

Hemorajik Şokta Hipertonik Tuz Solüsyonu ile Resüsitasyonun Anti-oksidan Etkisi

ANTIOXYDANT EFFECTS OF HYPERTONIC SALINE RESUSCITATION OF HEMORRHAGIC SHOCK IN RATS

Dr.Alaeddin DİLSİZ*, Dr.Hülagü BARIŞKANER**, Dr.Yavuz GEDERET***, Dr.Mehmet GÜRBİLEK***, Dr.İlhan ÇİFTÇİ*, Dr.Adil KARTAL****

Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi, *Çocuk Cerrahi ABD, **Farmakoloji ABD, ***Biyokimya ABD ve ****Genel Cerrahi ABD, KONYA

ÖZET

Amaç: Hemorajik şokta hipertonik tuz solüsyonu ile resüsitasyonun, serbest oksijen radikallerinin yol açtığı doku hasarına etkisini araştırmaktır.

Durum Değerlendirmesi: Son yıllarda hemorajik şokun hipertonik tuz solüsyonu ile resüsitasyonu giderek artmaktadır. Bu tedavi yönteminin kan basıncını yükseltmede ve post travmatik komplikasyonları azaltmada etkin olduğu gösterilmiştir.

Yöntem: Sıçanlarda aorta abdominalis kateterize edilerek kan alma yöntemi ile 60 dakika süreli hemorajik şok oluşturuldu. Denekler iki gruba ayrılarak çalışma grubundaki denekler alınan kan ve 4ml/kg dozda %7.5 NaCl solüsyonu ile, kontrol grubundaki denekler ise alınan kan ve alınan kanın iki katı kadar hacimde (9,75±0,9 ml) ringer laktat solüsyonu ile resüsite edildi. Deneklerde arteriyel kan basıncı sürekli kaydedildi ve şok öncesi, şok sırası ve resüsitasyon sonrasında kan örnekleri alınarak plazma malondialdehid (MDA) değerleri ölçüldü.

Çıkarımlar: Her iki grup arasında kan basıncı değerleri açısından anlamlı bir fark yoktu. Hipertonik tuz solüsyonu ile resüsite edilen deneklerde kontrol deneklere göre resüsitasyon sonrasında MDA değerlerinde artma daha az olarak gözlemlendi (çalışma grubunda 7.62±0.91 ng/ml, kontrol grubunda 10.13±1.04 ng/ml, p<0.05).

Sonuç: Hemorajik şokta hipertonik tuz solüsyonu ile resüsitasyon diğer avantajları yanı sıra serbest oksijen radikallerinin oluşturduğu doku hasarını da azaltmaktadır.

Anahtar kelimeler: Hipertonik tuz solüsyonu, resüsitasyon, hemorajik şok, serbest oksijen radikalleri, plazma malondialdehid değeri

SUMMARY

The aim of this study was to investigate the effect of hypertonic saline solution (HTS) on the tissue injury caused by oxygen free radicals in rats. The abdominal aorta was catheterized and animals were bled via catheter until their mean arterial pressure came down to 35mm Hg indicating the hemorrhagic shock established. After 60 minutes of shock, the animals were divided into two groups, each of which includes ten rats. First group resuscitated with HTS (7.5% NaCl, 4 ml/kg) plus shed blood and second group with twice the shed blood volume of lactated Ringer's (RL) plus shed blood. Arterial pressure was recorded before and during shock and in post-resuscitation period. Blood samples were obtained to determine plasma malondialdehyde levels. There was no significant difference between two groups with regard to arterial blood pressure. Post-resuscitation plasma malondialdehyde levels were lower in first group (HTS animals) compared with second group (RL animals) (p<0.05). In conclusion, the results

of this study showed that the resuscitation of hemorrhagic shock with HTS in rats decreased free radicals-induced tissue injury.

Keywords: Hypertonic saline resuscitation, hemorrhagic shock, plasma malondialdehyde, oxygen free radicals

Ağır travma, yanık ve şoka yol açan kanamalar nötrofilleri aktive ederek sitotoksik mediatörlerin aşırı salınımını ve doku hasarını tetikleyerek respiratuar distres ve multipl organ yetmezliği gibi ciddi posttravmatik komplikasyonlara yol açarlar (1,2). Kanamalardan sonra kan basıncının hızlı yükseltilmesi bu komplikasyonları azaltabilir ve travma sonrası sağ kalımı artırabilir.

Son yıllarda, travmalı hastaların resüsitasyonu için hipertonic tuz solüsyonu (HTS) kullanımı giderek artmaktadır. Çünkü HTS kanama sonrasında kan basıncını diğer klasik izotonik solüsyonlardan daha hızlı restore etmektedir (3). Çalışmalar HTS resüsitasyonunun plazma osmolalitesini artırmakla beraber güvenilir bir yöntem olduğu göstermiştir (4,5,6,7). Ayrıca bazı veriler travmalı hastalarda HTS resüsitasyonunun posttravmatik komplikasyonları azaltarak hastalığın seyrini iyileştirdiğini ortaya koymaktadır (8). HTS'nin bu etkilerinin sebebi tam olarak bilinmemektedir.

Çalışmamızda hemorajik şokun HTS ile resüsitasyonunun antioksidan etkisi araştırılmıştır. Bu amaçla oksijen radikallerinin oluşturduğu doku hasarının göstergesi olarak malondialdehid (MDA) aktivitesi ölçülmüştür.

GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmamızda her biri 260-330 gr ağırlığında 20 adet rekek wistar-albino sıçan kullanıldı. Denekler S.Ü. araştırma merkezi kuralları doğrultusunda uygun şartlarda tutuldu. Deneyin başlangıcına kadar serbestçe yem ve su verildi.

Denekler ketamin Hcl ve diazepam ile uyutul-

du. %70 alkol ile deri temizliği yapıldıktan sonra 2.5-3 cm'lik orta hat kesisi ile karına girildi. 10F polietilen kateter ile abdominal aorta, bifurkasyonun hemen proksimalinden kateterize edildi. Kateter basınç transduser (Grass PT 300) ile poligrafa (Grass 79 H; Grass Instrument CO. Quincy Mass., USA) bağlanarak deneğin arteriel kan basıncı devamlı olarak ölçüldü. Hemoraji (kan alımı), kan ve sıvıların verilmesi ve kan basıncının ölçümü üç yollu musluk ile aynı kateterden yapıldı. Denekler 100 U/kg dozda heparin ile antikoagüle edildi. Hemoraji öncesi kan basıncı ölçüldükten sonra deneğin kan basıncı 35 ± 5 mmHg oluncaya kadar kan alındı. 60 dakika süre ile denek şokta tutuldu.

Denekler rastgele, her birinde 10 adet olmak üzere iki gruba ayrıldı. Birinci grupta (çalışma grubu) denekler HTS (%7.5 NaCl sol, 4 ml/kg dozda) ve denekten alınan kan ve alınan kanın iki katı kadar hacimde ringer laktat (RL) solüsyonu ile resüsitasyon sağlandı. Bu resüsitasyon rejimi Coimbra ve ark (9) tarafından yayınlanan model esas alınarak uygulandı. Deneklerden şok öncesi, şokun altmışıncı dakikası ve resüsitasyondan 30 dakika sonra MDA ölçümleri için kan örnekleri alındı. Heparinize tüplere alınan kanlar 3000 devir/dak hızda 10 dakika santrifüje edilerek plazmaları ayrıldı. Ayrılan 0.5 ml plazma üzerine 2.5 ml trikloroasetik asit ilave edilerek 90°C 'de 15 dakika bekletildikten sonra 3000 devir/dak hızda 10 dakika santrifüje edildi. Üste kalan süpernatant ayrılacak şekilde 1 ml tiobarbitürik asit eklendi. 90°C 'de 15 dakika bekletildi. Spektrofotometrik metotla MDA konsantrasyonları nmol/ml cinsinden ölçüldü.

TABLO 1: HER İKİ GRUPTA ŞOK ÖNCESİ VE RESÜSİTASYON SONRASI ARTERİYEL KAN BASINÇLARI

Gruplar	Arteriyel kan basıncı (mmHg) $\bar{X} \pm \text{SD}$	
	Şok öncesi	Resüsitasyon sonrası
RL grubu	92.5 \pm 9.87	77.5 \pm 13.9
HTS grubu	100 \pm 13.6	91.4 \pm 15.05

**TABLO 2: HER İKİ GRUPTA ELDE EDİLEN
PLAZMA MALONDİALDEHİD DEĞERLERİ (ng/ml, $\bar{X} \pm SD$)**

	RL (kontrol) grubu	HTS (çalışma) grubu
Şok öncesi	6.04±1.06	5.84±0.67
Şok	5.59±1.05	5.75±0.59
Resüsitasyon sonrası	10.13±1.04*	7.62±0.91*
*p<0.05		

BULGULAR

Çalışmamızda deney süresinde kaybedilen denek olmadı.

Deneklerden şok oluşturmak için alınan kan miktarı ortalama 4.87 ± 0.45 ml idi. Deneklerde resüsitasyondan sonra ölçülen kan basıncı değerleri ile şok öncesi kan basıncı değerleri gözönüne alındığında gerek grupların kendi içlerinde ve gerekse gruplar arasında anlamlı fark gözlenmedi. İki grup arasında resüsitasyon sonrası kan basınçları açısından anlamlı bir fark olmasa da HTS grubunda kan basıncı resüsitasyon ile daha çok artmış ve şok öncesi değere daha çok yaklaşmıştı (Tablo 1).

Her iki grupta şok öncesi MDA değerleri arasında fark yoktu. Şok MDA değerlerinde hafif bir azalmaya neden olsa da, hem de iki grup arasında, hem de şok öncesi değerlere göre anlamlı bir fark gözlenmedi. Resüsitasyondan 30 dakika sonra alınan örneklerde MDA değerlerinde her iki grupta da anlamlı artış gözlemlendi ($p < 0.05$). Ancak bu artış HTS grubunda daha azdı. İki grupta resüsitasyon sonra MDA değerleri arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p < 0.05$). Elde edilen MDA değerleri Tablo 2'de özetlendi.

TARTIŞMA

Hipovolemik şokta resüsitasyon sonrasında oluşan ve dolaşıma katılan serbest radikaller dokularda hasara yol açar. Bu hasarın saptanmasında ve önlenmesinde bir takım yöntemler bulunmaktadır. Çalışmamızda hasarın saptanmasında ölçüt olarak MDA, hasarı hangi orada önleyebildiğini anlamak için de hipertonik tuzlu su seçilmiştir. MDA lipid peroksidasyonun son ürünüdür, hücre membranındaki doymuş yağ asitlerinin serbest oksijen radikalleri tarafından yıkımı sonucu ortaya çıkar ve oksidatif stresin göstergesi olarak bilinir (10).

Hemorajik şokta küçük hacimlerde (4 ml/kg veya erişkin bir hasta için yalnızca 250 ml) HTS kullanımının mantığı, HTS'nin hücre içindeki sıvıyı hücre dışına, yani hücreler arasına ve damar içine çekmesi esasına dayanır. Böylece daha az sıvı ile resüsitasyon sağlanır. HTS hemodinamik parametrelerin düzeltilmesinde konvansiyonel RL resüsitasyonuna göre daha iyi sonuçlar verdiği için, hemorajik şok ve yanık resüsitasyonu için tercih edilmektedir. Çalışmamızda şok sonrası resüsitasyon, çalışma grubunda ortalama 1.1 ml HTS + denekten alınan kan ile sağlanırken, kontrol grubunda ise alınan kanın iki katı kadar ringer laktat (9.75 ± 0.9 ml) + alınan kanın geri verilmesi ile yapılmıştır. Çalışma grubunda resüsitasyon sonrası kan basıncı değerlerinin şok öncesi değerlere daha yakın olması, iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olmasa da, HTS ile resüsitasyonun bir avantajı olarak değerlendirilebilir.

Çalışmamızda hemorajik şok modeli aorta abdominalis kanüle edilerek hazırlanmıştır. Bu model, modifiye yönü dışında, literatürde yıllardan beri kullanılan modelin eşidir (9).

Yapılan çalışmalar HTS ile resüsitasyonun kan viskozitesini ve endotel hücre şişmesini azalttığını göstermektedir (11). HTS infüzyonunu takiben böbrek ve barsak mukozaya perfüzyonu mikrosirkülasyon seviyesinde belirgin olarak artmakta (12) ve barsak mukozal bariyeri korunarak bakteriyel translokasyonu ve uzak organ (akciğer) hasarını azaltmaktadır (9,13).

Rhee ve ark. (14) hemorajik şok modelinde MDA yerine nötrofil fonksiyonlarını incelediler; sonuçta LR ile resüsitasyon esnasında ve resüsitasyon sonrasında nötrofil aktivasyonunun arttığını kanıtladılar. Kanama olmaksızın yalnız RL verilmesinin nötrofil aktivasyonuna yol açması da aynı çalışmanın ürünüdür. Aynı etki denekten alınan kan ya da HTS infüzyonundan sonra gözlenmemiştir.

HTS'nin travma veya hemorajik şoktaki etkisini irdeleyen çalışmalar HTS'nin nötrofil fonksiyonlarını baskılayabilmesi için nötrofillerin aktivasyonundan önce verilmesi gerektiğini vurgulamaktadırlar (15). Yine aynı çalışmalar RL'nin nötrofil fonksiyonlarını aktive ettiğini ve bu nedenle süperoksit radikallerinin düzeyini yükselttiğini bildirmektedirler. Uyarılmış nötrofillerden süperoksit salınımı ortama yüksek konsantrasyonda NaCl solüsyonu eklenerek ortamın ozmolaritesinin artması ile azalmıştır (16). Hipertonisitenin nötrofil fonksiyonlarını hangi mekanizma ile baskıladığı tam olarak bilinmemekle beraber, hiperosmolar solüsyonlar nötrofil ekzositozunu bloke ettiğinden, hücre iskeletindeki bu değişikliğin nötrofil fonksiyonları üzerindeki etkide santral rol oynadığı ileri sürülmüştür (17). Posttravmatik multipl organ yetmezliği riski yüksek hastalarda nötrofiller sitotoksitesine için uyarılırken, nötrofillerin apoptozisinin geciktiği de gözlenmiştir (18). Apoptozis dokuda sekestre olan nötrofillerin temizlenmesi için kritik öneme sahiptir. Gecikmiş apoptozis nötrofillerin fonksiyonel ömürlerinin uzamasına, dolayısıyla doku hasarının artmasına ve multipl organ yetmezliğine neden olur. Endotoksin ile indüklenmiş farelerde HTS verilmesinin apoptozisi koruyucu etkisi gösterilmiştir. Böylelikle HTS nin nötrofil fonksiyonlarını baskılayıcı etkisi kısmen apoptozis üzerinden olmaktadır.

Mezenterik lenf akımının hemorajik şok sırasında azaldığı, ancak RL resüsitasyonu sırasında ve sonrasında arttığı ortaya konmuştur (19). HTS ise hem mezenterik lenf akımını azaltmakta ve hem de nötrofillerin süperoksit oluşturmak üzere uyarılmasını önlemektedir (20).

HTS'nin nötrofil üzerindeki etkilerinden biri de L-selektin artışı önleyerek, nötrofillerin damar endoteline adezyonunu ve dolayısıyla kemotaksi ile dokuya göçünü engellemesidir (21,22).

Çalışmamızda HTS'nin verilme zamanı veya nötrofil fonksiyonları üzerindeki direkt etkileri araştırılmamıştır. Çalışmamızın ağırlık noktasını MDA'nın HTS ve RL'den nasıl etkilendiğini ortaya koymak oluşturmaktadır. Resüsitasyon sonrası ölçülen plazma MDA değerleri çalışma grubunda 7.62 ± 0.91 ng/ml, kontrol grubunda ise 10.13 ± 1.04 ng/ml olarak bulunmuştur ($p < 0.05$). Serbest radikallerin yol açtığı hasarın ölçütü olarak çalışılan MDA değerlerinin, HTS verilen deneklerde RL verilenlere göre düşük bulunmuş olması hemorajik şokta HTS ile resüsitasyonun, kan basıncının restorasyonu gibi diğer avantajları yanı sıra, serbest oksijen radikallerinin yol açtığı doku hasarını

azaltıcı etkisinin de var olduğunu ortaya koymaktadır.

Sonuç olarak hemorajik şokta olan sıçanlar daha küçük hacimdeki hipertonic tuz solüsyonu ile resüsite edilmekte ve daha düşük plazma malondialdehid düzeyi oluşmaktadır. Yani ringer laktat ile karşılaştırıldığında hipertonic tuz solüsyonu, şoktaki sıçanlarda oksijen radikallerinin dokuda yol açacağı hasarın şiddetini azaltmaktadır. Bir başka deyişle antioksidan etki yaratmaktadır.

KAYNAKLAR

1. Botha AJ, Moore FA, Moore EE, Sauaia A, Banerjee A, Peterson VM: Early neutrophil sequestration after injury: A pathogenic mechanism for multiple organ failure. *J Trauma* 1995;39:411-417.
2. Weiss SJ: Tissue destruction by neutrophils. *N Engl J Med* 1989;320:365-376.
3. Rowe GG, McKenna DH, Corliss RJ, Sialer S: Hemodynamic effects of hypertonic sodium chloride. *J Appl Physiol* 1972;32:182-184.
4. Velasco IT, Pontieri V, Roche e Silva M, Lopes OU: Hyperosmotic NaCl and severe hemorrhagic shock. *Am J Physiol* 1980;239:H664-H673.
5. Traverso LW, Bellamy RF, Hollenbach SJ, Witcher LD: Hypertonic sodium chloride solutions: effect on hemodynamics and survival after hemorrhage in swine. *J Trauma* 1987;27:32-39.
6. Brown JM, Grosso MA, Moore EE: Hypertonic saline and dextran: Impact on cardiac function in the isolated rat heart. *J Trauma* 1990; 30:646-651.
7. Griswold JA, Anglin BL, Love RTJ, Scott-Conner C: Hypertonic saline resuscitation: Efficacy in a community-based burn unit. *South Med J* 1991;84:692-696.
8. Mattox KL, Maningas PA, Moore EE, Mateer JR, Marx JA, Aprahamian C, Burch JM, Pepe PE: Prehospital hypertonic saline-dextran infusion for post-traumatic hypotension. *The USA Multicenter Trial. Ann Surg* 1991;213:482-491.
9. Coimbra R, Hoyt DB, Junger WC, Angle N, Wolf P, Loomis W, Evers MF: Hypertonic saline resuscitation decreases susceptibility to sepsis after hemorrhagic shock. *J Trauma* 1997;42:602-607.
10. Akkuş İ: Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri. *Konya; Mimoza* 1995;32-37.
11. Mazzoni MC, Borgstrom P, Intaglietta M, Arfors KE: Capillary narrowing in hemorrhagic shock is rectified by hyperosmotic saline-dextran reinfusion. *Circ Shock* 1990;31:407-408.
12. Behrman SW, Fabian TC, Kudsk KA, Proctor KK: Microcirculatory flow changes after initial resuscitation of hemorrhagic shock with 7.5% hyper-

- tonic saline / 6% dextran 70. *J Trauma* 1991; 31:589-600.
13. Diebel LN, Robinson SL, Wilson RF, Dulchavsky SA: Splanchnic mucosal perfusion effects of hypertonic versus isotonic resuscitation of hemorrhagic shock. *Am Surg* 1993; 59:495-499.
 14. Rhee P, Buris D, Kaufmann C: Lactated Ringer's solution resuscitation causes neutrophil activation after hemorrhagic shock. *J Trauma* 1998; 44:313-319.
 15. Ciesla DJ, Moore EE, Zallen G, Biffi WL, Silliman CC: Hypertonic saline attenuation of polymorphonuclear neutrophil cytotoxicity: Timing is everything. *J Trauma* 2000; 48:388-95.
 16. Junger WG, Hoyt DB, Davis RA et al: Hypertonicity regulates the function of human neutrophils by modulating chemoattractant receptor signaling and activating mitogen-activated protein kinase p38. *J Clin Invest* 1998; 101:2768-2779.
 17. Rizoli SB, Rotstein OD, Parodo J, Phillips MJ, Kapus A: Hypertonic inhibition of exocytosis in neutrophils: Central role for osmotic actin skeleton remodeling. *Am J Physiol* 2000; 279:619-633.
 18. Biffi WL, Moore EE, Zallen G, Johnson JL, Gabriel J, Offner PJ, Silliman CC: NeutroSanders GB., Hagan WH., Kinnaird DW. Adult intussusception and carcinoma of the colon. *Ann. Surg.* 1958; 147:796-803.
 19. Zallen G, Moore EE, Johnson JL, Tamura DY, Ciesla DJ, Silliman CC: Posthemorrhagic shock mesenteric lymph primes circulating neutrophils and provokes lung injury. *J Surg Res* 1999; 83:83-8.
 20. Zallen G, Moore EE, Tamura DY, Johnson JL, Biffi WL, Silliman CC: Hypertonic saline resuscitation abrogates neutrophil priming by mesenteric lymph. *J Trauma* 2000; 48:45-48.
 21. Angle N, Hoyt DB, Cabello-Passini R, Herdon-Remelius C, Loomis W, Junger WG: Hypertonic saline resuscitation reduces neutrophil margination by suppressing neutrophil L selectin expression. *J Trauma* 1998; 45:7-12.
 22. Rhee P, Wang D, Ruff P, Austin B, De Braux S, Wolcott K, Burris D, Ling G, Sun L: Human neutrophil activation and increased adhesion by various resuscitation fluids. *Crit Care Med* 2000; 28:74-78.

YAZIŞMA ADRESİ:

Faruk ÇOŞKUN
Şehit Adem Yavuz Sok. No:7/11
Kızılay, ANKARA