

İntestinal iskemi-reperfüzyon modelinde plazma homosistein, vitamin B₆, B₁₂ ve folik asit düzeyleri*

M. Ergun PARMAKSIZ, Ahmet KAZEZ, M. Ferit GÜRSU, Funda GÜLCÜ, Ş. Kerem ÖZEL, A. Aysel KÖSEOĞULLARI

Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Cerrahisi ve Biyokimya Anabilim Dalları, Elazığ

Özet

Amaç: İskemi/reperfüzyon (İ/R) sürecinde glutatyon miktarı artar ve birçok etki gösterir. Bu etkilerden birini de hücrelerde homosistein oluşumunda yer alan sisteini etkileyerek gösterir. Bu deneysel çalışmada intestinal İ/R sırasında, homosistein düzeyleri ve metabolize edilmesinde rol oynayan vitaminlerin durumu araştırıldı.

Gereç ve Yöntem: Ağırlıkları 90-120 gr. arasında değişen, toplam 40 erkek Wistar-albino cinsi prepubertal rat 4 gruba ayrıldı. Grup 1 (kontrol, n=10) kontrol olarak alındı. Bunlara herhangi bir işlem uygulanmadan kan örnekleri alındı. Grup 2 (sham, n=10)'de karın açıldı, superior mezenterik arter (SMA) disseke edilip karın kapatıldı. Grup 3 (iskemi, n=10) SMA kan akımı üç saat süre ile durduruldu. Grup 4 (İ/R, n=10) üç saat durdurulan SMA kan akımı tekrar başlatıldı ve 3 saatlik reperfüzyonun ardından kan örnekleri alındı. Tüm örneklerde plazma homosistein, vitamin B₆ ve B₁₂, folik asit düzeylerine bakıldı. Sonuçlar tek yönlü ANOVA, Scheffe ve Tukey HSD testleriyle değerlendirildi.

Bulgular: İskemi ve İ/R gruplarında homosistein düzeyleri kontrol ve sham gruplarından anlamlı oranda yüksek bulundu ($p<0.05$). Ancak, iskemi ve İ/R gruplarının sonuçları arasında istatistiksel anlamlı bir fark bulunmadı ($p>0.05$). Vitamin düzeyleri arasındaki farklılık da istatistiksel olarak anlamsız bulundu ($p>0.05$).

Sonuç: Homosistein düzeyi iskemi periyodunda artmaktadır. Homosisteinin metabolizmasında rol oynayan vitaminlerin düzeyleri erken dönemde değişmemektedir. İntestinal iskemik süreçlerde elde edilecek eşik değerler ile klinikte iskeminin derinliğinin belirlenmesi mümkün olabilir.

Anahtar kelimeler: Homosistein, intestinal iskemi/reperfüzyon, Vitamin B₆, Vitamin B₁₂, folik asit

Summary

Serum homocysteine, vitamin B₆, B₁₂ and folic acid levels in a rat model of intestinal ischemia-reperfusion

Aim: Glutathione increases during ischemia-reperfusion (I/R) and shows many effects in the pathogenesis of this process. One of its effects is to modulate cysteine, which has an important role in the production of homocysteine in the cells. In this experimental study, the levels of homocysteine during intestinal I/R and the vitamins that play a role in its metabolism were investigated.

Material and Method: Forty male Wistar-albino prepubertal rats weighing between 90 and 120 gr. were divided into 4 groups. Group 1 (control, n=10) was taken as control. Blood samples were taken without any applied procedure. In group 2 (sham, n=10) abdomen was opened, superior mesenteric artery (SMA) was dissected and then closed. In Group 3 (ischemia, n=10) SMA blood flow was stopped for three hours. In Group 4 (I/R, n=10) the blood flow was maintained again after cessation for 3 hours and blood samples were taken after 3 hours of reperfusion. In all samples, plasma homocysteine, vitamin B₆, B₁₂ and folic acid levels were determined. The results were assessed with One-way ANOVA, Scheffe and Tukey HSD tests.

Results: The increase of homocysteine levels was significant in ischemia and I/R groups when compared to control and sham groups ($p<0.05$). However the comparison of results between the ischemia and I/R groups was not significant ($p>0.05$). The difference of the vitamin levels was not significant between the groups, either ($p>0.05$).

Conclusion: Homocysteine levels increase during ischemia. The levels of vitamins which take part in homocysteine metabolism do not change in the early period. The cut-off levels obtained during intestinal ischemic events can be used to determine the depth of ischemia in clinical practice.

Key words: Homocysteine, intestinal ischemia/reperfusion, Vitamin B₆, Vitamin B₁₂, folic acid

*XXII. Ulusal Çocuk Cerrahisi Kongresi'nde sunulmuştur, 8-11 Eylül 2004, Bursa

Adres: Dr. Ahmet Kazez, Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi, Çocuk Cerrahisi Anabilim Dalı, 23119, Elazığ

Yayına kabul tarihi: 15.9.2005

Giriş

Homosistein, ilk kez 1932 yılında DeVigneaud tarafından tanımlanmış, kükürt içeren ve proteinlerin ya-

pisına katılmayan bir amino asittir (7). Normal olarak beslenme ile alınmayıp, metiyonin metabolizması sırasında bir ara ürün olarak oluşur. Plazmada % 70-80'i albümine bağlı, diğer kısmı ise serbest halde bulunur. Homosistein düzeyleri total plazma homosisteini ya da total serum homosisteini olarak ölçülmektedir. Normal total plazma homosistein düzeyi 5-15 µmol/L arasındadır (6,15,20). Homosisteinin çeşitli çalışmalarda vasküler ve iskemik patolojiler ile ilişkisi gösterilmiştir. Bu çalışmaların bir kısmında inflammatuar markerler arasında değerlendirilirken (14), bazılarında ise inflammatuar mediatör fırtınasının oluşumunda rol oynadığı bildirilmiştir (7,8,13,16).

Hiperhomosisteinemi, damar endotelindeki işlevsel bozukluklar ve zedelenmeyle başlayıp bunu takip eden trombosit aktivasyonu, pıhtılaşma faktörlerinin modifikasyonu ve trombüs oluşumu sonucu endotel üzerine daha toksik etkiler göstermektedir. Homosistein düzeylerinin artmasının bir sonucu da endotelde bulunan ve lipit peroksidasyonunu engelleyen glutatyon peroksidaz aktivitesinin baskılanmasıdır (2,21).

Homosisteinin plazmada metabolize edilmesinde başlıca vitamin B₆ (Vit B₆), vitamin B₁₂ (Vit B₁₂) ve folik asit etkili olmaktadır (17,18).

İskemi/reperfüzyon (İ/R) sırasında oluşan oksidatif stres, L-sisteinin L-glutamata dönüşümünü katalizleyen γ-glutamil sistein sentaz enzimini artırır. Bu da hücrede glutatyon sentezinin artmasına yol açar. Glutatyon hücre içinde homosistein oluşumunda yer alan sisteinin en önemli etkileyicisidir (19). Bu süreçte beklenen İ/R'nin homosistein düzeylerini etkilemesidir. Literatürde ağırlıklı olarak kardiyak ve serebral kaynaklı oksidatif streste homosistein düzeyleri ile ilgili çalışmalar yer almaktadır. Bu deneysel çalışmada bağırsak kaynaklı oksidatif stres durumunda homosistein düzeyleri ile metabolize edilmesinde rol oynayan Vit B₆, Vit B₁₂ ve folik asit ilişkisinin incelenmesi amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem

Çalışma; Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu onayı alındıktan sonra, Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Araştırma Merkezi'nde (FÜTDAM) yapıldı. Ortalama ağırlıkları 110 gr. (90-120 gr.)

olan Wistar-albino cinsi, erkek prepubertal ratlar kullanıldı. Ratlar 12 saat gün ışığı alan ve havalandırması bulunan odada (22-24°C, % 70-75 nemli) standart sıçan yemi ve çeşme suyu ile beslendi. Deneyden 12 saat önce beslenmeleri durduruldu ve sadece su almalarına izin verildi.

Her birinde 10 rat olacak şekilde ayrılan 4 grup üzerinde yapılan çalışmada; Grup 1:Kontrol, Grup 2:Sham, Grup 3:İskemi, Grup 4:İskemi-reperfüzyon (İ/R) olarak belirlendi.

Deneyin yapılışı: Bütün gruplarda genel anestezi için 4 mg/kg Ketamin-HCl ve 6 mgr/kg α-Ksilazin intramüsküler (İM) verildi. Deney sırasında gereklikçe bu dozun 1/3'ü İM olarak uygulandı.

Grup 1: Kontrol (n=10) grubu ratlardan, anestezinin üçüncü saatinde, aseptik şartlarda femoral arterden kan alındı.

Grup 2: Sham (n=10) grubu ratlara aseptik şartlarda orta hat laparotomi yapılarak süperior mezenterik arter (SMA) nazik bir şekilde disseke edildikten sonra başka bir işlem yapılmadan karın kapatıldı. Üç saat sonra femoral arterden kan alındı.

Grup 3: İskemi (n=10) grubu ratlara sham grubuna uygulanan işlemlere ek olarak atravmatik mikroklipl yardımıyla SMA kan akımı durduruldu. Ardından atravmatik klip kaldırılmadan karın 3/0 ipekle kapatıldı. Üç saat sonunda femoral arterden kan alındı.

Grup 4: İskemi-reperfüzyon (n=10) grubu ratlara iskemi grubuna uygulanan işleme ek olarak karın üç saat sonra yeniden açıldı. Ardından atravmatik mikroklipl kaldırılarak SMA kan akımı yeniden sağlandı. Batın karın 3/0 ipekle kapatıldı. Reperfüzyonun 3. saatinde femoral arterden kan alındı.

Kan örnekleri hem kuru biyokimya, hem de EDTA içeren tüplere alındı. EDTA içeren tüpler yarım saat içinde 3500 rpm'de 5 dakika santrifüj edilerek serumlarına ayrıldı. Serumlar -20°C'de saklandı. Tüm örnekler toplandıktan sonra plazma homosistein düzeyleri, ELISA (enzyme linked-immunosorbent assay) yöntemiyle DIAZYME (Diazyme Lab., San Diego USA) kitleri kullanılarak ölçüldü. Ölçüm yöntemi-

nin temeli; L-homosisteinin enzimatik olarak S-adenozil-L-homosisteine dönüşümü sonucu oluşan anti-SAH antikörlerinin ölçümüne dayanmaktadır. Folik asit ve Vit B₁₂ ticari kit kullanılarak otoanalizörde, Vit B₆ ise HPLC (high performance liquid chromatography) yöntemi ile çalışıldı.

İstatistiksel analiz; SPSS 10.0 programı kullanılarak yapıldı. Grup sayısı 4, denek sayısı 10 olan bağımsız gruplarda, önce tek yönlü kolumnografi (simirnow) yapılarak gruplardaki değerlerin normal dağılıma uyduğu tespit edildi. Bunun üzerine istatistiksel değerlendirme için tek yönlü Anova, Scheffe ve Tukey HSD testleri kullanıldı. Sonuçların tümünde p<0.05 değerleri anlamlı olarak kabul edildi.

Bulgular

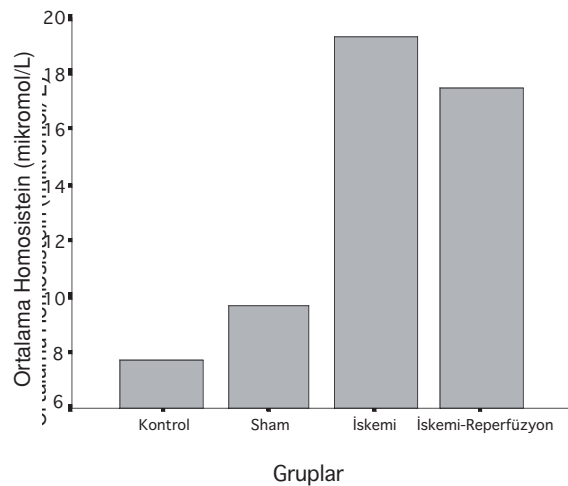
Homosistein ölçümleri iskemi grubunda en yüksek değerlerde bulundu (ortalama 19.24±7.46 µmol/L). İ/R grubunda da homosistein düzeyleri iskemi grubundaki kadar olmasa da ortalama 17.47±7.57

Tablo I. Çalışma gruplarında homosistein seviyeleri.

Grup	n	Homosistein (µmol/L)	p
Kontrol	10	7.72±1.80	
Sham	10	9.72±7.46	
İskemi	10	19.24±7.46	*
İ/R	10	17.47±7.57	†

*p<0.05: Grup 3 ile grup 1, 2

†p<0.05: Grup 4 ile grup 1, 2



Şekil 1. Homosistein değerlerinin gruplara göre dağılımı.

Tablo II. Çalışma gruplarında Vit B₆ seviyeleri.

Grup	n	Vitamin B ₆ (Ug/L)
Kontrol	10	77.40±16.66
Sham	10	70.39±22.52
İskemi	10	77.87±13.82
İ/R	10	71.67±11.58

Tablo III. Çalışma gruplarında Vit B₁₂ seviyeleri.

Grup	n	Vitamin B ₁₂ (pg/ml)
Kontrol	10	612.90±104.44
Sham	10	645.89±90.43
İskemi	10	574.34±148.82
İ/R	10	652.69±152.69

Tablo IV. Çalışma gruplarında Folik asit seviyeleri.

Grup	n	Folik asit (ng/ml)
Kontrol	10	7.01±1.26
Sham	10	7.14±0.87
İskemi	10	7.01±1.07
İ/R	10	7.07±0.63

µmol/L düzeyinde bulundu (Tablo 1). Gruplardaki homosistein düzeyleri istatistiksel olarak karşılaştırıldığında; kontrol ve sham grupları arasındaki fark anlamsızdı (p> 0.05). İskemi ile İ/R grupları arasında da istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı (p>0.05). Buna karşılık iskemi grubu ile kontrol ve sham grupları, İ/R grubu ile yine kontrol ve sham grupları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı olarak bulundu (p<0.05) (Tablo 1, Şekil 1).

Vit B₆ ve Vit B₁₂ düzeyleri arasındaki fark tüm çalışma gruplarında istatistiksel olarak anlamsız bulundu (p>0.05) (Tablo 2,3). Folik asit, iskemi grubunda en düşük ortalama değere sahip olmasına rağmen, (7.07±1.07) çalışma grupları arasındaki farklılık istatistiksel olarak bir anlamlılık taşııyordu (p>0.05) (Tablo 4).

Tartışma

Özellikle iskeminin eşlik ettiği durumlarda (miyokard patolojileri, serebral yetmezlik gibi) plazma homosistein düzeyleri yükselmektedir (5,6,9). Bunun nedeni olarak homosisteinin bir akut faz reaktanı olduğu üzerinde durulmuş ve yangısal olaylarda yüksel-

diği gösterilmiştir. Bu çalışmaların bir kısmında homosistein inflamatuvar gösterge arasında değerlendirilirken (14), bazılarında ise inflamatuvar mediyatör fırtınasının oluşumunda rol oynadığı bildirilmiştir (7,8,13,16). Ancak, homosisteinin, biyokimyasal olaylar zincirinde bir neden mi, yoksa bir sonuç mu olduğu hâlâ netlik kazanmamıştır (1,3). Yapılan çalışmada; homosistein düzeyi, diğer sistemlerdeki çalışmalarda olduğu gibi, iskemi sırasında en yüksek değere ulaşmakla beraber İ/R grubu ile de arasında anlamlı bir fark oluşmamıştır. Bu nedenle homosisteinin iskemi sırasında damarsal etkenlere yükselmiş olabileceği, reperfüzyon hasarından sorumlu tutulan serbest radikallerle ilişkisinin olmadığı varsayılabilir.

Gradman ve ark. manyetik rezonans arteriogramda, superior mezenterik arterde tıkanıklık tespit ettikleri hastada homosistein seviyesini 98,8 µmol/L (normal seviyenin 8 katı olarak) tespit etmişlerdir (5). Çelik ve arkadaşları ise, 21 ağır preeklampatik hastada plazma homosistein düzeyleri ile serebral etkilenme arasında ilişkiyi incelemiş ve beyinde ödem, iskemik odaklar ve enfarktüsün tespit edildiği grupta homosistein değerlerinin daha yüksek olduğunu bildirmişlerdir (4). Farklı iskemik patolojilerde akut iskemik dönemde homosistein seviyelerinin yüksek olduğu bildirilmesi nedeniyle, çalışmada akut iskemik model olarak SMA tıkanması ile oluşturulan intestinal iskemi modeli kullanılmıştır. SMA tıkanması bağırsak iskemisi oluşturmada en fazla kullanılan yöntemlerden biri olduğu için bu çalışmada tercih edilmiştir (10,11).

Homosisteinin plazmada metabolize edilmesinde başlıca Vit B₆, Vit B₁₂ ve folik asit rol oynamaktadır (18). Hiperhomosisteinemide vitaminlerin durumu ile ilgili bir çalışmaya rastlanmamıştır. Buna karşılık vitamin yetersizliklerinde homosistein düzeylerinin yükseldiği belirtilmiştir (15,18). Kanda yeterli düzeyde folat bulunduğu total homosistein düzeyleri değişmemekte ancak yetersiz folat düzeylerinde total homosistein düzeyleri artmaktadır. Benzer fakat daha düşük etkiler Vit B₁₂ ile de görülmektedir (12). Çalışmamızda, Vit B₆ iskemi grubunda en yüksek ölçülmesine rağmen, diğer gruplardan istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilmemiştir (p>0.05). Vit B₁₂ ve folik asit ise iskemi grubunda diğer gruplardan düşük olarak tespit edilmesine rağmen grupların karşılaştırılmasında istatistiksel fark gözlenmemiştir (p>0.05). Bu durumun nedeni olarak vitaminlerin ya-

rılanma ömürleri itibarı ile anlamlı bir düşüş göstermedikleri düşünülebilir.

Nekrotizan enterokolit, invajinasyon, mezo-intestinal bantlar, volvulus ve boğulmuş fitiklardaki iskemi sırasında homosisteinin yükselmesi beklenir. Yeterli klinik bulgu vermeyen olgularda iskeminin derinliğini tespit etmek için yapılacak klinik çalışmalar ile eşik değerleri belirlemek gerekir.

Sonuç olarak, özellikle iskemik bağırsak hastalığı düşünülen olgularda homosistein klinik patolojiyi belirlemede kullanılabilir görünmektedir. Homosistein, bağırsaklarda iskemi periyodunda yükselmektedir. Vit B₆, Vit B₁₂, folik asit'in iskemi ve İ/R'da seviyeleri değişmemektedir.

Kaynaklar

1. Andersson A, Hultberg B, Lindgren A: Redox status of plasma homocysteine and other plasma thiols in stroke patients. *Atherosclerosis* 151:535, 2000
2. Brattström L, Israelsson B, Tengborn L, et al: Homocysteine, factor VII, and antithrombin III in subjects with difference gene dosage for cystathionine beta-synthase. *J Inher Metab Dis* 12:475, 1989
3. Christen WG, Ajani UA, Glynn RJ, et al: Blood levels of homocysteine and increased risks of cardiovascular disease: causal or casual? *Arch Intern Med* 160:422, 2000
4. Çelik H, Yıldırım H, Sapmaz E, ve ark: Ağır preeklampatik hastalarda plazma homosistein düzeyleri ile kranial magnetik rezonans bulguları arasındaki ilişki. *Türkiye Klinikleri J Gynecol Obst* 13:96, 2003
5. Gradman WS, Daniel J, Miller B, Haji-Aghai M. Homocysteine-associated acute mesenteric artery occlusion treated with thrombectomy and bowel resection. *Ann Vasc Surg* 15:247, 2001
6. Guba SC, Fink LM, Fonseca V: Hyperhomocysteinemia. An emerging and important risk factor for thromboembolic and cardiovascular disease. *Am J Clin Pathol* 106:709, 1996
7. Hajjar KA: Homocysteine: a sulph'rous fire. *J Clin Invest* 107:663, 2001
8. Hofmann MA, Lalla E, Lu Y, et al: Hyperhomocysteinemia enhances vascular inflammation and accelerates atherosclerosis in a murine model. *J Clin Invest* 107: 675, 2001
9. Jacobsen DW: Homocysteine and vitamins in cardiovascular disease. *Clin Chem* 44:1833, 1998
10. Langer JC, Sohal SS: Increased mucosal permeability after intestinal ischemia-reperfusion injury is mediated by local tissue factor. *J Pediatr Surg* 27:329, 1992
11. Langer JC, Sohal SS, Riddell RH: Mucosal permeability to ⁵¹Cr EDTA following subclinical intestinal ischemia-reperfusion injury in the weanling rats. *J Pediatr Surg* 28:601,1993
12. Langman LJ, Cole DE: Homocysteine: cholesterol of the 90s? *Clin Chim Acta* 286:63, 1999
13. Loscalzo J: The oxidant stress of hyperhomocyst(e)ine-

mia. J Clin Invest 98:5, 1996

14. Maxwell SR: Coronary artery disease-free radical damage, antioxidant protection and the role of homocysteine. Basic Res Cardiol 95/Spp1:65, 2000

15. Medina MA, Urdiales JL, Amores-Sanchez MI: Roles of homocysteine in cell metabolism. Old and new functions. Eur J Biochem 268:3871, 2001

16. Meiklejohn DJ, Vickers MA, Dijkhuisen R, et al: Plasma homocysteine concentrations in the acute and convalescent periods of atherothrombotic stroke. Stroke 32:57, 2001

17. Miner SE, Evrovski J, Cole D: Clinical chemistry and molecular biology of homocysteine metabolism: an update. Clin Biochem 30:189, 1997

18. Selhub, J: Homocysteine metabolism. Annu Rev Nutr 19:217, 1999

19. Storti S, Cerillo AG, Rizza A, et al: Coronary artery bypass grafting surgery is associated with a marked reduc-

tion in serum homocysteine and folate levels in the early postoperative period. Eur J Cardio Thorac Surg 26:682, 2004

20. Ueland PM, Refsum H, Stabler SP, et al: Total homocysteine in plasma or serum: methods and clinical applications. Clin Chem 39:1764, 1993

21. Upchurch GR, Welch GN, Freedman JE: Homocysteine attenuates endothelial glutathione peroxidase and thereby patients peroxide mediated injury. Circulation 92:1, 1995

TEŞEKKÜR

Fırat Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Proje Müdürlüğü (FÜBAP, proje No:774)

ve Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Araştırmalar Merkezi (FÜTDAM) laboratuvarına desteklerinden dolayı teşekkür ederiz.