

## Pulmoner kontüzyon tedavisinde yeni bir yöntem: Hiperbarik oksijen, bir deneysel çalışma

*A novel method in the treatment of pulmonary contusion:  
hyperbaric oxygen, an experimental study*

Nurettin Yiyit,<sup>1</sup> Hasan Türüt,<sup>2</sup> Turgut Işıtmangil,<sup>1</sup> Osman Metin İpçioğlu,<sup>3</sup> Günalp Uzun,<sup>4</sup> Ufuk Berber,<sup>5</sup>  
Fatih Hikmet Candaş<sup>1</sup>, Rauf Görür<sup>1</sup>, Akın Yıldızhan<sup>1</sup>

<sup>1</sup>GATA Haydarpaşa Eğitim Hastanesi, Göğüs Cerrahisi Kliniği, İstanbul, Türkiye;

<sup>2</sup>Rize Üniversitesi, Göğüs Cerrahisi Anabilim Dalı, Rize, Türkiye;

<sup>3</sup>GATA Haydarpaşa Eğitim Hastanesi, Biyokimya Kliniği, İstanbul, Türkiye;

<sup>4</sup>GATA Haydarpaşa Eğitim Hastanesi, Suatlı Hekimliği ve Hiperbarik Tıp Kliniği, İstanbul, Türkiye;

<sup>5</sup>GATA Haydarpaşa Eğitim Hastanesi, Patoloji Kliniği, İstanbul, Türkiye

**Amaç:** Bu çalışmada, daha önce pek çok alanda faydalı olduğu ispatlanmış olan hiperbarik oksijenin (HBO) pulmoner kontüzyondaki (PK) etkinliği ve tek taraflı PK modeli ile oluşturulan PK'da HBO'nun hangi patofizyolojik mekanizmalar üzerine etkisi olduğu araştırıldı.

**Çalışma planı:** Çalışmada toplam 49 adet sıçan kullanıldı. Yedi adet sıçan kontrol grubu olarak seçildi. Kırk iki adet sıçana tek taraflı PK oluşturuldu ve sıçanlar kontüzyon grubu (n=21), HBO grubu (n=21) olarak iki ana gruba ayrıldı. Gruplar kendi içinde eşit üç alt gruba (n=7) bölündü. Hiperbarik oksijen grubunun birinci alt grubu tek doz, ikinci alt grubu iki doz ve son alt grubu üç doz HBO tedavisi aldı. Kontüzyondan 24 saat sonra her iki grubun birinci alt grupları, 48 saat sonra ikinci alt grupları ve 72 saat sonra üçüncü alt grupları sakrifiye edildi. Sağ akciğerden elde edilen doku örnekleri, tümör nekroz faktör alfa (TNF- $\alpha$ ), malondialdehid (MDA), miyeloperoksidaz (MPO), histopatolojik inceleme ve apoptozis analizine tabi tutuldu.

**Bulgular:** Kontrol grubuyla kontüzyon grubu karşılaştırıldığında MPO ve TNF- $\alpha$  düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı artış tespit edildi. Bu parametrelerde HBO tedavisi uygulanan sıçanlarda ise, istatistiksel olarak anlamlı olmayan azalma tespit edildi. Histopatolojik olarak yapılan inceleme sonucu kontüzyon grubunda alveoler hemoraji, ödem/konjesyon, alveol yırtılması ve lökosit sekestrasyonu skorlarında anlamlı artış tespit edildi. HBO tedavisi sonucu bu skorlarda istatistiksel olarak anlamsız, fakat önemli oranda iyileşme gözlemlendi. Apoptozis analizinde, kontüzyonun apoptotik hücre indüksiyonuna yol açtığı ve bu etkinin HBO tedavisi ile önemli oranda baskılandığı tespit edildi.

**Sonuç:** Pulmoner kontüzyon, akciğer dokusunda ciddi lokal hasarın yanında, indirekt etki ile aktive olan inflamatuvar yanıt mekanizmaları ve açığa çıkan serbest oksijen radikalleri vasıtası ile doku hasarına neden olmaktadır. İki ve üç doz HBO uygulanan sıçanlara kıyasla, tek doz HBO uygulanan sıçanların TNF- $\alpha$ , MDA ve MPO düzeyleri açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilmemesi, HBO tedavisinin en azından etki bakımından doz ve süre bağımlı olmadığını ortaya koymaktadır. Hiperbarik oksijenin apoptotik hücre ölümünü azalttığına inanmakla birlikte, HBO mekanizmasını tam olarak değerlendirmek için daha uzun sürelerde gözlem yapılmasının gerektiğine inanıyoruz.

**Anahtar sözcükler:** Apoptozis; hiperbarik oksijen; malondialdehid; miyeloperoksidaz; pulmoner kontüzyon; tümör nekroz faktör alfa.

**Background:** In this study, the effects of hyperbaric oxygen (HBO) -which was previously shown to have positive effects on different issues- on pulmonary contusion (PC) and the pathophysiological mechanisms of HBO which act on unilateral PC.

**Methods:** A total of 49 rats were used in this study. Seven rats were used as controls. Unilateral PC was induced in 42 rats and the rats were divided into two main groups, including contusion (n=21) and HBO group (n=21). Each group was divided into three subgroups (n=7). The first HBO subgroup received a single dose of HBO therapy, while the second HBO subgroup received two doses and the third HBO subgroup received three doses. The first subgroups of each main group were sacrificed 24 hours after the contusion, the second subgroups were after 48 hours and the third subgroups were sacrificed after 72 hours. Tissue samples obtained from the right lung were considered for tumor necrosis factor-alpha (TNF- $\alpha$ ), malondialdehyde (MDA), myeloperoxidase (MPO) and, histopathological study and apoptosis analysis.

**Results:** When compared controls with the contusion group, a statistically significant increase in MPO and TNF- $\alpha$  levels was observed. In the HBO treated group, these parameters were decreased, however the decrease was not statistically significant. Histopathological examination revealed significant increases in alveolar hemorrhage, edema/congestion, alveolar distruption and leukocytic sequestration scores. HBO treatment resulted in a statistically nonsignificant, however dramatic improvement in these scores. Apoptosis analysis showed that contusion resulted in an apoptotic cell induction and this effect was significantly inhibited with HBO treatment.

**Conclusion:** Pulmonary contusion results in a serious local injury, as well as tissue injury via indirect effect of activated inflammatory response mechanisms and exposed free oxygen radicals. Statistically nonsignificance between the TNF- $\alpha$ , MDA and MPO levels in rats receiving a single dose of HBO, compared to others receiving two or three doses suggested that its effect was independent from dosage and the time, at least. We believe that HBO treatment decreases apoptotic cell death and further long-term observations should be carried out to assess the exact mechanism of HBO.

**Key words:** Apoptosis; hyperbaric oxygen; malondialdehyde; myeloperoxidase; pulmonary contusion; tumor necrosis factor-alpha.



Available online at  
www.tgkdc.dergisi.org  
doi: 10.5606/tgkdc.dergisi.2012.169  
QR (Quick Response) Code

Geliş tarihi: 29 Şubat 2012 Kabul tarihi: 7 Nisan 2012

Yazışma adresi: Dr. Nurettin Yiyit, GATA Haydarpaşa Eğitim Hastanesi, Göğüs Cerrahisi Kliniği, 34668 Üsküdar, İstanbul, Türkiye.

Tel: 0532 - 510 86 80 e-posta: drnurettinyiyit@yahoo.com

Pulmoner kontüzyon (PK), künt göğüs travmasının eşlik ettiği çoklu vücut travmalı hastalarda klinik tabloya eşlik edebilen önemli bir mortalite ve morbidite nedenidir.<sup>[1,2]</sup> Pulmoner kontüzyon patofizyolojisi kantitatif olarak yayınlanmış veri bulunmadığından net bir biçimde ortaya konulmuş değildir.<sup>[2]</sup> Pulmoner kontüzyon akut ve lokal hasarın yanında sistemik inflamatuvar yanıtı da yol açmaktadır. Ayrıca oksidatif hasar da diğer taraftan yıkım sürecine katkı sağlamaktadır.<sup>[1-4]</sup>

Pulmoner kontüzyona spesifik bir tedavi yöntemi henüz mevcut olmadığından birçok farklı ajan deneysel modellerde kullanılmış ve sonuçları yayınlanmıştır.<sup>[1,5]</sup> Künt travmalarda hiperbarik oksijen (HBO)'in etkinliği bilinmesine karşın PK konusu pek detaylandırılmamıştır.<sup>[5]</sup> Farklı hastalıklarda kullanımı her geçen gün yerleşmekte olan HBO'nun akut akciğer hasarında etkinliğine yönelik yeni deneysel çalışmalar yapılmaktadır.<sup>[6]</sup> Hiperbarik oksijenin antioksidatif enzimlerin ve inflamatuvar medyatörlerin regülasyonunda etkin olduğuna dair veriler bulunmaktadır.<sup>[7]</sup> Birçok araştırmacı HBO'nun doku oksijenasyonunu düzelterek tedaviyi olumlu etkilediğini anti-inflamatuvar etkisi olduğunu bildirmiştir.<sup>[8-10]</sup>

Bu çalışmamızda, pek çok alanda etkinliği ispatlanmış olan HBO'nun PK'daki etkinliği ve tek taraflı PK modeli ile oluşturulan PK'da HBO'nun hangi patofizyolojik mekanizmalar üzerine etkisi olduğu araştırıldı.

## GEREÇ VE YÖNTEMLER

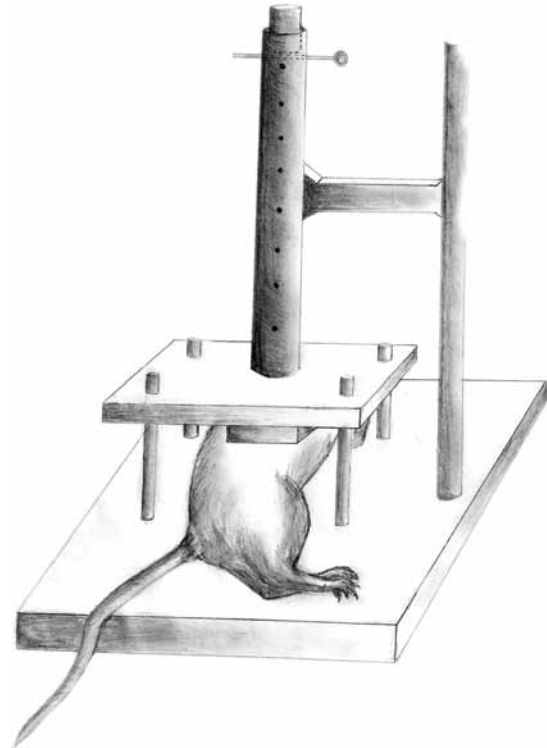
Çalışma için Haydarpaşa Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi Deneysel Araştırma ve Hayvan Laboratuvarı Deneysel Hayvanı Etik Kurulu'ndan onay alındı. Çalışma Marmara Üniversitesi Hayvan Araştırmaları Laboratuvarında gerçekleştirildi. Çalışmada Wistar Albino türü 280-320 gr ağırlığında 49 adet erişkin sıçan kullanıldı. Bir kafeste en fazla beş sıçan olacak şekilde sıçan yemi verilen ve 12 saat aydınlık, 12 saat karanlık ortam sağlanan sıçanların, su alımları serbest bırakıldı. Sıçanlara deneysel işlem öncesinde ketamin HCl (Ketalar®, Eczacıbaşı, İstanbul Türkiye) 40 mg/kg + xylazine (Rompun®, Bayer, İstanbul Türkiye) 5 mg/kg intraperitoneal yolla uygulanarak anestezi sağlandı. İşlem boyunca sıçanlar solunumları spontan olarak devam edecek şekilde uyutuldu. Analjezi, intraperitoneal olarak uygulanan 0.05 mg/kg morfin sülfat ile sağlandı.

Raghavendran ve ark.nın<sup>[3]</sup> tanımladığı izole iki taraflı PK modelinin modifiye edilmesi ile oluşturulan tek taraflı PK modeli ile PK yapıldı. Plastik kalkanın sıçanın tamamen lateral duvarını kapsayacak şekilde yerleştirilmesi sırasında orta aksiller hat ve ksifoid proses işaretlenerek standardizasyon ve optimizasyon sağlandı (Şekil 1). Ortaya çıkan enerji  $E = mgh$  formü-

lü ile (E: enerji, g: yer çekimi; 9.8 m/s<sup>2</sup>, h: yükseklik; 100 cm ve m: düşürülen ağırlık; 0.225 kg) hesaplandı. Kullanılan ağırlık 225 gr ve yükseklik 1 metre olduğundan göğüs duvarına transfer edilen enerji 2.2 joule olarak hesaplandı.

Çalışma grupları kontrol grubu, kontüzyon grubu ve HBO grubu olarak belirlendi. Kontrol grubu (n=7), kontüzyon oluşturulmayan sıçanlar ile oluşturuldu. Kontüzyon grubu (n=21), yedişerli üç alt grup şeklinde oluşturuldu. Her bir alt gruba kontüzyon oluşturulduktan sonra sırasıyla 24, 48 ve 72 saat sonra sakrifikasyon yapıldı. Hiperbarik oksijen grubu (n=21), yedişerli üç alt gruptan oluşturuldu. Kontüzyon oluşturulduktan iki saat sonra 1, 2. ve 3. alt gruplara ilk seans olarak 2.5 ATA basınçta 90 dk %100 O<sub>2</sub> ile HBO, 2. ve 3. alt gruplara 24 saat sonra 2. seans şeklinde HBO, son olarak da 3. alt gruba da kontüzyondan 48 saat sonra 3. seans şeklinde HBO uygulandı. Hiperbarik oksijen grubunda yer alan her bir alt gruptaki sıçanlara tedaviden 24 saat sonra sakrifikasyon uygulandı. Tüm gruplarda sağ üst lob histopatolojik inceleme, sağ alt lob ise biyokimyasal analiz için çıkarıldı.

Çıkarılan akciğer dokularında biyokimyasal analiz yöntemleriyle tümör nekroz faktör-alfa (TNF- $\alpha$ ), malondialdehid (MDA) ve miyeloperoksidaz (MPO) çalışıldı. Bu amaçla akciğer dokuları tüplere alındı. Her birine 3 ml serum fizyolojik eklenerek blender



Şekil 1. Tek taraflı pulmoner kontüzyon modeli.

(Ultra-Tumax T25 Janke & Kuntel IKA Labortechnik, Germany) da üç dakika hemojenize edildi. Analizlerde çıkan sonuçları standardize etmek için dokulardaki protein miktarları Lowry<sup>[11]</sup> yöntemi ile tespit edildi. TNF- $\alpha$  değerleri, "Assay MAX Rat Tumor Necrosis Factor-alpha Elisa Kit"i (AssayPro, Saint Charles-Missouri, Winfield-Missouri, USA) kullanılarak Elisa yöntemiyle Microplate Reader RT-2100 C (Rayto Electronics Inc., China) cihazı ile ölçüldü. TNF- $\alpha$  değerleri pg/ml olarak belirtildi. Malondialdehid düzeyleri, NWLSS "Malondiadehyde Assay Rat Kit"i (Northwest Life Science Specialities, LLC) kullanılarak DU 800 Spectrophometer (Beckman COULTER, USA) cihazında fotometrik olarak ölçüldü. Sonuçlar mM/g doku olarak belirtildi. Miyeloperoksidaz enzim aktivitesi, NWLSS "Myeloperoksidase Activity Assay Rat Kit"i (Northwest Life Science Specialities, LLC) kullanılarak DU 530 Spectrophometer (Beckman COULTER, USA) cihazında fotometrik olarak ölçüldü. MPO enzim aktivitesi U/g doku olarak belirtildi.

Histopatolojik değişiklikler (intraalveoler hemoraji, alveoler ödem, alveoler distrüpsiyon, konjesyon ve lökositik infiltrasyon) incelendi. Alveoler ödem ve konjesyon 0'dan 3'e kadar skorlandı. Bu skorlamada; 0= patoloji yok, 1= hafif (%10), 2= orta düzey (%15-20), 3= şiddetli (%20-25) olarak kabul edildi. Lökositik infiltrasyon ise inflamasyon şiddetini göstermede kullanıldı. Her

bir bölüm 10 alt bölüme ayrıldı ve lökosit infiltrasyonu H-E x 400 büyütme ile her bir alt bölümde 0'dan 3'e kadar skorlandı. 0= Ekstravasküler lökosit yok, 1= 10'un altında lökosit, 2= 10-45 arası lökosit, 3= 45'den fazla lökosit olarak belirlendi. Karşılaştırma için elde edilen sayıların ortalaması alındı.

Apoptozisin immünohistokimyasal olarak gösterilebilmesi için TUNEL (ApopTag<sup>®</sup> Plus Peroxidase, In Situ Apoptosis Detection Kit, Chemicon International, Temecula, CA 92590) yöntemi kullanıldı.<sup>[12]</sup>

İstatistiksel analizler SPSS (SPSS Co., Chicago, IL, ABD) 13.0 versiyon paket programı kullanılarak yapıldı. Gruplar arası karşılaştırmalar sürekli veriler için One way ANOVA post hoc LSD testi, devamlı olmayan veriler için ki-kare testi kullanılarak yapıldı. P<0.05 değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

## BULGULAR

Kontrol grubu ile karşılaştırılan kontüzyon alt gruplarının hepsinde TNF- $\alpha$  düzeylerinde artış tespit edildi. Bu artışın sadece birinci ve üçüncü kontüzyon alt grubunda istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü. Hiperbarik oksijen alt gruplarıyla kontüzyon alt grupları kıyaslandığında TNF- $\alpha$  düzeylerinin tedavi sonrası azaldığı, fakat bu farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı tespit edildi (Tablo 1).

**Tablo 1. Kontrol kontüzyon ve hiperbarik oksijen tedavisi uygulanan gruplarda analiz edilen tümör nekroz faktör alfa, malondialdehid ve mieloperoksidaz düzeyleri**

Gruplar	Test	Min.-Maks.	Ort.±SS
Kontrol grubu	Tümör nekroz faktör alfa	0.264-1.083	0.745±0.311
	Malondialdehid	0.228-0.869	0.450±0.205
	Miyeloperoksidaz	0.132-0.245	0.165±0.037
Kontüzyon-I alt grubu	Tümör nekroz faktör alfa	0.973-2.606	1.448±0.629
	Malondialdehid	0.424-1.932	0.890±0.550
	Miyeloperoksidaz	0.193-0.603	0.399±0.157
Kontüzyon-II alt grubu	Tümör nekroz faktör alfa	0.912-1.432	1.153±0.207
	Malondialdehid	0.327-0.883	0.670±0.190
	Miyeloperoksidaz	0.274-0.340	0.293±0.024
Kontüzyon-III alt grubu	Tümör nekroz faktör alfa	0.819-2.509	1.417±0.669
	Malondialdehid	0.399-0.901	0.579±0.173
	Miyeloperoksidaz	0.146-0.345	0.210±0.069
HBO-1 alt grubu	Tümör nekroz faktör alfa	0.454-2.900	1.153±0.846
	Malondialdehid	0.355-1.866	0.835±0.574
	Miyeloperoksidaz	0.145-1.326	0.361±0.426
HBO-2 alt grubu	Tümör nekroz faktör alfa	0.302-1.434	0.804±0.393
	Malondialdehid	0.360-0.969	0.523±0.212
	Miyeloperoksidaz	0.239-0.394	0.284±0.053
HBO-3 alt grubu	Tümör nekroz faktör alfa	0.767-1.365	1.038±0.201
	Malondialdehid	0.324-0.907	0.477±0.217
	Miyeloperoksidaz	0.114-0.378	0.204±0.092

Min.: Minimum; Maks.: Maksimum; Ort.±SS: Ortalama ± standart sapma; HBO: Hiperbarik oksijen.

Malondialdehit aktivitesi incelendiğinde; tüm kontüzyon alt gruplarında, kontrol grubuna göre MDA aktivitesinde artış olmasına karşın tek istatistiksel olarak anlamlı artış 1. kontüzyon alt grubunda tespit edildi ( $p=0.028$ ). Hiperbarik oksijen uygulanan sıçanların akciğer dokularında yapılan MDA analizi sonucunda; tüm HBO alt gruplarında kontüzyon alt gruplarına kıyasla MDA düzeylerinde tedavi sonrası düşüş görüldü. Fakat bu düşüşün istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görüldü (Tablo 1).

Birinci kontüzyon alt grubundaki MPO aktivitesinde, kontrol grubu ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı bir artış tespit edildi ( $p=0.029$ ). Bunun yanında 2. ve 3. kontüzyon alt gruplarında ise kontrol grubuna kıyasla artış tespit edilmesine rağmen, artışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görüldü. Tüm HBO alt gruplarında MPO aktivitesinin istatistiksel olarak anlamlı olmayan bir azalma gösterdiği tespit edildi (Tablo 1).

Histopatolojik olarak gruplar arasında yapılan karşılaştırma sonucunda kontüzyonun tüm parametreler açısından akciğerde hasar ve lökosit sekestrasyonuna yol açtığı, tek seans HBO'nun histopatolojik olarak nispi bir düzelme sağladığı özellikle alveoler ödem/konjesyon skorlarında istatistiksel olarak anlamlı bir azalma sağladığı tespit edildi (Şekil 2).

Sıçanların akciğer dokularında apoptozise yönelik yaptığımız çalışma sonucunda; kontrol grubu ile kıyaslandığında, kontüzyon uygulanan grupta, kontrol grubunda gözlenmeyen apoptotik hücrelerin mevcudiyeti tespit edildi. Fakat bu hücrelerin bir kısmının pnömosit dizileri içinde olmasına rağmen çoğunlukla interstisyel dokuda tespit edilmesi bu apoptotik hücrelerin nötrofil veya lenfosit kaynaklı olabileceği ihtimalini düşündürdü (Şekil 3a, b). Hiperbarik oksijen grubu ile kontüzyon grubunun karşılaştırılması sonucu, apoptozis yönünden nispi bir azalma tespit edildi (Şekil 3c). Tek seans HBO alan sıçanlar ile 2. ve 3. seans HBO uygulanan sıçanlar arasında ise anlamlı bir farklılık tespit edilmedi.

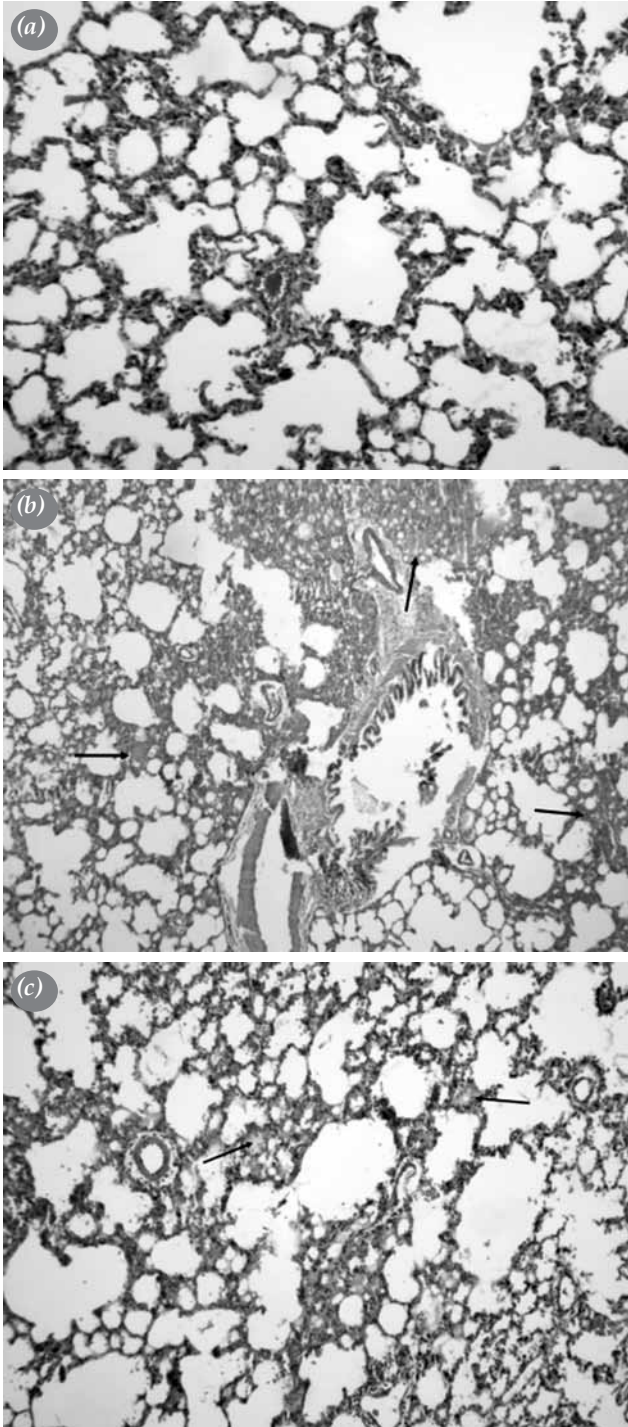
## TARTIŞMA

Farklı akut akciğer hasarı modellerinde TNF- $\alpha$ 'nın anahtar patofizyolojik rol oynadığı gösterilmiştir.<sup>[4,7]</sup> Akciğer hasarı, TNF- $\alpha$  gibi proinflamatuvar sitokinlerin salınımını sağlayan nötrofil ve makrofajları direkt olarak aktive ederken, nötrofiller tarafından salınan diğer inflamatuvar ürünleri de etkiler. Ayrıca nötrofil ile vasküler endotel arasındaki irtibata etki ederek nötrofil bağımlı vasküler permeabilitede artışa yol açar.<sup>[13]</sup> Chu ve ark.<sup>[7]</sup> oluşturdukları akut akciğer hasarı modellerinde, BAL sıvısında ve plazmada TNF- $\alpha$  konsantrasyonunun arttığını ve HBO'nun TNF- $\alpha$  üretimini baskıladığını göstermişlerdir. Yazarlar HBO'nun akciğer dokusunda nötrofil infiltrasyonunu azalttığını, aynı şekilde TNF- $\alpha$  salınımını düşürdüğünü bildirmişlerdir. Çalışmamızda, kontüzyon oluşturulan sıçanlarda TNF- $\alpha$  düzeylerinde anlamlı bir artış olduğunu tespit edildi. Bu sonuç, TNF- $\alpha$ 'nın kontüzyonun neden olduğu akciğer hasarında rolü olduğunu bir kez daha ispatlamaktadır. Analiz sonuçları bize, kontüzyondan 24 saat sonra ölçülen TNF- $\alpha$  düzeylerinin 48 saat sonra minimal azaldığını, fakat 72 saat sonra yine aynı seviyelerde kaldığını gösterdi. Bu durum kontüzyon sonrası erken yanıt ile TNF- $\alpha$  üzerinden etkili mekanizmaların hızlı bir progresyondan daha ziyade daha yavaş seyirli bir inflamatuvar süreç eşliğinde aktif olduğunu düşündürmektedir. Hiperbarik oksijen TNF- $\alpha$  değerlerinde ciddi bir azalmaya neden oldu. Bu sonuç literatür verileri ile uyumlu olacak şekilde, hiperbarik oksijenin kontüzyonun yol açtığı inflamatuvar yanıtta anahtar rol oynayan bir medyatör olan TNF- $\alpha$ 'yı baskıladığını ve böylece en azından bu mekanizma üzerinden kontüzyonun yıkıcı etkilerini azalttığını yansıtmaktadır.<sup>[7]</sup> Doz-süre ilişkisi bakımından irdelendiğinde ise, ilk seans HBO uygulanan sıçanların akciğer dokusu TNF- $\alpha$  düzeyleri ile 2. ve 3. seans HBO uygulanan sıçanlardaki TNF- $\alpha$  düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilmemesi, HBO'nun en azından TNF- $\alpha$  üzerine etkisinin doz ve süre bağımlı olmaması ile açıklanabilir.

**Tablo 2. Histopatolojik sonuçlar açısından kontrol ve kontüzyon grubu ile kontüzyon alt grupları ve hiperbarik oksijen alt grupları arasındaki ortalama ve istatistiksel karşılaştırma**

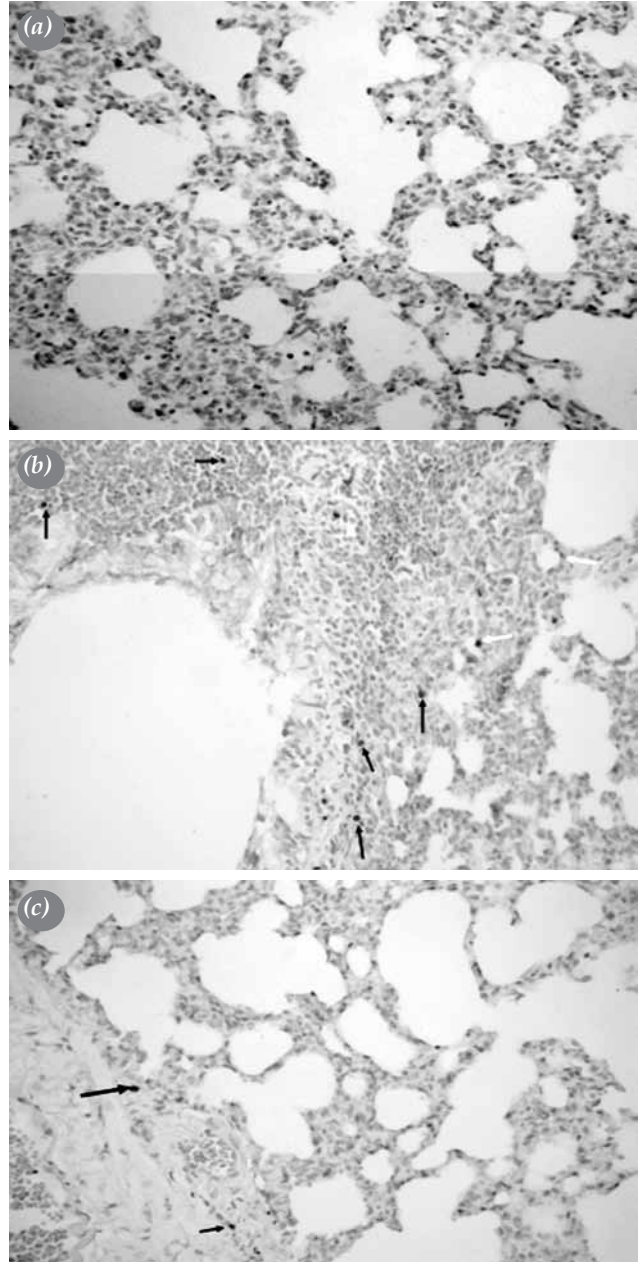
Histopatolojik parametreler	Kontrol/kontüzyon-I	Kontüzyon-I/HBO-I	Kontüzyon-II/HBO-II	Kontüzyon-III/HBO-III
Alveoler hemoraji	0/1.8 p=0.007	1.8/1.8 p>0.05	1.5/1 p=0.215	1.8/1 p=0.069
Alveoler ödem/konjesyon	0.7/3 p=0.001	3/2.2 p=0.048	2.6/2.2 p=0.30	2.5/2 p=0.116
Alveoler distrüpsiyon	0.2/1.6 p=0.004	1.6/1.1 p>0.05	1.3/1.3 p=0.110	1.6/1.3 p=0.108
Lökositik sekestrasyon	0/2 p=0.001	2/1.3 p>0.05	1.8/1.1 p=0.859	1.4/0.8 p=0.108

HBO: Hiperbarik oksijen.



**Şekil 2.** (a) Kontüzyon uygulanmayan normal akciğer dokusu (H-E x 100). (b) Kontüzyona uğramış akciğer dokusu (H-E x 100). (c) Kontüzyondan sonra tek seans hiperbarik oksijen tedavisi uygulanmış akciğer dokusu (H-E x 100).

Akut akciğer hasarına yol açan PK gibi durumlarda alveoler makrofajların süperoksit radikalleri adı verilen potent serbest oksijen radikallerini (SOR) ve peroksinitriti üretebildiği bilinmektedir.<sup>[14]</sup> Salınan bu SOR, lipid



**Şekil 3.** (a) Kontrol grubunda apoptozis çalışması (x100). (b) Kontüzyon grubunda interstisyel alanda apoptotik hücreler (siyah oklar), pnömosit dizileri arasında (beyaz oklar) (x100). (c) Tek seans hiperbarik oksijen alan alt grupta apoptotik hücreler (x400). Apoptozisin immünohistokimyasal gösterimi TUNEL (ApopTag® Plus Peroxidase, In Situ Apoptosis Detection Kit, Chemicon International, Temecula, CA 92590) boyama yöntemi ile elde edilmiştir.

peroksidasyonu yoluyla oksidatif hasara neden olabilmektedir. Diğer taraftan, uzun süreli hiperoksinin normal dokulara, kısmen nöronlara, pnömositlere ve pulmoner endotel için toksik etkilere sahip olduğu gösterilmiştir. Hiperbarik hiperoksinin in vivo oksijenin toksitesini artırdığı ve bu etkinin reaktif oksijen radikalleri

ile ilişkili olduğu düşünülmektedir.<sup>[15]</sup> Perng ve ark.nın<sup>[8]</sup> akut akciğer hasarı çalışmaları kan ve akciğer dokusunda MDA artışını ve HBO'nun akciğer dokusunda MDA miktarını düşürdüğünü göstermektedir. Lakin bu düşüş serum düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Hiperbarik oksijenin oksidatif strese neden olduğunun bilinmesine karşın moleküler mekanizması açık değildir. Bununla birlikte reaktif molekülleri özellikle süperoksit ve hidrojen peroksiti stimüle eden HBO'nun bir takım yararlı etkileri olabileceği ifade edilmiştir.<sup>[16]</sup> Noda ve ark.nın<sup>[17]</sup> yaptıkları bir çalışma HBO nedenli dokuda artış gösteren lipid peroksidlerinin ekspozürden üç saat sonra tespit edilmediğini göstermiştir. Bu çalışmalardan günümüze kadar HBO'nun oksidatif etkisinin sürekliliğine ilişkin ilave ayrıntı veren veriler bulunmamaktadır. Çalışmamızda MDA seviyelerinin kontrol grubuna kıyasla kontüzyondan sonra anlamlı oranda artış göstermesi, kontüzyon nedeni ile aktive olduğunu düşündüğümüz oksidatif stres ve lipid peroksidasyonunun indirekt bir bulgusudur. Bu durum, akut akciğer hasarına neden olan kontüzyon sırasında aktive olan nötrofil ve makrofajların yanı sıra reaktif oksijen metabolitlerinin de diğer taraftan hasarı artırıcı etkilerinin olduğunu kanıtlamaktadır. Çalışmamızda kontüzyon uygulandıktan 24 saat sonra yapılan MDA analizi ile 48. ve 72. saatlerde yapılan MDA analizleri arasında da orantısız bir azalma trendi tespit edildi. Yani ilk 24 saat içinde oksidatif stresin maksimum düzeyde olduğu ve bu durumun zamanla tedricen azaldığı gözlemlendi. Hiperbarik oksijen uygulanan grupta istatistiksel olarak anlamlı olmasa da MDA değerlerinin düşüş göstermesi kontüzyon ile mücadelede kullanım alanı olabileceğini göstermektedir. Diğer taraftan ardışık uyguladığımız HBO seansları açısından analiz edildiğinde arada anlamlı bir fark tespit edilmemesi, bu konu üzerinde değişik doz ve sürede yeni denemelere gereksinim olduğu gerçeğini ortaya koymaktadır.

Histopatolojik açıdan bakıldığında, kontüze akciğerdeki değişiklikler maruz kalınan travmanın şiddeti ile orantılı olmakla birlikte intraalveoler hemoraji, alveoler distrüpsiyon, alveoler ödem ve konjesyondan ibarettir. Kontüzyondan sonraki akut histopatolojik değişikliklerin analiz edildiği bir çalışmada künt travmadan sonraki 24. saatte yoğun lökositik infiltrasyonun tabloya eşlik ettiği bildirilmiştir.<sup>[10]</sup> Hiperbarik oksijenin akciğer hasarı sonrasında akciğer dokusundaki lökosit infiltrasyonunu ve alveoler septa kalınlaşmasını azalttığı gösterilmiştir.<sup>[8]</sup> Çalışmamızda kontüze sıçan akciğerinde intraalveoler hemoraji, alveol yırtılması, alveoler ödem ve konjesyon gibi her bir parametrenin istatistiksel olarak anlamlı şekilde artış gösterdiği tespit edildi. Lökosit sekestrasyonu için kullandığımız skorlama sistemi de yine kontüzyon grubunda lökositik infiltrasyonun kontü-

rol grubuna oranla anlamlı şekilde artmış olduğunu ortaya koydu. Bu sonuçlar, hem akut yıkıcı etkiyi hem de MPO artışını gösterdiğimiz kontüze akciğer dokusunda histopatolojik olarak da lökosit infiltrasyonunda artış olduğunu teyit etmektedir. Bu da kontüzyonun direkt doku hasarı yanında sekonder etkiler ile aktive olan inflamatuvar yanıtın bir göstergesidir. İkinci ve üçüncü kontüzyon alt gruplarında, lökositik infiltrasyon yönünden anlamlı olmasa da bir azalma eğilimi tespit ettik. Bu veri, kontüzyondan sonraki 48. saatten itibaren anti-inflamatuvar mekanizmanın devreye girdiğini göstermektedir. Histopatolojik sonuçlar açısından kontrol grubu ile HBO alt grupları kıyaslandığında ise, HBO alt gruplarında sadece alveoler ödem/konjesyon açısından istatistiksel olarak anlamlı bir azalma tespit edildi. Doz-süre açısından bakıldığında, tek seans HBO uygulanan alt grupta özellikle lökositik sekestrasyonun belirgin düzeyde azaldığı, bunun yanında 2. ve 3. seans HBO uygulanan grupta ise çok anlamlı bir değişiklik olmadığı görüldü. Bu da tek doz HBO'nun anti-ödem ve anti-inflamatuvar etkileri ile PK'deki ikincil inflamatuvar yanıtı inhibe ederek akciğer hasarını azaltabileceğini göstermektedir.

Liener ve ark.,<sup>[13]</sup> künt göğüs travmasının apoptozisi indüklediğini bildirmiş ve PK'yi takiben akciğerde apoptozisin başladığına dair ilk kanıtları sunmuşlardır. Ancak bu çalışmada, göğüs travmalı sıçanlarda sistemik hipoksiye rağmen apoptotik karaciğer hücresinde artış belgelenmemiştir. Bu nedenle programlanmış hücre ölümünün indüksiyonunda lokal mekanizmaların sorumlu olabileceği öngörülmüştür. Oksidatif stresin, nitrik oksit ve iskeminin apoptozisi indükleyen faktörler olduğu ve apoptozise masif SOR'nin üretiminin neden olduğu ifade edilmiştir.<sup>[18,19]</sup> Akciğerde SOR'nin kaynağı olarak bilinen infiltrat PMN'lerin yükselen MPO düzeyleri bu hipotezin altında yatmaktadır.<sup>[13]</sup> Nötrofiller kısa ömürlü hücrelerdir ve apoptozisin irdelendiği dokuda karıştırıcı faktör olabilirler.<sup>[20]</sup> Bu potansiyel tuzağa rağmen, farklı travma tiplerini takiben oluşan apoptozise odaklanan birçok çalışmada, ilgilenilen dokudaki nötrofil birikimi saptanamamıştır.<sup>[18,21,22]</sup> Liener ve ark.<sup>[13]</sup> bu nedenle MPO aktivitesini ölçerek dikkatlerini akciğer dokusundaki PMNL infiltrasyonunun büyüklüğüne yöneltmişlerdir. Yazarlar, büyük hava yolları etrafındaki bölgelerde bazen morfolojik yapı kaybolduğundan ve MPO aktivitesi arttığından akciğer dokusundaki birçok apoptotik hücrenin nötrofil kökenli olabileceğini bildirmişlerdir. Çalışmamızda, kontüzyon grubunda kontrol grubuna kıyasla MPO aktivitesindeki anlamlı artışın ve PK'deki inflamatuvar erken yanıtın patogeneze kesinlikle aktif rolü olduğu bir kez daha teyit edildi. İlginç şekilde, histopatolojik olarak da teyit edildiği üzere, kontüzyondan 24 saat sonra ölçülen MPO aktivitesi



ile 48. ve 72. saatlerdeki MPO aktiviteleri arasında anlamlı olduğunu düşündüğümüz ters bir ilişki vardı. Yani, kontüzyon söz konusu olduğunda, tedavi uygulanmasa bile belli oranlarda aktive olan anti-inflamatuvar mekanizmalarla spontan bir onarım sürecinden bahsedebiliriz. Hiperbarik oksijen verdiğimiz sıçanlar ile kıyaslandığında, MPO aktivitesindeki anlamlı olmayan fakat azalma şeklindeki yanıtın, HBO'nun en azından organizmaya ek bir yük getirmediği ve MPO aktivitesindeki spontan azalma hızından daha etkili şekilde MPO'yu azaltması kontüzyon tedavisinde alternatif bir ajan olabileceği konusunda ileri çalışmalar yapılması gerektiği görüşümüzü desteklemektedir. Çalışmamızda kontüzyon uygulanmış akciğer dokusunda apoptozis mevcudiyetinin gösterilmiş olması, kontüzyonun apoptozisi indüklediğini göstermektedir. Fakat burada altını çizmemiz gereken nokta, apoptotik hücrelerin ağırlıklı olarak parenkim hücre dizileri içinde görülmesi beklenirken, intertisyumda izlenmesidir. Preparatlarda nötröfil invazyonunun olması nedeni ile bu apoptotik hücrelerin apoptozis boyası tutan lökositler olduğunu düşünmekteyiz. Akciğer parenkim hücre dizileri arasında kalan apoptotik hücrelerin asıl dikkate almamız gereken hücreler olduğunu düşünmekteyiz. Apoptotik hücre ayırımını bu şekilde yapmış olmamıza rağmen lökositik hücrelerin ayırımında sitokeratin 18 boyasının daha etkin bir çözüm olduğu bilinmektedir. Hiperbarik oksijen gruplarında, kontüzyon grubu ile kıyaslandığında apoptozis yönünden çok ciddi olmayan bir azalma tespit ettik. Fakat bunun beklentilerin altında bir azalma olduğunu söyleyebiliriz. Hiperbarik oksijenin apoptotik hücre ölümünü azalttığına inanmakla birlikte, bu etkiyi gözlemlemek için daha uzun süreçlerde gözlem yapılmasının faydalı olabileceğini düşünmekteyiz.

### **Çıkar çakışması beyanı**

Yazarlar bu yazının hazırlanması ve yayınlanması aşamasında herhangi bir çıkar çakışması olmadığını beyan etmişlerdir.

### **Finansman**

Yazarlar bu yazının araştırma ve yazarlık sürecinde herhangi bir finansal destek almadıklarını beyan etmişlerdir.

### **KAYNAKLAR**

1. Simon B, Ebert J, Bokhori F. Practice management guideline for pulmonary contusion-flail chest. Charleston (SC): EAST Practice Management Workgroup for Pulmonary Contusion-Flail Chest; 2006.
2. Miller PR, Croce MA, Bee TK, Qaisi WG, Smith CP, Collins GL, et al. ARDS after pulmonary contusion: accurate measurement of contusion volume identifies high-risk patients. *J Trauma* 2001;51:223-8.
3. Raghavendran K, Davidson BA, Helinski JD, Marschke CJ, Manderscheid P, Woytash JA, et al. A rat model for isolated bilateral lung contusion from blunt chest trauma. *Anesth Analg* 2005;101:1482-9.
4. Knöferl MW, Liener UC, Seitz DH, Perl M, Brückner UB, Kinzl L, et al. Cardiopulmonary, histological, and inflammatory alterations after lung contusion in a novel mouse model of blunt chest trauma. *Shock* 2003;19:519-25.
5. Rogatsky GG, Mayevsky A. The life-saving effect of hyperbaric oxygenation during early-phase severe blunt chest injuries. *Undersea Hyperb Med* 2007;34:75-81.
6. Gill AL, Bell CN. Hyperbaric oxygen: its uses, mechanisms of action and outcomes. *QJM* 2004;97:385-95.
7. Chu SJ, Li MH, Hsu CW, Tsai SH, Lin SH, Huang KL. Influence of hyperbaric oxygen on tumor necrosis factor-alpha and nitric oxide production in endotoxin-induced acute lung injury in rats. *Pulm Pharmacol Ther* 2007;20:684-90.
8. Perng WC, Wu CP, Chu SJ, Kang BH, Huang KL. Effect of hyperbaric oxygen on endotoxin-induced lung injury in rats. *Shock* 2004;21:370-5.
9. Zhang Q, Chang Q, Cox RA, Gong X, Gould LJ. Hyperbaric oxygen attenuates apoptosis and decreases inflammation in an ischemic wound model. *J Invest Dermatol* 2008;128:2102-12.
10. Miljkovic-Lolic M, Silbergleit R, Fiskum G, Rosenthal RE. Neuroprotective effects of hyperbaric oxygen treatment in experimental focal cerebral ischemia are associated with reduced brain leukocyte myeloperoxidase activity. *Brain Res* 2003;971:90-4.
11. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951;193:265-75.
12. Sträter J, Walczak H, Krammer PH, Möller P. Simultaneous in situ detection of mRNA and apoptotic cells by combined hybridization and TUNEL. *J Histochem Cytochem* 1996;44:1497-9.
13. Liener UC, Knöferl MW, Sträter J, Barth TF, Pauser EM, Nüssler AK, et al. Induction of apoptosis following blunt chest trauma. *Shock* 2003;20:511-6.
14. Ischiropoulos H, Zhu L, Beckman JS. Peroxynitrite formation from macrophage-derived nitric oxide. *Arch Biochem Biophys* 1992;298:446-51.
15. Ay H, Topal T, Uysal B, Ozler M, Oter S, Korkmaz A, et al. Time-dependent course of hyperbaric oxygen-induced oxidative effects in rat lung and erythrocytes. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2007;34:787-91.
16. Hink J, Jansen E. Are superoxide and/or hydrogen peroxide responsible for some of the beneficial effects of hyperbaric oxygen therapy? *Med Hypotheses* 2001;57:764-9.
17. Noda Y, McGeer PL, McGeer EG. Lipid peroxide distribution in brain and the effect of hyperbaric oxygen. *J Neurochem* 1983;40:1329-32.
18. Ikeda H, Suzuki Y, Suzuki M, Koike M, Tamura J, Tong J, et al. Apoptosis is a major mode of cell death caused by ischaemia and ischaemia/reperfusion injury to the rat intestinal epithelium. *Gut* 1998;42:530-7.
19. Satake K, Matsuyama Y, Kamiya M, Kawakami H, Iwata H, Adachi K, et al. Nitric oxide via macrophage iNOS induces

- apoptosis following traumatic spinal cord injury. *Brain Res Mol Brain Res* 2000;85:114-22.
20. Newman SL, Henson JE, Henson PM. Phagocytosis of senescent neutrophils by human monocyte-derived macrophages and rabbit inflammatory macrophages. *J Exp Med* 1982;156:430-42.
21. Hiramatsu M, Hotchkiss RS, Karl IE, Buchman TG. Cecal ligation and puncture (CLP) induces apoptosis in thymus, spleen, lung, and gut by an endotoxin and TNF-independent pathway. *Shock* 1997;7:247-53.
22. Magnotti LJ, Upperman JS, Xu DZ, Lu Q, Deitch EA. Gut-derived mesenteric lymph but not portal blood increases endothelial cell permeability and promotes lung injury after hemorrhagic shock. *Ann Surg* 1998;228:518-27.