etkili bir şekilde indirgerler. NAS glutatyon prekürsörü ve analogu olarak mukolitik, oksidatif stres kaynaklı hastalıklar, çeşitli solunum yolu hastalıkları ve sepsiste koruyucu ve tedavi amaçlı kullanılmaktadır. Planlanan bu çalışmada antioksidan ajanın hangi dönemde verileceği araştırıldı.

İskemik hasarda ve reperfüzyon sonucunda ortaya çıkan lokal ve sistemik etkilerin önlenmesinde antioksidanların kullanımı kabul edilmiştir. Ayrıca NAS'ın antioksidan

özellikleri de bilinen bir gerçektir. Ancak İ/R hasarını önlemek için antioksidan ajan kullanımının zamanı tam olarak açıklanmamıştır. Aslında bu klinik uygulamada oldukça önemli bir noktadır. Eğer İ/R hasarı olmadan risk grubundaki hastalara antioksidan madde verilmesi faydalı ise bu, literatüre önemli bir katkıdır. Ceran ve ark. (3) yaptıkları çalışmada, antioksidan ajan olarak bilirubini İ/R hasarından önce vermişlerdir. Oysa Kazez ve ark. (4) antioksidan ajan olarak melatonini İ/R hasarından sonra uygulamışlardır. Bu çalışmalarda görüldüğü gibi antioksidan savunma mekanizması oksidatif stresi olumlu yönde etkilerken, antioksidan ajanın veriliş zamanı konusunda fikir birliği yoktur. Ayrıca NAS'ın intestinal iskemi reperfüzyon modelinde etkinliği bilinmemektedir. Planlanan bu çalışma ile yukarıda sıralanan sorulara açıklık getirmek amaçlanmıştır.



GENEL BİLGİLER

İNTESTİNAL İSKEMİ REPERFÜZYON HASARI

İskemi, kan akımının hücrel fonksiyonları karşılamak için gerekli olan düzeyin altında olması durumudur. İskemi sırasında hücrel enerji depolarının tükenmesi sonucunda iskemik kaskat olarak bilinen olaylar zinciri başlamaktadır. İskemik dokunun reperfüzyonu yani kesilen kan akımının tekrar sağlanması durumunda bir yandan iskemi sırasında kaybolan bazı fonksiyonların geri gelmesi sağlanırken, diğer yandan ani ve fazla miktardaki oksijen ve dolaşımdaki kan elemanlarının iskemik dokularda özellikle serbest oksijen radikalleri ile daha ileri hasarlara yol açmaktadır (5).

Bağırsak iskemisi en çok superior mezenterik arter (SMA) tıkanıklığı sonucu meydana gelmektedir. Mezenterik dolaşım bozukluğu yapan diğer bir çok klinik durum da bağırsak iskemisine neden olur. Bunlar arasında trombus ve emboli gibi doğrudan damar içini tıkayan patolojiler; inkarsere inguinal herni, invaginasyon, nekrotizan enterokolit, tümör, fibrotik band gibi dışardan bası yapan cerrahi hastalıklar; şok, hemokonsantrasyon, hipovolemi, atriyal fibrilasyon gibi perfüzyon bozukluğuna yol açan nonokluziv durumlar sayılabilir (6). Etiyolojisine bakmaksızın akut bağırsak iskemisinin prognozu kötü olup, mortalite oranı %25-75 arasındadır. Bütünüyle mezenterik kan akımına bağlı olan ince bağırsak, bazı bölgelerinde karın arka duvarıyla vasküler bağlantıları olan kalın bağırsağa göre iskemiden daha çok etkilenir. Ancak yakın düzeylerdeki iskeminin oluşturduğu hasar, hızla gelişen sekonder bakteriyel invazyona bağlı olarak kalın bağırsakta daha fazladır. Kalın bağırsak tutulumunda iskemik zedelenme daha çok splenik fleksür ve rektumun orta kısmında görülür. Çünkü bu alanlar superior mezenterik, inferior mezenterik ve hipogastrik arter sistemlerinden

en az yararlanan anatomik bölgelerdir. İnce bağırsakların mukoza ve submukozaları iskemiye kalın bağırsaklara oranla daha duyarlıdır. Arteriyel tıkanmada, komşu normal barsak dokusundan keskin bir sınırla ayrılma söz konusudur. Venöz tıkanmada sınırlar belirgin değildir (7).

Bağırsak kan akımının azalmasından hemen sonra sıklıkla şiddetli ve aralıklı karın ağrısı gelişir. Dışkı çıkışı yavaşlar ve bazen tabloya rektal kanama ve kusma eşlik eder. Genellikle şiddetli ağrı atakları arasında ağrısız dönemler vardır ve fizik bakıda kayda değer bulgular görülmez. Oskültasyonda hiperaktif bağırsak sesleri duyulur. İlerleyen saatlerde karın ağrısı şiddeti azalır. Ancak, ağrı sürekli ve yaygın bir hal alır. Fizik bakıda karın tüm kadrantlarında yaygın hassasiyet vardır. Dinlemekle bu evrede bağırsak sesleri duyulmaz. Bağırsakta nekroz geliştiğinde sıvı, protein ve elektrolit kaybı başlar. Yaygın peritonit tablosu gelişir. Sıvı ve elektrolit dengesindeki bozukluk sonucu hastanın genel durumu iyice kötüleşir ve şok dönemine girilir (8).

Bağırsak kan akımının azalması yada durması kolleteral bir dolaşım ile kompanse edilmezse geri dönüşümsüz iskemik hasara neden olur (9). İntestinal iskemik hasar mukozanın villüs tabakasında başlar. Mukoza tabanındaki hasar ise proteolitik enzimlerin, bakterilerin ve endotoksinlerin bağırsak lümeninden sistemik dolaşıma katılımına yol açar. Kardiyak baskılayıcı maddelerin salınımı ile birlikte hastanın kardiyak ve solunumsal fonksiyonları da kötü yönde etkilenmiş olur. Bağırsak iskemisi olan ve semptomların başlamasından sonraki ilk 12 saat içinde bağırsak rezeksiyonu yapılmaksızın tedavi edilen hastaların retrospektif analizi, intestinal ve kardiyopulmoner sorunların reperfüzyonundan sonra ortaya çıktığını göstermiştir.

Revaskülerize bağırsağın iyileşmesi genellikle birkaç hafta alır. Bu dönem genellikle diyare ve malabsorbsiyon ile karakterizedir. Sıklıkla mukozal ülserasyon ve lümen içine kanama gibi nadiren hayatı tehdit eden ama kan transfüzyonu gerektiren durumlar gözlenir. Sonraki bir safhada mukozal lezyonlar bazı hastalarda cerrahi tedavi gerektiren bağırsağın mekanik darlıklarına yol açar (10).

Schoenberg ve ark. (11) yaptıkları çalışmalarda bir saatlik barsak iskemisinden sonra mukozada birkaç lezyonun oluştuğunu, iki saat iskemi ve ardından reperfüzyonda bu lezyonların giderek arttığını, üç saat iskemi sonrasında ise barsağın absorpsiyon kapasitesinin azaldığını göstermişlerdir. Reperfüzyon sonrası barsağın su absorpsiyon fonksiyonu eski haline dönmemekte ve bağırsak lümeninde su kaybı oluşmaktadır (12). Ratlarda yapılan çalışmalarda, İ/R ataklarının, ince bağırsak üzerindeki etkileri incelenmiş; 30 dakika (dk) iskemi, ardından 24 saat reperfüzyon yapılan ratların bir grubu, 30 dk iskemi ve iki saatlik

reperfüzyona tabi tutulmuş. Sonuçlar kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, iki kez İ/R'ye maruz kalan grupta nötrofil infiltrasyonu, lökotrien B₄ (LTB₄) ve aktive nötrofillerin artmasına rağmen oluşan mukozal hasarın, bir kez iskemiye maruz kalan ratlardan daha az olduğu gösterilmiştir. Sonuç olarak, ilk geçirilen İ/R atağının daha sonraki ataklara karşı adaptif bir cevap geliştirdiği düşünülmektedir (13). Yani, daha önce kısa periyotlarda iskemiye maruz kalmak, daha uzun süreli iskemilere karşı hücrel hasarları azaltabilir (14). Reperfüzyonun, iskemik dokularda yaptığı hasarı destekleyen başka görüşlerde mevcuttur. Kısa periyotlarda yapılan reperfüzyonda, dokularda küçük histolojik değişiklikler oluşurken, uzun periyotlarda yapılan reperfüzyonlarda daha ileri derecede hasarı gösteren değişiklikler oluşur. Dört saatlik iskeminin oluşturduğu hasar, üç saatlik iskemi ve bir saatlik reperfüzyon sonrası oluşan hasardan daha azdır. Ayrıca reperfüzyonun başında verilen tedavi iskemi reperfüzyon hasarını azaltmak amacıyla iskemiden önce verilen tedavi kadar etkilidir.

Sonuç olarak, doku hasarının ortaya çıkabilmesi reperfüzyon sırasında iskemik dokuların moleküler oksijenle karşılaşmasına bağlıdır (15). Ayrıca reperfüzyon sonucunda oluşan arteriyel vazospazm, iskemiye bağlı interstisiyel ödem, hemoraji ve venöz konjesyon mikrodolaşımı bozmak suretiyle oluşan hasara katkıda bulunan diğer faktörlerdir (16). İntestinal İ/R hasarı oluşumunda iki mekanizma sorumlu tutulmaktadır. Bunlardan birincisi serbest oksijen radikallerinin oluşumu, ikincisi ise iskemi sırasında kalsiyumun hücre içi artışına bağlı fosfolipaz A₂'nin aktive olmasıdır (17).

SERBEST OKSİJEN RADİKALLERİNİN OLUŞUMU

İntestinal İ/R sürecinde serbest oksijen radikalleri ve türevlerinin üretimi ile ilgili çeşitli mekanizmalar mevcuttur. Serbest oksijen radikallerinin üretiminde en önemli basamak ksantin oksidaz sistemidir (18).

İntestinal İskemi Sırasında Pürin Metabolizması

Hipoksi sırasında adenzin trifosfat (ATP) üretimi durmasına rağmen kullanımı devam eder. Yüksek enerjili ATP'nin fosfat bağlarının kırılmasıyla adenzin monofosfat (AMP) oluşur. Daha ileri aşamalarda ATP adenzine kadar indirgenir. Adenzin, inozin üzerinden hipoksantine indirgeneceği ekstraselüler aralığa hızla dağılır (10). Yapılan bir çalışmada 2 saatlik iskeminin ATP konsantrasyonunu iskemi öncesi değerinin yaklaşık %40'ına düşürdüğünü, bu düşüşün barsak dokusunda AMP'nin 7,6 kat, hipoksantin 10 kat

arttığı gösterilmiştir (18). Bağırsaklar, vücuttaki ksantin dehidrogenaz ve oksidazın en zengin kaynağıdır (19). Pickett ve ark. (20) en yüksek enzim konsantrasyonunu ince bağırsağın villöz tabakasında olduğunu göstermişlerdir. Ayrıca ksantin oksidaz aktivitesi villus tabanından uçlarına doğru artış gösterir. Bu durum, iskemi sonrası villus uçlarındaki hasarın tabana göre daha fazla olduğu fikrini destekler (12). Normal dokularda hipoksantin, ürik aside dönüşür. Hipokside ise hipoksantin daha fazla metabolize edilemez ve birikir. Aynı zamanda iskemide ksantin dehidrogenazın büyük bir kısmı ksantin oksidaza dönüşür. Bu dönüşümün büyük bir kısmı iskeminin başlaması ile ilk dakikada gerçekleşir. Reperfüzyonun başlaması ile ksantin oksidaz hipoksantini ksantine, sonrada ürik aside dönüştürür. Bu basamakta serbest oksijen radikalleri oluşur.

SERBEST RADİKALLER

Vücuttaki birçok reaksiyonda rol oynayan moleküler oksijen yaşam için mutlak ve aerobik organizmalar için önemli bir besindir. Oksijensiz ortamda ölüm olur. Ancak bu durum daha çok oksijenin daha iyi olacağı anlamına gelmez. Oksijen konsantrasyonu % 100 olduğunda insanların yanı sıra bir çok aerobik organizma için toksik etkilerinin olduğu da bilinmektedir. Bu nedenle çeşitli hastalıkların tedavisi sırasında kullanılmı sınırlı olmaktadır (21).

Serbest oksijen radikalleri, dış yörüngelerinde bir veya daha fazla ortaklanmamış elektron bulduran atom veya moleküllerdir. Elektronlar, dış yörüngelerinde çiftler halinde bulduklarında o bileşik daha kararlı ve sabit bir yapıya sahip olur. Eksik elektronlu moleküller ise karalı değildirler. Kolaylıkla elektron alıp vererek, herhangi bir molekül ile reaksiyona girebilirler. Serbest oksijen radikallerinin yarı ömürleri çok kısa olmasına rağmen genel olarak çok reaktiftirler (22).

Serbest oksijen radikalleri ve lipid peroksidasyonunun organ ve dokularda meydana getirdiği hasar ve hastalıkların patogenezindeki rolleri yoğun bir şekilde araştırılmaktadır. Yaşlanma, dejeneratif hastalıklar, yanıklar, akciğer hastalıkları, karsinogenez, diabet, ateroskleroz ve katarakt oluşumundaki etkileri birçok çalışmada kanıtlanmıştır (23).

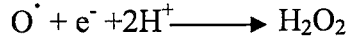
Süperoksit Radikali (O₂')

Serbest oksijen radikallerinin ilk oluşumu süperoksit (O₂') radikalidir. Süperoksit genellikle instabildir ve hidrojen peroksit ve oksijene dönüşür. Ancak daha ciddi hasara neden

olan oksijen radikallerinin öncüsü olması nedeni ile önemlidir (24). Fagositoz görevi yapan makrofaj, nötrofil ve monositler tarafından enzimatik olarak üretilirler (25).

Hidrojen peroksit (H₂O₂)

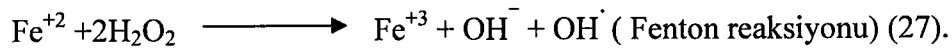
Süperoksida bir elektron eklenmesiyle oluşur.



Hidrojen peroksit hücre membranlarından kolaylıkla geçebilen, endotelial hücreleri hasarlayabilen güçlü bir sitokindir. Serbest radikal olmadığı halde birçok reaktifin oluşum reaksiyonlarına katıldığı için H₂O₂ de toksik metabolitler içinde yer alır. Toksik özellik gösterebilmesi için hidroksil radikaline dönüşmek zorunda olabilir (26). Hidrojen peroksit zayıf ve yavaş bir oksidandır. Katalaz enzimi ile H₂O ve O₂'ye yıkılır. Ancak reperfüzyonda H₂O₂, süperoksit radikali ile Haber-Weiss reaksiyonuna girer (24). Haber-Weiss reaksiyonu, demirin (Fe) katalizörlüğünde gerçekleşen, süperoksit radikali ve hidrojen peroksitin Fe eşliğinde reaksiyona girip, sonuçta hidroksil radikali (OH[·]), hidroksil kökü (OH⁻) ve oksijenin olduğu bir reaksiyondur.



Normal şartlarda bu reaksiyon fizyolojik önemi olmayacak kadar yavaştır. Ancak hemoproteinler ve metal şelatların varlığında Fenton reaksiyonu denen reaksiyonla daha hızlı olarak meydana gelir.



Hidroksil Radikali (OH[·])

Fe ile H₂O₂'nin birleşmesi ile oluşur.



Hidroksil radikali, bilinen serbest radikaller içinde en güçlü olan ve doku hasarında sorumlu ana radikaldir (25). Çok kısa ömürlü ve reaktif olan bu radikal, protein, polisakkarit, nükleik asit ve ansatüre yağ asitleri gibi birçok biyolojik madde ile reaksiyona girer. Bu radikalın en önemli özelliği, hidrojen atomlarını hücre membranındaki poliansatüre yağ asitlerinden ayırmasıdır. Lipid peroksidasyonunu başlatarak hücre membranında çözülme ve buna bağlı hücre ölümü olur (28).

Hidroperoksil Radikali (HO_2^-)

Süperoksit radikalinin protonlanmasıyla oluşan ve süperoksitten daha güçlü olan bir ajandır. Biyolojik membranlardan kolay geçebilme ve yağ asitleriyle direkt olarak reaksiyona girebilme özelliği vardır (29).

Nitrik Oksit (NO)

NO, hemostatik olaylarda ve organizmanın savunma mekanizmalarında otokrin ve parakrin etkisi olan bir aracıdır. Makrofajlar, nötrofiller, hepatositler ve endotel hücreler tarafından üretilir. En önemli fonksiyonu vücudun çeşitli dokularında interlökin-1 (IL-1) ve sitokinlerin etkilerine paralel bir işlev görmesidir (30). Tümör hücrelerini, parazitleri, bakterileri ve mantar hücrelerini öldürmede görev alır. Ancak yüksek seviyelerde normal hücreler üzerinde de toksik etkisi vardır. Süpeoksit anyonları ile inaktifleşir ve SOD enzimi ile korunur. Bu bakımdan serbest radikal tutucu olarak kabul edilse de uygun ortamlarda süperoksit ile güçlü bir oksidan olan peroksinitriti oluşturur. Düşük pH'da stabil değildir. Spontan olarak parçalanarak hidroksil radikali ve nitrojen oksit oluşturur (29).

FOSFOLİPAZ A_2 AKTİVASYONU

Reperfüzyon sırasında hücre içi Ca^{++} akışının artması, fosfolipaz A_2 'nin aktivasyonuna neden olur. Fosfolipaz A_2 , hücre membranındaki fosfolipidlerden yağ asitlerini ayırarak lesitinden lizolesitin, sefalinden lizosefalin ve fosfotidilkolinden lizofosftidilkolin oluşturan hidrolitik bir enzimdir. Özellikle lizofosfatidilkolin konsantrasyon artışı ile reperfüzyon sonrası fosfolipaz artışı arasında paralellik vardır. Oldukça sitotoksik olup, iskemi sonrası permeabiliteyi artırır (27). Hücre içi Ca^{++} artışı ile birlikte fosfolipaz A_2 'nin aktivasyonu siklooksijenaz ve lipoksioksijenaz yollarını harekete geçirir. Siklooksijenaz yolu ile prostoglandinler, lipoksioksijenaz yolu ile LTB_4 ve diğer araşidonik asit metabolitleri olan tromboksan A_2 (TXA_2) oluşur. TXA_2 ve LTB_4 güçlü kemotaktik ajanlardır. Proteolitik enzimleri artırarak serbest oksijen radikallerinin artışına ve reperfüze olan dokuda nötrofillerin birikimine neden olurlar (31).

Araşidonik asit metabolitlerinden ilki olan prostosiklin (PGI_2), fosfolipaz aktivasyonu ile endotelial hücrelerden salınır. Trombosit agregasyonunu önleyen güçlü bir

vazodilatatördür. İ/R hasarı ile birlikte PGI₂ düzeyinin azalması, hasarlanan dokularda ödemi arttırmak suretiyle dolaşımın giderek bozulmasına yol açar.

TXA₂ ise, PGI₂ aksine trombosit agregasyonuna ve vazospazma neden olur. Araşidonik asitten trombositler tarafından sentezlenir. Fizyolojik şartlarda PGI₂ ile denge halindedir. Ancak, reperfüzyon ile birlikte fosfolipaz A₂'nin aktivasyonu, TXA₂ düzeyini artırır.

Araşidonik asitten lipoksijenaz yolu ile oluşan LTB₄, İ/R sırasında endotel disfonksiyonunda önemli bir rolü olan metabolittir. LTB₄ nötrofil yüzeyindeki spesifik reseptörlere bağlanarak CD18 gibi adhezyon moleküllerinin aktivasyonuna yol açar. Serbest oksijen radikallerinin, proteazların ve nötrofillerin kemotaktik aktivitesinde artışa neden olur (24).

Nötrofil Aktivasyonu

Serbest oksijen radikalleri, nötrofil aktivasyonu ile birlikte lipid peroksidasyonuna ve epitelyal hasara yol açarlar. Nötrofiller, şiddetli mukozal lezyonların oluşumundan büyük ölçüde sorumludur (28). Aktive olan nötrofiller fazla miktarda oksijen tüketimine ve hücre membranındaki Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADP) enziminin katalizörlüğündeki bir reaksiyonla aşırı miktarlarda süperoksit anyonların oluşumuna yol açar. Ardından süperoksit dismutaz ve myeloperoksidaz enzimlerinin katalizörlüğünde H₂O₂, OH⁻ ve hipoklorik asit oluşur (32).

Myeloperoksidaz (MPO) enzimi, dokularda polimorfonükleer lökositlere spesifik bir enzimdir. Doku lökosit düzeyini göstermede yol göstericidir. MPO enzimi dokuda biriken polimorfonükleer lökositleri gösteren bir enzim olarak kullanılır ve reperfüzyon hasarının göstergesi olarak kabul edilir (33).

Aktive nötrofiller myeloperoksidaz, elastaz, proteaz, kollegenaz, laktoferrin ve katyonik proteinler gibi birçok proteini ortama salıp prostoglandin ve serbest radikalleri oluşturarak mikrovasküler hasarı başlatırlar (34). Endotel hücreleri tarafından üretilen bir plazma proteini olan Von Willebrand faktör (VWF) düzeyi akut vasküle endotel hasarında hızla artar. Reperfüzyonda belirgin olarak artan VWF ve plazma protein karbonil düzeyinin reperfüzyon hasarını belirlemede kullanılabileceği gösterilmiştir (35).

Lenfosit, nötrofil ve villus epitel hücreleri tarafından yapılan CD44 adlı protein hematopoezis, lenfosit aktivasyonu, hücrel migrasyon ve tümör metastazlarında lökosit

göçüne neden olan bir proteindir. İ/R sonunda bu proteinin yapımı azalır. Villus bütünlüğünde kayıp ve bağırsak bariyer fonksiyonlarında bozulma meydana gelir.

SERBEST RADİKALLERİN HÜCRESEL ETKİLERİ

Serbest radikaller hücredeki lipid, deoksiribonükleik asit (DNA), hücre membranı ve proteinlere saldırarak zarara uğratırlar.

Membran Lipidleri ve Lipid Peroksidasyonu

Hücre membranındaki yağ asitleri, fosfolipidler, glikolipidler ve steroller serbest radikallerin en genel hedefleri arasındadır. Hücre membranı hücre dışında oluşan serbest radikaller için hedef noktasıdır. Bu radikaller hücre membranında bulunan proteinler ve lipidleri oksidasyona uğratarak membran akışkanlığının ve iyonik gradiyentin bozulmasına neden olurlar. Bu oksidasyon tepkimesi hidroksil, hidroperoksil ve tekil oksijen radikalleri tarafından gerçekleştirilir. Lipid peroksidasyonun en belirgin ürünü olan malondialdehit (MDA) aynı zamanda lipid peroksidasyonunu belirlemede kullanılır. MDA oluşum yerinden kolayca difüze olur. Membran yapısındaki lipid ve proteinlere çapraz bağlanarak membranın kendine özgü özelliklerin değişmesine yol açar ve permeabiliteyi bozmaktadır.

Nükleik Asitler ve DNA

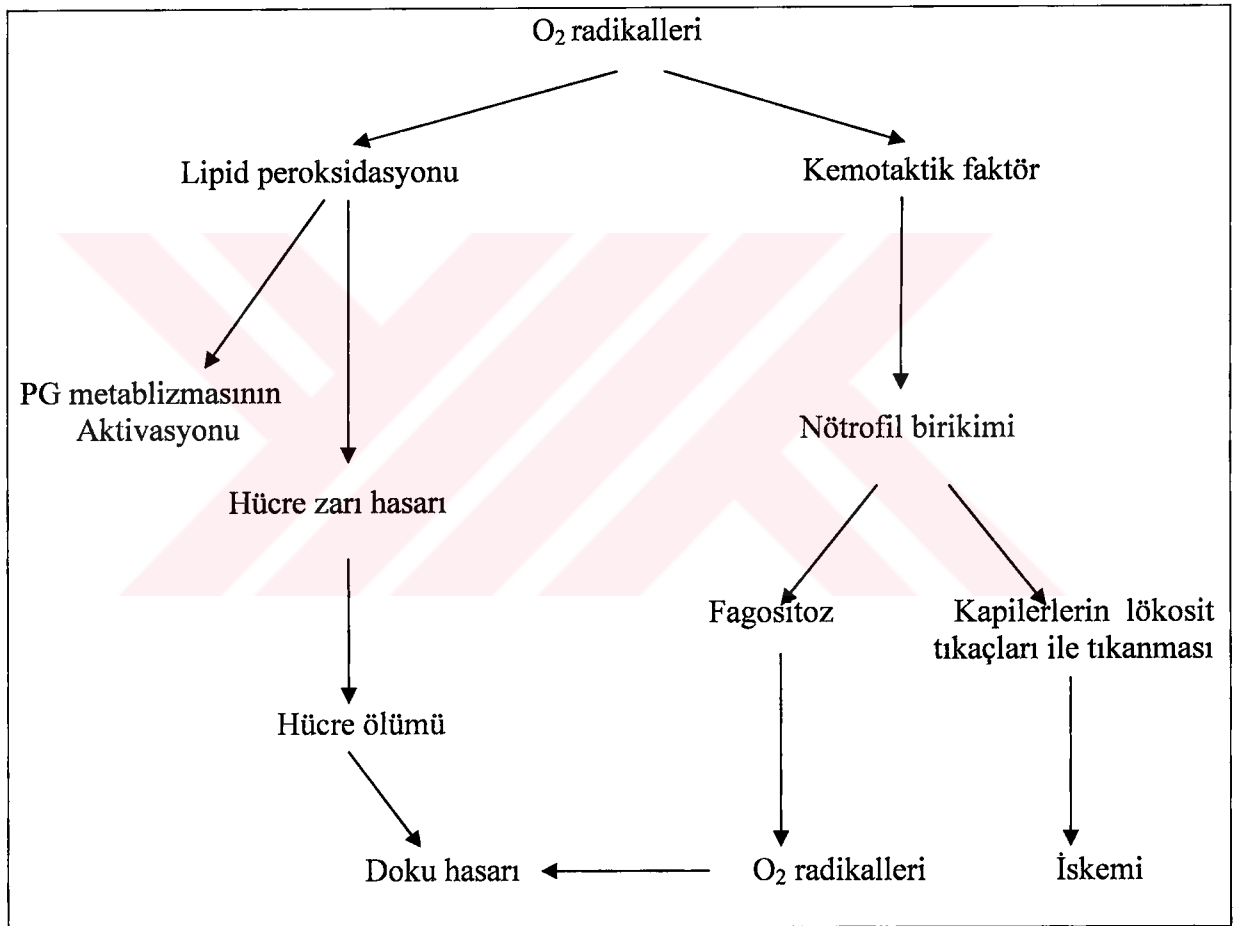
Nükleik asitler serbest radikaller için önemli hedeflerden biridir. Serbest radikallerle nükleotidlerin etkileşmesi sonucu DNA zincirinde kırılma ve mutasyonlar oluşabilir. DNA hasarının büyüklüğü serbest radikallerin polimeraz enzimi ile reaksiyona girerek DNA'nın onarılmasını engellemesi ile ilişkilidir (5).

Proteinler

Serbest radikaller protein yapısındaki amino asitlerle reaksiyona girerek sülfidril gruplarının kaybına ve karbonil gruplarının oluşmasına neden olurlar. Özellikle yapısında çift bağ ve sülfidril grubu içeren triptofan, trozin, fenilalanin, histidin, metiyonin ve sistein serbest radikallerle reaksiyona girerler (36).

Karbonhidratlar

Hidroksil radikali glukoz, mannitol ve deoksi şekerlerle doğrudan reaksiyona girer. Monosakkaritlerin oksidasyonu peroksitler, hidrojen peroksit ve okzoaldehitler oluşur. Okzoaldehitler DNA, Ribonükleik asit (RNA) ve proteinlere bağlanabilme ve çapraz bağlar yapma özelliğinden dolayı hücrede zararlı etkilere yol açarlar (5).



Şekil 1. Serbest oksijen radikallerinin etkileri (17).

ANTIÖKSİDAN SAVUNMA MEKANİZMALARI

Vücutta serbest radikallerin oluşumu ve bunların meydana getirdiği zararı önlemek için bir çok mekanizma vardır. Bu mekanizmalar kısaca antioksidanlar olarak bilinirler. Antioksidanlar serbest radikallerin oluşumunu engelleyerek hücreleri hasara karşı korurlar (37).

Antioksidanlar endojen ve eksojen olarak ikiye ayrılırlar

1- Endojen antioksidanlar: Bu gruba organizmada kendisi veya öncülü bulunan antioksidanlar girer. Örneğin; süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GPx), katalaz (KAT), α -tokoferol, β -karoten, glutatyon (GSH), vitamin C, bilirubin ve melatonin.

2- Eksojen antioksidanlar: Bu gruba ise daha çok organizmanın dışardan aldığı antioksidanlar girer. Örneğin; Allopurinol, folik asit, soya fasulyesi tripsin inhibitörü, difenilin iyodür ve desferoksamin (5).

Süperoksit Dismutaz (SOD)

SOD, süperoksit radikalinin hidrojen peroksit ve suya dönüşümünü katalizler (38).

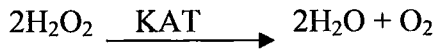


Bu reaksiyonla SOD, süperoksitten OH[·]'nin oluşumunu engellemektedir. Ancak SOD artarsa H₂O₂ seviyesi yükselebilir ve bu durumda SOD bir prooksidan olarak görev yapar. SOD organizmada oksidan stres arttığı zaman etkinliğini artırır. Özellikle antioksidan sistemlerin aktivitelerinde azalma olduğu klinik durumlarda SOD aktivitesi artar (21).

Yapılan çalışmalarda SOD ile tedavi edilen SMA'nın bir saatlik klempajı sonrası oluşan vasküler permeabilitenin azalmış olduğu görülmüştür. Reperfüzyon öncesi uygulanan SOD bağırsak lümenine olan net sıvı kaybını önler ve mukozal lezyonların ilerlemesini engeller (17). SOD hücrelerde iki şekilde bulunur. Birincisi daha çok stoplazmada bulunur, bakır ve çinko ihtiva eder. İkincisi mitokondriada bulunur ve manganez içerir (39).

Katalaz (KAT)

KAT, demir içeren ve H₂O₂'yi su ve oksijene dönüştüren bir enzimdir.

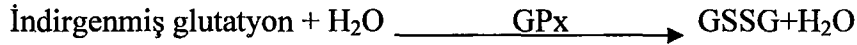


KAT birçok hücrede bulunur. Nöron ve kardiyak hücrelerde azdır. Genellikle karaciğer, böbrek veya beyin peroksizomlarında ve subsellüler organellerin iç kısmında bulunur. KAT enziminin inhibasyonu endotelial hücrelerde hidrojen peroksit toksitesini arttırmaz. Bu nedenle enzimin bir antioksidan olarak rolü açık değildir (40).

Glutasyon peroksidaz (GPx)

GSH, serbest radikallerin hücre içinde detoksifikasyonunu sağlayan ve lipid peroksidasyonunu önleyen en önemli endojen antioksidandır (41). Hücre içi GSH, antioksidan olarak bulunan tiol bileşigidir. Septik şokta GSH düzeylerinin azaldığı gösterilmiştir ve hücre içi glutasyon depolarının azalması ile mortalitenin artığı görülmüştür (32).

GPx enzimi selenyuma bağlı bir enzim olup, GSH elektronları kopararak H₂O₂'ye ve okside glutatyon (GSSG) dönüştürür.



Endojen yada eksojen oluşan radikaller bir taraftan GSH düzeyini azaltarak öte yandan da GSH metabolizmasına bağlı enzimlerin aktivitesini inhibe ederek alveoler makrofaj fagositozunu bozar ve lökositlerin kemotaksisini engelleyerek hasarın ilerlemesine neden olurlar. GPx'in H₂O₂'nin neden olduğu hücre sel hasara karşı koruyucu gücünün KAT'a göre daha fazla olduğu bilinmektedir (27).

N-ASETİLSİSTEİN (NAS)

NAS'ın bir GSH prekürsörü olarak bilinmesi, radikal giderici etkisinden faydalanma fikrini gündeme getirmiştir. İlk kez 1963 yılında Sheffner, mukolitik tedavi amacıyla sistein derivelerini klinikte kullanıma sunmuştur. L-sistein'in sodyum tuzu olan NAS derivasyonunun doğal sisteinden daha az irritatif olması ve göreceli olarak daha az toksik ve daha çok sülfidril grubu içermesinden dolayı klinik kullanımının daha etkili ve uygun olacağı belirtilmiştir.

Farmakokinetik

NAS, doğal bir amino asit olan L-sisteinin N-asetillenmiş türevidir. L-sisteinin sodyum tuzu olarak hazırlanmıştır. Sistein, antioksidan etkisi olan birkaç amino asitten biridir. Asetilsistein C₃H₉NO₃S şeklinde formüle edilebilir. Molekül ağırlığı 163.2 dir. %22 oranında suda erir. Alkol ve değişik sıvılarda da benzer oranda erime gösterir (42). NAS karaciğerde metabolize olur ve yarılanma ömrü iki ile altı saattir. Yaklaşık %20-30'u idrarla değişmeden atılır. Aktif metabolitleri disülfidler, sistein, sistin, methionin ve indirgenmiş glutatyondur (43).

Etki Mekanizması

Asetilsistein mukoproteindeki disülfid bağları ile reaksiyona giren serbest sülfidril grupları içeren bir tiol bileşigidir. Sonuçta sülfidril-disülfid bağlarının yer değiştirmesi ile mukoprotein molekülleri daha küçük parçalara ayrılır ve daha az visköz birimler haline gelip infekte sekresyondaki DNA bağlarını belirgin önemli ölçüde azaltır. Mukopürülan materyal lizise uğrar ve daha az visköz hale gelmiş olur. Bu primer etki NAS'ın bir mukokinetik ajan olarak kullanımının ana nedenidir.

GSH major bir serbest radikal giderici bir ajandır. Bir GSH prekürsörü olan NAS'ın serbest radikalleri detoksiye edebilme yeteneğinin anlaşılması son yıllarda bu ajanın klinik kullanımı oldukça yaygınlaştırmıştır (42). NAS, serbest radikalleri ve reaktif elektrofilleri detoksifiye eder. Reaktif elektrofiller, elektronlara afinitesi oldukça yüksek olan ve yeni radikalleri oluşturmaya hazırlanan molekül parçalarıdır. NAS ayrıca ortamdaki H₂O₂ düzeyini azaltır ve H₂O₂'nin toksik etkilerine karşı hücreyi korur. NAS'ın toksik radikallere karşı koruyucu etkisi, GSH biyosentezini artırması ve GSH prekürsörü olması nedeniyledir (44). NAS alındıktan sonra hızla absorbe ve deasetile edilerek hücre içi ve hücre dışı GSH depolarına eklenir. NAS, sistein derivasyonu olarak daha az toksik ve GSH prekürsörü olabilme yeteneği en iyi olan sistein derivasyonlarına dönüşür (45).

Tedavide Kullanımı

1. Akciğer hastalıklarının tedavsinde: NAS mukoproteindeki kimyasal disülfid bağlarını parçalayan serbest sülfidril gruplarını içermesi sayesinde sekresyonların viskozitesini azaltarak mukolitik etki gösterir. Produktif öksürükle seyreden solunumsal hastalıklarda kullanılmaktadır (42,46). NAS verilen hastaların bronkoalveolar lavajlarında kontrol gruplarına oranla sistein ve GSH konsantrasyonlarında artış gözlenmiştir. Ayrıca bronkoalveolar lavajda serbest radikallerin artışına ve oksidatif olayların aktivasyonuna neden olan makrofaj ve nötrofillerin azalmasına neden olur. Bununla beraber lavajdaki laktoferrin ve eozinofilik katyonik proteinlerin de kemotaktik aktivitesini azaltarak etki gösterdiği düşünölmektedir (47).

NAS'ın %10-20'lik solüsyonları trakeobronşial sitemde tıkaç oluşturan sekresyonları açmak için bolus şeklinde endotrakeal tüpten verilebilir. Muköz sinüs ve fistüllerin temizliğinde ve mukusla kontamine olmuş yaraların debridmanında da kullanılır. Akut ve kronik bronşit, kardiovasküler sistem hastalıkları gibi temelinde oksidatif stresin yer aldığı

hastalıklarda NAS ile tedavi edilenlerin atak şiddetleri anlamlı şekilde azalmış, ortalama hastanede yatış ve tedavi süreleri belirgin biçimde kısalmıştır (48).

Serbest radikal hasarı diyafram disfonksiyonunun patogeneğinde de önemlidir. Respiratuar kas yetmezliğine sekonder gelişen ventilasyon yetersizliklerinde NAS kullanımının klinik faydalar getirebileceği vurgulanmıştır (49).

2. Parasetamol toksisitesi: Yüksek dozda parasetamol alkilleyici bileşiklere dönüşüp GSH'yı baskılayarak yada karaciğer hücre membranına hasar vererek hücre nekrozuna neden olur. NAS reaktif parasetamol metabolitlerin tükettiği mitokondrial ve sitozolik GSH depolarını doldurarak etki gösterir. Zehirlenmeden saatler sonra NAS verildiğinde nötrofiller üzerindeki etkisiyle hepatik hasarın ilerlemesine karşı koyar ve mikrodolaşımın yeniden oluşmasını sağlar. Ayrıca parasetamol klirensini, sülfat konjugasyonu yan yolunu arttırmak suretiyle de etki etmektedir (38).

3. Kistik fibroz ve mekonyum ileusu: NAS içeren solüsyonlar oral yada rektal enema uygulaması şeklinde özellikle kistik fibrozlu hastaların ince bağırsaklarında meydana gelen mekonyum ileusu olgularında başarıyla uygulanmaktadır (42,50).

4. Septik şok: Deneysel çalışmalarda NAS'ın hepato-splanik kan akımını arttırdığı görülmüştür. Septik şokta doğal hücre içi antioksidan olan GSH'nın azaldığı ve bunun da hücre membranlarını oksijen radikallerine karşı bir zafiyet ortaya çıkardığı saptanmıştır. Antioksidan ve sitoprodüktif etkisi olan NAS aynı zamanda endotel kökenli gevşetici faktörü stimüle edebilir ve mikrovasküler kan akımını artırabilir. Nötrofil ve trombosit agregasyonunu, pulmoner hipertansiyon ve vasküler geçirgenliği azaltabilir. Septik şokta NAS'ın oksijenizasyonu ve statik akciğer kompliyansını 24 saatte arttırdığı, bunun mortalite üzerine bir etkisinin olmadığı fakat mekanik ventilatör gereksinimini kısaltarak daha erken taburcu olmalara imkan sağladığı bulunmuştur (51).

5. Antidot olarak kullanım: NAS altın, kobalt ve diğer ağır metaller, karbontetraklorür, metimerkür, halotan, arsenik, asetaldehid, kumarin, interferon, bromobenzen, naftalin ve doxurubisin zehirlenmesinde de antidot olarak kullanılmaktadır (42,50).

6. Kardiovasküler sistem üzerine etkisi: NAS nitratın vazodilatör etkisine olan toleransı tersine çevirerek küçük kan damarlarında direkt vazodilatötör etki yapar. NAS'ın aynı zamanda pozitif inotrop ve güçlü vazodilatötör etkileri vardır (52). Hepatik disfonksiyonlu hastalarda karaciğer kan akımını düzenler. Sepsisli hastalarda kardiyak fonksiyonlarda düzelme ve gastrik pH'nın azalmasını önlediği gösterilmiştir (53).

7. Miyokard infarktüsü: NAS'ın intravenöz uygulamasının miyokard infarktüsülü hastalarda trombolitik ajan olarak kullanılabileceği ve gliseril trinitritin periferel ve koroner

etkilerini potansiyelize ettiği bildirilmiştir. NAS bir thiol bileşiği olarak küçük koroner damarların dilatasyonunu artırır.

8. Diğer klinik kullanım alanları: Siklofosfamid ile oluşan hemorajik sistitte NAS'ın thiol grupları sistide yol açan akrolenin aldehid grupları ile reaksiyona girerek toksik molekülleri nötralize eder.

NAS kullanımının romatoid artrit, vaskülit ve skleroderma gibi inflamatuvar hastalıkların tedavisinde faydalı etkileri bulunmuştur.

Nefrolitiazis ve sistünürü profilaksisinde diyetle alınan sistini daha çok çözünür sistin disülfid haline getirerek yaralı etkileri gösterilmiştir (42).

NAS'ın güçlü karsinogenler üzerinde farklı dozlarda farklı etkileri görülebilir. Yüksek dozlarda mutajenik metabolitlerin aktivasyonunu engeller. Bu etkisi ile karsinogenezisin değişik evrelerinde farklı karsinojen ve mutajenlere karşı koruma sağlayabilir (45).

Yan Etkileri

NAS'in toksisitesi son derece nadirdir. Çok ender olarak anafilaksi, taşikardi, ürtiker ve bronkospazm gibi aşırı duyarlılık reaksiyonları gelişebilir (42).

GEREÇ VE YÖNTEMLER

Bu çalışma, Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Cerrahisi Anabilim Dalı (AD), Patoloji AD ve İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Biyokimya AD tarafından, etik kurul onayı alındıktan sonra Eylül 2004-Kasım 2004 tarihleri arasında Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Araştırma Biriminde yapıldı. Deneyde bu laboratuarda üretilen 48 adet erişkin, 380-450 g ağırlığında Wistar-Albino cinsi sıçanlar kullanıldı. Denekler 22 ± 1 °C ısıda, 12 saat karartılıp 12 saat aydınlatılan ve % 50-60 oranında nemlendirilen bir ortamda tutuldular. Deney gününe kadar sıçanların beslenmesinde standart pellet yem ve şehir içme suyu kullanıldı. Çalışma için Trakya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri kapsamında destek sağlanmıştır (TÜBAP no:566).

Anestezi ve Cerrahi İşlemler

Cerrahi işlem öncesinde deneklere 5-10 mg/kg dozunda xylazin hidroklorür (Rompun®, Bayer-İstanbul) ve 50-70 mg/kg dozunda ketamin hidroklorür (Ketalar®, Pfizer-İstanbul) kas içine uygulanarak anestezi sağlandı. Tüm sıçanların karın ciltleri %10'luk povidon iyot çözeltisi ile temizlenerek örtüldü ve orta hat kesisi ile karna girildi. Dahil oldukları deney gruplarına göre SMA'nın aortadan çıktığı yerin hemen distaline atravmatik mikrovasküler klemp kondu. Klempin konulması ile birlikte bağırsaklarda solukluk görülüp, nabızın kaybolduğundan emin olundu. Orta hat kesileri 4/0 atravmatik ipeklerle tek tek kapatıldı. Bu iskemi işlemi 45 dk süreyle gerçekleştirildi (Resim 1). Bu sürenin sonunda aynı kesi yerinden tekrar karna girildi. Mikrovasküler klemp kaldırılarak bir saat reperfüzyon işlemi yapıldı (Resim 2). Revaskülarizasyonun gerçekleştiği, barsaklardaki soluk rengin daha

pembe bir renk alıp nabzın tekrar hissedilmesi ile gözlemlendi. Reperfüzyon süresince karın 4/0 atravmatik ipek ile tek tek kapatıldı. Sıçanlara dahil oldukları gruplara göre kuyruk veninden 100 mg/kg dozunda NAS (Asist®, Bilim-İstanbul) uygulandı. Tüm sıçanların yaklaşık son 20 cm'lik ince bağırsakları alındı. Çıkarılan bu ince bağırsak segmentleri, 18 numara branül yardımıyla serum fizyolojik ile yıkandıktan sonra yaklaşık 10 cm'lik segment histopatolojik inceleme için %10 formaldehit içinde, geri kalan barsak segmenti ise kurutma kağıdı ile kurutulduktan sonra alüminyum folyoya sarılarak çalışma gününe kadar -80 °C de saklandı.

Biyokimyasal incelemeler için kan örnekleri sıçanlardan intrakardiyak olarak sağ ventrikülden heparinli tüplere alındı. Elde edilen kanlar çalışma gününe kadar -80 °C de saklandı.

Deney sırasında denek kaybı olmadı. Cerrahi işlemlerin sonunda tüm denekler servikal dislokasyon ile öldürüldüler.

Gruplar

Çalışma, her biri sekiz adet sıçandan oluşan altı grupta toplam 48 adet sıçan üzerinde yapıldı.

İlk grup kontrol (K) grubuydu. Bu gruptaki deneklerin karınlarına orta hat kesisi ile girilerek ince bağırsağın son 20 cm'lik kısmı çıkartıldı. Serum fizyolojik ile bağırsak temizliği yapılarak yarısı histopatolojik, diğer yarısı biyokimyasal inceleme için ayrıldı.

İkinci grup iskemi (İ) grubuydu. Bu gruptaki deneklerin karınları açıldıktan sonra SMA'ya atravmatik mikrovasküler klemp kondu. Karınları 4/0 atravmatik ipekle tek tek kapatıldı. İskemi işlemi 45 dk süreyle uygulandı. Bu sürenin sonunda tekrar karna girilerek ince bağırsağın son 20 cm'lik kısmı çıkartılarak histopatolojik ve biyokimyasal inceleme için ayrıldı.

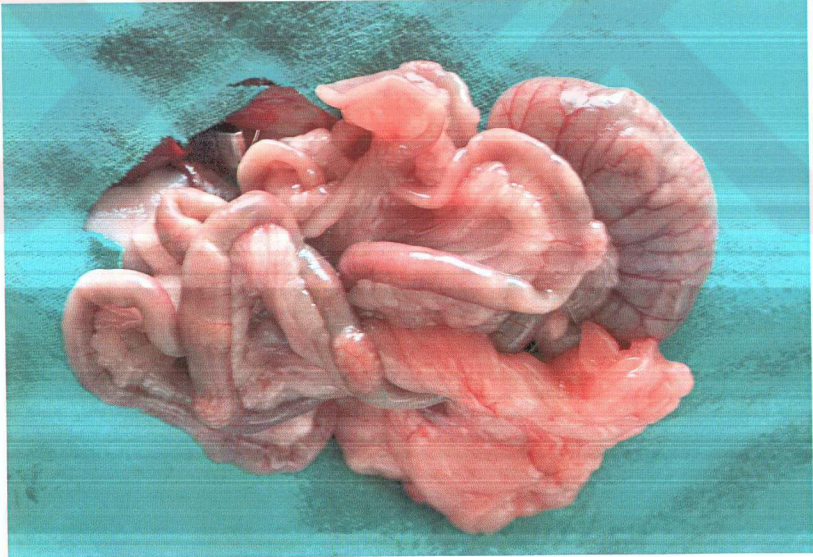
Üçüncü grup iskemi ile birlikte NAS (İ+NAS) uygulanan gruptu. Bu gruptaki deneklerin karınlarına aynı şekilde girilerek SMA'ya klemp konulduktan hemen sonra deneklerin kuyruk veninden 100 mg/kg dozunda NAS verildi. Karınları 4/0 atravmatik ipek ile tek tek kapatıldı. İskemi işlemi 45 dk süreyle uygulandı. Sürenin sonunda karınları tekrar açılan deneklerin ince bağırsaklarının son 20 cm'i çıkartılarak histopatolojik ve biyokimyasal incelemeler için hazırlandı.

Dördüncü grup (İ/R) grubuydu. Bu gruptaki deneklerin karınlarına girildikten sonra SMA kleplendi. Karınları 4/0 ipeklerle kapatıldıktan sonra 45 dk süreyle iskemi uygulandı. Bu sürenin sonunda karna tekrar girilerek klemp açıldı. Karın tekrar 4/0 ipekle tek tek

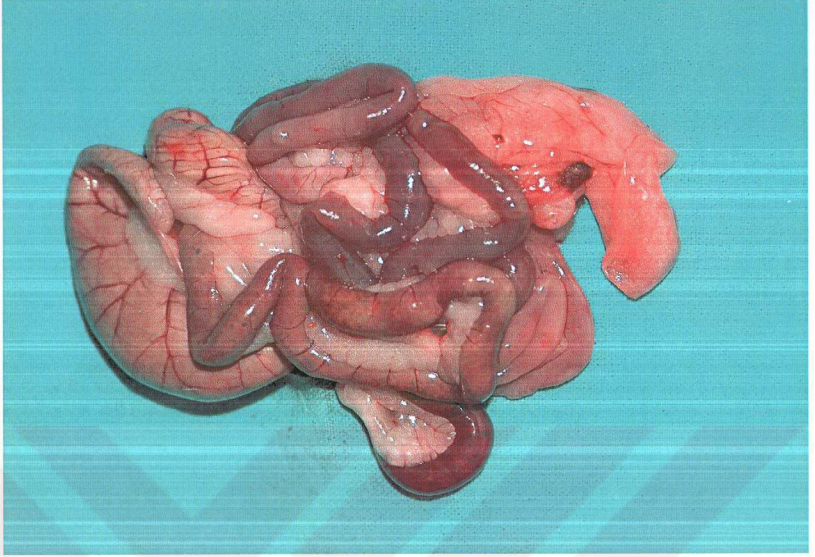
kapatıldıktan sonra bir saat reperfüzyon işlemi uygulandı. Sürenin sonunda ince barsağın son 20 cm'lik kısmı çıkartılarak histopatolojik ve biyokimyasal incelemeler için ayrıldı.

Beşinci grup İ/R ile birlikte NAS (İ/R+NAS) uygulanan gruptu. Bu gruptaki deneklerin karınları açılıp, SMA kleplendi ve 100 mg/kg NAS kuyruk veninden uygulanarak karınları 4/0 ipekle kapatıldı. İskemi işlemi 45 dk süreyle uygulandı. Bu sürenin sonunda klemp açıldı ve karın 4/0 ipekle kapatıldı. Reperfüzyon işlemi bir saat süreyle uygulandı. Süre sonunda tekrar karınları açıldı ve ince bağırsağın son 20 cm'lik kısmı histopatolojik ve biyokimyasal inceleme için ayrıldı.

Altıncı grup reperfüzyonun başlaması ile birlikte NAS (R+NAS) verilen gruptu. Bu gruptaki deneklerin karınları açılıp SMA kleplendi. Karın 4/0 ipekle tek tek kapatıldıktan sonra 45 dk iskemi uygulandı. Sürenin sonunda karınları açılan deneklere klemp açıldıktan hemen sonra 100 mg/kg NAS uygulandı. Karınları 4/0 ipekle kapatıldı. Reperfüzyon işlemi bir saat uygulandı. Sürenin sonunda ince bağırsağın son 20 cm'lik kısımları çıkartıldı ve histopatolojik ve biyokimyasal incelemeler için alındı.



Resim 1. İskemi işlemi sonunda ince bağırsaklar görülmektedir.



Resim 2. Reperfüzyon işlemi sonunda ince bağırsaklar görülmektedir.

Biyokimyasal İnceleme

Biyokimyasal çalışmalar için gerekli kan örnekleri her bir grupta, belirlenen tedavinin hemen bitiminde anestezisi altına deneklerden intrakardiyak olarak sağ ventrikülden, heparinli tüplere alındı. Daha sonra çalışma için belirlenen barsak dokusu çıkarıldı. Kan örnekleri, Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Araştırma Biriminde 2,500 gravitede 10 dk santrifüj edilerek plazmaları ayrıldı. GSH için kan örneği üç kez serum fizyolojik ile yıkandı. Yıkamış eritrositler ve plazma örnekleri endorff tüplerine kondu ve çalışma anına kadar -80°C de muhafaza edildi. Deneklerin barsak dokuları biyokimyasal inceleme için serum fizyolojik ile yıkanarak kan artıkları giderildi. Kurutma kağıdı ile iyice kurulandıktan sonra temizlenmiş doku örnekleri alüminyum folyaya sarılarak çalışma anına kadar -80°C de muhafaza edildi. Çalışma gününde soğuk zincir altında Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Biyokimya AD'na götürüldü. Yıkamış eritrositlerde GSH, plazma örneklerinde MDA, SOD ve NO değerleri çalışıldı. Barsak dokusu örneklerinde de MDA, SOD, GSH ve NO değerleri çalışıldı. Sonuçlar önceden hazırlanan veri formuna işlendi.

Plazma ve Doku MDA Ölçümü

Plazma lipid peroksit seviyesini belirlemek için kullanılan yöntemlerden birisi olan malondialdehit düzeyinin ölçümü, Buege ve Aust (54) tarafından tanımlanan yöntemle göre spektrofotometrik olarak saptandı.

Bu metod, lipid peroksidasyonunun önemli son ürünlerinden biri olan MDA'nın thiobarbitürik asit ile asit ve sıcak ortamda reaksiyonu sonucu kırmızı renk oluşumuna dayanmaktadır. Ölçüm prensibi, bir molekül MDA ile iki molekül thiobarbitürik asidin kondansasyonu sonucu oluşan renkli kompleksin 535 nm'deki absorbansının spektrofotometrik tayini esasına dayanmaktadır.

Ayırıcılar:

Stok çözelti: 1. %15 Trikloroasetik asit çözeltisi

2. %0.375 Thiobarbitürik asit çözeltisi

3. 0.25 N Hidroklorik asit karışımı hazırlanır.

İşlem: 250 mikrolitre plazma, 1000 mikrolitre stok çözelti ile karıştırılır. Tüplerin ağzı kapatılarak 15 dk kaynar su banyosunda (100 °C de) bekletilir. Soğuduktan sonra, 1000 gravitede 10 dk santrifüj edilir. Santrifüj sonrası elde edilen süpernatantın absorbansı 535 nm'de köre (500 mikrolitre distile su+1000 mikrolitre stok çözeltisi) karşı spektrofotometrik olarak okunur.

Sonuç: Örnekteki MDA konsantrasyonu, ekstinksiyon katsayısı ($1.56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) ve dilüsyonlar hesaplanarak mikromol/L ya da nmol/mL plazma olarak TBARS (Thiobarbitürik asitle reaksiyon veren substratlar) değerleri ifade edilir.

Bu yöntemle deneklerden alınan plazma MDA sonuçları nmol/mL, doku sonuçları ise nmol/ mg protein olarak verildi.

Plazma ve Dokularda SOD Aktivitesinin Ölçümü

Deneklerden alınan plazma ve doku örneklerinde SOD aktivitesi Sun metodu kullanılarak saptandı (55). Bu yöntemle SOD aktivitesinin tayininin esası, ksantin/ksantin oksidaz sistemi ile oluşturulan süperoksit anyonlarının nitroblue tetrazoliumu indirgememesinin SOD tarafından inhibisyonuna dayanır. Nitroblue tetrazoliumu indirgenmesini %50 inhibe eden enzim aktivitesini bir ünite SOD göstermektedir.

Reaksiyon karışımı için 200 mL'lik bir behere

- 40 mL ksantin
- 20 mL EDTA
- 20L Nitroblue tetrazolium
- 12 mL Na₂CO₃
- 6 mL bovin serum albumin

konulur ve pH 10.2'ye ayarlanır.

Plazmada:

	Test (mL)
Plazma	0.02
Distile su	0.18
Kloroform – Etanol	0.16

10.000 rpm'de beş dk santrifüj edilir.

	Kör (mL)	Test (mL)
Reaksiyon karışımı	1	1
Distile su	0.16	-
Süpernatant	-	0.16
Ksantin oksidaz	0.1	0.1

25 °C' de 20 dk inkübe edilir.

CuCl ₂	0.05	0.05
-------------------	------	------

Spektrofotometrede 560 nm dalga boyunda formazon oluşumu ölçülür.

Dokuda:

	Kör (mL)	Test (mL)
Reaksiyon karışımı	1	1
Distile su	0.02	-
Doku (%20 lik homojenat)	-	0.02
Ksantin oksidaz	0.05	0.05

25 °C' de 20 dk inkübe edilir.

CuCl ₂	0.05	0.05
-------------------	------	------

Spektrofotometrede 560 nm dalga boyunda formazon oluşumu ölçülür.

$$\% \text{ inhibisyon} = \frac{(A_{\text{kör}} - A_{\text{numune}})}{A_{\text{kör}}} \times \%100$$

formülü ile % ir $\frac{A_{\text{kör}}}{A_{\text{kör}}}$ CuZn- SOD aktivitesi hesaplanarak mg/L olarak değeri belirlenir. Bu yöntemle deneklerden alınan plazma ve ince bağırsak dokularında SOD aktivitesi Sun yöntemi modifiye edilerek ölçüldü. Plazma SOD sonuçları U/mL, doku sonuçları ise U/mg protein olarak verildi.

Eritrosit ve Doku GSH Düzeyinin Ölçümü

Deneklerden alınan eritrosit ve doku örneklerinde GSH düzeyleri Beutler ve ark. (56) metodu kullanılarak ölçüldü. Bu yöntemin prensibi, tuz çöktürmesi ile deproteinize edilen eritrosit hemolizatındaki GSH'nın 5, 5'- di tio bis – 2-nitro benzoik asit (DTNB) varlığında tamponlanmış ortamda 412 nm'de absorpsiyon yapan indirgenmiş sarı renkli kromojen oluşturması esasına dayanır.

Ayıraçlar:

1. Proteinsizleştirme çözeltisi: 1.67 gr metafosforik asit, 0.20 gr disodyum EDTA, 30 gr NaCl 100 ml' ye distile su ile tamamlanır.
2. Fosfat çözeltisi: 0.3 M Na₂HPO₄
3. DTNB ayırıcı: 40 mg DTNB, 100 ml %1 lik sodyum sitrat çözeltisinde çözülerek hazırlanır.

İşlem: Oda sıcaklığına getirilen eritrositlerden 0.2 ml alınır. Üzerine 1.8 ml distile su 3.0 ml proteinsizleştirme çözeltisi eklenerek vortekste karıştırılır. Beş dakika oda ısısında bekletilip süzülür. Süzüntüden iki ml alınıp, üzerine sekiz ml Na₂HPO₄ ve bir ml DTNB çözeltisi eklenir. Kör için 1.2 ml proteinsizleştirme çözeltisi konularak 412 nm de köre karşı absorbans okunur.

$$\text{GSH değerlerinin hesaplanması } \% \text{ mg} = \text{Ekstinksiyon katsayısı} \times \text{Dilüsyonlar} \\ = (\text{Abs}/13.6) \times (5/2 \times 11/2 \times 307 \times 100)$$

$$\text{Hemoglobin } \% \text{ gr} = (\text{Numune abs}/\text{Standart abs}) \times \text{Dilüsyon} \times \text{Std gr} \times 100$$

şeklinde formülize edilen hesaplamaların ardından eritrosit GSH düzeyleri mg/gr hemoglobin olarak verilir.

Bu yöntemle deneklerden alınan eritrositlerde sonuçlar $\mu\text{mol}/\text{gr.Hb}$, dokularda ise $\mu\text{gr}/\text{mg}$ protein olarak verildi.

Eritrosit Hemoglobin Tayini

Eritrosit hemoglobin tayinindeki prensip, hemoglobin içindeki demirin ferrosiyanürle oksitlenerek methemoglobine çevrilmesi ve oluşan bu methemoglobinin siyanürle reaksiyona girerek sonuçta stabil siyanomethemoglobine dönüşmesidir. Oluşan bu renkli ürünün absorbansının 546 nm'de spektrofotometrik olarak ölçümü, eritrosit içi hemoglobin düzeyini belirler (57).

Ayırıcılar:

Drabkin ayırıcı: 50 mg potasyum siyanür, 200 mg potasyum ferrisiyanür, bir gr sodyum bikarbonat distile suda çözünerek bir litreye tamamlanır. Ayırıcının bozulmaması için 0.140 gr KH_2PO_4 eklenir.

İşlem: Beş ml drabkin ayırıcı üzerine 20 μl % 0.9 NaCl ile yıkanmış eritrosit eklendi, iyice karıştırıldı. Beş dakika bekledikten sonra 546 nm'de suya karşı absorbansı spektrofotometrede ölçüldü.

Hemoglobin miktarı (gr/dl) = (Numune Abs/Standart Abs) x 36.77 formülü ile hesaplandı.

Protein Tayini

Dokularda protein düzeylerinin belirlenmesinde Folin-Lowry yönteminden yararlanıldı (58). Yöntemin esası, folin ayırıcının proteinlerin peptid bağları ve tirozin, triptofan gibi aromatik halkalı aminoasitler ile reaksiyona girmesi sonucu oluşan mavi renkli ürünün absorbanlarının spektrofotometrede 750 nm dalga boyunda okunması esasına dayanmaktadır

NO Tayini

NO, stabil metabolitleri olan nitrit ve nitrat iyonlarının konsantrasyonlarıyla tayin edildi (59). Nitrat, nitrat redüktaz, NADPH ve FAD varlığında nitrite indirgenir. NADPH fazlası piruvat ve laktat dehidrogenaz etkinliğinde uzaklaştırılarak, ortamdaki total nitrit, Griess reaktifi ile reaksiyona sokulur. Oluşan pembe renkli diazo bileşiği 550 nm dalga boyunda okunur. NO standart eğrisi ise 4, 8, 16, 24 ve 40 μM konsantrasyonlarındaki potasyum nitrat çözeltileri ile hazırlanarak sonuçlar hesaplandı.

Histopatolojik İnceleme

Histopatolojik inceleme için ayrılan doku parçaları %10'luk formaldehit içerisinde fikse edilerek Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji AD'na gönderildi. Tespit sonrası takip işlemleri yapılan örnekler parafinle bloklandı. Kalınlığı dört mikron olan standart kesitler Hemotoksilen Eosin (HE) ile boyanarak mikroskopik inceleme için hazırlandı.

Tüm preparatlar aynı patoloji uzmanı tarafından, Chiu ve ark. (60) tarafından yapılan sınıflamaya uygun olarak ışık mikroskopunda (Nikon E600-Japonya) incelendi (Tablo 1). Elde edilen veriler önceden hazırlanan bir forma işlendi.

Tablo 1. Histopatolojik değerlendirme (60).

EVRE	BULGU
0	Normal villus
1	Supepitelyal alanın gelişmesi, genellikle villusların apeksinde, kapiller konjesyon
2	Supepitelyal alanın genişlemesi ile epitelyal tabakanın lamina propriadan orta derecede ayrılması
3	Villusların alt kısımlarının lamina propriadan ileri derecede epitelyal ayrışması
4	Villusların soyulması, kapiller dilatasyon, lamina proprianın geçirgenliğinde artma
5	Lamina propriada parçalanma, hemoraji ve ülserasyon

İstatiksel İnceleme

Verilerin değerlendirilmesi Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi dekanlığı Bilgi İşlem Merkezinde bulunan S0064 Minitab Release 13 (lisans numarası wcp 1331.00197) programı ile yapıldı. Biyokimyasal ve histopatolojik sonuçlar Kruskal-Wallis varyans analizi ile değerlendirildi. Fark, p değeri 0.05'den küçük olduğunda anlamlı kabul edildi. Anlamlı fark bulunan gruplar arasındaki karşılaştırmalar için ise Mann-Whitney U testi kullanıldı.

BULGULAR

Biyokimyasal Bulgular

Deneysel çalışma sonucunda deneklerden alınan ince bağırsak doku örneklerinde çalışılan MDA, SOD enzim aktivitesi, GSH ve NO değerlerine ait sonuçlar Tablo 2’de görülmektedir.

Birinci grup olan K grubundaki ince bağırsak doku MDA değeri $0,25\pm0,08$ olarak bulundu. İkinci grup olan İ grubunun MDA değeri ise $0,46\pm0,09$ olarak ölçüldü. Üçüncü gruptaki İ/R grubunda bu değer $0,57\pm0,11$ olarak bulundu. NAS verilen gruplardan dördüncü gruptaki İ+NAS grubunda MDA $0,32\pm0,08$ olarak bulunurken, beşinci gruptaki İ/R+NAS grubunda $0,40\pm0,08$ idi. Son grup olan R+NAS grubunda ise MDA $0,29\pm0,07$ olarak bulundu. İ/R grubundaki doku MDA değeri K, İ/R+NAS, İ+NAS ve R+NAS gruplarından anlamlı olarak yüksekti ($p<0.05$). İ grubunun doku MDA düzeyi K, İ+NAS ve R+NAS gruplarından anlamlı ölçüde yüksek bulundu ($P<0.05$). NAS uygulanan gruplardan sadece İ/R+NAS grubundan anlamlı düzeyde düşüktü ($p<0.05$). İ/R+NAS ve İ+NAS grupları doku MDA değerleri arasında önemli ölçüde bir fark bulunmadı ($p>0.05$).

Deneysel çalışma sonunda elde edilen bir diğer biyokimyasal parametre de ince bağırsak SOD enzim aktivitesiydi. K grubunda SOD değeri $1,17\pm0,21$ olarak bulundu. İ grubunda bu değer $0,95\pm0,11$ idi. İ/R grubunun SOD değeri $0,87\pm0,17$ olarak saptandı. NAS verilen gruplardan İ+NAS grubunda SOD $1,19\pm0,17$ diğer bir grup olan İ/R+NAS grubunda $1,07\pm0,11$ ve son olarak R+NAS grubunda $1,07\pm0,19$ idi. İ/R grubunun ince bağırsak

dokusundaki SOD enzim aktivitesi K, İ/R+NAS, İ+NAS ve R+NAS grupları ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak da anlamlı düzeyde düşük saptandı ($p<0.05$). İ grubunun doku SOD düzeyleri İ/R+NAS ve İ+NAS gruplarından anlamlı derecede düşük bulundu ($p<0.05$). NAS uygulanan grupların doku SOD değerleri arasında anlamlı bir fark saptanmadı ($p>0.05$).

Biyokimyasal incelemelerden diğer bir parametre ise doku GSH değerleriydi. Birinci grup olan K grubunda GSH $23,48\pm 3,43$ bulunurken, İ grubundaki GSH $17,82\pm 4,14$ ve İ/R grubunda ise GSH $10,97\pm 3,50$ olarak bulundu. NAS verilen İ+NAS grubunda GSH $17,98\pm 4,20$ bulunurken İ/R+NAS grubunda ise GSH $15,90\pm 3,93$ ve son olarak R+NAS grubunda GSH $22,12\pm 4,10$ bulundu. İ/R grubu doku GSH değerleri diğer tüm gruplardan istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde düşük bulundu ($p<0.05$). İ grubunun doku GSH değerleri ise NAS verilen gruplardaki GSH değerlerinden anlamlı bir fark göstermedi ($p>0.05$). R+NAS grubu doku GSH düzeyi, İ/R+NAS grubu GSH düzeyinden anlamlı bir şekilde yüksek bulunurken ($p<0.05$), İ+NAS grubu GSH düzeyi ile arasında anlamlı bir fark saptanmadı ($p>0.05$).

İnce bağırsak dokusunda çalışılan son biyokimyasal parametre NO idi. İlk grup olan K grubunda NO değeri $380,37\pm 24,58$ olarak saptanırken, İ grubundaki NO $511,75\pm 70,84$ ve İ/R grubunda ise NO $717,75\pm 42,48$ olarak bulundu. NAS verilen İ+NAS grubunda NO $483,25\pm 45,88$ iken, İ/R+NAS grubunda ise NO $604,75\pm 58,37$ ve son olarak da R+NAS grubunda NO $528,88\pm 60,71$ olarak tespit edildi. İ/R grubunda ölçülen ince bağırsak doku NO düzeyi istatistiksel olarak anlamlı şekilde diğer gruplara göre en yüksek bulundu ($p<0.05$). En düşük doku NO değeri diğer gruplardan anlamlı olacak şekilde K grubunda saptandı ($p<0.05$). İ grubunda ölçülen NO değeri, İ+NAS ve R+NAS grubu doku NO düzeyi arasında anlamlı bir fark bulunmadı ($p>0.05$). NAS uygulanan gruplardan İ+NAS grubu doku NO düzeyi, İ/R+NAS grubuna göre anlamlı derecede düşük bulunurken ($p<0.05$), R+NAS grubu NO değeri arasında anlamlı bir fark görülmedi ($p>0.05$).

Tablo 2. Gruplara ait ince bağırsak doku MDA, SOD, GSH ve NO değerleri.

BİYOKİMYASAL PARAMETRELER	K	İ	İ/R	İ+NAS	İ/R+NAS	R+NAS	p
MDA nmol/prot							
Ortanca	0,24	0,48	0,59	0,33	0,40	0,29	
Minimum	0,14	0,31	0,42	0,19	0,29	0,19	
Maksimum	0,38	0,59	0,76	0,43	0,57	0,40	
Ortalama±standart sapma	0,25±0,08	0,46±0,09	0,57±0,11	0,32±0,08	0,40±0,08	0,29±0,07	<0.05 ¹
SOD U/mg.prot							
Ortanca	1,21	0,93	0,89	1,25	1,11	1,13	
Minimum	0,84	0,82	0,65	0,93	0,92	0,74	
Maksimum	1,45	1,12	1,18	1,35	1,22	1,27	
Ortalama±standart sapma	1,17±0,21	0,95±0,11	0,87±0,17	1,19±0,17	1,07±0,11	1,07±0,19	<0.05 ²
GSH mgr/mg.prot							
Ortanca	23,74	18,02	10,60	18,19	16,08	22,62	
Minimum	17,71	11,54	6,49	9,74	10,07	16,48	
Maksimum	28,42	24,75	16,42	23,05	21,09	28,04	
Ortalama±standart sapma	23,48±3,43	17,82±4,14	10,97±3,50	17,98±4,20	15,90±3,93	22,12±4,10	<0.05 ³
NO nmol/gr.yaş doku							
Ortanca	385,50	489,00	713,00	478,00	599,50	529,50	
Minimum	341	413	653	432	528	453	
Maksimum	412	612	784	569	692	648	
Ortalama±standart sapma	380,37±24,58	511,75±70,84	717,75±42,48	483,25±45,88	604,75±58,37	528,88±60,71	<0.05 ⁴

¹ İR grubundaki doku MDA değeri K, İ/R+NAS, İ+NAS, R+NAS gruplarında P<0.05

İ grubundaki doku MDA değeri K, İ+NAS, R+NAS gruplarında P<0.05

R+NAS grubunun doku MDA değeri İR+NAS grubunda p<0.05

² İR grubundaki doku SOD değeri K, İ/R+NAS, İ+NAS, R+NAS gruplarında P<0.05

İ grubundaki doku SOD değeri İ/R+NAS, İ+NAS gruplarında P<0.05

³ İR grubundaki doku GSH değeri K, İ, İ/R+NAS, İ+NAS, R+NAS gruplarında P<0.05

R+NAS grubundaki doku GSH değeri İR+NAS grubunda P<0.05

⁴ İR grubundaki doku NO değeri K, İ/R+NAS, İ+NAS, R+NAS gruplarında P<0.05

İ+NAS grubundaki doku NO değeri İ/R+NAS grubunda P<0.05

Deneysel çalışmanın sonunda deneklerden alınan kanlardaki plazmada MDA, SOD enzim aktivitesi ve NO ile eritrosit GSH değerlerine ait sonuçlar Tablo 3’de sunuldu.

Tablo 3. Gruplara ait plazma MDA, SOD, NO ve eritrosit GSH değerleri

BİYOKİMYASAL PARAMETRELER	K	İ	İ/R	İ+NAS	İ/R+NAS	R+NAS	p
MDA nmol/ml							
Ortanca	1,42	5,12	5,54	4,07	3,86	1,91	
Minimum	0,96	4,33	4,18	3,54	2,98	1,12	
Maksimum	2,03	5,95	6,22	4,93	4,63	2,48	
Ortalama±standart sapma	1,46±0,35	5,11±0,52	5,34±0,77	4,07±0,46	3,84±0,59	1,78±0,48	<0.05 ¹
SOD U/ml							
Ortanca	29,93	31,26	36,33	33,58	34,44	34,35	
Minimum	26,43	26,86	31,27	30,76	29,42	26,74	
Maksimum	35,76	34,43	39,56	38,74	38,43	37,86	
Ortalama±standart sapma	30,15±3,15	30,74±2,69	35,99±2,69	34,06±3,01	34,54±2,81	33,02±3,70	<0.05 ²
GSH µmol/gr.Hb							
Ortanca	4,52	3,21	2,89	3,78	3,49	3,98	
Minimum	3,74	2,75	2,28	3,19	2,94	3,42	
Maksimum	4,63	3,71	3,17	4,27	4,19	4,55	
Ortalama±standart sapma	4,34±0,36	3,23±0,33	2,85±0,29	3,75±0,37	3,49±0,38	3,98±0,35	<0.05 ³
NO µmol/L							
Ortanca	23,10	48,31	44,48	41,03	40,74	42,80	
Minimum	19,54	37,76	39,02	31,42	30,23	35,56	
Maksimum	27,32	52,18	50,54	46,43	45,23	47,64	
Ortalama±standart sapma	23,02±2,96	47,15±4,73	44,73±3,91	40,41±5,40	39,26±5,51	41,79±4,08	<0.05 ⁴

¹ İR grubundaki plazma MDA değeri K, İ/R+NAS, İ+NAS, R+NAS gruplarında P<0.05

İ grubundaki plazma MDA değeri K, İ+NAS, İR+NAS, R+NAS gruplarında P<0.05

R+NAS grubunun plazma MDA değeri İR+NAS, İ+NAS grubundan p<0.05

² İR grubundaki plazma SOD değeri K, İ gruplarında P<0.05

İ grubundaki plazma SOD değeri İR+NAS, İ+NAS gruplarında P<0.05

³ İR grubundaki eritrosit GSH değeri K, İ, İ/R+NAS, İ+NAS, R+NAS gruplarında P<0.05

İ grubundaki eritrosit GSH değeri İ+NAS, R+NAS gruplarında P<0.05

R+NAS grubundaki eritrosit GSH değeri İR+NAS gruplarında P<0.05

⁴ İR grubundaki plazma NO değeri K grubunda P<0.05

İ grubundaki plazma NO değeri K, İ/R+NAS, İ+NAS, R+NAS gruplarında P<0.05

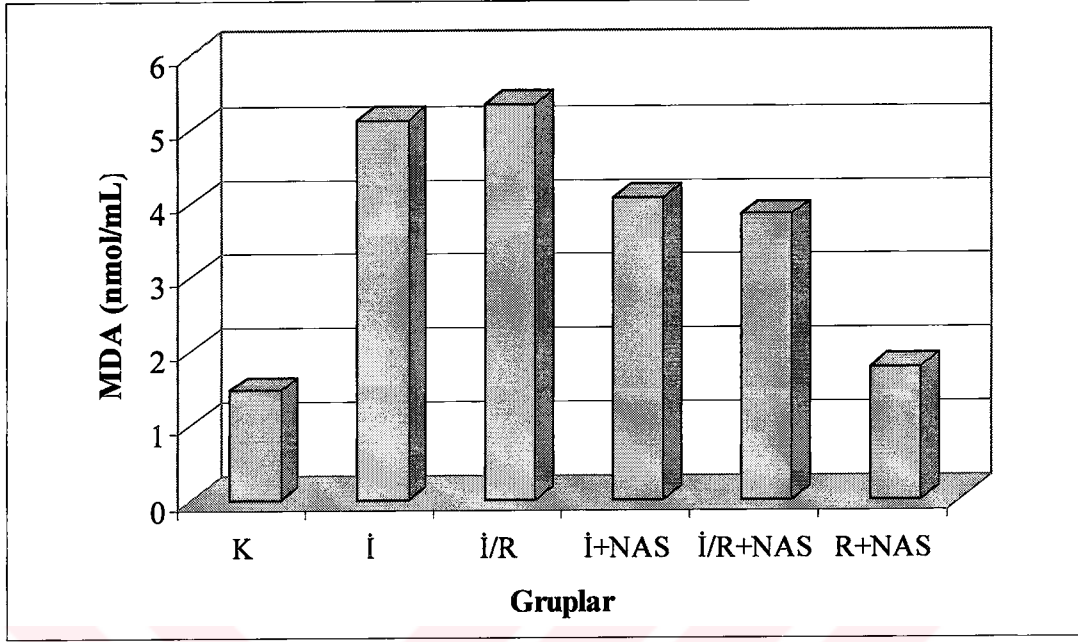
Birinci grup olan K grubunda plazma MDA düzeyi 1,46±0,35 olarak bulunurken, İ grubunda bu değer 5,11±0,52 ve üçüncü grup İ/R grubunda ise MDA 5,34±0,77 olarak ölçüldü. NAS uygulanan gruplardan İ+NAS grubunda plazma MDA 4,07±0,46 olarak ölçüldü. NAS uygulanan diğer gruplardan İ/R+NAS ve R/NAS grubunda ise plazma MDA düzeyi sırasıyla 3,84±0,59 ve 1,78±0,48 olarak tespit edildi. İ/R grubunda bulunan MDA değeri K, İ/R+NAS, İ+NAS ve R+NAS gruplarından istatistiksel olarak da yüksek bulundu (p<0.05). İ grubunun plazma MDA değeri K, İ/R+NAS, İ+NAS ve R+NAS gruplarındaki plazma MDA değerlerinden anlamlı şekilde yüksekti (p<0.05). R+NAS grubunda plazma MDA düzeyi diğer NAS uygulanan İ/R+NAS ve İ+NAS gruplarından anlamlı derecede

düşüktü ($p<0.05$). İ+NAS ve İ/R+NAS arasında anlamlı bir fark saptanmadı ($p>0.05$). K grubunun plazma MDA değeri R+NAS grubu hariç diğer gruplardan anlamlı olarak düşüktü ($p<0.05$).

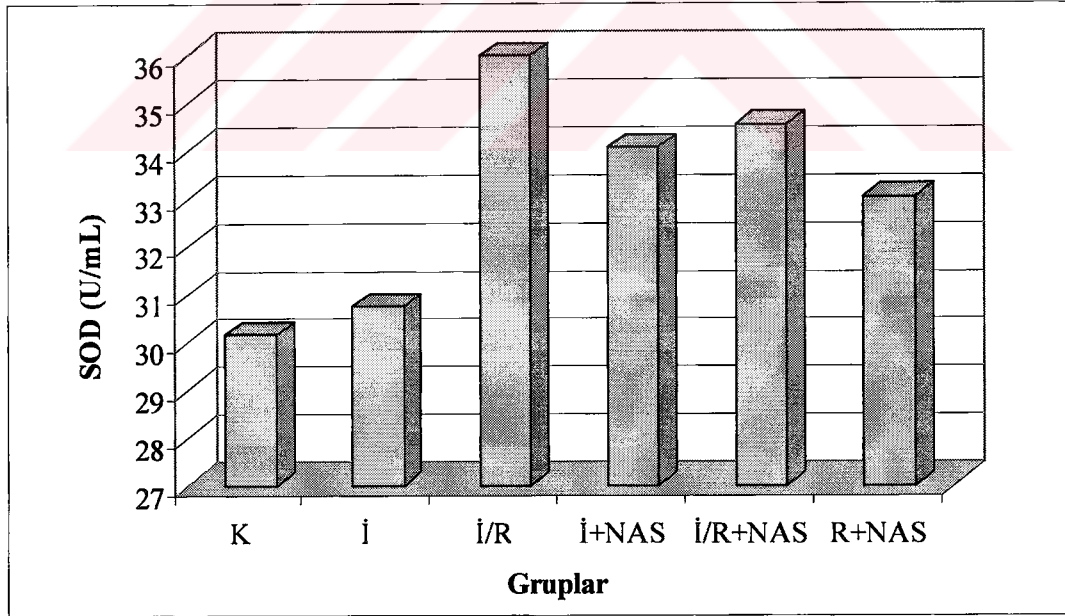
Deneklerin plazmalarında çalışılan diğer bir biyokimyasal parametre SOD enzim aktivitesiydi. K grubunda SOD enzim aktivitesi $30,15\pm 3,15$ olarak saptanırken, İ grubunda bu değer $30,74\pm 2,69$ ve İ/R grubunda ise $35,99\pm 2,69$ olarak tespit edildi. İ+NAS grubunda SOD aktivitesi $34,06\pm 3,01$ ve İ/R+NAS grubunda $34,54\pm 2,81$ olarak bulunurken son grup olan R+NAS grubunda ise $33,02\pm 3,70$ idi. İ/R grubundaki plazma SOD düzeyi K ve İ grubundan anlamlı olarak daha yüksek bulundu ($p<0.05$). İ grubunun plazma SOD düzeyleri İ/R+NAS ve İ+NAS gruplarına göre daha düşük saptandı ($p<0.05$). NAS uygulanan grupların plazma SOD düzeyleri arasında anlamlı bir fark saptanmadı ($p>0.05$).

Deneklerden alınan kanlardaki eritrosit GSH düzeyleri K grubunda $4,34\pm 0,36$ idi. İ grubunda GSH düzeyi $3,23\pm 0,33$ olarak bulunurken İ/R grubunda bu değer $2,85\pm 0,29$ olarak ölçüldü. Eritrosit GSH düzeyi İ+NAS grubunda $3,75\pm 0,37$ olarak saptanırken, İ/R+NAS ve R+NAS grubunda bu değerler sırasıyla $3,49\pm 0,38$ ve $3,98\pm 0,35$ olarak tespit edildi. İ/R grubunda elde edilen eritrosit GSH değerleri istatistiksel olarak da anlamlı bir şekilde diğer tüm gruplardan daha düşük saptandı ($p<0.05$). İ grubunun eritrosit GSH değeri İ+NAS ve R+NAS gruplarındaki GSH değerlerinden anlamlı olarak düşük saptandı ($p<0.05$). Ancak İ/R+NAS grubu ile arasında bir fark saptanmadı ($p>0.05$). R+NAS grubunda saptanan GSH değeri İ/R+NAS grubundaki GSH değerinden anlamlı olarak yüksek bulunurken ($p<0.05$), İ+NAS grubu GSH değeri arsında anlamlı bir fark saptanmadı ($p>0.05$).

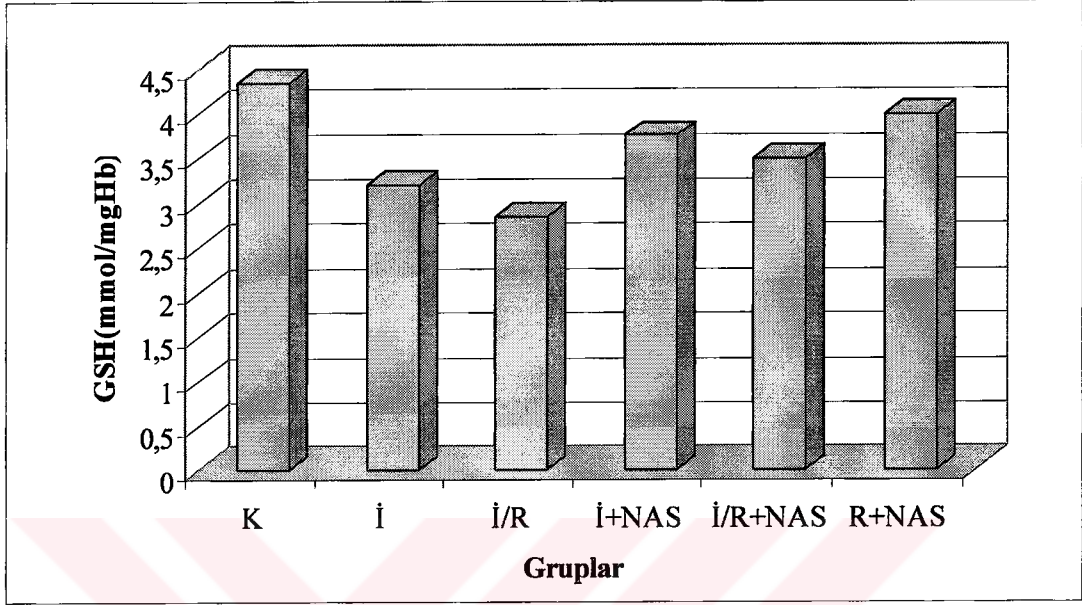
Biyokimyasal parametrelerden sonuncusu plazma NO değerleriydi. K grubunda plazma NO değeri $23,02\pm 2,96$ olarak ölçülürken, İ grubunda ve İ/R grubunda NO değerleri sırasıyla $47,15\pm 4,73$ ve $44,73\pm 3,91$ olarak bulundu. İ+NAS grubunun plazma NO düzeyi $40,41\pm 5,40$ ve İ/R+NAS grubunda ise $39,26\pm 5,51$ olarak bulundu. Son grup olan R+NAS grubunda bu değer $41,79\pm 4,08$ olarak tespit edildi. İ/R grubunda saptanan plazma NO değeri yalnızca K grubuna göre anlamlı düzeyde yüksekti ($p<0.05$). En yüksek plazma NO değeri İ grubunda bulundu ve bulunan bu değer İ/R grubu hariç diğer gruplardan anlamlı derecede yüksek saptandı ($p<0.05$). NAS verilen gruplar arasında yapılan karşılaştırmalarda ise plazma NO düzeyleri arasında anlamlı bir fark saptanmadı ($p>0.05$).



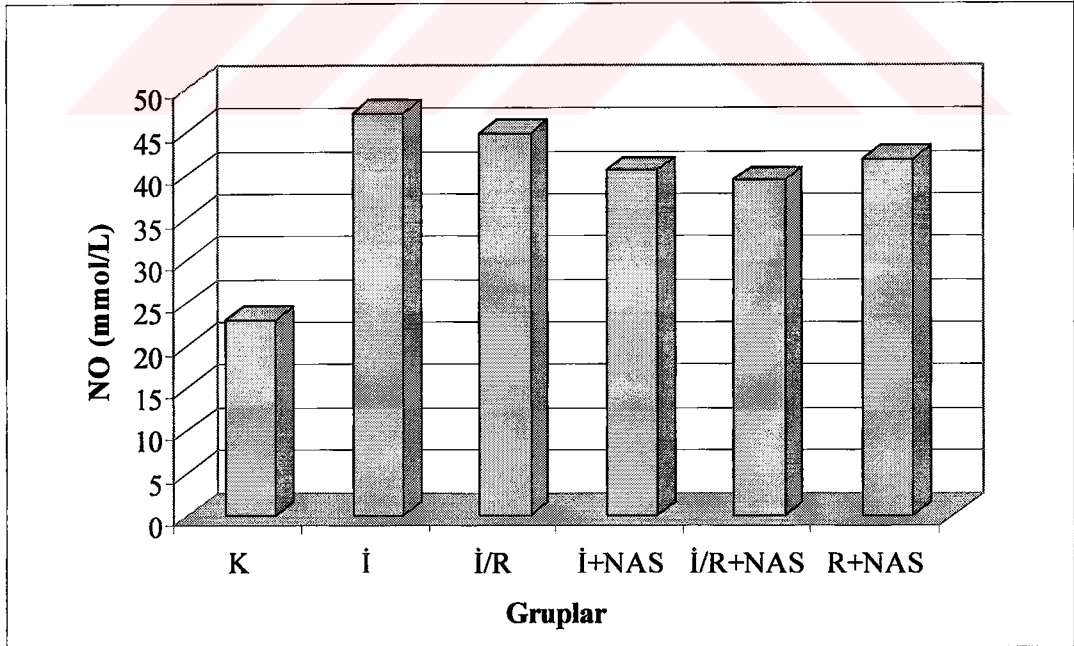
Şekil 2. Gruplara ait plazma MDA değerlerinin dağılımı görülmektedir.



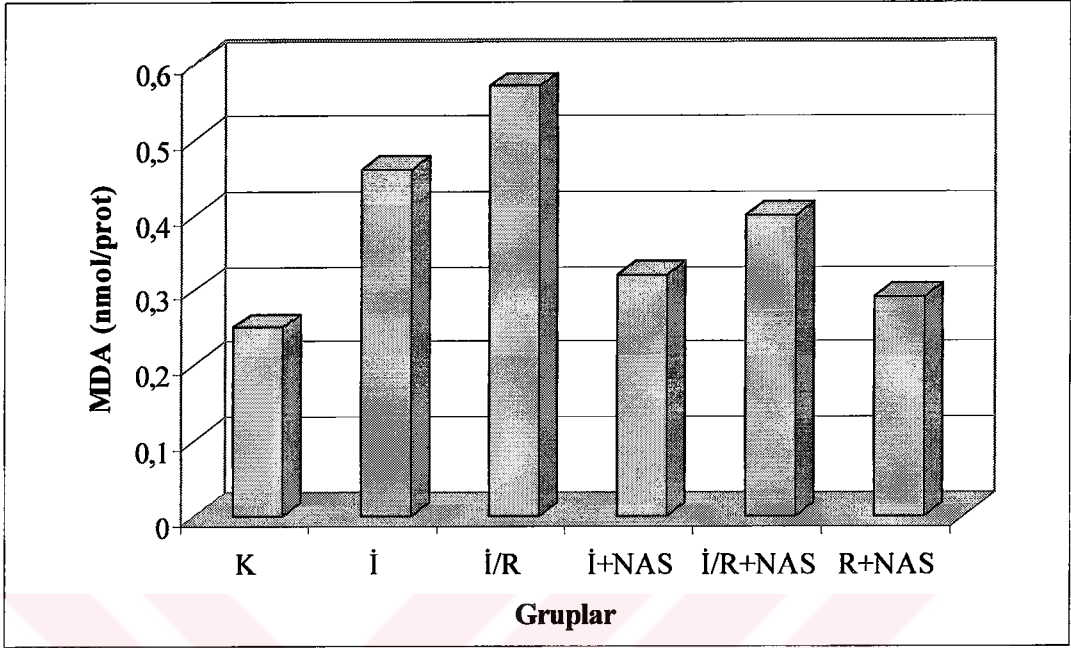
Şekil 3. Gruplara ait plazma SOD değerlerinin dağılımı görülmektedir.



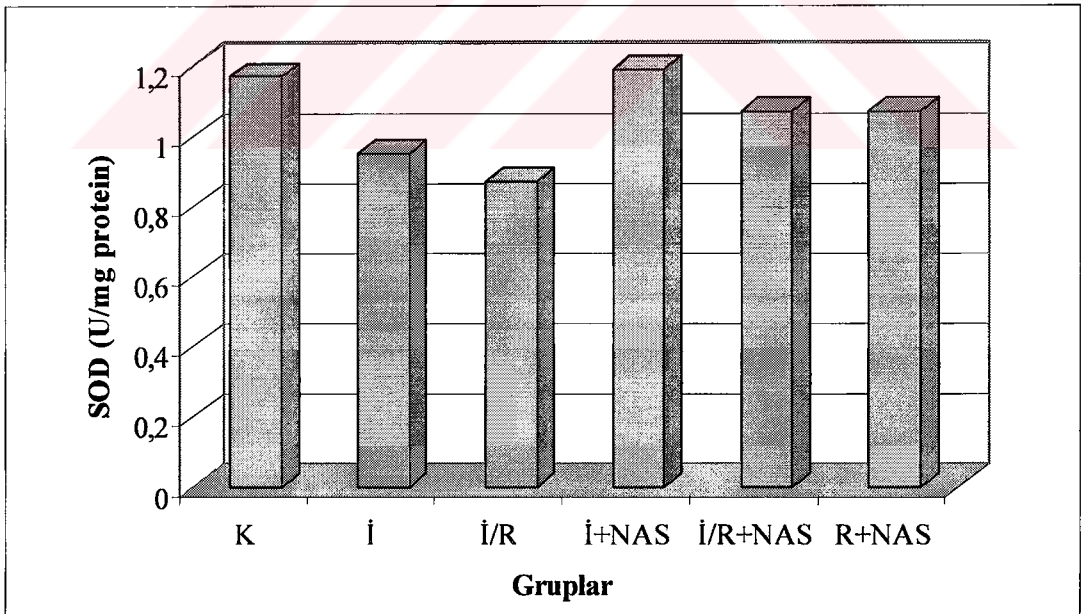
Şekil 4. Gruplara ait eritrosit GSH değerlerinin dağılımı görülmektedir.



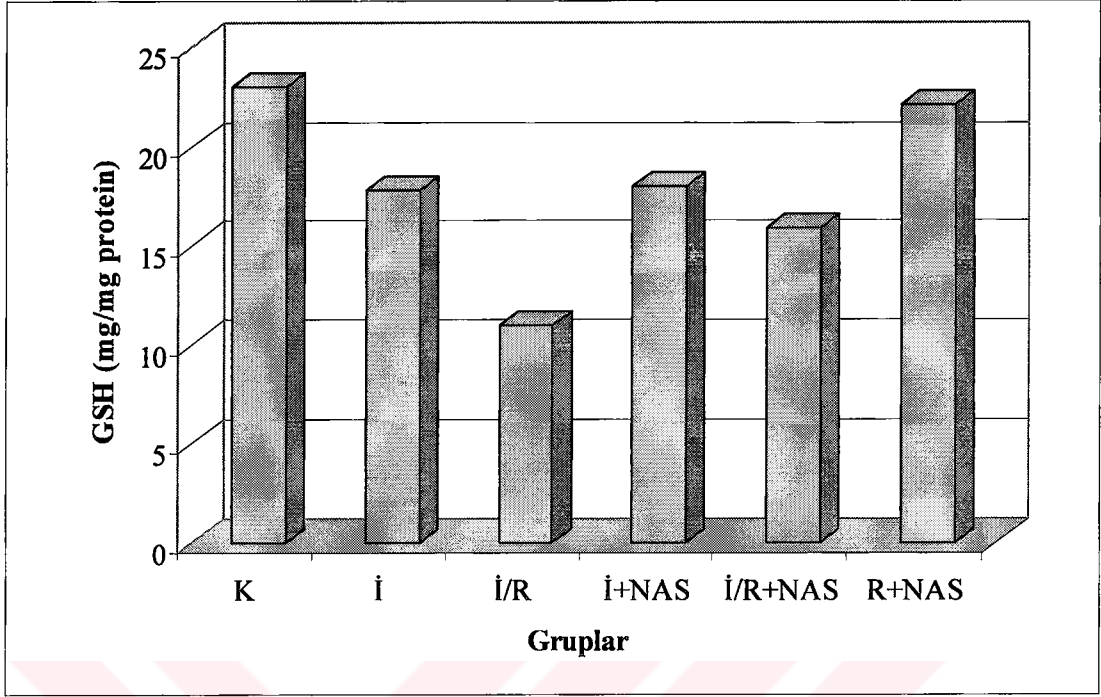
Şekil 5. Gruplara ait plazma NO değerlerinin dağılımı görülmektedir.



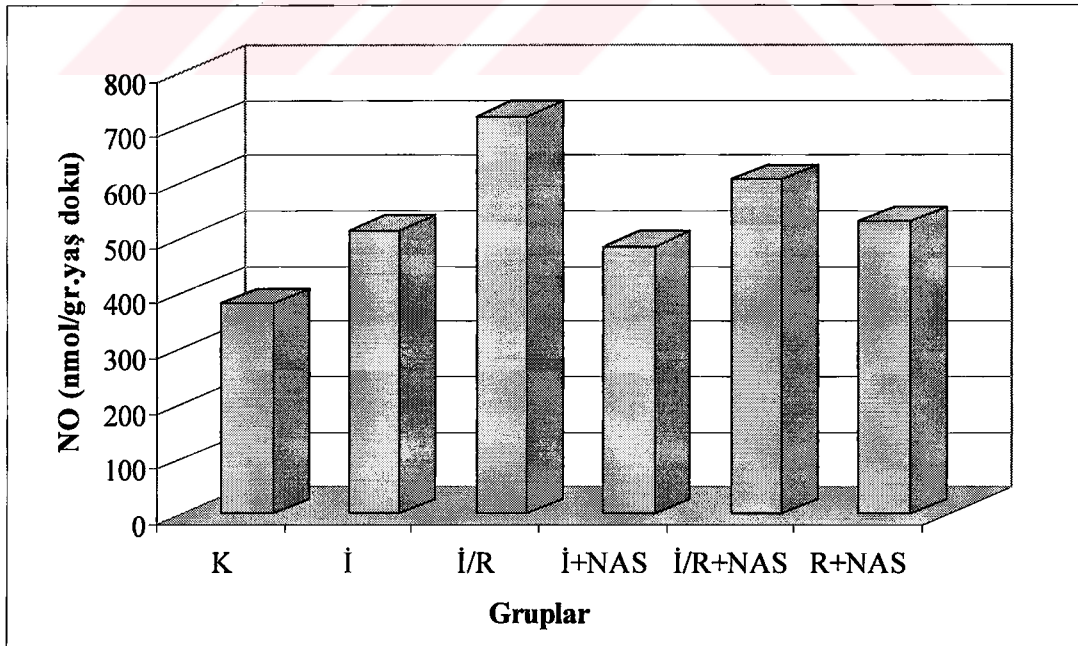
Şekil 6. Gruplara ait ince bağırsak doku MDA değerlerinin dağılımı görülmektedir.



Şekil 7. Gruplara ait İnce bağırsak SOD değerlerinin dağılımı görülmektedir.



Şekil 8. Gruplara ait ince bağırsak doku GSH değerlerinin dağılımı görülmektedir.



Şekil 9. Gruplara ait ince bağırsak doku NO değerlerinin dağılımı görülmektedir.

Histopatolojik Bulgular

Deneyisel çalışma sonunda gruptaki deneklerin ince bağırsaklarında oluşan hasarların histopatolojik sonuçları Tablo 4’de gösterildi.

Tablo 4. Gruptaki deneklerin Chiu sınıflamasına göre dağılımları (60).

GRUPLAR	Evre 0	Evre 1	Evre 2	Evre 3	Evre 4	Evre 5	Toplam
K	8						8
İ		1	6	1			8
İ/R			1	4	1	2	8
İ+NAS	1	7					8
İ/R+NAS		5	2	1			8
R+NAS		3	5				8

K grubundaki deneklerin tümü Evre 0 olarak değerlendirildi (Resim 3). İ grubundaki deneklerden biri Evre 1, altısı Evre 2 ve biri Evre 3 olarak değerlendirildi. Evre 1 hasarlanmada villusların apeksinde kapiller konjesyon izlendi (Resim 4). Evre 2 hasarlanmada supepitelyal alanın genişlemesi ve epitelyal tabakanın lamina propriadan orta derecede ayrıldığı görüldü (Resim 5). Evre 3 hasarda ise villusların lamina propriadan ileri derecede ayrılmış olduğu gözlemlendi (Resim 6). İ/R grubundaki deneklerden biri Evre 2, dördü Evre3, biri Evre 4 ve ikisi Evre 5 olarak değerlendirildi. Evre 4 hasarlanmada villuslarda soyulma görüldü (Resim 7). Evre 5 hasarlanmada ise lamina propriada parçalanma, hemoraji ve ülserasyon gözlemlendi (Resim 8).

Grublardaki deneklerin histopatolojik değerlendirme sonuçları Tablo 5’de gösterildi.

Tablo 5. Grublara ait histopatolojik değerlendirme sonuçları.

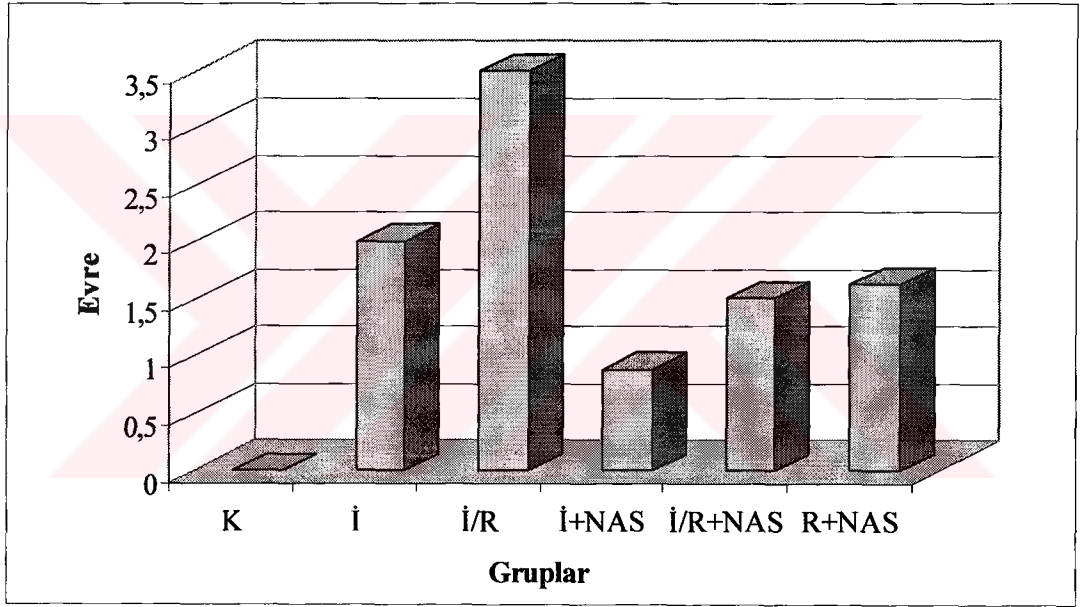
GRUPLAR	Ortanca	Minimum	Maksimum	Ortalama±standart sapma	p
K	0,00	0	0	0,00±0,00	
İ	2,00	1	3	2,00±0,53	0.05 ¹
İ/R	3,00	2	5	3,50±1,06	0.05 ²
İ+NAS	1,00	0	1	0,88±0,35	0.05 ³
İ/R+NAS	1,00	1	3	1,50±0,75	
R+NAS	2,00	1	2	1,50±0,75	
p				<0,05 ¹	

¹ İ grubunda oluşan hasar İ+NAS grubunda p<0.05

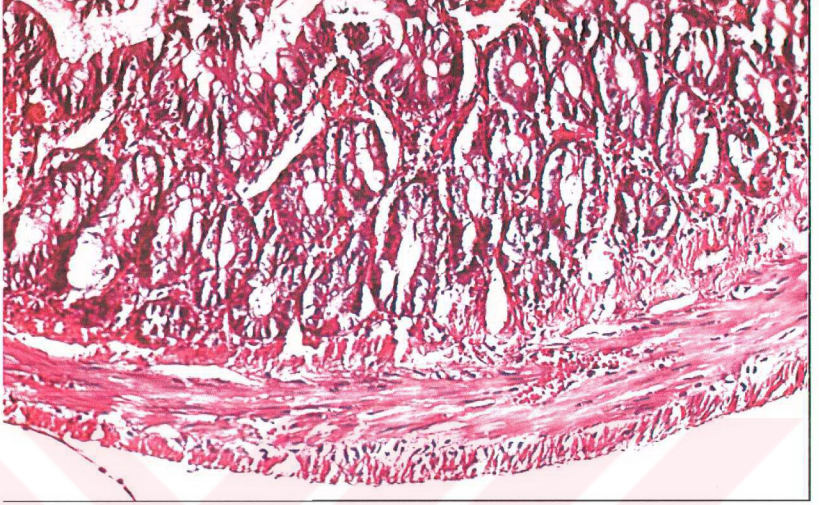
² İ/R grubunda oluşan hasar K, İ, İ+NAS, R+NAS, İR+NAS gruplarında p<0.05

³ İ+NAS grubunda oluşan hasar R+NAS grubunda p<0.05

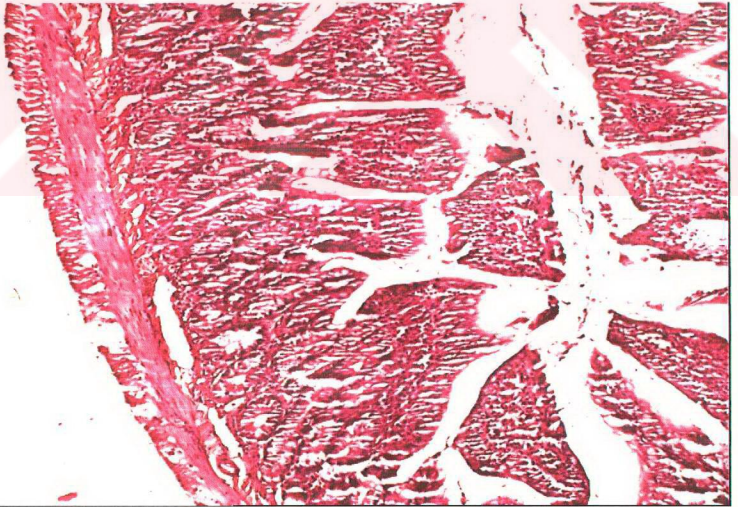
K grubundaki deneklerin ince barsak hasarı $0,00 \pm 0,00$ olarak bulundu. İ grubunda ince bağırsak hasarı $2,00 \pm 0,53$ olarak bulunurken, İ/R grubunda oluşan hasar $3,50 \pm 1,06$ idi. NAS uygulanan gruplardan İ+NAS grubundaki hasar $0,88 \pm 0,35$ olarak tespit edilirken, İ/R+NAS grubunda $1,50 \pm 0,75$ ve R+NAS grubunda ise $1,50 \pm 0,75$ olarak saptandı. İ/R grubunda oluşan hasar diğer gruplardan istatistiksel olarak da anlamlı olacak şekilde en yüksek bulundu ($p < 0,05$). İ grubunda oluşan hasar İ+NAS grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı olarak yüksek bulundu ($p < 0,05$). İ+NAS grubunda oluşan hasar, R+NAS grubunda oluşan hasardan anlamlı olarak düşük saptanırken ($p < 0,05$), İ/R+NAS grubu ile arasında oluşan hasarda anlamlı bir fark bulunmadı ($p > 0,05$).



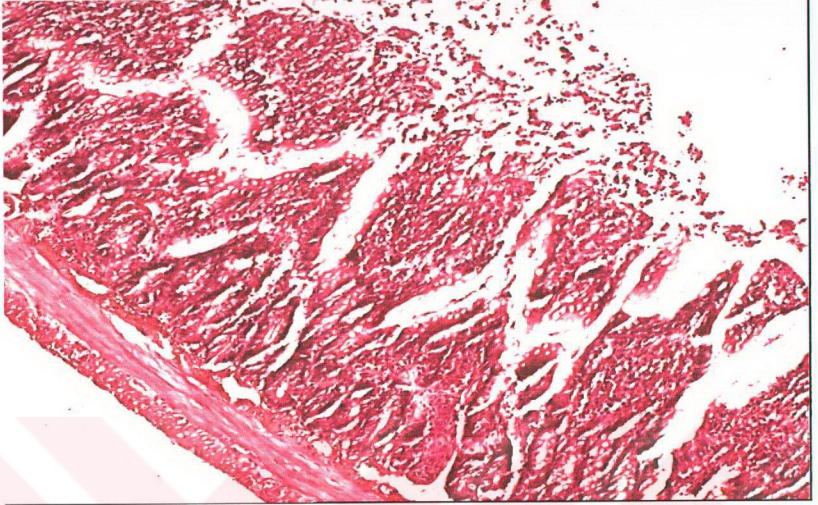
Şekil 10. Gruplara ait histopatolojik değerlendirme sonuçları.



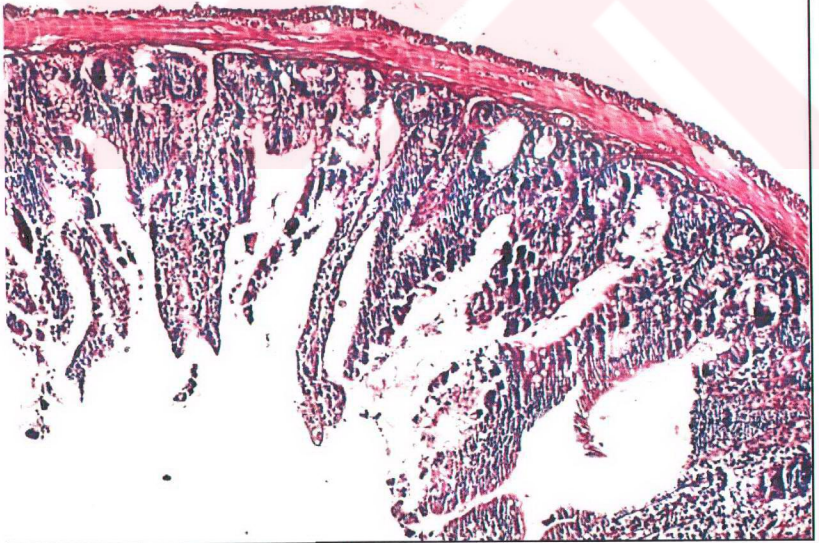
Resim 3. Evre 0. Normal ince bağırsak görülmektedir. (HE, X100)



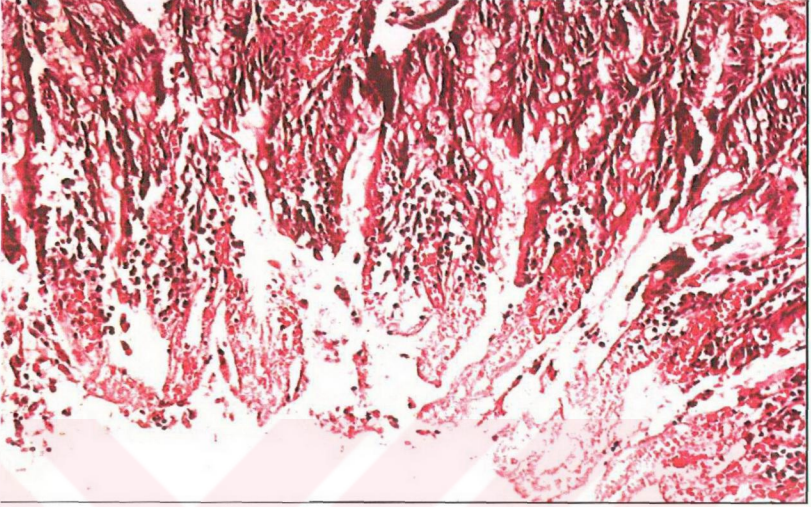
Resim 4. Evre1. Supitepelyal alanda minimal ödematöz genişleme ile birlikte lamina propriada kapiller dilatasyon görülmektedir. (HE, X500)



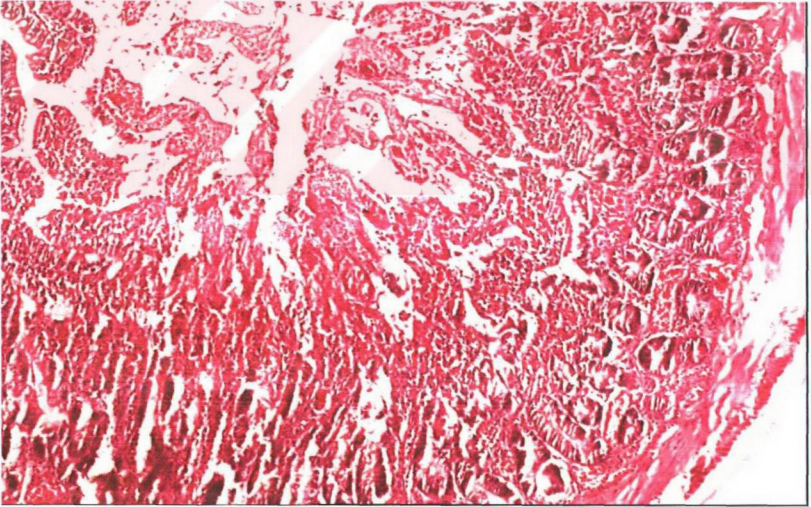
Resim 5. Evre 2. Supepitelyal alanın genişlemesi ile epitelyal tabakanın lamina propriadan orta derecede ayrılması görülmektedir. (HE, X50)



Resim 6. Evre 3. Villusların alt kısımlarının lamina propriadan ileri derecede epitelyal ayrılması görülmektedir. (HE, X50)



Resim 7. Evre 4. Villusların soyulması, kapiller dilatasyon, lamina proprianın geçirgenliğinde artma ve yüzeysel nekroz görülmektedir. (HE, X50)



Resim 8. Evre 5. Lamina propriada parçalanma, hemoraji ve ülserasyon görülmektedir. (HE, X50)

TARTIŞMA

Bağırsaklar da dahil olmak üzere çeşitli organlarda sadece iskemi sonrasında değil, reperfüzyon sonrasında da oluşan hasara bağlı fonksiyon bozuklukları görülür. Son yıllarda, iskemik hasara bağlı mukozal lezyonların gelişiminde iki mekanizma üzerinde durulmaktadır. Bunlar, oksijen radikallerinin dengesiz artışı ve iskemi sırasındaki fosfolipaz A₂'nin aktivasyonudur. Hücre membranının oksijen radikalleri ile reaksiyonu sonucu lipid peroksidasyonu ile birlikte hücre ölümü başlar. Radikal giderici antioksidan ajanların kullanımının, bağırsak İ/R hasarını azalttığını gösteren çalışmalar mevcuttur. Bu amaçla reperfüzyon öncesi ve iskemi süresince verilen antioksidan ajanların reperfüzyon hasarını azalttığı bildirilmiştir (28).

Boyd ve ark. (61) tarafından yapılan deneysel çalışmada hamsterlerde bağırsaklarda 30 dk süreyle iskemi ve ardından üç saat süreyle reperfüzyon işlemi uygulanmış olup, antioksidan ajan olarak γ hidrosibutirat, allopurinol ve E vitamini uygulanmışlar, γ hidrosibutirat'ın İ/R hasarında önemli ölçüde azalma sağladığını, allopurinol ile bu hasarın kısmi olarak azaldığını göstermişlerdir. Ancak, E vitamini ile İ/R hasarına karşı koruyucu etki gösterilememiştir. Yoshida ve ark. (62) sıçanlarda splanknik bölgede 40 dk süreyle iskemi ve 110 dk süreyle reperfüzyon uygulayarak yaptıkları deneysel çalışmada antioksidan ajan olarak E vitamini, taurine ve selenyum kullanmışlar ve çalışma sonunda selenyumun, E vitamini ve taurine göre ortalama kan basıncını daha fazla artırıp, mikrosirkuluar perfüzyonu daha çabuk düzelttiğini ortaya koymuşlardır. Öztürk ve ark. (63) da sıçanlardaki intestinal İ/R hasarında selenyumun bakteriyel translokasyonu ve oluşan hasarı önemli ölçüde azalttığını göstermişlerdir. Schmeling ve ark. (64), sıçanlarda bağırsaklarda iki saat iskemi ve bir saat reperfüzyon uygulayarak yaptıkları çalışmada antioksidan ajan olarak diklofenak sodyum,

lodoksamid, desferoksamin, dimetilsulfoksid, SOD ve KAT kullanmış, İ/R hasarını diklofenak sodyumun diğer ajanlara oranla daha fazla azalttığını göstermişlerdir. Ceran ve ark. (3), sıçanlarda bağırsaklarda 45 dk iskemi ve bir saat reperfüzyon uyguladıkları çalışmalarında bilirubini işlemiden iki saat önce vermişler ve deney sonunda bilirubinin İ/R hasarını önemli ölçüde azalttığını ortaya koymuşlardır. Günel ve ark. (28), tavşanlarda barsaklarda bir saat iskemi ve ardından bir saat reperfüzyon oluşturarak yaptıkları çalışmalarında antioksidan etkinliklerini araştırmak amacıyla mannitol, C vitamini, E vitamini ve kortikosteroid kullanmışlar, deney sonunda mannitol ve C vitamininin İ/R hasarını azaltırken, kortikosteroid ve E vitamininin ise oluşan hasara karşı bir koruyucu etkilerinin olmadığını bildirmişlerdir. Bağırsak İ/R hasarında antioksidan etkinliklerini araştırmak amacıyla pentoksifilin, kafeik asit fenetil ester, meletonin, allopurinol, trimetazidin gibi ajanlar kullanılmış ve oksidatif strese karşı etkili oldukları gösterilmiştir (4,65-70).

NAS sulfidril grup vericisi ve serbest radikal temizleyicisi thiol grubu güçlü bir antioksidandır (46). Bu özelliğinden dolayı bir çok araştırmacı tarafından incelenen bir ilaçtır. Karaciğer, akciğer, beyin, ekstremiteler ve böbrekte İ/R hasarı oluşturarak yapılan deneysel çalışmalarda NAS'ın oluşan oksidatif hasarı önlemede etkili olduğu bildirilmiştir (41,71-76). Mojžiš ve ark (77) ise NAS'ın İ/R hasarına bağlı oluşan mide mukozasındaki hasarı daha da arttırdığını ortaya koymuşlardır.

Çalışmamızda, bağırsak İ/R hasarına karşı NAS'ın etkinliğini araştırdık. NAS, thiol grubu ve düşük molekül ağırlıklı bir antioksidandır. Hücreleri oksidatif hasara karşı değişik mekanizmalarla korur. Hidroksil radikale, hidrojen peroksite ve hipoklorik aside hücre dışında direkt antioksidan olarak etki eder. Hücre içi ve dışında reaktif oksijen radikallerine karşı savunmada önemli bir rol üstlenen GSH'nın hücre içi rezervinin artmasını, GPx enzim aktivitesini artırmak yolu ile sağlar. Bundan başka SOD enzim aktivitesini artırmak suretiyle oluşan oksidatif hasarı azaltır. Ayrıca arginaz enzim aktivitesini artırıp, NO düzeyini azaltmak yolu ile reaktif oksijen radikallerine karşı koruyucu etki sağlar (71, 78).

NAS'ın bağırsak İ/R hasarına karşı koruyucu etkilerini araştırmak amacıyla deneklerden alınan plazma ve ince bağırsak doku örneklerinde MDA, SOD, GSH ve NO düzeylerini inceledik. Reperfüzyon hasarını göstermede bir marker olarak kabul edilen MDA'nın plazma düzeyi en yüksek İ/R grubunda saptandı. İ/R grubunda bulunan MDA değeri K, İ/R+NAS, İ+NAS ve R+NAS gruplarından istatistiksel olarak da yüksek bulundu ($p<0.05$). İ grubunun plazma MDA değeri K, İ/R+NAS, İ+NAS ve R+NAS gruplarındaki plazma MDA değerlerinden anlamlı şekilde yüksekti ($p<0.05$). NAS uygulanan gruplardan en düşük plazma MDA düzeyi R+NAS grubunda saptandı. Bu en düşük plazma MDA düzeyi

diğer NAS uygulanan İ/R+NAS ve İ+NAS gruplarından anlamlı derecede düşüktü ($p<0.05$). İ+NAS ve İ/R+NAS arasında anlamlı bir fark saptanmadı ($p>0.05$). K grubunun plazma MDA değeri R+NAS grubu hariç diğer gruplardan anlamlı olarak düşüktü ($p<0.05$). İnce bağırsak doku MDA değerleri tıpkı plazma MDA değerleri gibi en yüksek İ/R grubunda bulundu. İ/R grubundaki doku MDA değeri K, İ/R+NAS, İ+NAS ve R+NAS gruplarından anlamlı olarak yüksekti ($p<0.05$). İ grubunun doku MDA düzeyi K, İ+NAS ve R+NAS gruplarından anlamlı ölçüde yüksek bulundu ($P<0.05$). NAS uygulanan gruplardan en düşük doku MDA değeri R+NAS grubunda bulundu. Bulunan bu değer NAS uygulanan gruplardan sadece İ/R+NAS grubundan anlamlı düzeyde düşüktü ($p<0.05$). İ/R+NAS ve İ+NAS grupları doku MDA değerleri arasında önemli ölçüde bir fark bulunmadı ($p>0.05$). Sonuç olarak hem plazma, hem de doku MDA düzeyleri en yüksek İ/R grubunda bulundu. NAS uygulanan gruplardaki doku ve plazma MDA değerleri ışığında NAS'ın, hem iskemi hem de reperfüzyona bağlı ince barsak doku hasarını önlemede etkili olduğu görülmüştür.

İnce bağırsakta oluşan İ/R hasarını göstermek için araştırdığımız diğer bir biyokimyasal parametre plazma ve doku SOD enzim aktivitesiydi. İ/R grubundaki plazma SOD düzeyi K ve İ grubundan anlamlı olarak daha yüksek bulundu ($p<0.05$). İ grubunun plazma SOD düzeyleri İ/R+NAS ve İ+NAS gruplarına göre daha düşük saptandı ($p<0.05$). NAS uygulanan grupların plazma SOD düzeyleri arasında anlamlı bir fark saptanmadı ($p>0.05$). İ/R grubunun ince bağırsak dokusundaki SOD enzim aktivitesi K, İ/R+NAS, İ+NAS ve R+NAS grupları ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak da anlamlı düzeyde düşük saptandı ($p<0.05$). İ grubunun doku SOD düzeyleri İ/R+NAS ve İ+NAS gruplarından anlamlı derecede düşük bulundu ($p<0.05$). NAS uygulanan grupların doku SOD değerleri arasında anlamlı bir fark saptanmadı ($p>0.05$). Bu sonuçlar ışığında NAS'ın ince bağırsak İ/R hasarına karşı plazma SOD düzeylerini artırarak etki etmediğini, ancak ince bağırsak dokusunda oluşan İ/R hasarına karşı SOD enzim aktivitesini artırarak etkili olduğu düşüncesindeyiz.

İ/R hasarına karşı NAS'ın antioksidan etkilerini araştırmak amacıyla eritrosit ve ince bağırsak doku GSH düzeylerini inceledik. İ/R grubunda elde edilen eritrosit GSH değerleri istatistiksel olarak da anlamlı bir şekilde diğer tüm gruplardan daha düşük saptandı ($p<0.05$). İ grubunun eritrosit GSH değeri İ+NAS ve R+NAS gruplarındaki GSH değerlerinden anlamlı olarak düşük saptandı ($p<0.05$). Ancak İ/R+NAS grubu ile arasında bir fark saptanmadı ($p>0.05$). NAS uygulanan gruplar arasında en yüksek eritrosit GSH değeri R+NAS grubunda bulundu. R+NAS grubunda saptanan GSH değeri İ/R+NAS grubundaki GSH değerinden anlamlı olarak yüksek bulunurken ($p<0.05$), İ+NAS grubu GSH değeri arsında anlamlı bir

fark saptanmadı ($p>0.05$). İ/R grubu doku GSH değerleri tıpkı eritrosit GSH değerlerinde olduğu gibi diğer tüm gruplardan istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde düşük bulundu ($p<0.05$). İ grubunun doku GSH değerleri ise NAS verilen gruplardaki GSH değerlerinden anlamlı bir fark göstermedi ($p>0.05$). NAS uygulanan gruplardan en yüksek doku GSH değeri R+NAS grubunda saptandı. R+NAS grubu doku GSH düzeyi, İ/R+NAS grubu GSH düzeyinden anlamlı bir şekilde yüksek bulunurken ($p<0.05$), İ+NAS grubu GSH düzeyi ile arasında anlamlı bir fark saptanmadı ($p>0.05$). Bu sonuçlar doğrultusunda NAS'ın reperfüzyon sonunda oluşan hasara karşı eritrositlerde ve ince bağırsak dokusunda GSH rezervlerini artırarak etkili olduğu düşünülmektedir. Ancak, iskemi sonunda oluşan hasarda NAS uygulamasının oluşan hasara karşı eritrosit GSH düzeyini artırarak etkili olurken, ince bağırsaklarda doku GSH düzeylerinde anlamlı bir artma oluşturmadığı sonucuna vardık.

İ/R hasarına karşı NAS'ın antioksidan etkisini doku ve plazma NO düzeylerini inceleyerek de araştırdık. İ/R grubunda saptanan plazma NO değeri yalnızca K grubuna göre anlamlı düzeyde yüksekti ($p<0.05$). En yüksek plazma NO değeri İ grubunda bulundu ve bulunan bu değer İ/R grubu hariç diğer gruplardan anlamlı derecede yüksek saptandı ($p<0.05$). NAS verilen gruplar arasında yapılan karşılaştırmalarda ise plazma NO düzeyleri arasında anlamlı bir fark saptanmadı ($p>0.05$). İ/R grubunda ölçülen ince bağırsak doku NO düzeyi istatistiksel olarak da anlamlı şekilde diğer gruplara göre en yüksek bulundu ($p<0.05$). En düşük doku NO değeri diğer gruplardan anlamlı olacak şekilde K grubunda saptandı ($p<0.05$). İ grubunda ölçülen NO değeri, İ+NAS ve R+NAS grubu doku NO düzeyi arasında anlamlı bir fark bulunmadı ($p>0.05$). NAS uygulanan gruplardan İ+NAS grubu doku NO düzeyi, İR+NAS grubuna göre anlamlı derecede düşük bulunurken ($p<0.05$), R+NAS grubu NO değeri arasında anlamlı bir fark görülmedi ($p>0.05$). Bu sonuçlar neticesinde NAS'ın reperfüzyon hasarına karşı plazma NO düzeylerini azaltarak antioksidan bir etki göstermediği, ancak iskemik hasara karşı plazma NO düzeylerini azaltarak koruyucu bir etki gösterdiği sonucuna vardık. Ancak, NAS'ın ince bağırsakta oluşan reperfüzyon hasarına karşı doku NO düzeyini azaltması sayesinde antioksidan bir etkisinin olduğu, iskemik hasara karşı ise koruyucu bir etkisinin olmadığı kanısındayız.

Deneklerden aldığımız ince bağırsak doku örneklerini Chiu sınıflamasına göre değerlendirdik. İ/R grubunda oluşan hasar diğer gruplardan istatistiksel olarak da anlamlı olacak şekilde en yüksek bulundu ($p<0.05$). Bu sonuç, deneysel model ile ince bağırsaklarda İ/R hasarı oluşturulduğunun bir göstergesi olarak kabul edilebilir. İ grubunda oluşan hasar İ+NAS grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı olarak yüksek bulundu ($p<0.05$). NAS uygulanan gruplarda en düşük hasar İ+NAS grubunda saptandı. İ+NAS grubunda oluşan hasar, R+NAS

grubunda oluşan hasardan anlamlı olarak dūřuk saptanırken ($p < 0.05$), İ/R+NAS grubu ile arasında oluşan hasarda anlamlı bir fark bulunmadı ($p > 0.05$). Sonuç olarak NAS uygulamasının hem iskemi hem de reperfūzyon hasarına karşı korumada histopatolojik olarak etkili olduğunu sōyleyebiliriz.

Mezenterik kan akımının bozulması temelinde oluşan ve patogeneğinde İ/R hasarının etkili olduğu trombüs, emboli gibi doğrudan damar içini tıkayan patolojiler ve inkarsere inguinal herni, invaginasyon, nekrozitan enterokolit, tūmör, fibrotik band gibi cerrahi hastalıkların tedavisinde NAS'ın faydalı olabileceğini dūřünmekteyiz.



SONUÇLAR

Oluşturduğumuz deneysel intestinal İ/R modelinde NAS'ın intestinal İ/R hasarına karşı koruyucu etkileri araştırıldı.

Bu amaçla çalışılan biyokimyasal parametrelerden biri olan MDA'nın hem plazma, hem de doku düzeyleri en yüksek İ/R grubunda bulundu ($p<0.05$). NAS uygulanan gruplardaki doku ve plazma MDA değerleri ışığında NAS'ın, hem iskemi hem de reperfüzyona bağlı ince bağırsak doku hasarını önlemede etkili olduğu görülmüştür.

Ayrıca NAS'ın ince bağırsak İ/R hasarına karşı plazma SOD düzeylerini artırarak etki etmediğini, buna karşın ince bağırsak dokusunda oluşan oksidatif hasara karşı SOD enzim aktivitesini artırarak etkili olduğunu saptadık

İncelenen biyokimyasal parametrelerden biri olan GSH'nın elde edilen sonuçlar neticesinde NAS'ın reperfüzyon sonunda oluşan hasara karşı eritrositlerde ve ince bağırsak dokusunda GSH rezervlerini artırarak etkili olduğu görülmüştür. Ancak, iskemi sonunda oluşan hasarda NAS, eritrosit GSH düzeyini arttırarak etkili olurken, ince bağırsaklarda oluşan hasarda doku GSH düzeylerinde anlamlı bir artma oluşturmadığı sonucuna vardık ($p>0.05$).

Elde edilen biyokimyasal parametrelerden sonuncusu doku ve plazma NO düzeyleriydi. NAS'ın reperfüzyon hasarına karşı plazma NO düzeylerini azaltarak antioksidan bir etki göstermediği, öte yandan iskemik hasara karşı plazma NO düzeylerini azaltarak koruyucu bir etki gösterdiği sonucuna vardık ($p<0.05$). Ayrıca NAS'ın ince bağırsakta oluşan reperfüzyon hasarına karşı doku NO düzeyini azaltması sayesinde antioksidan bir etkisinin olduğu, iskemik hasara karşı ise koruyucu bir etkisinin olmadığı anlaşıldı.

Deneklerin ince bağırsak doku örneklerinin histopatolojik olarak değerlendirmeleri neticesinde NAS'ın hem iskemi hem de reperfüzyon hasarına karşı koruyucu etkilerinin olduğu anlaşılmıştır.

Sonuç olarak NAS, intestinal İ/R hasarına karşı ince bağırsak dokusunda ve plazmada farklı antioksidan mekanizmalar üzerinden etki eden, oksidatif hasara karşı koruyucu özelliği olan antioksidan bir ajan olduğu görüşündeyiz.



ÖZET

Bu çalışmada intestinal iskemi/reperfüzyon hasarının önlenmesinde N-asetilsisteinin etkisi araştırılmıştır.

Çalışmada 48 adet Wistar-Albino cinsi sıçan kullanılmıştır. Her biri 8 adet sıçan içeren gruplar halinde 6 grup oluşturulmuştur. Gruplar sırasıyla; Grup 1: Kontrol, Grup 2: İskemi, Grup3: İskemi/Reperfüzyon, Grup 4: İskemi+N-asetilsistein, Grup 5: İskemi/Reperfüzyon+N-asetilsistein ve Grup 6: Reperfüzyon+N-asetilsistein şeklinde düzenlenmiştir. Deneklere dahil oldukları gruplara göre intestinal 45 dakika süreyle iskemi ve bir saat süreyle reperfüzyon uygulanmıştır. Grup 4 ve Grup 5'deki deneklere cerrahi işlemin başında, Grup 6'da reperfüzyonun başlaması ile birlikte intravenöz N-asetilsistein verilmiştir. Deney sonunda tüm sıçanlardan biyokimyasal ve histopatolojik incelemeler için intrakardiyak kan örnekleri ve yaklaşık 20 cm'lik ince bağırsak anısı alındı.

Biyokimyasal inceleme olarak kan ve doku örneklerinde malondialdehit, süperoksit dismutaz, glutatyon ve nitrik oksit çalışıldı. İnce bağırsak doku örnekleri histopatolojik olarak Chiu sınıflamasına göre incelendi. Biyokimyasal ve histopatolojik sonuçlar Kruskal-Wallis varyans analizi ve Mann Whitney U testleriyle değerlendirildi.

Deneysel intestinal İskemi/Reperfüzyon modelinde N-asetilsisteinin koruyucu etkilerini araştırmak amacıyla çalışılan biyokimyasal parametrelerden biri olan Malondialdehitin hem plazma, hem de doku düzeyleri en yüksek İskemi/Reperfüzyon grubunda bulundu ($p<0.05$). İskemi sonunda oluşan hasarda N-asetilsistein, eritrosit glutatyon düzeyini arttırarak etkili olurken, ince bağırsaklarda oluşan hasarda doku glutatyon düzeylerinde anlamlı bir artma oluşturmadığı sonucuna vardık ($p>0.05$). N-asetilsisteinin reperfüzyon hasarına karşı plazma nitrik oksit düzeylerini azaltarak antioksidan bir etki

göstermediği, öte yandan iskemik hasara karşı plazma nitrik oksit düzeylerini azaltarak koruyucu bir etki gösterdiği sonucuna vardık ($p<0.05$).

Sonuç olarak, biyokimyasal ve histopatolojik değerlendirmeler ışığında, oluşturduğumuz deneysel intestinal iskemi/reperfüzyon modelinde N-asetilsistein uygulamasının hem iskemi hem de reperfüzyon hasarına karşı korumada etkili olduğu kanısına varıldı.

Anahtar Kelimeler: İnce bağırsak, Reperfüzyon hasarı, N-asetilsistein.



EFFECT OF N-ACETYLCYSTEINE ON INTESTINAL ISCHEMIA- REPERFUSION INJURY

SUMMARY

In this study, the effect of N-acetylcysteine on preventing intestinal ischemia/reperfusion injury has been researched.

48 Wistar-Albino rats have been used in this study in 6 groups, each including 8 rats. Groups have been arranged as; Group 1: Control, Group 2: Ischemia, Group 3: Ischemia/Reperfusion, Group 4: Ischemia +N-acetylcysteine, Group 5: Ischemia/Reperfusion + N-acetylcysteine and Group6: Reperfusion + N-acetylcysteine, respectively. 45 minutes of intestinal ischemia and one hour of reperfusion has been applied to objects according to their groups. Intravenous N-acetylcysteine is administered at the beginning of the surgery to group 4 and 5 objects, and at the beginning of reperfusion to group 6 objects. At the end of the experiment, intracardiac blood samples and 20 cm of intestinal loops has been collected from all rats for biochemical and histopathological examinations.

As biochemical examinations, malondialdehyde, superokside dismutase, glutation and nitric okside have been studied on blood and tissue samples. Intestinal tissue samples have been examined histopathologically according to Chiu Clasification. Biochemical and histopathological outcomes have been evaluated by using Kruskal-Wallis variant analises and Mann Whitney U test.

Malondialdehyde, which is one of the biochemical parametes used with the aim of researching the protective effects of N-acetylcysteine in the model of experimental intestinal

ischemia/reperfusion and of which both the plasma and tissue levels were found to be in the highest ischemia/reperfusion group ($p < 0.05$). As a result of the injury of ischemia, N-acetylcysteine was effective by increasing the level of erythrocyte glutation, however, we did not find significant increase in the levels of tissue glutation in the injury occurred in small intestine ($p > 0.05$). In this study, we found that N-acetylcysteine decreases plasma nitric oxide levels against reperfusion injury and does not create an antioxidant effect. On the other hand, it demonstrates protective effect by decreasing nitric oxide levels against ischemia injury.

In conclusion, it has been suggested, in the light of biochemical and histopathological evaluations of our experimental study that N-acetylcysteine administration is effective to prevention of injury in both ischemia and reperfusion.

Key Words: Small intestine, Reperfusion injury, N-acetylcysteine.



KAYNAKLAR

1. Chen Y, Milles AM, Grisham BM. Pathophysiology and reactive oxygen metabolites. In: Ahmad S (Eds.). Oxidative stress and antioxidant defenses in biology. 1th ed. New York: Chapman and Hall Co; 1995. p.62-95.
2. Young DG. Intussusception. In: O'Neill JA, Rowe MI, Grosfeld JL, Fonkalsrud EW, Coran AG (Eds.). Pediatric Surgery. 5th ed. St. Louis: Mosby-Year Book Co; 1998. p.1185-98.
3. Ceran C, Sönmez K, Demiroğulları B, Dursun A, Düzgün E, Başaklar AC et al. Effect of bilirubin in ischemia/reperfusion injury on rat small intestine. J Pediatr Surg 2001; 36(12):1764-7.
4. Kazez A, Demirbağ M, Üstundağ B, Özercan IH, Sağlam M. The role of melatonin in prevention of intestinal ischemia-reperfusion injury in rats. J Pediatr Surg 2000; 35(10):1444-8.
5. Ateş B. İntestinal İskemi-Reperfüzyon Uygulamalarında Değişik Antioksidanların Koruyucu Etkilerinin Araştırılması (tez). Malatya: İnönü Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü; 2001.
6. Ekingen G. İntestinal İskemi Reperfüzyon Hasarında Amrinon'un Etkisi (tez). Ankara: Gazi Üniversitesi Tıp Fak; 1999.
7. Robbins SL, Kumar V (Çeviri: Ö. Uluoğlu). Patoloji. Ankara: Güneş Kitapevi; 1990: 685-6.
8. Haglund U, Bergqvist D. Intestinal ischemia-the basics. Langenbecks Arch Surg 1999; 384(3): 233-8.

9. Lundgren O, Haglund U. The pathophysiology of the intestinal countercurrent exchanger. *Life Sci* 1978; 23(14):1411-22.
10. Schoenberg MH, Beger HG. Oxygen radicals in intestinal ischemia and reperfusion. *Chem Biol Interact* 1990; 76(2):141-61.
11. Schoenberg MH, Muhl E, Sellin D, Younes M, Schildberg FW, Haglund U. Posthypotensive generation of superoxide free radicals--possible role in the pathogenesis of the intestinal mucosal damage. *Acta Chir Scand* 1984;150(4):301-9.
12. Granger DN, Holwarth ME, Parks DA. Ischemia-reperfusion injury: role of oxygen-derived free radicals. *Acta Physiol Scand Suppl.* 1986; 548:47-63.
13. Miner TJ, Tavaf-Motamen H, Stojadinovic A, Shea-Donohue T. Ischemia-reperfusion protects the rat small intestine against subsequent injury. *J Surg Res* 1999; 82(1):1-10.
14. Granger DN, Korthuis RJ. Physiologic mechanisms of postischemic tissue injury. *Annu Rev Physiol* 1995; 57:311-32.
15. Augustin AJ, Goldstein RK, Milz J, Lutz J. Influence of anti-inflammatory drugs and free radical scavengers on intestinal ischemia induced oxidative tissue damage. *Adv Exp Med Biol* 1992; 316:239-51.
16. Urbaniak JR, Seaber AV, Chen LE. Assessment of ischemia and reperfusion injury. *Clin Orthop Relat Res* 1997; 334:30-6.
17. Schoenberg MH, Beger HG. Reperfusion injury after intestinal ischemia. *Crit Care Med* 1993; 21(9):1376-86.
18. 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(4):581-9.
19. Auscher C, Amory N, Pasquier C, Delbarre F. Localization of xanthine oxidase activity in hepatic tissue. A new histochemical method. *Adv Exp Med Biol* 1977; 76A:605-9.
20. Pickett JP, Pendergrass RE, Bradford WD, Elchlepp JG. Localization of xanthine oxidase in rat duodenum; fixation of sections instead of blocks. *Stain Technol* 1970; 45(1):35-6.
21. Fridovich I. Superoxide radical: an endogenous toxicant. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1983; 23:239-57.
22. Seven A, Candan G. Serbest radikaller ve lipid peroksidasyonu. *Klinik Gelişim* 1995; 8:3906-11.
23. Seven A, Candan G. Radikal ve lipid peroksid düzeyini arttıran etkenler. *Biyokimya Dergisi* 1995; 4:43-56.
24. Grace PA. Ischemia-reperfusion injury. *Br J Surg* 1994; 81:637-47.

25. Kılınç K. Oksijen radikalleri: üretilmeleri, fonksiyonları ve toksik etkileri. *Biyokimya Dergisi* 1985; 2:60-89.
26. Sohal RS, Brunk UT. Mitochondrial production of pro-oxidants and cellular senescence. *Mutat Res* 1992; 275(3-6):295-304.
27. Reilly PM, Schiller HJ, Bulkley GB. Pharmacologic approach to tissue injury mediated by free radicals and other reactive oxygen metabolites. *Am J Surg* 1991;161(4):488-503.
28. Günel E, Çağlayan F, Çağlayan O, Dilsiz A, Duman S, Aktan M. Treatment of intestinal reperfusion injury using antioxidative agents. *J Pediatr Surg* 1998; 33(10):1536-9.
29. Oostenbrug GS, Mensink RP, Hardeman MR, De Vries T, Brouns F, Hornstra G. Exercise performance, red blood cell deformability, and lipid peroxidation: effects of fish oil and vitamin E. *J Appl Physiol.* 1997; 83(3):746-52.
30. Kolb H, Kolb-Bachofen V. Nitric oxide: a pathogenetic factor in autoimmunity. *Immunol Today* 1992; 13(5):157-60.
31. Mustafa NA, Yandı M, Turgutalp H, Ovalı E, Aydemir V, Albayrak L. Role of diltiazem in ischemia-reperfusion injury of the intestine. *Eur Surg Res* 1994; 26(6):335-41.
32. Molnar Z, Shearer E, Lowe D. N-Acetylcysteine treatment to prevent the progression of multisystem organ failure: a prospective, randomized, placebo-controlled study. *Crit Care Med* 1999; 27(6):1100-4.
33. Ormrod DJ, Harrison GL, Miller TE. Inhibition of neutrophil myeloperoxidase activity by selected tissues. *J Pharmacol Methods* 1987; 18(2):137-42.
34. Savaş Ç, Aras T, Çakmak M, Bilgehan A, Ataoğlu O, Türközkan N et al. Pentoxifylline inhibits overflow and reduces intestinal reperfusion injury. *J Pediatr Surg* 1997; 32(6):905-10.
35. Abu-Zidan FM, Winterbourn CC, Bonham MJ, Simovic MO, Buss H, Windsor JA. Small bowel ischaemia-reperfusion increases plasma concentrations of oxidised proteins in rats. *Eur J Surg* 1999; 165(4):383-9.
36. Kehrer JP. Free radicals as mediators of tissue injury and disease. *Crit Rev Toxicol* 1993; 23(1):21-48.
37. Steenvoorden DP, van Henegouwen GM. The use of endogenous antioxidants to improve photoprotection. *J Photochem Photobiol B* 1997; 41(1-2):1-10.
38. Wong JW, Ebeler SE, Rivkah-Isseroff R, Shibamoto T. Analysis of malondialdehyde in biological samples by capillary gas chromatography. *Anal Biochem* 1994; 220(1):73-81.
39. Sun Y, Oberley LW, Li Y. A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clin Chem* 1988; 34(3):497-500.

40. Stojadinovic A, Smallridge R, Nath J, Ding X, Shea-Donohue T. Anti-inflammatory effects of U74389F in a rat model of intestinal ischemia/reperfusion injury. *Crit Care Med* 1999; 27(4):764-70.
41. Demir S, İnal-Erden M. Pentoxifylline and N-acetylcysteine in hepatic ischemia/reperfusion injury. *Clinica Chimica Acta* 1998; 275:127-35.
42. Ziment I. Acetylcysteine: a drug that is much more than a mucokinetic. *Biomed Pharmacother* 1988; 42(8):513-9.
43. Stewart S, Ryan C, Poropat S. Managing patients with acute myocardial ischemia and reperfusion injury with N-acetylcysteine. *Dimens Crit Care Nurs* 1997; 16(3):122-31.
44. Moldeus P, Cotgreave IA, Berggren M. Lung protection by a thiol-containing antioxidant: N-acetylcysteine. *Respiration* 1986; 50 Suppl 1:31-42.
45. van Zandwijk N. N-acetylcysteine for lung cancer prevention. *Chest* 1995; 107(5):1437-41.
46. Aruoma OI, Halliwell B, Hoey BM, Butler J. The antioxidant action of N-acetylcysteine: its reaction with hydrogen peroxide, hydroxyl radical, superoxide, and hypochlorous acid. *Free Radic Biol Med* 1989; 6(6):593-7.
47. van Herwaarden CL, Bast A, Dekhuijzen PN. The role of N-acetylcysteine in the treatment of chronic obstructive pulmonary disease. *Neth J Med* 1995; 47(2):45-8.
48. De Flora S, Grassi C, Carati L. Attenuation of influenza-like symptomatology and improvement of cell-mediated immunity with long-term N-acetylcysteine treatment. *Eur Respir J* 1997; 10(7):1535-41.
49. Travaline JM, Sudarshan S, Roy BG, Cordova F, Leyenson V, Criner GJ. Effect of N-acetylcysteine on human diaphragm strength and fatigability. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 156(5):1567-71.
50. Holdiness MR. Clinical pharmacokinetics of N-acetylcysteine. *Clin Pharmacokinet* 1991; 20(2):123-34.
51. Spapen H, Zhang H, Demanet C, Vleminckx W, Vincent JL, Huyghens L. Does N-acetylcysteine influence cytokine response during early human septic shock? *Chest* 1998; 113(6):1616-24.
52. Vale JA, Proudfoot AT. Paracetamol (acetaminophen) poisoning. *Lancet* 1995; 346(8974):547-52.
53. Walsh TS, Lee A. N-acetylcysteine administration in the critically ill. *Intensive Care Med* 1999; 25(5):432-4.
54. Buege JA, Aust SD. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol* 1978; 52:302-10.

55. Sun Y, Oberley LW, Li Y. A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clin Chem* 1988; 34(3):497-500.
56. Beutler E, Duron O, Kelly BM. Improved method for the determination of blood glutathione. *J Lab Clin Med* 1963; 61:882-8.
57. Frankel S, Reitman S & Sonnenwirth AC. Hemoglobin In: Gradwohl's (eds.). *Clinical Laboratory Methods and Diagnosis*. 7th ed. Saint Louis: Mosby Co; 1974. p.403-04.
58. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AC, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193(1):265-75.
59. Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids. *Anal Biochem* 1982; 126(1):131-8.
60. Chiu CJ, McArdle AH, Brown R, Scott HJ, Gurd FN. Intestinal mucosal lesion in low-flow states. I. A morphological, hemodynamic, and metabolic reappraisal. *Arch Surg* 1970; 101(4):478-83.
61. Boyd AJ, Sherman IA, Saibil FG, Mamelak M. The protective effect of gamma-hydroxybutyrate in regional intestinal ischemia in the hamster. *Gastroenterology* 1990; 99(3):860-2.
62. Yoshida WB, Alasio T, Mazziotta R, Qin F, Kashani M, Lee S et al. Effect of alpha-tocopherol, taurine and selenium on the attenuation of ischemia/reperfusion injury of splanchnic organs. *Cardiovasc Surg* 1998; 6(2):178-87.
63. Öztürk C, Avlan D, Cinel İ, Cinel L, Ünlü A, Çamdeviren H et al. Selenium pretreatment prevents bacterial translocation in rat intestinal ischemia/reperfusion model. *Pharmacol Res* 2002; 46(2):171-5.
64. Schmeling DJ, Caty MG, Oldham KT, Guice KS. Cytoprotection by diclofenac sodium after intestinal ischemia/reperfusion injury. *J Pediatr Surg* 1994; 29(8):1044-8.
65. Savaş Ç, Aras T, Çakmak M, Bilgehan A, Ataoğlu O, Türközkan N et al. Pentoxifylline inhibits overflow and reduces intestinal reperfusion injury. *J Pediatr Surg* 1997; 32(6):905-10.
66. Hammerman C, Goldschmidt D, Caplan MS, Kaplan M, Schimmel MS, Eidelman AI et al. Amelioration of ischemia-reperfusion injury in rat intestine by pentoxifylline-mediated inhibition of xanthine oxidase. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1991; 29(1):69-74.
67. Şener G, Akgün U, Şatiroğlu H, Topaloğlu U, Keyer-Uysal M. The effect of pentoxifylline on intestinal ischemia/reperfusion injury. *Fundam Clin Pharmacol* 2001; 15(1):19-22.

68. Koltuksuz U, Özen S, Uz E, Aydınç M, Karaman A, Gültek A et al. Caffeic acid phenethyl ester prevents intestinal reperfusion injury in rats. *J Pediatr Surg* 1999; 34(10):1458-62.
69. Ciz M, Cizova H, Lojek A, Kubala L, Papezikova I. Ischemia/reperfusion injury of rat small intestine: the effect of allopurinol dosage. *Transplant Proc* 2001; 33(5):2871-3.
70. Tetik C, Özden A, Çalli N, Bilgihan A, Bostanci B, Yis Ö et al. Cytoprotective effect of trimetazidine on 60 minutes of intestinal ischemia-reperfusion injury in rats. *Transpl Int* 1999; 12(2):108-12.
71. Portella AO, Montero EF, Poli de Figueiredo LF, Bueno AS, Thurow AA, Rodrigues FG. Effects of N-acetylcysteine in hepatic ischemia-reperfusion injury during hemorrhagic shock. *Transplant Proc* 2004; 36(4):846-8.
72. Sekhon B, Sekhon C, Khan M, Patel SJ, Singh I, Singh AK. N-Acetyl cysteine protects against injury in a rat model of focal cerebral ischemia. *Brain Res* 2003; 971(1):1-8.
73. Çakır O, Oruç A, Kaya S, Eren N, Yıldız F, Erdiñç L. N-acetylcysteine reduces lung reperfusion injury after deep hypothermia and total circulatory arrest. *J Card Surg* 2004; 19(3):221-5.
74. Köksal C, Bozkurt AK, Cangel U, Üstundağ N, Konukoğlu D, Müsellim B et al. Attenuation of ischemia/reperfusion injury by N-acetylcysteine in a rat hind limb model. *J Surg Res* 2003; 111(2):236-9.
75. Öcal K, Avlan D, Cinel İ, Ünlü A, Öztürk C, Yaylak F et al. The effect of N-acetylcysteine on oxidative stress in intestine and bacterial translocation after thermal injury. *Burns* 2004; 30(8):778-84.
76. Conesa EL, Valero F, Nadal JC, Fenoy FJ, Lopez B, Arregui B et al. N-acetyl-L-cysteine improves renal medullary hypoperfusion in acute renal failure. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2001; 281(3):R730-7.
77. Montero EF, Quireze C Jr, d'Oliveira DM. Bile duct exclusion from selective vascular inflow occlusion in rat liver: role of ischemic preconditioning and N-acetylcysteine on hepatic reperfusion injury. *Transplant Proc* 2005; 37(1):425-7.
78. Erbaş H, Aydoğdu N, Kaymak K. Effects of N-acetylcysteine on arginase, ornithine and nitric oxide in renal ischemia-reperfusion injury. *Pharmacol Res* 2004; 50(5):523-7.

EKLER





T.C
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ETİK KURUL KARARLARI

Oturum Sayısı : 08

Karar Tarihi : 14.06.2002

- 4- Fakültemiz Çocuk Cerrahisi Anabilim Dalınca yapılacak olan ve Prof.Dr.Mehmet PUL'un yürütücüsü olduğu "N-asetil Sisteinin İntestinal İskemi-Reperfüzyon Hasarına-Etkisi" adlı Araştırma Görevlisi Dr.Süleyman AYVAZ'ın tez çalışması incelendi.Çalışmanın amaç, yaklaşım, gereç ve yöntemler açısından, etik kurallara uygun olarak hazırlandığına ve yapılabileceğine mevcudun oybirliği ile karar verildi.

Başkan
Prof.Dr.Tuncay ÇAĞLAR
Dekan Vekili

Prof.Dr.Şendoğan GÜLEN
Üye

Prof.Dr.Gültaç ÖZBAY
İzinli

Prof.Dr.Aydın ALTAN
Üye