

OVEREKTOMİLİ SIÇANLARDA İSKEMİ REPERFÜZYON SONRASI OLUŞAN UZAK DOKU HASARININ GÖSTERGESİ OLARAK KARACİĞER MALONDİALDEHİD DÜZEYİ

Hülya AYBEK,¹ Süleyman DEMİR,¹ Selahattin SERT,¹ Erkan ALATAŞ²

Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi, ¹Biyokimya Anabilim Dalı, ²Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı

İskemi reperfüzyon modellerinde yalnızca iskemi gelişen dokunun değil, uzak dokuların da hasar gördüğü bildirilmiştir. Bu çalışmada overektomili siçanlarda doku malondialdehid (MDA) düzeylerine bakılarak, serebral iskemi reperfüzyonun karaciğer dokusunda uzak doku hasarı oluşturma durumu araştırıldı. Wistar albino cinsi siçanlar rasgele gruplara bölündü. Grup 1: Overektomize ve iskemi reperfüzyon yapılan grup (n=9). Grup 2: Sadece overektomize olan grup (n=5). Grup 3: Overektomi ve iskemi reperfüzyon yapılmayan grup (n=5). Grup 1 ve 2'deki siçanlara overektomi yapıldıktan iki hafta sonra grup 1'deki siçanların karotis arterlerine Pulsinelli ve ark.nın geliştirdiği ve yeniledikleri dört damar oklüzyon modeli ile serebral iskemi modeli oluşturuldu. Yirmi dört saatlik reperfüzyonu takiben alınan karaciğer dokusunda MDA düzeyi çalışıldı. Karaciğer dokusunda MDA düzeyleri grup 1'de 99.2±40.2 nmol/mg doku, grup 2'de 31.5±5.5 nmol/mg doku, grup 3'de 35.8±6.6 nmol/mg doku olarak bulundu. Grup 1'deki MDA düzeyi grup 2 (p=0.006) ve grup 3'e (p=0.009) göre istatistiksel olarak anlamlı artış gösterdi. Bu sonuçlar overektomili siçanlarda beyin iskemi reperfüzyonun karaciğer dokusunda uzak doku hasarı yaparak MDA düzeylerini artırdığını göstermektedir.

Anahtar Sözcükler: Beyin iskemisi/komplikasyonlar; karaciğer/metabolizma; malondialdehid; overektomi; siçan, Wistar cinsi; reperfüzyon hasarı/kan/metabolizma.

HEPATIC MALONDIALDEHYDE LEVELS AS DISTANT TISSUE INJURY MARKER ARISED AFTER ISCHEMIA REPERFUSION IN OVARIECTOMIZED RATS

In ischemia reperfusion models, it is notified that not only the ischemic tissue but also distant tissues were injured. The purpose of this study was to investigate even if cerebral ischemia reperfusion causes distant tissue damage in hepatic tissue in ovariectomized rats, by evaluating tissue MDA levels. Wistar albino type rats were randomly divided into groups. Group 1: ovariectomized and subjected to ischemia and reperfusion (n=9), Group 2: ovariectomized only (n=5), Group 3: neither ovariectomized nor subjected to ischemia and reperfusion (n=5). Following two weeks the rats in group 1 and 2 have been ovariectomized, rats in group 1 were subjected to cerebral ischemia through their carotid arteries with four vessel occlusion model modified by Pussinelli et al. After 24 hour of reperfusion, MDA levels were studied on the hepatic tissue samples. Hepatic tissue MDA levels were as following: Group 1: 99.2±40.2 nmol/mg tissue, Group 2: 31.5±5.5 nmol/mg tissue, Group 3: 35.8±6.6 nmol/mg tissue. MDA levels of group 1 were statistically higher than group 2 (p=0.006) and group 3 (p=0.009). These results reveal that brain ischemia reperfusion increases MDA levels in ovariectomized rats by generating distant tissue damage at hepatic tissue.

Key Words: Brain ischemial/complications; liver/metabolism; malondialdehyde; ovariectomy; rats, Wistar; reperfusion injury/ blood/metabolism.

İskemik hasarın olduğu doku ve organlarda reperfüzyon zedelenmesi yanında doğrudan iskemik harabiyete uğramayan organlarda hasar, doku reperfüzyonu sonucu gelişmektedir. Karaciğer, bağırsak

hastalığı ve yanık durumlarında uzak organ hasarına bağlı ölümler bildirilmiştir.^[1] İskemi reperfüzyon hasarında serbest radikallerin önemli rol oynadığı bilinmektedir. İskemi takiben oluşan reperfüzyonda

Başvuru tarihi: 27.1.2005 Kabul tarihi: 1.9.2005

İletişim: Dr. Hülya Aybek, Erenler Mah., 211. Sok., Platin konutları, C Blok, Kat: 3, No: 6, 20200 Servergazi, Denizli.

Tel: +90 - 258 - 373 73 88 e-posta: haybek@pamukkale.edu.tr

gözlenen oksijen patlaması reaktif oksijen türlerinin artışına yol açacaktır. Reaktif oksijen türlerinin artışı hücresel makromoleküller yanında membran lipitlerinde lipit peroksidasyonu denilen zincirleme reaksiyona neden olur. Serbest radikallerin oluşumunun artışının önemli bir göstergesi, hücre membranında oluşturduğu lipit peroksidasyonunun son ürünlerinden biri olan malondialdehid (MDA) ölçümüdür. MDA lipit peroksidasyon ürünüdür ve nükleik asitler gibi önemli biyomoleküller ile reaksiyona girerek hücre hasarına yol açtığı bilinmektedir.

Menopozda azalan östrojen düzeyinin radikal hasar etkisi üzerine farklı sonuçlar bulunmaktadır.^[2,3] İskemi reperfüzyon sonrası uzak organlarda radikal hasar olduğu ise gösterilmiştir. Literatürde beyin iskemisini takiben gözlenen reperfüzyonun karaciğer dokusunda serbest radikal hasarını artırdığını gösteren çalışmalar bulunmaktadır.^[4] Beyin iskemisi reperfüzyonuna bağlı karaciğer hasarı menopozda incelenmemiştir.

Bu nedenle çalışmamızda overektomi ile yapay olarak menapozda sokulan sıçanlarda beyin iskemisi reperfüzyonunun karaciğer dokusunda serbest radikal hasarını artırıp artırmadığının belirlenmesini amaçladık.

GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmamız Etik Kurulu onayı alınarak, Pamukkale Üniversitesi Deneysel ve Cerrahi Hayvanları Araştırma Laboratuvarında Şubat-Mart 2004 tarihinde gerçekleştirildi.

Wistar albino cinsi sıçanlar rastgele üç gruba bölündü. Deney grupları aşağıda belirtildiği şekilde oluşturuldu. Deney sonunda karaciğer dokusunda MDA düzeyi ölçüldü.

Grup 1 (n=9): Her iki over ve overe ait yağ dokusu ayrılarak arteriya ve vena ovarica'lar bağlandıktan sonra overler çıkarıldı. On dört gün sonunda beyin iskemisi modeli (Pulsinelli ve ark.nın geliştirdiği ve yeniledikleri dört damar oklüzyon modeli) uygulandı.^[5] On beş dakikalık iskemisi sonrası klempler açıldı. Yirmi dört saatlik reperfüzyondan sonra hayvanlara tekrar anestezi uygulandı. Karaciğer dokusu alınarak denekler sakrifiye edildi.

Grup 2 (n=5): Her iki over ve overe ait yağ dokusu ayrılarak arteriya ve vena ovarica'lar bağlandı ve overler çıkarıldı. On dört günlük overektomi süresi sonunda iskemisi reperfüzyon modeli uygulanmadan

karaciğer doku örneği alınarak denekler sakrifiye edildi.

Grup 3 (n=5): Overektomi ve iskemisi reperfüzyon yapılmadı. Batın açılıp overler çıkarılmadan kapatılarak ameliyat stresinin etkisi ekarte edildi. On dört gün sonra karaciğer dokusu alınarak denekler sakrifiye edildi.

Malondialdehid düzeyi ölçümü

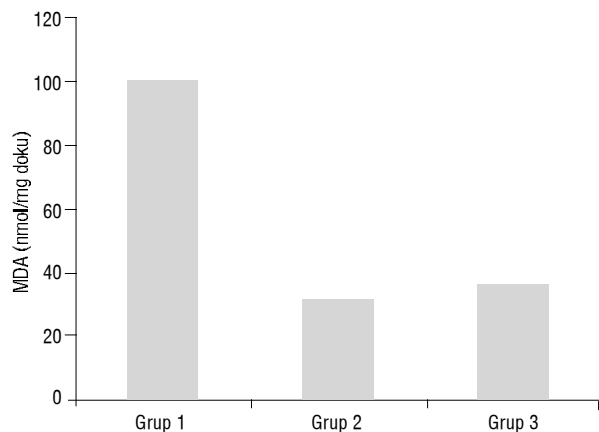
Malondialdehidin asidik ortamda tiobarbitürik asitle oluşturduğu rengin 532 nm'de absorbansının ölçülmesi prensibine dayanan Ohkawa ve ark.nın^[6] yöntemi uygulanarak ölçüldü.

Kısaca, 0.5 ml doku homojenatı üzerine %8.1 sodyum dodesil sülfat 0.2 ml, pH'sı 3.5 olan %20 asetik asit 1.5 ml ve %0.8 tiobarbitürik asit solüsyonu 1.5 ml eklenerek 95°C'de 60 dakika ısıtıldı. Soğutulduktan sonra 4000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Üst tabakanın absorbansı 532 nm'de ölçüldü. Standard olarak 1,1,3,3-tetraetoksipropan kullanılarak çizilen kalibrasyon grafiğinden numunedeki MDA miktarı hesaplandı ve nmol/mg doku olarak ifade edildi.

İstatistiksel Analiz: Sonuçlar 'SPSS 11.0 for Windows' istatistik programında, Kruskal Wallis ve Mann-Whitney U-testi kullanılarak değerlendirildi. p<0.05 olan veriler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

BULGULAR

Karaciğer dokusunda MDA düzeyleri grup 1'de 99.2±40.2 nmol/mg doku, grup 2'de 31.5±5.5 nmol/mg doku, grup 3'de 35.8±6.6 nmol/mg doku olarak bulundu (Şekil I).



Şekil I. Karaciğer dokusunda malondialdehid düzeyleri.

Overektomi ve iskemi reperfüzyon yapılan gruptaki MDA düzeyi overektomi yapılan ($p=0.006$) ve yapılmayan gruba ($p=0.009$) göre istatistiksel olarak anlamlı artış gösterdi.

TARTIŞMA

İskemiye takiben reperfüzyon hasarının oluşumunda oksidan-antioksidan dengedeki değişiklikler önemli bir faktördür. İskeminin purin katabolitlerinin birikimine ve ksantin dehidrogenazın oksijen radikal oluşturan ksantin oksidaza proteaz bağımlı dönüşümüne neden olduğuna inanılmaktadır. Reperfüzyonla oksijen sağlandığından hipoksantin ve ksantin oksidaz oksijen radikalleri oluşturarak hücrel hasar oluşturmaktadır. İskemi reperfüzyona bağlı karaciğer dokusunda radikal hasarı gösteren çalışmalar bulunmaktadır.^[7-9] Bu çalışmalarda farklı antioksidanların karaciğer iskemi reperfüzyon hasarı sonrası antioksidan enzim düzeylerine etkisi tartışılmıştır. Uzak doku iskemi reperfüzyonunun karaciğer dokusu antioksidan enzim düzeyine etkisi hakkında ise az sayıda çalışma bulunmaktadır.^[10] Zhang ve ark.^[11] ile Yang ve ark.^[12] bildirdikleri çalışmalarda intestinal iskemi reperfüzyonu sonrasında karaciğer MDA düzeyini artmış bulmuşlardır. Bu çalışmalar intestinal iskemi reperfüzyon hasarı sonrası diğer organların yanı sıra karaciğer dokusunda da artan radikal hasarın olduğunu düşündürmektedir. Yıldırım ve ark.^[13] geliştirdikleri farklı bir modelde, böbrek iskemi reperfüzyonu yapılan tavşanlarda karaciğer dokusunda MDA düzeyinin artmış olduğunu göstermişler ve dehidroepiandrostenedion tedavisi ile bu MDA düzeyinin %19 azaldığını saptamışlardır. Yapılan bu çalışmaların sonuçları bizim çalışma sonucumuzla uyumlu olarak, farklı organlarda iskemi reperfüzyon hasarı sonrası uzak doku hasarı olarak, karaciğer dokusunda MDA düzeylerinin artabileceği sonucunu göstermektedir.

Yang ve ark.^[4] çalışmalarında beyin iskemi reperfüzyonu sonrası karaciğer doku MDA düzeyini yüksek bulmuşlar ve farklı tedavi protokollerinin MDA düzeyi üzerine etkisini araştırmışlardır. Bu çalışma bizim deney grubumuzla uyumlu olarak beyin iskemi reperfüzyonu sonrası karaciğer dokusu MDA düzeylerinin arttığını gösteren tek çalışmadır ve beyin dokusuna yapılan iskemi reperfüzyon hasarının karaciğer dokusu radikal hasarını artırdığını göstermektedir.

Östrojenin antioksidan özellikte olduğu düşünülmeyen dolaylı östrojenin etkileri üzerine çeşitli araştırmalar yapılmıştır. Overektomili sıçanlarda karaciğer, beyin, akciğer ve böbrek dokusu antioksidan kapasiteleri üzerine overektominin etkileri araştırılmıştır. Overektominin dokularda serbest radikal hasarını artırdığını gösteren çalışmalar çoğunlukta-
dır.^[14] Bu çalışmaların yanı sıra overektominin karaciğer MDA ve süperoksit dismutaz (SOD) düzeylerini değiştirmediğini gösteren çalışmalar da bulunmaktadır.^[15] Bu durum overektomi sonrası karaciğer MDA düzeyinin değişebileceği yanı sıra değişmeye-
bileceği sonucunu da ortaya çıkarmaktadır. Bizim çalışmamızda beyin iskemi ve reperfüzyonu yapılan overektomize grupta karaciğer doku MDA düzeyleri yüksek bulundu.

Çalışmamızda artan karaciğer MDA düzeylerinin overektomi ile oluşturulan östrojen yokluğundan çok, uzak organ reperfüzyon hasarına bağlı olduğu sonucuna vardık.

KAYNAKLAR

1. Nielsen VG, Tan S, Baird MS, McCammon AT, Parks DA. Gastric intramucosal pH and multiple organ injury: impact of ischemia-reperfusion and xanthine oxidase. *Crit Care Med* 1996;24(8):1339-44.
2. Czlonkowska A, Ciesielska A, Joniec I. Influence of estrogens on neurodegenerative processes. *Med Sci Monit* 2003;9(10):RA247-56.
3. Mullges W. Cerebral risks in hormone replacement therapy in postmenopausal women. *WHI Study [Article in German]. Internist (Berl)* 2004;45(2):228-30. [Abstract]
4. Yang XF, He W, Lu WH, Zeng FD. Effects of scutellarin on liver function after brain ischemia/reperfusion in rats. *Acta Pharmacol Sin* 2003;24(11):1118-24.
5. Pulsinelli WA, Buchan AM. The four-vessel occlusion rat model: method for complete occlusion of vertebral arteries and control of collateral circulation. *Stroke* 1988;19(7):913-4.
6. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 1979;95(2):351-8.
7. Wang WT, Wang W, Xu ZJ, Lin LN, Li D. Role of lipid peroxidation in hepatic ischemia-reperfusion injury and effect of L-Arginine [Article in Chinese]. *Zhongguo Wei Zhong Bing Ji Jiu Yi Xue* 2003;15(2):91-3. [Abstract]
8. Zhou L, Rui JA, Zhou RL, Peng XM, Wang SB, Chen SG, et al. Liver injury after intermittent or continuous hepatic pedicle clamping and its protection by reduced glutathione. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2004;3(2):209-13.
9. Aydemir EO, Var A, Uyanik BS, Ilkgul O, Aydede H, Sakarya A. The protective mechanisms of defibrotide on liver ischaemia-reperfusion injury. *Cell Biochem Funct*

- 2003;21(4):307-10.
10. Zhou JL, Zhu XG, Ling T, Zhang JQ, Chang JY. Effect of endogenous carbon monoxide on oxidant-mediated multiple organ injury following limb ischemia-reperfusion in rats [Article in Chinese]. *Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi* 2002;16(4):273-6. [Abstract]
 11. Zhang Z, Sun M, Wang H, Le J. Protective effect of erigeron injections on hepatotoxicity induced by intestinal ischemia-reperfusion in mice [Article in Chinese]. *Wei Sheng Yan Jiu* 2001;30(2):86-8. [Abstract]
 12. Yang JC, Wang ZW, Li CL, Lin JH, Liu XG, Ji QX. Multiple organ injury at early stage of intestinal and hepatic ischemia-reperfusion in rats. *Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao* 2004;24(2):198-200, 203.
 13. Yildirim A, Gumus M, Dalga S, Sahin YN, Akcay F. Dehydroepiandrosterone improves hepatic antioxidant systems after renal ischemia-reperfusion injury in rabbits. *Ann Clin Lab Sci* 2003;33(4):459-64.
 14. Gomez-Zubeldia MA, Hernandez R, Viguera J, Arbues JJ, Aparicio A, Millan JC. Effect of bilateral ovariectomy and ovarian steroid hormones on the antioxidant systems and plasma malondialdehyde levels in Wistar rats. *Endocr Res* 2000;26(1):97-107.
 15. Ozgonul M, Oge A, Sezer ED, Bayraktar F, Sozmen EY. The effects of estrogen and raloxifene treatment on antioxidant enzymes in brain and liver of ovariectomized female rats. *Endocr Res* 2003;29(2):183-9.