

# Alfa-D tokoferol kullanımının reperfüzyon travmasındaki etkilerinin histokimyasal ve ultrastrüktürel yöntemlerle incelenmesi

(Tavşanlarda deneysel çalışma)

Hakan Gürbüz<sup>(1)</sup>, Osman Uğur Çalpur<sup>(2)</sup>, Erkan Yamak<sup>(3)</sup>, Gülara Hüseyinova<sup>(4)</sup>, Aydın Akgün<sup>(5)</sup>

Bu çalışmada, alfa-D tokoferol (E vitamini) kullanımının reperfüzyon travmasındaki etkisi ultrastrüktürel ve histokimyasal yöntemler kullanılarak araştırıldı. Deney ve kontrol grupları, beşer adet tavşandan oluşturuldu. Deney grubuna çalışma öncesi 7 gün süreyle, günde tek doz intramüsküler alfa-D tokoferol asetat 100 mg/kg/gün verildi. Kontrol grubunda ise herhangi bir ilaç kullanılmadı. Reperfüzyon travması, tavşanların alt ekstremitelerine turnike uygulanması ile oluşturuldu. Turnike uygulanmasına bağlı oluşan serbest oksijen radikallerinin, lipid peroksidasyonu sonucu oluşturduğu malondialdehid varlığı, periferik sinir dokusunda araştırıldı. Deney grubunda malondialdehidin istatistik açıdan anlamlı bir şekilde düşük olduğu görüldü ( $p < 0.001$ ). Ultrastrüktürel incelemede ise, periferik sinir ve kas motor üniterindeki yapısal değişiklikler araştırıldı. Deney grubundaki ultrastrüktürel incelemelerde, doku yıkımının geri dönüşümlü ve hafif olduğu görüldü. Kontrol grubunda ise, doku yıkımı oldukça ciddi ve geri dönüşümsüzdü. Bu bulgular; serbest oksijen radikali varlığının, dokuda yıkıma sebep olacağını; alfa-d tokoferol kullanımının ise, serbest oksijen radikallerinin lipid peroksidasyonunu engelleyerek, dokuların yıkımına engel olabileceğini bize gösterdi. Sonuç olarak, turnike uygulaması düşünülen olgularda, cerrahi öncesi alfa-d tokoferol kullanılmasıyla dokuların reperfüzyon travmasından korunabileceği düşünüldü.

**Anahtar kelimeler:** E vitamini (alfa-d tokoferol), reperfüzyon travması, malondialdehid, ultrastrüktürel inceleme, motor ünite, periferik sinir

## Investigation of the effects of alpha-D tocopherol use in reperfusion trauma by histochemical and ultrastructural methods (Experimental study in rabbits)

In this study, the effect of alpha-d tocopherol used in reperfusion trauma was investigated by histochemical and ultrastructural methods. The rabbits were divided into the study and the control groups each consisting of five subject. The rabbits in this study in 100 mg/kg doses once a day before the reperfusion trauma had been performed. The animals in the second group were given no medication and served as control. Reperfusion trauma was performed by tourniquet application to the lower extremities of the animals. After the constitution of the reperfusion trauma, the existence of malondialdehid was examined in nerve tissue which is formed by the lipid peroxidation of the free oxygen radicals. The malondialdehid levels were found to be significantly low in the study group ( $p < 0.001$ ). Ultrastructural examination also showed that the tissue destruction in nerve tissue and motor unit was slight and reversible in this group. On the other hand, in the animals constituting the control group, this destruction was rather severe and irreversible. These results were interpreted as; the presence of free oxygen radicals gives rise to destruction in the tissues and this effect may well be prevented by using alpha-d tocopherol which inhibits lipid peroxidation of free oxygen radicals.

**Keywords:** Vitamin E (Alpha d tocopherol), reperfusion trauma, malondialdehid, ultrastructural methods, motor unit, periferic nerve

Turnike uygulamaları ortopedik cerrahi girişimlerde sıklıkla kullanılır. Bu uygulamalarda, doku belli bir süre kansız bırakılarak hem cerraha rahat bir çalışma ortamı sağlanır, hem de olası kan kayıpları önlenir. Ancak, bu uygulama aynı anda serbest oksijen radikali oluşumuna neden olarak reperfüzyon travmasına yol açar. Serbest oksijen radikalleri, özellikle lipid peroksidasyon ile oluşan doku hasarındaki en temel etkenlerdir (8, 9). Bu nedenle biz de, bu deneysel çalışmada, alfa D tokoferolün, turnike uygulamasına bağlı oluşan serbest oksijen radikallerinin kas ve motor ünite üzerindeki yıkıcı etkilerini, ne ölçüde değiştirdiğini araştırdık.

## Materyal metod

Çalışmada ortalama ağırlığı 1.7 kg olan on adet tavşanı kullanıldı. Deney ve kontrol grupları beşer adet tavşandan oluşturuldu. Kontrol grubundaki deneklere herhangi bir tedavi uygulanmazken, deney grubundakilere turnike uygulaması öncesi 7 gün süreyle, her gün tek doz intramüsküler 100mg/kg alfa D tokoferol asetat verildi. Her iki grup tavşanların alt ekstremitelerine ikişer saat süreyle turnike uygulandı. Bu işlem ketamin ve rompun anestezisi altında gerçekleştirildi. Turnike uygulamasının sonlandırılmasını takiben 60. dakikada hem malondialdehid ölçümü, hem de ultrastrüktürel inceleme için periferik sinir do-

(1) Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Ortopedi ve Travmatoloji Anabilim Dalı, Uzman Dr.

(2) Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Ortopedi ve Travmatoloji Anabilim Dalı, Doç. Dr.

(3) Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Ortopedi ve Travmatoloji Anabilim Dalı, Araştırma Görevlisi

(4) Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı, Uzman Dr.

(5) Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Biokimya Anabilim Dalı, Araştırma Görevlisi



ku örneği alındı. Serbest oksijen radikallerinin lipid peroksidasyonu sonucu oluşturduğu malondialdehid tiyobarbitirik asit yöntemiyle araştırıldı (3). Ultrastrüktürel incelemede ise, hücrelerdeki hasarın derinliği ve geri dönüşümlülüğü her iki grup arasında kıyaslama yapılırken incelendi.

## Bulgular

Tiyobarbitirik asit yöntemiyle araştırılan malondialdehid miktarları n.mol/gr cinsinden Tablo 1'de verilmiştir. Sonuçlar "Student'in t testi" ile kıyaslandığında, kontrol grubunda malondialdehid miktarının anlamlı bir şekilde yüksek olduğu tespit edilmiştir ( $p < 0.001$ ).

	Deney grubu*		Kontrol grubu*	
	Sağ	Sol	Sağ	Sol
1. Tavşan	9984	10140	16224	15912
2. Tavşan	7800	7956	16692	24024
3. Tavşan	11700	10296	24648	19188
4. Tavşan	8736	9360	15736	17784
5. Tavşan	9672	8424	20436	14040

Tablo 1: Deney ve kontrol gruplarının malondialdehid miktarları (\*) n. mol/gr cinsinden

Kontrol grubunda, sinir liflerinde ve kas motor ünitelerde ciddi destrüktif ve dejeneratif değişiklikler tespit edildi. aksonlarda ödem, nörofibril ve mitokondrilerin sayısında bazen yok olmaya kadar giden azalma dikkati çekmekteydi. Myelin kılıflarında disosiyasyon, fragmentasyon, paralellığın kaybı ve membranların arasında genişleme dikkati çekmekteydi (Resim 1). Myosit hücre boşluklarında ödem ve dejenere olmuş motor ünite tespit ediliyordu. Sarkolem (postsinaptik boşluk) ve aksolem (presinaptik boşluk) arasında primer sinaptik boşluk kaybolmuştu. Aksolem ve sarkolem membran gibi izlenmekteydi (Resim 2). Myelin liflerinin etrafındaki Schwann hücrelerinde hafif aktifleşme tespit edildi. Sitoplazmalarında; endoplazmik retinakulumun, ribozomların, serbest polizomların ve mitokondrilerin sayısı artmıştı. Bazı Schwann hücrelerinin sitoplazmalarında, rezorbsiyona uğramış dejenere myelin membranlar ve parçalanmış sinir lifleri tespit edildi. Birkaç yerde sinir liflerinin hafif hi-



Resim 1: Aksonlarda ödem, nörofibril ve mitokondrilerin sayısında azalma izlenmekte. Myelin kılıflarında ise disosiyasyon, fragmentasyon, paralellığın kaybı ve membranların arasında genişleme görülmekte (X10000)

perplazisi görüldü. Buna karşın, deney grubundaki hayvanların ultrastrüktürel incelemelerinde; myositlerde yoğun ödem, sitoplazmada myoflamentlerin disorganizasyonu, mitokondrilerin homojenizasyonu tespit edildi (Resim 3). Myosit boşluklarında, kollajen lifleri arasında bulunan kas motor ünitesinin sinaptik membranındaki, mikrovezikül ve mitokondrilerde yapısal değişiklikler görülmedi (Resim 4). Myelinli sinir liflerinde, Schwann hücrelerinde, sinir lifleri arasında ödem ve myelin dissosiasyonu izlendi. Ancak değişiklikler destrüktif ve dejeneratif karakterde değildi



Resim 2: Myosit hücre boşluklarında ödem ve dejenere olmuş motor ünite izlenmekte. Aksolem ve sarkolem arasında primer sinaptik boşluğun kaybolduğu, aksolemin sarkolem gibi izlendiği görülmekte (X10000)

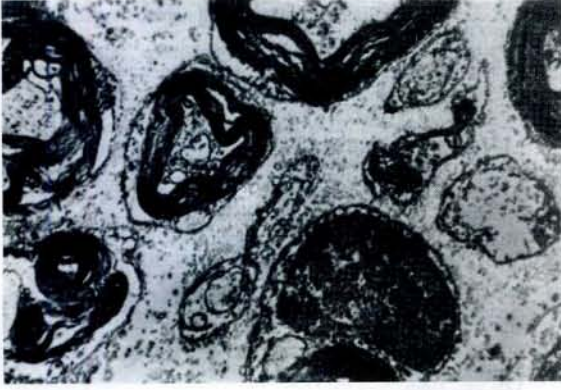


Resim 3: Myositlerde yoğun ödem, sitoplazmada myoflamentlerin disorganizasyonu, mitokondrilerin homojenizasyonu görülmekte (X10000)



Resim 4: Sinaptik membranda, mikroveziküller ve mitokondrilerde yapısal değişiklik yok (X15000)





Resim 5: Myelinli sinir liflerinde, Schwann hücrelerinde ve sinir lifleri arasında ödem, ayrıca myelin dissosiyasyonu görülmekte (X 1000)

(Resim 5). Myelinli ve myelinsiz sinir liflerinin proliferasyonu gözlemlendi. Tüm bu bulgular, kompensatuar değişiklikler olarak yorumlandı.

## Tartışma

Son yörüngesinde eşleşmemiş elektron içeren atom, ya da atom gruplarına serbest radikaller denir (15). Serbest radikaller çok geniş bir ailedir. Özellikle aerob organizmalarda serbest oksijen radikalleri çok önemlidir (2). Serbest oksijen radikalleri, normal hücre metabolizmalarında oluşursa da, defansif mekanizmalarla hücreye zarar vermeden anında yok edilebilir (10).

Serbest oksijen radikalleri çeşitli yollarla oluşurlar. Bunlar arasında en önemlisi, iskemik dokuların reperfüzyonudur (8, 9, 10, 20). İskemi süresince dokunun ATP stoğu hipoksantine dönüşür. Dokuda oluşmuş proteazlar yardımıyla, reperfüzyonla dokuya gelen oksijen, serbest oksijen radikalleri oluşumuna yol açar (5). Replantasyon sonrası görülen "Reflow fenomen", reperfüzyon travmasının hem kliniği, hem de patogenezi açısından tipik örneğini teşkil eder (21).

Serbest oksijen radikalleri: fosfolipidlerden arazi-donik asit açığa çıkararak, hücreye zarar verecek HETE ve prostaglandinleri oluştururlar (1). Ayrıca makrofajları ortama çekip, hücre yıkımını artırırlar (17) ve Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> ATP enzimini inhibe edip, hücre membranının bütünlüğünü bozarlar (11). Özellikle de lipid peroksidasyonu ile dokuya zarar verirler (10, 13).

Serbest oksijen radikallerinin direkt hücre içi tespiti zor ve pahalıdır (12). Bu nedenle serbest oksijen radikali tespitinde indirekt yöntemler kullanılır. Serbest oksijen radikallerinin, lipid peroksidasyonu sonucu oluşturduğu malondialdehid tiyobarbitirik bir yöntemdir (3). Biz de, çalışmamızda incelediğimiz periferik sinirlerde, tiyobarbitirik asit yöntemi ile, serbest oksijen radikali varlığını araştırdık.

Yapılan çalışmalarda, turnike sonrası çeşitli zaman dilimlerinde alınan doku parçalarındaki malondialdehid miktarlarının en yüksek seviyeye 60. dakikada çıktığı gözlemlenmiştir (14). Çalışmamızda, malondi-

aldehid miktarını en yüksek seviyeye ulaştığı gösterilen 60. dakikada ölçtük. Ayrıca, aynı zaman dilimlerindeki serbest oksijen radikali aktivitesine bağlı doku hasarını da araştırdık. Çünkü serbest oksijen radikali-ne bağlı doku hasarı en çok bu ana kadar oluşacak ve sonrasında devreye giren oksido-redüksiyon ve enzimatik reaksiyonlar radikali aktivitesini ortadan kaldıracaktır (1, 3, 10). Ancak, doku hasarı da o ana kadar oluşmuş olacaktır.

Alfa D tokoferol (E vitamini) membran stabilizasyonunu koruyucu ve lipid peroksidasyonu engelleyici etkiye sahiptir (16, 18). Anti oksidan olarak da bilinir (2). Yüksek lipid çözünürlüğü nedeniyle kolayca membran fosfolipidleri arasına girmekte ve 20 karbonlu doymamış yağ asitlerini redükte ederek serbest oksijen radikallerinin biomembranlarda geliştireceği lipid peroksidasyonunu önlemektedir. Ancak bu etkileri belli bir süre kullanımı sonucu oluşur (19). Biz de bu etkileri sağlamak için tavşanlara turnike uygulanmasından 7 gün önce alfa d tokoferol asetat verdik.

Ayrıca alfa d tokoferol serbest radikallerle birleşerek "tokoferol kuinon"a dönüşmekte ve bu şekilde serbest radikal temizleyici işlemini de gerçekleştirilmektedir. Yine tokoferol kuinon bileşiği de, lipid peroksidasyonu ve trombosit agregasyonunu inhibe etmektedir. Bu etkilerin dışında alfa d tokoferolün fosfolipaz A2, C ve D'nin biomembranlardaki zararlı etkilerini önlediği de gösterilmiştir (2, 4, 6, 7).

Kontrol grubuna oranla daha ciddi destrüksiyon ve dejenerasyonun yanı sıra, deney grubuna göre çok daha hafif kompensatuar bulguların mevcut olması, deney grubunda ise doku hasarının hafif ve geridönüşümlü olması, ayrıca deney grubundaki malondialdehid miktarının istatistikî açıdan anlamlı bir şekilde düşük bulunması, bize serbest oksijen radikali aktivitesi ile doku hasarı arasında doğru orantının varlığını düşündürdü. Serbest oksijen radikali aktivitesindeki bu düşüş ise, deney grubunda alfa d tokoferol kullanımına bağlandı.

Bu nedenle, turnike kullanılması önceden planlanmamış ameliyatlarda, alfa D tokoferolün cerrahi öncesi kullanılmasının yararlı olacağı kanısındayız. Bu şekilde turnike uygulanmasının ortaya çıkaracağı serbest oksijen radikallerinin ve bunlara bağlı doku hasarlarının azaltılabileceğini düşünmekteyiz.

## Kaynaklar

1. Braugler, J.M., Hall, E.D.: Central nervous system. Trauma and Stroke. 1. Biomechanical consideration for oxygen radical formation and lipid peroxidation. J. Free Radic. Biol. Med. 6:289-301, 1989.
2. Butterick, C., Beahner, R., Bozer, L.: Vitamin E selective inhibitor of the NADPH oxidoreductase enzyme system in human granulocytes. Am. J. Path. 112:287-293, 1983.
3. Casini, A.F., Ferrari, M., Pompella, A., Maellono, E., Compantti, L.X Lipid peroxidation and cellular damage in extrahepatic tissues of bromobenzene intoxicated mice. Am. J. Path 123:520-530, 1986
4. Chen, L.H., Boissonneault, G.A., Glauert, H.B.: Vitamin C, vitamin E and cancer (Review). Anticancer Res. 8:739-748, 1988.
5. Cord, J.M.: Oxygen derived free radicals in post ischemic tissue injury. Eng. Med. 312:159-163, 1985.
6. Douglas, C.E., Chan, A.C., Choy, P.C.: Vitamin E inhibits platelet phospholipase A2. Biochim Biophys Acta. 876:639-645, 1986.

7. Erin, A.N., Spirin, M.M., Tabidze, L.V.: Formation of alfa tocopherol complexes with fatty acids: A hypothetical mechanism of stabilization of biomembranes by vitamin E. *Biochim Biophys Acta*. 774:96-102, 1984.
8. Farid Gharagozloo, Francisco, J., Melendez, Robert, A. Hein., Richard, E. Austin. Richard Shemin.: The effect of oxygen free radicals scavengers on the recovery of regional myocardial function after coronary occlusion and surgical reperfusion. *J. Thorac Cardiovasc Surg* 95: 631-636, 1988.
9. Guarnieri, C., Flamigni, F., Corderado, c.M.: Role of oxygen in the cellular damage induced by Re-oxygenation of hypoxic heart. *J. Mol. Cell. Cadiol.* 12:797-808, 1980.
10. Irwin Fridovic.: The biology of oxygen radicals. *Science*. 201: 875-880, 1990.
11. Myung Suk Kim., Tai Akera.: O2 free radicals; Cause of ischemia-reperfusion injury to cardiac Na+K+ ATP ase. *Am. J. Physiol.* 252 (Heart Circ. Physiol. 21) H252-H257, 1987.
12. Pryor, W.A., Prier, D.G., Churc, D.F.: Electron spin resonance study of main stream and sidestream cigarette smoke. Nature of the free radicals in gase smoke and in cigarette tor. *Environ Health Perspect* 47: 345-355, 1983.
13. Donald, J. Korthis. Neil Granger., Many, I. Townsley. Aubrey, E. Taylor.: The role of oxygen derived free radicals in ischemia induced increases in canine skeletal muscle vascular permeability. *Clin. Res.* 57: 599-609, 1985.
14. Saunders, R.D., Dugan, L.L., Demediuk, P.: Effects of methyl prednisolone and combination of alfa tocopherol and selenium on arachidonic acid metabolism and lipid peroxidation inn traumatized spinal cord tissue. *J. Neurochem.* 49:24-31, 1987.
15. J.W. Schmidley.: Free radical in central nervous system ischemia. *Stroke*. 21 (7): 1086-1090, 1990.
16. Skharmano, A.T., Aidakhanov., Kurmangaliyov, S.M.: Effect of vitamin E deficiency on oxidative. Metabolism and antioxidant. Enyzem activity of macrophages. *Ann. Nutr. Metab.* 34:143-146, 1990.
17. Stewen, W., Werns., Benedict, R., Lucchesi.: Leucocytes, oxygen radicals, and myocardial injury due to ischemia and reperfusion. *Radical Biology&Medicine.* 4:31-37, 1988.
18. Tappel, A.L.: Vitamin E as biological lipid antioxidant vitamin. *Hormones.* 20: 493-510, 1962.
19. Yamato, M., Shima, T., Vazumi, T.: A possible role of lipid peroxidation in cellular damages caused by cerebral ischemia and the protective effect of alfa tocopherol administration. *Stroke.* 14:977-982, 1983.
20. William, A.: Pryor. Oxy-radicals and related species. Their formation, lifetimes and reactions. *Ann. Rev. Physiol.* 48:657-667, 1986.
21. Sdeblic, T.A., Shafter, J.W.: An ischemia induced model of revascularization failure of replanted limbs. *J. Hand. Surg.* 10A: 125-131, 1985.

**Yazışma adresi:**

**Uzman Dr. Hakan Gürbüz**

**Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi**

**Ortopedi ve Travmatoloji Anabilim Dalı**

**22030 Edirne, Türkiye**