

**T.C.**  
**PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ**  
**TIP FAKÜLTESİ**  
**KALP VE DAMAR CERRAHİSİ**  
**ANABİLİM DALI**

**ALT EKSTREMİTE İSKEMİSİ SONRASI**  
**REPERFÜZYONUN ERKEN SAFHASINDA VENÖZ**  
**KAN UZAKLAŞTIRILMASI VE MANNİTOL**  
**KULLANIMININ**  
**RENAL HASAR ÜZERİNE ETKİSİ**

**UZMANLIK TEZİ**  
**DR. FAHRİ ADALI**

**TEZ DANIŞMANI**  
**DOÇ. DR. İBRAHİM GÖKŞİN**

**DENİZLİ-2009**

Doç.Dr. İbrahim GÖKŞİN danışmanlığında Dr. Fahri ADALI tarafından yapılan "Alt Ekstremitte İskemisi Sonrası Reperfüzyonun Erken Safhasında Venöz Kan Uzaklaştırılması ve Mannitol Kullanımının Renal Hasar Üzerine Etkisi" başlıklı çalışma jürimiz tarafından Kalp ve Damar Cerrahisi Anabilim Dalı UZMANLIK TEZİ olarak kabul edilmiştir.

BAŞKAN Prof.Dr. Ahmet BALTALARLI

ÜYE Doç.Dr. İbrahim GÖKŞİN

ÜYE Doç.Dr. Ali Vefa ÖZCAN

Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylım.

19.02.2010

Z. Ayhan

T.C.

PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ DEKANI

## TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim süresince bilgilerinden ve tecrübelerinden yararlandığım, bana her konuda destek ve yardımlarını esirgemeyen başta Anabilim Dalı başkanımız Prof. Dr. Ahmet Baltalarlı olmak üzere Doç. Dr. İbrahim Gökşin, Doç. Dr. Gökhan Önem, Doç. Dr. Vefa Özcan, Doç. Dr. Mustafa Saçar, Yrd. Doç. Dr. Bilgin Emrecan' a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Asistanlığım süresince birlikte çalıştığım tüm asistan arkadaşlarıma, Kalp ve Damar Cerrahisi hemşire ve personeline teşekkür ederim.

Bu çalışmanın tamamlanmasındaki katkılarından dolayı; özellikle tez danışmanı hocam Doç.Dr. İbrahim Gökşin' e, Patoloji Anabilim Dalı Öğretim üyesi Doç. Dr Metin Akbulut' a, Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyesi Doç. Dr. Yaşar Enli' ye ve Uzm. Barbaros Şahin' e teşekkür ederim.

Ayrıca maddi ve manevi desteklerini benden hiçbir zaman esirgemeyen çok sevgili aileme sonsuz sevgilerimi sunarım.

**Dr. Fahri ADALI**

# İÇİNDEKİLER

	<b>Sayfa No</b>
<b>TEŞEKKÜR</b>	I
<b>TABLolar DİZİNİ</b>	III
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b>	IV
<b>KISALTMALAR DİZİNİ</b>	V
<b>GİRİŞ</b>	1
<b>GENEL BİLGİLER</b>	3
<b>İSKEMİ</b>	3
<b>REPERFÜZYON</b>	4
<b>Serbest Oksijen Radikalleri</b>	5
<b>Komplemanlar</b>	7
<b>Endotelial Faktörler</b>	7
<b>Polimorf Nüveli Lökositler</b>	9
<b>Ksantin Oksidaz</b>	10
<b>Platelet Aktive Edici Faktör</b>	10
<b>Sitokinler</b>	10
<b>ANTIÖKSİDANLAR</b>	11
<b>Antioksidan Enzimler</b>	11
<b>Enzim Olmayan Antioksidanlar</b>	13
<b>Ekzojen Antioksidanlar</b>	13
<b>Diğer Antioksidanlar</b>	14
<b>MYELOPEROKSİDAZ</b>	14
<b>MALONDİALDEHİT</b>	15
<b>GEREÇ VE YÖNTEM</b>	16
<b>BULGULAR</b>	21
<b>TARTIŞMA</b>	24
<b>SONUÇ</b>	30
<b>ÖZET</b>	31
<b>SUMMARY</b>	33
<b>KAYNAKLAR</b>	35

## TABLÖLAR ÇİZELGESİ

		<b>Sayfa No</b>
<b>Tablo-1</b>	Histopatolojik değerlendirme	4
<b>Tablo-2</b>	Biyokimyasal inceleme sonuçları	9
<b>Tablo-3</b>	Gruplardaki histopatolojik değişiklikler	17

## ŞEKİLLER ÇİZELGESİ

		<b>Sayfa No</b>
<b>Şekil-1</b>	İskemide membran hasarının mekanizmaları	20
<b>Şekil-2</b>	Ratlarda batın açılması	21
<b>Şekil-3</b>	Grade I histolojik değişiklikler	22
<b>Şekil-4</b>	Grade II histolojik değişiklikler	23

## KISALTMALAR ÇİZELGESİ

<b>ATP:</b>	Adenozin TriFosfat
<b>CAT:</b>	Katalaz
<b>COX:</b>	Siklooksijenaz
<b>DNA:</b>	Deoksiribo Nükleik Asid
<b>EDCF:</b>	Endotelyal Derived Contracting Faktör
<b>EDRF:</b>	Endotelyal Derived Relaxing Faktör
<b>EDTA:</b>	Etilen Daimin Tetra Asetik Asit
<b>GSH:</b>	Glutasyon
<b>GSH-Px:</b>	Glutasyon Peroksidaz
<b>GSSG:</b>	Okside Glutasyon
<b>GST:</b>	Glutasyon S transferaz
<b>HOCl:</b>	Hipoklorus Radikali
<b>H2O2:</b>	Hidrojen Peroksit
<b>İL:</b>	İnterlökin
<b>İAA:</b>	İnfrarenal Abdominal Aort
<b>İR:</b>	İskemi/Reperfüzyon
<b>LTB4:</b>	Lökotrien B4
<b>MDA:</b>	Malondialdehit
<b>MPO:</b>	Myeloperoksidaz
<b>NADP:</b>	Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat
<b>NO:</b>	Nitrik Oksit
<b>OH-:</b>	Hidroksil Radikali
<b>PAF:</b>	Platelet Aktive Edici Faktör
<b>PLGSH:</b>	Fosfolipit Hidroperoksit Glutasyon
<b>PMNL:</b>	Polimorfonükleer Lökosit
<b>ROS:</b>	Reaktif Oksijen Türevleri
<b>SOD:</b>	Süperoksit Dismutaz
<b>SOR:</b>	Serbest Oksijen Radikali
<b>TNF:</b>	Tümör Nekroz Faktör
<b>TxA2 :</b>	Tromboxan A2

## GİRİŞ

İskemi, dokunun oksijen ve diğer metabolitlere olan ihtiyacının dolaşım tarafından sağlanamaması ve oluşan artık ürünlerin yine dolaşım tarafından uzaklaştırılmaması olarak tanımlanır (1). İskemi, hücrede enerji düzeyinin düşmesine ve toksik metabolitlerin dokuda birikmesine yol açarak hücre disfonksiyonu ve sonrasında hücre ölümüne kadar gidebilen bir dizi biyokimyasal reaksiyonu başlatır (2).

Reperfüzyon ise bu iskemik dokudaki kan dolaşımının yeniden sağlanmasıdır. İskemik bir dokunun reperfüzyonu dokunun oksijen ve diğer metabolik ihtiyaçlarını karşılarken paradoksal olarak dokularda hasar oluşturur (3).

Abdominal aort cerrahisinde, ameliyat sonrası dönemde önemli bir mortalite nedeni olan böbrek yetmezliği, en sık rastlanan komplikasyonlardan birisidir(4). Renal disfonksiyon etyolojisinde, aortik kros klemp ve iskemi reperfüzyon hasarı önemli bir yer tutar (5).

İskemi reperfüzyona (İ/R) bağlı böbrekte oluşan hasarda serbest oksijen radikalleri özellikle sorumlu tutulurken, ksantin oksidaz ise serbest oksijen radikalleri primer kaynağı olarak gösterilmiştir (6, 7, 8, 9). Alt ekstremitte iskemi ve reperfüzyonu sık karşılaşılan ve klinik açıdan önemli bir durumdur. Reperfüzyonla birlikte serbest oksijen radikalleri ve inflamatuvar mediatörlerin etkisiyle hem lokal hem de sistemik hasar oluşumu başlamış olur (6, 10, 11). Kan akımının yeniden sağlanması ekstremitteyi kurtarmasına karşın, multisistem organ disfonksiyonu gelişebilir ve mortaliteye neden olabilir (7). Abdominal ve periferik arter cerrahisi esnasında damar klembi kullanılması ile uzak organlarda hasar ortaya çıkmaktadır. Cerrahi prosedürlerin tamamlanmasının ardından damar klembinin kaldırılması ile dokuların reperfüzyonu sağlanır. Reperfüzyon döneminde meydana gelen doku hasarı iskemik hasardan daha fazladır. Bu fenomen “iskemi/reperfüzyon hasarı” olarak adlandırılmaktadır. İskemik dokuların perfüzyonu ile birlikte iskemik kalan dokularda (özellikle alt ekstremitte kas dokusu) oksijensiz metabolizma sonucunda üretilen laktik asit, K<sup>+</sup>, myoglobin, serbest oksijen radikalleri gibi yıkım ürünlerinin



sistemik dolaşıma karışması, serbest oksijen radikallerinin salınımı artarken nötrofillerin aktivasyonu da tetiklenmiş olur (8). Serbest oksijen radikallerinin salınımı sonrasında lipid peroksidasyon etkinliği de hızlanmaktadır. Damarın klemplenmesi esnasında (iskemi dönemi) sadece distal organlarda hasar oluşmaktadır. Uzak organlarda herhangi bir değişiklik gösterilmemiştir (9). Alt ekstremitelerin iskemi reperfüzyonu sonrası uzak organlarda (Böbrek, akciğer..gibi) hasar oluşmaktadır (7).

Günlük uygulama içerisinde İ/R tıbbın pek çok alanında karşılaşılan bir olaydır. Emboli için potansiyel risk kaynağı miyokard infarktüsü, mitral kapak darlığı, atrial fibrilasyona bağlı gelişen intrakardiyak pıhtılar ayrıca abdominal aort anevrizması, aterooklusif hastalık, abdominal aort klemplenmesi, katater yada tıbbi aletlerin takılması (arterial basınç monitorizasyonu, transluminal angioplasti, intraaortik balon pompası), künt yada penetre direk arterial yaralanmalar, İ/R olayının görüldüğü durumlardan sadece bazılarıdır. Pratikte bütün cerrahi işlemler sırasında dokuların iskemisi ve bunu takiben bir reperfüzyon periyodu vardır. İskemik periodta oluşan metabolitlerin (Serbest oksijen radikalleri, myoglobin, potasyum, laktik asit...vs). reperfüzyonun erken fazında sistemik sirkülasyona katılmadan uzaklaştırılmasının renal hasar üzerine olan etkisi araştırılacaktır.

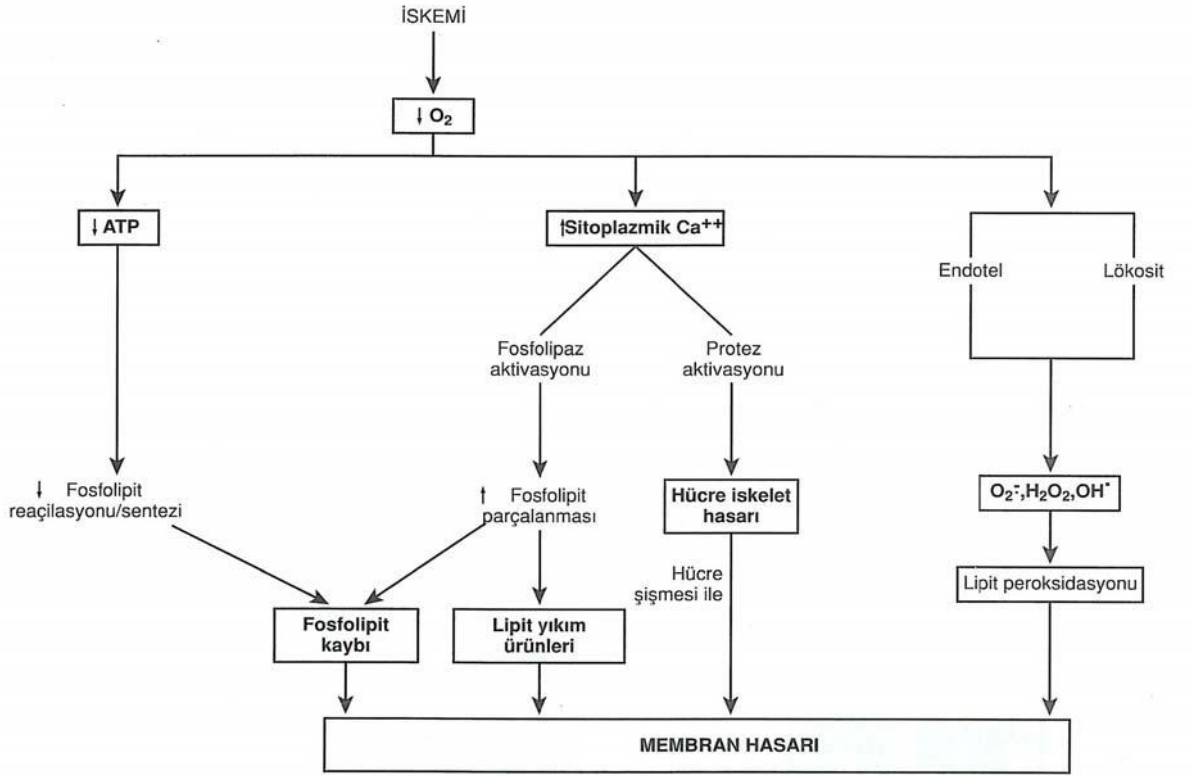
Bu deneysel çalışmamızda; abdominal aortanın belirli bir süre klemplenmesi sonucu oluşturulan geçici iskemi sonrası, reperfüzyonun erken safhasında venöz kan uzaklaştırılması ve mannitol kullanımının renal hasarı önlemede etkisini araştırmak amaçlandı.

## GENEL BİLGİLER

### İSKEMİ

Bir dokuya giden kan akımının yetersiz hale gelmesi veya durması durumunda, dokunun yetersiz perfüzyonu sonucu oksijenden yoksun kalması ve o dokuya ait hücrelerin fonksiyon bozukluğu ile başlayan, hücrelerin bütünlüğünün kaybolması hatta hücre ölümüne kadar ilerleyen bir dizi biyokimyasal olay gerçekleşir (12). Normal hücre fonksiyonları için gerekli olan yüksek enerjili fosfat bağları aerobik metabolizma ile sağlanır. İskemik ortamda anaerobik metabolizma devreye girer. Bu da laktik asit ve toksik metabolitlerin birikimi ile sonuçlanır. Ortaya çıkan asidoz nedeniyle doku adenosin trifosfat (ATP) düzeyi azalır. Bu durumda hücre fonksiyonları için gerekli olan enerjiden yoksun kalır (13, 14, 15).

Dokuların iskemiyeye olan toleransları birbirinden farklılık gösterir. İR herhangi bir organ yada dokuda gelişikten sonra iskeminin süresi, şiddeti ve organın büyüklüğüne bağlı olarak hem o organda hemde uzak organlarda hasar gelişir. İskelet kasları iskemiyeye uzun süre dayanabilirken nöronlarda dakikalar içinde irreversible yıkım meydana gelebilir. Uzamış iske mi hücrede metabolik ve yapısal değişikliklere neden olur. İske mi nedeniyle hücre sel oksidatif fosforilizasyon azalır. Hücre membranında adenosin trifosfat (ATP) bağımlı iyon pompası fonksiyonunun bozulması sonucu hücre içine kalsiyum ( $Ca^{++}$ ), sodyum ( $Na^{+}$ ) ve su girişi artar. İske mi sırasında adenin nükleotid katabolizması sonucu hücre içine hipoksantin birikir. Bu arada endotelde bazı proinflatuar ürünlerin (lökosit adhezyon molekülleri, sitokinler) ve biyoaktif ajanların (endotelin, tromboksan  $A_2$ ) yapımı artarken, diğ er bazı koruyucu ürünlerin (yapısal nitrikoksit sentaz, trombomodulin) ve biyoaktif ajanların (prostosiklin, NO) yapımı baskılanır. Böylece iske mi, daha sonraki reperfüzyon döneminde doku zedelenebilirliğini arttıran proinflatuar bir durum başlatır.



**Şekil 1:** İskemide membran hasarının mekanizmaları

## REPERFÜZYON

Reperfüzyon, iskemiye neden olan etkenlerin ortadan kaldırıldıktan sonra, iskemiye uğrayan doku ya da organların yeniden kanlanması ve oksijenlenmesi olayıdır. Reperfüzyon hasarı ise, iskemi periyodunu izleyen yeniden kanlanma döneminde doku ya da organlarda meydana gelen hasar olarak tanımlanır. Bir dokuda iskemi ve reperfüzyon neticesinde meydana gelen hasar, dokunun aynı sürede sadece iskemiye maruz kalması sonucu oluşan hasardan daha fazladır. Reperfüzyon hasarına doğrudan veya dolaylı olarak katılan pek çok madde ve biyokimyasal reaksiyon tanımlanmıştır. Hücre içine moleküler oksijenin sunumuyla hızla oluşan serbest oksijen radikal (SOR) türevleri en çok suçlanan faktör olmakla birlikte, reperfüzyon hasarından birçok mekanizma sorumlu tutulmuştur (16,17). İskemik dokuda kan akımı yeniden restore edildiğinde iskemi reperfüzyona bağlı olarak meydana gelen hasarın o bölgede sınırlı kalmayıp; renal, kardiyak, ve

pulmoner komplikasyonlara yol açmaktadır. Reperfüzyon hasarına en fazla duyarlı olan hücresel yapılar, membran lipitleri, proteinler, nükleik asitler ve DNA molekülleridir (18).

İ/R hasarının fizyopatolojisi tam olarak açığa kavuşmamış, birbiriyle ilişkileri karmaşık, hücresel ve humoral olaylar dizisidir.

Burada;

1. Serbest oksijen radikalleri
2. Komplemanlar
3. Endotelial faktörler
4. Polimorf nüveli lökositler (PMNL)
5. Ksantin oksidaz
6. Platelet aktive edici faktör (PAF)
7. Sitokinler, olmak üzere başlıca yedi komponentten sözedilebilir.

### **Serbest Oksijen Radikalleri**

Serbest radikaller, dış yörüngelerinde tek sayıda elektron içeren moleküllerdir. Eşlenmemiş elektrona sahip moleküller kararsız bir haldedir. Başka bir molekülle etkileşime girerek, dış yörüngesindeki elektronu eşleme ve stabil duruma gelme eğilimindedirler. Bu moleküller herhangi bir molekül veya atomla ile reaksiyona girerek, elektron alırlar veya verirler. Kimyasal olarak reaktiviteleri yüksek yapılardır (19, 20).

İçinde bulunduğumuz çevrede çeşitli fiziksel etkenler ve kimyasal olaylar nedeniyle devamlı bir radikal yapımı söz konusudur. Canlılarda ciddi miktar ve çeşitlilikte SOR eksojen ve endojen, fizyolojik veya patolojik mekanizmalar sonucu oluşabilir. Canlılarda oluşan serbest radikallerin endojen kaynakları oksijen, nitrik oksid (NO), aktive nötrofil, mitokondriyal elektron transport sistemi, endoplazmik retikulum, peroksisom ve plazma membranıdır.

Oksijenin indirgenmesi ve aerobik hücrelerin enzimatik oksidasyonu sırasında negatif yüklü bir ara ürün olan Süperoksit anyonu ( $O_2^-$ ) oluşur.



Süperoksit radikalinin toksisitesi biyolojik hedeflerle direk reaksiyona girmesiyle oluşabilir. Süperoksit anyonundan süperoksid dismutaz (SOD) enzimiyle veya spontan dismutasyonla ikinci bir ara ürün olan hidrojen peroksit radikali ( $H_2O_2$ ) oluşur ( $O_2^- + 2H^+ \rightarrow H_2O_2$ ). Ardından mitokondride başka bir ürün olan hidroksil radikali ( $OH^-$ ) oluşur. Canlıda bu serbest radikaller haricinde hidrojen peroksit, hipoklorik asit gibi radikal olmayan, fakat serbest radikal oluşturma potansiyeline sahip zararlı oksijen türleri de oluşabilmektedir. Diğerleriyle karşılaştırılığında süperoksit anyonu ( $O_2^-$ ) yüksek elektron aktivitesine sahiptir ve çok reaktiftir. Fakat oksijen radikallerinden en aktif olanı ( $OH^-$ ) radikalidir (12, 21, 22).

### **Serbest Radikallerin Hasar Mekanizması**

Reperfüzyon döneminde meydana gelen serbest radikallere bağlı olarak, hücrenin temel yapı ve fonksiyonlarında farklı derecelerde hasar oluşmaktadır. Bu hasara en fazla duyarlı olan yapılar membran lipidleri, proteinler, nükleik asitler ve DNA molekülleridir (20).

### **Lipid Peroksidasyonu**

Süperoksid radikali ve onun yıkım ürünleri olan hidroksil radikali ile hidrojen peroksit mitokondrium, lizozom ve plazma membranları üzerinde reperfüzyonun en önemli nedeni olan lipid peroksidasyonu vasıtasıyla hücre hasar meydana getirir (23, 24). Hücre membranlarında lipid peroksidasyonu yoluyla meydana gelen hücre hasarı, membran permeabilite artışından hücre lizisine kadar değişebilir (25).

Lipid radikalleri veya malondialdehid gibi peroksidasyon ürünleri aracılığı ile lipid peroksidasyonu, biyolojik membranlarda yaygın hale geldiğinde hücresel yapı ve fonksiyon hasarları meydana gelir. Yapısal hasarın derecesine göre, plazma membranında vizkositenin azalması, membran permeabilitesinin değişmesi, membran potansiyeli azalması, membrana bağlı enzimlerin aktivitesinde azalma gözlenir. Lizozomal ve mitokondrial membranları ilgilendiren ileri derecede lipid peroksidasyonu ile organel içeriğinin hücre içine salınması neticesinde proteoliz hızlanır ve doku hasarını artırır. Membran geçirgenliğinin bozulması ile protein

sentezi için çok önemli olan potasyum ve magnezyum iyonlarının konsantrasyonları değişir ve buna bağlı olarak protein sentezinde inhibisyon oluşur (26, 27).

### **Proteinlerin Oksidasyonu**

Serbest oksijen radikalleri, aminoasit yan zincirleri oksidasyonuna neden olarak protein-protein bağlarının oluşmasına neden olurlar. Bununla birlikte protein yapısında, ana zinciri okside ederek proteinlerin parçalanmasına yol açarlar. Oksidasyon sonucu proteinlerin sekonder ve tersiyer yapılarında oluşan değişiklikler fonksiyonlarını etkilemektedir. Enzim veya reseptör fonksiyonuna sahip membran proteinleri, özellikle serbest radikallerin modifikasyonlarına duyarlı oldukları için protein oksidasyonu ile önemli hücresel ve membran fonksiyonları bozulmaktadır (21, 28).

### **DNA Hasarı**

Serbest oksijen radikallerinin, hücrede etkilediği önemli yapılardan biri de nükleik asitlerdir. Reaktif oksijen radikallerini adenin ve piridin nükleotid durumlarının idamesi için gerekli yollara engel olabilirler. Reaktif oksijen radikalleri DNA ile reaksiyona girerek mutajenik olan 8-Hidroksiguanin'in oluşmasına sebep olurlar (29, 30).

### **Komplemanlar**

İskemi/reperfüzyon kompleman sistemini aktive eder. Komplemanların arka arkaya aktivasyonu, anafatoksin C3a ve C5a'nın üretimine yol açar. Nötrofiller üzerindeki etkileri ise kemotaksis, endotele adhezyonun artışı, serbest oksijen radikallerinin üretim ve salınmasını sağlamaktır (23, 25). Kompleman aktivasyonu sonucu oluşan, proinflamatuvar komponentler bir yandan lokositleri aktive ederken, diğer yandan TNF- $\alpha$ , IL-1 ve IL-6 oluşumunu uyararak inflamatuvar cevabı güçlendirir.

### **Endotelial Faktörler**

Endotelial hücrelerden; EDRF (endotelial derived relaxing faktör) ve EDCF (endotelial derived contracting faktör) denilen vazoaktif maddeler salınmaktadır (31,

32). EDCF; bu grup içinde en önemlileri endotelin ve  $TxA_2$  'dir. EDRF; gurubu içinde en önemlileri nitrik oksit (NO) ve  $PGI_2$  'dir.

Endotelial hücreler iskemi ve reperfüzyonun zararlı etkilerine karşı duyarlıdır. Uzamış hipoksinin membran potansiyelini değiştirdiği, iyonların dağılımını bozduğu, hücre içi hacmi arttırdığı, membran akışkanlığını azalttığı ve endotel hücrelerinin yapısını bozduğu bilinmektedir. Bu değişikliklere enerji depolarının tükenmesi, belirli biyoaktif ajanların üretiminde azalma (prostasiklin, nitrik oksid vb.) ve diğer ajanların üretiminde hızlanma (endotelin, tromboksan  $A_2$  vb.) eşlik etmektedir. Ayrıca, hipoksik endotel hücrelerinde bazı genlerin uyarıldığı (adezyon molekülleri, sitokinler vb.), bazılarının ise (eNOS, trombomodulin vb.) baskılandığı gösterilmiştir (33). Reperfüzyon, hipoksinin neden olduğu endotel hücre yanıtlarının abartılı bir şekilde devamına neden olmaktadır (34).

Prostaglandinler böbrekte çok önemli işlevlere sahiptir.  $PGE_1$ ,  $PGE_2$  ve prostasiklin ( $PGI_2$ ) vazodilatatör etkileri yoluyla glomerülerfiltrasyonu artırır. Bu prostaglandinler aynı zamanda su ve sodyum atılımını da artırır (35).  $PGE_1$ , vazodilatatör bir prostaglandin olup, özellikle iskemi-reperfüzyon deneylerinde hasarlı organda oksijen tüketimini ve süperoksit anyon üretimini azaltır (36, 37). Prostasiklin ( $PGI_2$ ) endotel hücrelerinden serbestlenen ilk vazoaktif ajan ve aynı zamanda endotelial yüzeylerde trombosit agregasyonunu önleyen güçlü bir vazodilatatördür.

Tromboksan  $A_2$  ( $TxA_2$ ), trombosit agregasyonu ve vazokonstrüktör yapıcı etkisi vardır.  $TxA_2$ , iskemi-reperfüzyonda endotel tabakasına nötrofil adhezyonunu indükleyen potent bir kemotaktik maddedir.

Lökotrien  $B_4$  ( $LB_4$ ), iskemi- reperfüzyon süresince endotelial fonksiyon bozukluğunda önemli rol oynar. Endotelin-1 (ET-1), güçlü vazokonstrüktördür.

Nitrik Oksit (NO), L-Argininden nitrik oksit sentetaz enzimi ile oluşan bir EDRF'dir. Güçlü bir vazodilatördür ve trombosit adhezyon ve agregasyonunda inhibitör rolü bulunmaktadır. NO endotel hücresinde sentezlendikten sonra damar

düz kas hücresine difüzyon ile girer. Burada sitozolik enzimlerden soluble guanilat siklazı stimüle eder. Siklik guanozin monofosfat (c-GMP) atar. Artan c-GMP phosphatidyl inositol mekanizması indirek olarak  $Ca^{++}$  kanallarının inhibisyonu yaparak hücre içi  $Ca^{++}$  miktarını düşürür ve vasküler düz kas hücrelerinde relaksasyon oluşturur (38).

İskemi reperfüzyon, endotel hücrelerinde NO ile süperoksit arasındaki dengeyi değiştirerek hem arteriyollerde endotel bağımlı vazodilatasyonda bozulmaya hemde venüllerde akut inflamatuvar yanıtı neden olmaktadır. Radikal olarak reaktivitesi düşüktür fakat özellikle lipid radikallerle reaksiyona girmesi NO'e antioksidan bir özellik kazandırır. Süperoksit ile NO arasındaki reaksiyon ile oluşan peroksinitrit, hidroksil radikali benzeri aktiviteye sahip olup radikalik reaksiyonları başlatmaya ek olarak biyomoleküllerin nitrasyonuna sebep olur. Fizyolojik derişimde üretilen NO, esas olarak oksihemoglobin tarafından nitrata ( $NO_3^-$ ) oksitlenerek aktivitesi sonlandırılır. Oksijen radikallerindeki durumun tersine, nitrik oksiti ortamdaki kaldıran herhangi bir spesifik enzim yoktur. Oksijenli ortamda NO karalı değildir, derişiminin artması ile oksidasyonu hızlanır. Bundan dolayı ortamdaki derişimi ile kendi ömrü arasında ters bir orantı vardır. Özellikle indüklenabilir nitrik oksit sentaz enziminin indüksiyonu sırasında NO derişiminin artması ile oksidasyonu da hızlanır ve farklı reaktif nitrojen oksit türleri meydana gelir. Bu reaktif türler NO'in indirek etkilerinden sorumlu olup; hücrel moleküllerin nitrozilasyonuna, nitrasyonuna, nitrozasyonuna neden olarak proteinlerin ve enzimlerin inaktivasyonuna sebep olabilirler (19).

### **Polimorf Nüveli Lökositler (PNL)**

İskemi reperfüzyon hasarının en önemli hücrel elemanlarıdır. Reperfüze dokular dolaşan nötrofilleri aktive edebilen ve/veya kendine çekebilen inflamatuvar mediyatörler üretir (39, 40, 41). İskemi reperfüzyon lökosit aktivasyonu, kemotaksis ve lökosit endotel hücre adhezyonuna yol açar. Aktive nötrofiller, hücre zarlarındaki NADPH-oksidadaz enzimi aracılığı ile moleküler oksijeni süperoksit iyonuna redüklerler. Süperoksit, genellikle spontan dismutasyonla hidrojen peroksit'e dönüşür. Hidrojen peroksit, klorür iyonlarının varlığında, nötrofillerin azurofilik granüllerinde bulunan myeloperoksidadaz enzimi aracılığı ile hipoklorik asite



redüklenir. Hipoklorik asit kuvvetli bir oksidandır ve çok sayıda biyolojik molekülle kolayca tepkimeye girebilir (17, 42).

Aorta kros klemp koyduktan sonra alınan plazma hem nötrofil hem de endotel adezyon molekül üretimine yol açmaktadır (39).

### **Ksantin Oksidaz**

İskemi sonrası periyotta, iskemiye maruz kalan dokudaki serbest radikallerin primer kaynağı ksantin oksidaz enzimidir. Ksantin oksidaz enzimi “dehidrojenaz” ve “oksidaz” aktivitesine sahip iki halde bulunur. İskemi döneminde ksantin dehidrojenaz enziminin kalsiyum aracılı bir proteaz vasıtasıyla ksantin oksidaza dönüşmesi, intestinal dokuda 10 saniye, kardiyak kasta 8 dakika, böbrek, karaciğer, dalak ve akciğerde 30 dakika sürmektedir. Bu durum farklı dokuların iskemi-reperfüzyon hasarına neden değişik miktarda cevap verdiği konusunda fikir verici olmaktadır. Hipoksantin ve ksantin oksidasyonu serbest radikallerin meydana gelmesine neden olur. (12, 21, 43). Plazma ksantin oksidaz aktivitesi, aortik oklüzyon-reperfüzyonu takiben dramatik bir biçimde artar (44).

### **Platelet Aktive Edici Faktör (PAF)**

İskemi ve reperfüzyon hasarında platelet aktive edici faktör (PAF) de rol oynamaktadır. Reaktif oksijen türevleri (ROS)’nin endotel hücrelerini PAF üretimi yapmak amacıyla indüklediği de gösterilmiştir. PAF güçlü bir nötrofil agonistidir. İR hasarında PAF, nötrofil adezyonunu artırır ve lökositlerin damar dışına çıkmasına yardımcı olur. Pek çok çalışma PAF’ın in vitro ve in vivo ortamda lökositlerin mikrovasküler endotele adhezyonunu arttırdığını göstermiştir. PAF’ın, reperfüzyon sonucu gerçekleşen kemotaksisin bir düzenleyicisi olduğu düşünülmektedir (45).

### **Sitokinler**

Reperfüzyonun ardından, kanda IL-1, IL-6 ve Tümör Nekrozis faktör-a (TNF- $\alpha$ ) gibi sitokinler ortaya çıkar. Bu sitokinlere karşı antagonistler kullanılarak, hem IL-1’in hem de TNF- $\alpha$ ’nın vasküler zedelenmeyi ve endotel adhezyon moleküllerini arttırdıkları gösterilmiştir (12, 14). TNF-alfa 17kDa molekül ağırlığında bir sitokindir. Aktive monosit, makrofaj, mast hücreleri, endotel hücreleri, T hücreleri, B

hücreleri, Kupffer hücreleri gibi farklı hücrelerde üretilir (46). IL-6 molekül ağırlığı 26-kDa olan bir sitokindir. T hücreleri, makrofajlar, monositler, endotel hücreleri, mast hücreleri, kemik iliği stromal hücreleri gibi farklı hücrelerde üretilir (46, 47). Çoklu organ yetmezliği ve sıkıntılı solunum sendromunun patogeneğinde önemli bir faktördür (47, 48).

İskemi–reperfüzyonda sitokin salınımının bilinmesine karşın bu sitokinlerin permeabilite üzerine olan etkilerinin doğrudan mı yoksa hücre adhezyon molekülleri ekspresyonu ve nötrofil adhezyon aktivasyonu vasıtasıyla mı olduğu tam olarak ortaya konamamıştır (49).

## **ANTIOKSIDANLAR**

Serbest oksijen radikallerinin ciddi hasar oluşturma potansiyellerine karşı hücreler, bu toksik ürünleri hızla metabolize edecek savunma sistemleri geliştirmişlerdir. Canlılarda sürekli olarak serbest oksijen radikalleri oluşmasına karşın antioksidan savunma sistemleri ile oksidasyon arasındaki dengeden dolayı zararlı etkiler önlenir. Fizyolojik veya patolojik olaylar neticesinde bu dengenin oksidasyon lehine değişmesi halinde oksidatif hasar oluşabilmektedir.

İskemi-reperfüzyon hasarlanmasını inhibe eden çok sayıda endojen mekanizma bulunmakla birlikte, ekzojen olarak da hasarlanmayı engelleyebilen pek çok sayıda ilaç tanımlanmıştır. Etki mekanizmaları farklı olan ekzojen ve endojen ajanlar aşağıda tanımlanmıştır.

### **Antioksidan Enzimler**

Serbest radikalleri, biyolojik önemi olan moleküllerle reaksiyona girmeden önce daha zararsız bileşiklere dönüştürerek yada başka moleküllerden radikal üretimini inhibe ederek etkilerini gösterirler (21).

a. Mitokondriyal sitokrom enzim sistemi

Solumun zincirinin son enzimi sitokrom oksidaz süperoksidi detoksifiye eder. Bu şekilde yakıt maddelerinin oksidasyonu tamamlanır ve bol enerji üretimi sağlanır. Fakat süperoksid üretimi genellikle bu enzimin kapasitesini geçer bu durumda diğer antioksidanlar devreye girer.

b. Süperoksid dismutaz (SOD)

Süperoksid dismutaz, süperoksidin hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dönüşümünü katalize eder (50). Enzimin fizyolojik fonksiyonu; oksijeni metabolize eden hücreleri süperoksid serbest radikallerinin zararlı etkilerine karşı korumaktır. SOD aktivitesi, yüksek oksijen kullanan dokularda özellikle eritrositlerde yüksektir. Normal metabolizma sırasında süperoksid üretimi fazla olmasına karşın SOD ile intrasellüler süperoksid düzeyi düşük tutulur.

c. Glutasyon peroksidaz (GSH-Px)

Glutasyon peroksidaz hidroperoksitlerin redüklenmesinden sorumlu enzimdir. GSH-Px; tetramerik, dört selenyum atomu içeren sitozolik bir enzimdir. Membran fosfolipid hidroperoksitlerini alkollere indirger. Membrana bağlı en önemli antioksidan olan vitamin E eksikliğinde PLGSH-Px membranı peroksidasyona karşı korur. Hidroperoksitlerin indirgenmesiyle oluşan GSSG, glutasyon redüktazın katalizlediği reaksiyonla tekrar GSH' ye dönüşür (51).

GSH-Px solunum patlaması sırasında serbest radikal peroksidasyonu sonucu fagositik hücrelerin zarar görmesini önler. Eritrositlerde de GSH-Px oksidan strese karşı antioksidandır. GSH-Px aktivitesinde azalma hidrojen peroksitin artmasına ve şiddetli hücre hasarına neden olur (51).

d. Katalaz (CAT)

Dört tane hem grubu içeren bir hemoproteindir. Hidrojen peroksiti oksijen ve suya parçalar. Eritrositler yüksek miktarda katalaz içerirler ve katalaz aktivitesinin %98'den fazlasını sağlarlar. Peroksidaz aktivitesi yanında bir hidrojen peroksiti elektron verici bir substrat olarak, diğerini de oksidan ve elektron alıcısı olarak kullanabilir (52).

e. Glutasyon-S-transferaz (GST)

Araşidonik asit ve linoleat hidroperoksitleri başta olmak üzere lipid peroksitlerine karşı GST'lar selenyum bağımsız GSH-Px aktivitesiyle bir savunma mekanizması meydana getirirler.

GST'lar antioksidan özellikleri yanısıra karaciğerde sitokrom p-450 enzim sistemi ile detoksifikasyona yardımcı olurlar. Bunun yanısıra hücre içi bağlayıcı ve taşıyıcısı, prostoglandin izomeraz etkisi, LTC<sub>4</sub> (Lökotrien C<sub>4</sub>) sentezi ve genotoksik ajanların detoksifikasyonu gibi başka fonksiyonları vardır (53).

### **Enzim olmayan antioksidanlar**

1- Lipid fazda bulunanlar

$\alpha$ -tokoferol ve  $\beta$ -karoten

2- Sıvı fazda (hücre sitozolünde veya kan plazmasında bulunanlar): Askorbik asit, melatonin, urat, sistein, seruloplazmin, transferin, laktoferrin, myoglobin, hemoglobin, ferritin, metiyonin, albümin, bilirubin, glutatyon.

### **Ekzojen Antioksidanlar**

#### **İlaçlar:**

1- Ksantin Oksidaz İnhibitörleri:

Allopürinol

Oksiprinol

2- NADPH Oksidaz inhibitörleri: Adenozin, lokal anestezipler, kalsiyum kanal blokerleri, nonsteroid Antiinflatuar ilaçlar vs.

3- Rekombinant Süperoksid dismutaz

4- Trolox-C: E vitamini analogudur.

5- Endojen antioksidan aktiviteyi arttıran maddeler: GSH-Px aktivitesini arttıranlar (asetilsistein)

8- Diğer nonenzimatik serbest radikal toplayıcıları

Mannitol, 6 karbonlu şeker, molekül ağırlığı 182 dalton olan ve idrarla vücutta metabolize olmadan atılan polisakkarit yapısında bir ajandır. Osmolaritesi 1098 mosm/L dir. Mannitol, hidroksil radikallerini mannitol serbest radikallerine dönüştürür. Bunlar da daha sonra diğer mannitol serbest radikalleri ile reaksiyon vererek stabil reaktif olmayan mannitol dimerlerini oluşturur (54). Etki mekanizması;

intratübüler idrar akımını artırır, tübüler obstrüksiyonu azaltır; reaktif oksijen moleküllerine karşı “scavenger” görevi yaparak hücre hasarını azaltır. Yan etki olarak hipervolemi ve pulmoner ödeme neden olabilir.

Albümin, serbest sülfidril grupları ile lipit hidroperoksidler üzerinde süpürücü etki ve peroksidaz benzeri etki gösterir (55).

9- Demir redoks döngüsü inhibitörleri: Desferroksamin, seruloplazmin

10- Demir şelatörleri

11- Nötrofil adhezyon inhibitörleri

### **Diğer Antioksidanlar**

1- Karotenoidler

2- Melatonin

3- Glutatyon

4- Ürat

5- Sistein

6- Albümin

7- Serüloplazmin

### **MYELOPEROKSİDAZ (MPO)**

Serbest oksijen radikalleri hem dokuya doğrudan zarar vermekte hem de PMNL'lerin hasarlı dokuda birikmesini sağlamaktadır. Nötrofil ve monositler primer lizozomal granüllerinde bir HEM enzimi olan MPO ihtiva ederler. Nötrofiller dolaşımında bulunan PMNL'lerin % 90'ından fazlasını oluşturular. Kompleman fragmanları, hidroksil radikaller, ROS ve sitokinler gibi uyarılar nötrofil aktivasyonuna neden olur. Dokuya gelen aktive PMNL'ler; MPO, elastaz, proteaz, kollajenaz , laktoferrin ve katyonik proteinler gibi enzimlerini açığa çıkarırlar. Bu enzimler hem dokudaki hasarı artırır, hem de daha fazla radikal oluşmasına neden olurlar.

MPO çeşitli bileşikleri (elektron ya da hidrojen donörleri) okside edebilen bir enzim substrat kompleksi oluşturmak için, substratı olan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile birleşir ve bunların oksidasyonu sonucu, çeşitli yollarla organizmayı etkileyebilen toksik ajanlar meydana getir ve bunlar hücre ölümüne yol açarlar. Nötrofillerin primer fonksiyonu fagositoz ve mikroorganizmaların sindirimi olmasına rağmen bu hücrelerden toksik ajanların sızıntısı veya sekresyonu yakın hücrelere zarar verir. Fagositik kaynaklı oksidanlar ototoksik, immünoşüpresif ve mutajenik etkiler gösterirler (56).

### **MALONDİALDEHİT (MDA)**

Serbest radikallerin en hasar verici etkisi, poliansatüre yağ asitleri ve fosfolipidden oluşan hücre membranları üzerine olmaktadır. Oksijen serbest radikalleri lipid peroksidasyonunu indükleyerek fonksiyonel ve yapısal hücre hasarına neden olur (24). Lipid peroksidasyonu, lipid moleküllerindeki iki ansatüre bağ arasında yerleşmiş metilen grubundan bir hidrojen atomunun çıkması ile başlatılan kompleks bir fenomendir. Sonuçta yeni bir karbon merkezli lipid serbest radikali oluşur. Oksijen varlığında bu yeni lipid serbest radikalinden lipid peroksitler veya hidroperoksitler oluşmaktadır. Bu son ürünler nispeten daha stabil bir son ürün olan ve lipid peroksidasyonunun markeri olarak kullanılabilen malondialdehite dönüşür (57).

## GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmamızda, Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu onayı alındıktan sonra ağırlıkları 200- 300 gr arasında değişen 30 adet dişi Wistar albino rat, eşit sayıda (n = 6) ve rastgele olarak beş gruptan birine dahil edildi. Opere edilecek ratlar bir gece önce aç bırakılarak sadece su ile beslenmeleri sağlandı.

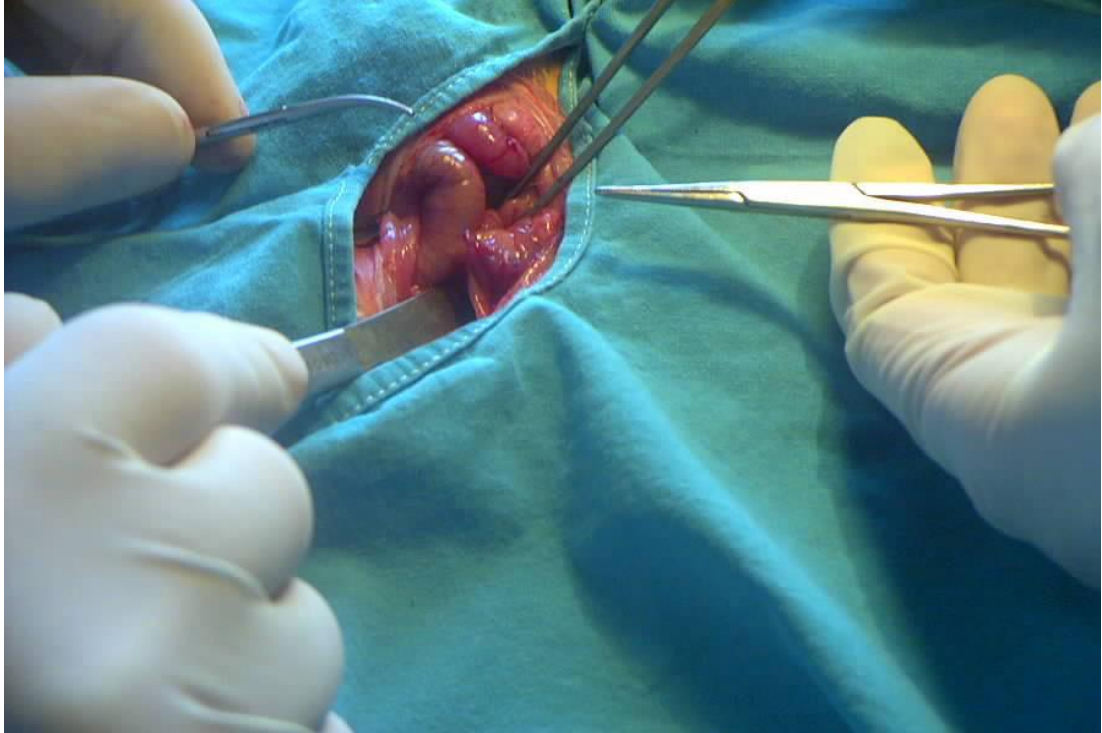
Biyokimyasal ölçümler Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Biyokimya Kliniğinde yapıldı. Çalışmada cerrahi aletler kullanıldı. Alınan sol böbrek örnekleri biyokimyasal değerlendirmeler için -20 °C de saklandı.

Histopatolojik ölçümler Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Patoloji Kliniğinde yapıldı. Alınan sağ böbrek örnekleri histopatolojik değerlendirmeler için %10 formolinle tespit edildi.

### **Aortik İskemi-Reperfüzyon Tekniği**

Deney başlangıcında, intraperitoneal enjeksiyonla, 90 mg/kg dozda ketamine hydrochloride ve 10 mg/kg dozda xylazin verilerek anestezi sağlandı. İşlem boyunca ratlar solunumları spontan olarak devam edecek şekilde uyutuldu. Ratlara supin pozisyon verildi. Cilt aseptik olarak hazırlandı. Her bir rata subcutan 75 İÜ heparin yapıldı. Sıvı dengesini korumak amacıyla, 5 ml lik serum fizyolojik ense bölgesi cilt altına verildi. Anestezi sonrasında batın ksifoidin hemen altından pubisin 0.5 cm üzerine kadar yaklaşık 4 cm'lik orta hattan laparotomi ile açıldı. Islak gaz ile barsaklar sola çekilerek abdominal aortaya ulaşıldı (grup I, II, III, IV, V). infrarenal abdominal aortaya (İAA) travmatik olmayan bir mikrovasküler klemp (vascu-statts II, midi straight 1001-532; Scanlan Int., St. Paul, MN, USA) konuldu (grup II, III, IV, V). Isı ve sıvı kaybını en az miktara indirmek için batın insizyonu kapatıldı. Solunumlarının rahat olması için ratlar yan taraflarına yatırıldılar. 180 dakika sonra sıvı dengesini korumak amacıyla, tekrar 3 ml lik serum fizyolojik ense bölgesi cilt altına verildi. Ardından batın açılarak İAA daki mikrovasküler klemp kaldırıldı (grup II, III, IV, V). VCI dan insülin enjektörü ile 1 cc venöz kan alındı (grup III, V) ve ardından 1 cc mannitol verildi (grup IV, V). İnsülin enjektörü ile işlem yapılan VCI

daki alan kanamayı önlemek amacıyla 8.0 propilen (Prolen, Ethicon UK® ) suture ile psoas kasına tamponedecek şekilde suture edilerek hemostaz saglandı. 120 dakika süreyle reperfüzyon saglandı. 2 saatlik reperfüzyon sonrası, tüm ratlar anestezi altında sakrifiye edildi ve böbrekleri abdomenden çıkartıldı. Böbrekler, biyokimyasal incelemeler yapılıncaya kadar -20°C. de saklandı. Böbrek dokusunda miyeloperoksidaz (MPO), süperoksit dismutaz (SOD), Gutasyon peroksidaz (GSH) aktiviteleri ve malondialdehit (MDA) düzeyleri ölçüldü. Aynı zaman diliminde, laparotomi sonrası İAA diseksiyonu yapıp İAA oklüzyonu yapılan ratlar (grup II) deney için kontrol grubu olarak kabul edildi.



**Şekil 2:** Ratlarda batın açılması

### **Deney grupları**

Çalışmaya toplam 30 denek alınarak 6'şarlı 5 gruba ayrıldı.

Grup I (SHAM): Laparotomi ve İAA diseksiyonu yapıldı ancak İAA oklüzyonu yapılmadı.

Grup II (KONTROL GRUBU): Laparotomi, İAA diseksiyonu, 3 saat süreyle İAA oklüzyonu ve 2 saat süreyle reperfüzyon yapıldı.



Grup III (VENÖZ KAN UZAKLAŞTIRILAN GRUP ): Laparotomi, İAA diseksiyonu, 3 saat süreyle İAA oklüzyonu ve 2 saat süreyle reperfüzyon yapıldı. Reperfüzyonun erken fazında 1 cc venöz kan alındı.

Grup IV (MANNİTOL GRUBU): Laparotomi, İAA diseksiyonu, 3 saat süreyle İAA oklüzyonu ve 2 saat süreyle reperfüzyon yapıldı. Reperfüzyonun erken fazında 1 cc mannitol verildi.

Grup V (KOMBİNE GRUP): Laparotomi, İAA diseksiyonu, 3 saat süreyle İAA oklüzyonu ve 2 saat süreyle reperfüzyon yapıldı. Reperfüzyonun erken fazında 1 cc venöz kan alınıp 1 cc mannitol verildi.

### **Biyokimyasal İşlemler**

#### **Malondialdehit Ölçümü**

MDA düzeyleri Okhawa yöntemiyle belirlendi (58). Çözülme sonrası her örnek tartıldı, 0.15 N potasyum klorür kullanılarak 10 kez (w/v) homojenize edildi. 0.4 ml homojenat 1.5 ml tiyobarbitürik asit (%0.8), 1.5 ml asetik asit (pH 3.5, %20) ve 0.2 ml sodyum dodesil sülfat (%8.1). Tüm örnekler ve standartlar karıştırıldıktan sonra bir saat 100°C de ısıtıldı. Absorbans 532 nm 'de kaydedildi ve MDA standartlarından elde edilenlerle karşılaştırıldı.

#### **Glutatyon Düzeyinin Ölçümü**

GSH tahmini Moron ve arkadaşlarının tanımladığı işlemin modifikasyonu yapıldı (59). Modifikasyon kısaca şöyleydi: 0.15 N potasyum klorürle örneklerin homojenizasyonu sonrası, 0.5 ml homojenat 3 ml deproteinizasyon solusyonuyla (sodyum klorür, metafosforik asit, EDTA ve distile su) karıştırıldı. Her örnek 5 dakika 1000 g santrifüje edildi ve 0.5 ml supernatant 2 ml Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> ve 0.5 ml Ellman reaktifi (DTNB, ditiyodinitrodibenzoik asit, sodyum sirat, distile su) eklendi. Supernatantların absorbansı 412 nm'de kaydedildi.

#### **Myeloperoksidaz Aktivitesinin Ölçümü**

MPO düzeyinin saptanması için Knight ve arkadaşlarının yöntemi kullanıldı (60). EDTA (5mM) ve hekza-decil-trimethyl-ammonyum bromide (0.5%) içeren 50mM'lık fosfat tamponu (pH:6) ile klorürle dokuların homojenizasyonu yapıldı. Homojenatlar 4°C'de 30 dakika 4000g'de santrifüj edildikten sonra, enzim aktivitesinin ölçülmesi için süpernatantlar alındı. 0,05 ml supernatant 1,45 ml "H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0.01%) ve o-dianizidine (1%) içeren fosfat tamponuna (100mM)" katıldı. MPO ile indirgenmiş o-dianizidine ölçümü 460 nm dalga boyunda spektrofotometre ile ölçüldü.

### **Süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesinin ölçümü**

Winterbourn ve arkadaşlarının tanımladığı yöntem ile SOD aktivitesi ölçüldü (61). Dokular 0,02 M'lık (pH:7,8) fosfat tamponu kullanılarak homojenize edildi. 0,1 ml homojenat 0,2 ml EDTA+NaCN, 0,2 ml nitro-blue tetrazolium (NBT) (1.5 mM), 0,05 ml riboflavin (0.12 mM), 0,245 ml fosfat tamponu (0.02 M) ile karıştırıldı. Bu karışımı içeren test tüpleri 15 dakika, oda sıcaklığında, floresans ışığının altında tutuldu. Nitro-blue tetrazolium (NBT)'un fotokimyasal indirgenmesinin inhibisyonuna dayanan SOD aktivitesi, 560 nm'de spektrofotometrik olarak ölçüldü.

### **Böbrek Doku Örneklerinin Histopatolojik Olarak İncelenmesi**

Histopatolojik inceleme için doku örnekleri % 10 ' luk formaldehitde fikse edildi, derecelendirilmiş konsantre alkolde dehydrate edildi, xylene ile temizlendi, ardından parafine gömüldü. Parafin bloklar 4µm kalınlığında kesildi ve Hemotoksilen-Eozin (HE) boyası ile boyandı. Hazırlanan preparatlar gruplara kör olan tek bir patolog tarafından incelendi. Tubuler nekroz varlığında mikroskopik böbrek hasarı olarak kabul edildi. Renal hasar bu özelliğe göre semikantitatif olarak; grade 0 normal, grade 1 hafif (fokal), grade 2 orta (multifokal) and grade 3 şiddetli (yaygın) patolojik değişiklikler olarak değerlendirildi (62). Histopatolojik parametreler Tablo 2' de görüldüğü gibi derecelendirildi.

**Tablo 1:** Histopatolojik değerlendirme

Histopatolojik bulgular	Grade
Normal	0
Hafif (fokal) patolojik değişiklikler	1
Orta (multifokal) patolojik değişiklikler	2
Şiddetli (diffuz) patolojik değişiklikler	3

### **İstatiksel Değerlendirme**

İstatiksel analizler Statistical Package for Social Sciences 17.0 (SPSS 17.0) paket programı kullanılarak yapıldı. Değerler ortalama  $\pm$  standart deviasyon olarak verildi. Biyokimyasal değişkenlerde gruplar arasındaki farklılıkları değerlendirmek için nonparametrik testlerden Mann-Whitney U testi kullanıldı. İstatiksel anlamlılık için  $p < 0,05$  olan değerler anlamlı farklılık olarak kabul edildi. Histopatolojik değişkenlerde gruplar arasındaki farklılıkları değerlendirmek için nonparametrik Ki Kare (Chi Square) testi kullanıldı. İstatiksel anlamlılık için  $p < 0,05$  olan değerler anlamlı farklılık olarak kabul edildi.

## BULGULAR

### Biyokimyasal inceleme

Böbrek örneklerinde, her bir grup için, MPO ( $\Delta A/\text{dakika/g doku}$ ), SOD (U/mg protein) ve GSA (k/mg protein) aktiviteleri ve MDA (nmol/mg protein) düzeyleri tablo 2’ de verilmiştir.

**Tablo 2:** Biyokimyasal inceleme sonuçları

	MDA	GSH	SOD	MPO
Grup I	165 ± 42	472 ± 82	2.37 ± 0.50	34.58 ± 8.20
Grup II	320 ± 102	294 ± 94	3.67 ± 0.59	57.4 ± 15.1
Grup III	124 ± 39	659 ± 291	2.03 ± 0.55	36.4 ± 15.2
Grup IV	64 ± 41	1594 ± 262	2.65 ± 0.53	32.6 ± 13.3
Grup V	72 ± 30	2336 ± 475	1.40 ± 0.21	14.7 ± 9.7

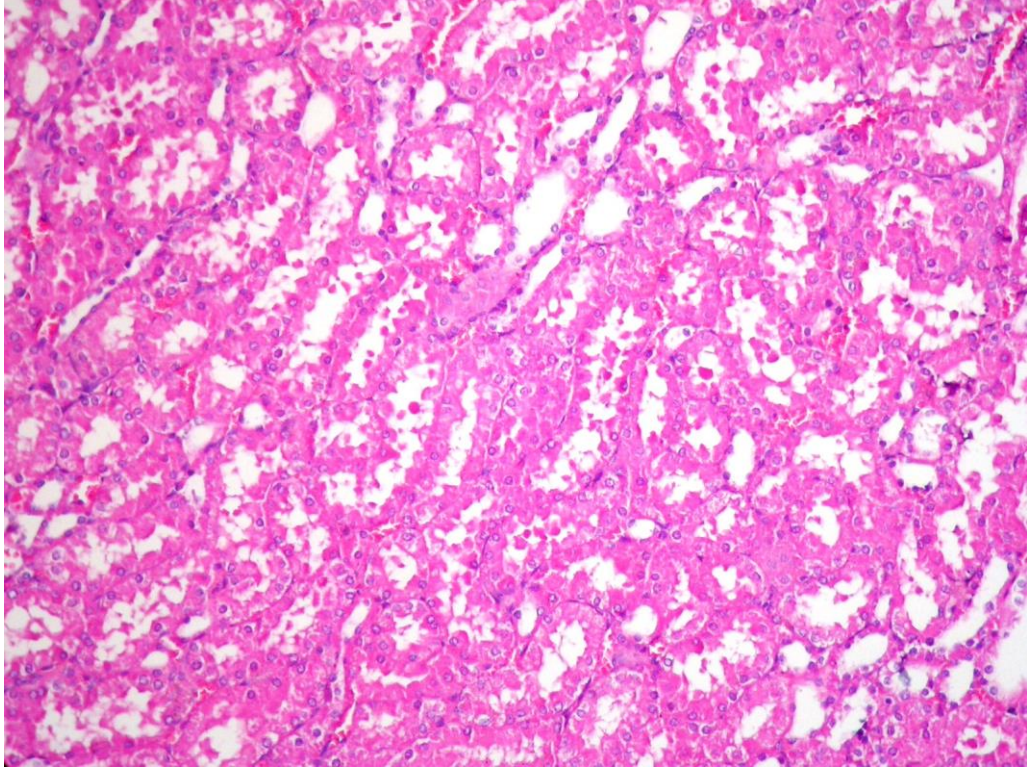
Grup I ile grup II karşılaştırıldığında GSH, SOD, MPO aktiviteleri ve MDA düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı ( $p < 0.05$ ). Grup II ile grup III karşılaştırıldığında GSA, SOD aktiviteleri ve MDA düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı ( $p < 0.05$ ), MPO aktivitesi yönünden anlamlı fark saptanmadı ( $p > 0.05$ ). Grup II ile grup IV karşılaştırıldığında GSH, SOD, MPO aktiviteleri ve MDA düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı ( $p < 0.05$ ). Grup II ile grup V karşılaştırıldığında GSH, SOD, MPO aktiviteleri ve MDA düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı ( $p < 0.05$ ). Grup III ile grup IV karşılaştırıldığında MDA düzeyleri ve GSH aktiviteleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı ( $p < 0.05$ ), SOD ve MPO aktivitesi yönünden anlamlı fark saptanmadı ( $p > 0.05$ ). Grup III ile grup V karşılaştırıldığında tüm parametreler yönünden anlamlı fark saptandı ( $p < 0.05$ ). Grup IV ile grup V karşılaştırıldığında MDA düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı ( $p < 0.05$ ), GSH, SOD, MPO aktiviteleri yönünden anlamlı fark saptanmadı ( $p > 0.05$ ).

## Histopatolojik İnceleme

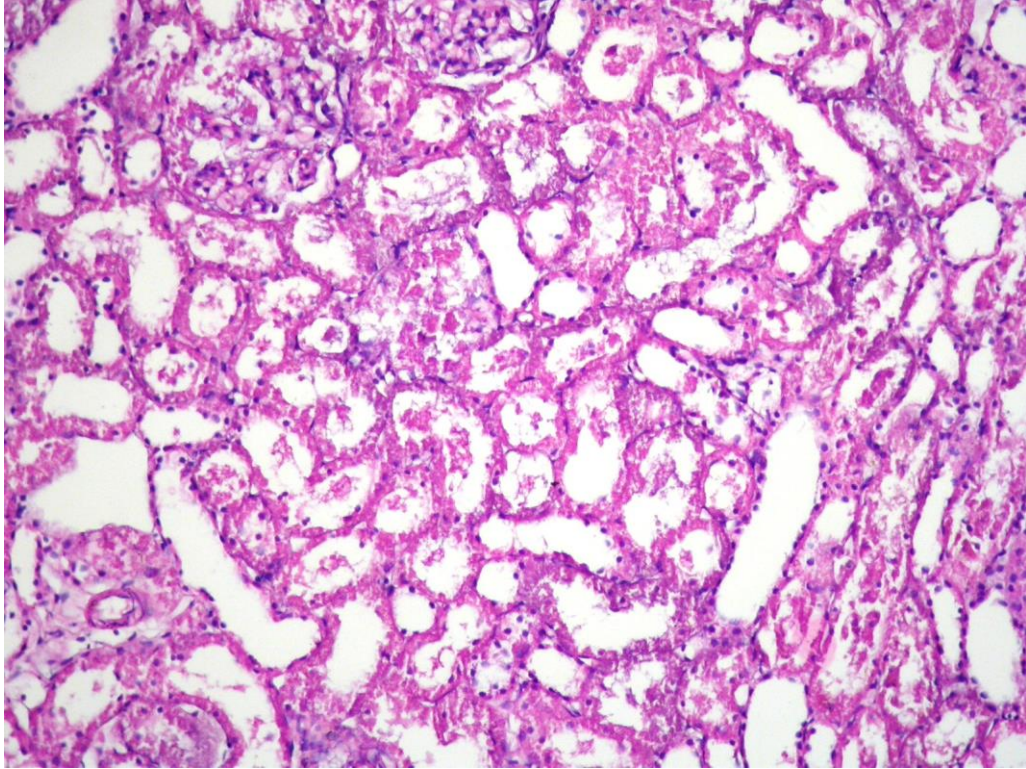
Grup 1 ile grup 2 karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı ( $p = 0.012$ ). Grup 2 ile grup 3 karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlıydı ( $p = 0.043$ ). Grup 2 ile grup 4 karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı ( $p = 0.043$ ). Grup 2 ile grup 5 karşılaştırıldığında aradaki fark istatistiksel olarak anlamlıydı ( $p = 0.003$ ). Grup 3 ile grup 4 karşılaştırıldığında aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildi ( $p = 1$ ). Grup 3 ile grup 5 karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı ( $p = 0.363$ ). Grup 4 ile grup 5 karşılaştırıldığında aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildi ( $p = 1$ ). Histopatolojik değişiklikler Tablo 3’de özetlenmektedir.

**Tablo 3:** Gruplardaki histopatolojik değişiklikler

Histopatolojik parametreler	Grup I	Grup II	Grup III	Grup IV	Grup V
Tübüler Nekroz Grade’i	0	2	1	1	1
	1	2	0	2	1
	1	2	2	1	1
	1	1	1	0	1
	1	2	1	1	1
	0	2	1	1	1



**Şekil 3:** Grade I Histolojik değişiklikler görölmektedir( H-E 40x büyütme).



**Şekil 4:** Grade II Histolojik değişiklik görölmektedir( H-E 40x büyütme).

## TARTIŞMA

Bir organ veya dokuya kan akımının kesilmesi ve daha sonraki reperfüzyon süreci hücre ölümü ve organ disfonksiyonuna yol açan bir dizi patolojik reaksiyonu başlatır. Son yıllarda araştırma tekniklerinin gelişmesiyle birlikte bu patolojik tablonun ortaya çıkmasında asıl önemli rolü reperfüzyon sürecindeki hasarın oynadığı anlaşılmıştır. Reperfüzyon hasarı sonucu oluşan fonksiyon bozukluğu organdan organa değişiklikler göstermekle beraber, hasardan oksijen radikallerinin sorumlu olduğu belirlenmiştir. İskemik dokuda kan akımı yeniden restore edildiğinde iskemi, reperfüzyona bağlı olarak meydana gelen hasarın o bölge ile sınırlı kalmayıp, daha uzak organlarda (renal, kardiyak ve pulmoner v.b.) komplikasyonlara yol açmaktadır.

Alt ekstremitte iskemisi akut ve kronik formlarda karşımıza çıkabilen ve her iki formunda da morbiditesi yüksek arteryel patolojilerdir. Akut alt ekstremitte iskemisi, diagnostik ve terapötik modalitelerdeki gelişmelere rağmen arteryel sistemin major dolaşım bozukluklarından biri olmayı sürdürmekte olup, yüksek morbidite ve mortalite oranıyla klinikteki önemini korumaktadır (63). Kardiyak aritmiler, ileri yaş, düşük kardiyak out-put, ciddi kalp kapak hastalıkları, akut miyokard infarktüsü ve kardiyak operasyonlar alt ekstremitte iskemisi için risk faktörleridir (64). Alt ekstremitte iskemisi vakalarında, mortaliteyi azaltmayı amaçlayan yeni yaklaşım, hızlı tanı ve tedavi protokollerinin devam ettirilmesi yönündedir (43). Bizde yaptığımız çalışmayla, daha önceden yapılmamış bir yöntem olan iskemi sonrası reperfüzyonun erken fazında venöz kan alınması ve/veya mannitol verilmesi yöntemiyle uzak organ olan böbrek hasarını azaltmayı amaçladık.

Uzun süreli iskemi, miyonekroza, hipotansiyona, hiperkalemiye, miyoglobulinüri ve akut tübüler nekroza neden olabilir. Eğer perfüzyon saatler içinde sağlanmazsa yüksek morbidite ve mortaliteye sebep olur. Bu nedenle bizim çalışmamızda, iskemi süresi 3 saat süreyle sınırlı tutulmuştur. Bu 3 saatlik süre iskemik değişikliklerin ortaya çıkması için yeterlidir. Aynı zamanda doku viabilitesinin devamı içinde uygun bir süreyi teşkil etmektedir.

İskeminin süresi hastanın prognozunu direkt olarak etkilemekte, bundan dolayı da erken tanı ve tedavi hayati önem taşımaktadır. Fakat meydana gelen hasar bifazik karakterli olup iskemi kadar reperfüzyon da meydana gelen hasarda rol oynar (63, 65). Özellikle akut alt ekstremitte iskemisinin ardından kanlanmanın hızlı bir şekilde tekrar sağlanması paradoksik olarak sistemik komplikasyonlar ve beklenmeyen mortalite ile sonuçlanmaktadır (66). Erken tanı ile iskemik hasarın azaltılabileceği düşünülse bile, bu yaklaşımda reperfüzyon hasarı ve bu hasarın sonuçları hala kaçınılmazdır. Bu sebeple günümüzde reperfüzyon hasarını önlemeye yönelik çalışmalar çok büyük önem taşımaktadır. Bizim çalışmamızda iskemi süresi 3 saatlik periyodu kapsadı. Alt ekstremitte iskemisi sonrası reperfüzyona bağlı renal hasarı azaltmak amacıyla, reperfüzyonun erken fazında venöz kan uzaklaştırılması ve mannitol tedavisi uygulandı.

Bazı hücrelerin anoksiye diğerlerinden daha hassas olmalarından dolayı ekstremitelerin iskemiye toleransını değerlendirmek zor olabilir. Hücrelerin O<sub>2</sub> ihtiyaçları ve dokuların solunum hızları farklıdır. İskemi periodunu takiben dokunun iyileşmesi sırasında sorumlu nedenler sadece hipoksiye karşı spesifik doku toleransı ve dolaşımın duraklama süresine bağlı değil, aynı zamanda başlangıç sebebi düzeltildikten sonra normal akımın restorasyon süresi gibi bazı lokal değişikliklere de bağlıdır. Bu durum reflow fenomeni olarak da adlandırılır. Hardy ve arkadaşlarının (67) akut alt ekstremitte iskemi modelinde, reperfüzyon sonunda düşük reflow'un nedeni iskemiye bağlı vazokonstrüksiyon, nötrofil agregasyonu, endotel kaynaklı relaksan faktörün oksijen radikalleri tarafından ortadan kaldırılmasıdır. Bu noktada serbest oksijen radikallerinin etkisini azaltmada, nonenzimatik temizleyicilerden mannitol, enzimatik temizleyicilerden süperoksit dismutaz, ksantin oksidaz inhibitörleri, dimetil sulfoksit, dimetilüre ve demir şelatörleri ayrıca intraselüler antioksidan sistemlerden oltipraz ve glutatyon sistemleri sayılabilir (68). Bizde çalışmamızda nonenzimatik antioksidanlardan mannitolu scavenger olarak kullandık.

Alt ekstremitte iskemi-reperfüzyon hasarının, klinik modelde incelenmesi zordur. Bu nedenle çalışmalarda hayvan modelleri kullanılmaktadır. Fakat seçilen model, modeldeki iskeminin derinliği ve süresi sonuçların değerlendirilmesi



açısından çok büyük önem taşımaktadır. Gerektiği kadar derin bir iskemi oluşturulmadığında reperfüzyon hasarının önlenmesi de çok anlamlı olmayacaktır. Wehrens; ratların ekstremitelerdeki kollateral dolaşımının, insanlardaki ile analog olması nedeniyle insandaki klinik soruna en yakın, devamlı ve derin iskemiyeye yalnızca femoral akım ile birlikte kollateral dolaşımının da engellenmesi ile ulaşılabilineceğini bildirmiştir. Zira, iskemik periyod uzadıkça dokunun oksijensiz kalmasının neden olacağı hasar reperfüzyon hasarını fazlasıyla geçmekte, doku nekrozu ve hücre ölümüyle neticelenmektedir (69). Bizim çalışmamızda, iskemik periyot 3 saatlik süreyle sınırlandırıldığından doku nekrozu ve hücre ölümü oluşmamış, dokular viabilitelerini korumuşlardır. Çalışmamızda, reperfüzyon süresi ise 2 saat ile sınırlı tutulmuştur. Bu 2 saatlik süre uzak organ reperfüzyon hasarını önlemek için yeterli süredir. İskemik periyodun ardından reperfüzyon safhasının erken fazında venöz kan alınması ve mannitol tedavisi uygulanarak renal hasarın azaltıldığı gösterilmiştir.

Aort cerrahisi sonrası gelişen böbrek yetmezliğinin patogenezinde aortik iskemi reperfüzyon hasarının önemli bir rolü vardır (5). Bu deneysel çalışmada, reperfüzyonun erken fazında venöz kan uzaklaştırılmasının, grup III, böbreklerde oluşan iskemi reperfüzyon hasarını azalttığı saptandı. Çalışmamızda, reperfüzyonun erken fazında venöz kan uzaklaştırılması, infrarenal aortik oklüzyon-reperfüzyon sonrası, rat böbreklerinde, SOD aktivitesi ve MDA düzeyini istatistiksel olarak anlamlı derecede düşürmüş ve GSH aktivitesini istatistiksel olarak anlamlı derecede yükseltmiştir, MPO aktivitesinde istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır. Sham grubu, IV ve grup V te ise, rat böbreklerinde, MPO, SOD aktivitesi ve MDA düzeyini istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük ve GSH aktivitesi istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. Sham grubundaki sonuçlarla deney grubundaki sonuçların farklı olmaması uyguladığımız deney modelinin başarılı olduğunu göstermektedir.

Antioksidan maddelerin kullanımı ile reperfüzyon hasarını önlemeye yönelik çalışmalar devam etmektedir. Bu amaçla nonenzimatik serbest radikal toplayıcı olan mannitol kullanılmıştır. Mannitol, hidroksil radikallerini mannitol serbest radikallerine dönüştürür. Bunlar da daha sonra diğer mannitol serbest radikalleri ile

reaksiyon vererek stabil reaktif olmayan mannitol dimerlerini oluşturur (54). Etki mekanizması olarak, intratübüler idrar akımını artırır, tübüler obstrüksiyonu azaltır; reaktif oksijen moleküllerine karşı “scavenger” görevi yaparak hücre hasarını azaltır. İrreversible böbrek yetmezliği oluşmadan akut böbrek yetmezliğinin oligürik fazının önlenmesi veya tedavisi için diüretik olarak kullanılmaktadır. Bizim çalışmamızda mannitol, antioksidan ve diüretik etkilerinden yararlanmak amacıyla kullanıldı. Mannitol, subkutan olarak emilemediği için iv olarak vena cava inferiordan verildi. Deneyimizde vena cava inferior yoluyla girişimi, juguler ven girişimi sırasında ortaya çıkan pnömotoraks gibi komplikasyonlarla karşılaşmamak için tercih ettik. Ayrıca vena cava inferiorun çalışma alanımızın içinde olması bizim için zaman açısından ekstra bir avantaj sağladı. İnsülin enjektörü ile venöz kan alınan ve/veya mannitol verilen vena cava inferiordaki girişim yeri, kanamayı önlemek amacıyla 8.0 propilen sütür ile psoas adalesine suture edildi. Psoas adalesi tampon görevi yaparak hemostazın kolaylıkla sağlanmasına yardımcı oldu.

Çalışmamızda, kontrol grubuna ait SOD aktivitesi diğer 4 grupta karşılaştırıldığında anlamlı derecede daha yüksek bulundu, MPO aktivitesi ise sham grubu, IV, V e göre anlamlı derecede yüksek bulundu, grup III e göre istatistiksel olarak olmasa bile yüksek bulundu. Kontrol grubuna ait GSH aktivitesi diğer 4 grupta karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı derecede daha düşük bulundu. Bununla ilgili olarak, dokuda SOD ve MPO düzeylerinin ölçülmesi inaktive edilen serbest oksijen radikali miktarına ilişkin fikir verebilir.

Serbest oksijen radikalleri aracılığıyla oluşan lipid peroksidasyonu, hücre membran hasarının önemli bir sebebidir, membran geçirgenliğini etkileyerek hücre içinde fazla miktarda  $Ca^{+2}$  birikmesine yol açar (70, 72). Hücre membran fonksiyonu bozukluğu da, hücre şişmesi ve hücre ölümü ile sonuçlanır. MDA, lipid peroksidasyonunda bir son üründür ve oksidatif hasarın seviyesini göstermek için kullanılmaktadır (73, 74, 75). Çalışmamızda, kontrol grubuna ait MDA düzeyi diğer dört grupta karşılaştırıldığında anlamlı derecede daha yüksek bulundu. Bu sonuç, reperfüzyon ve iskemik periyodun yeterli olduğu ve kontrol grubunun planlamasının başarılı olduğunun göstergesidir. MDA düzeyleri ile lipid peroksidasyonunun doğru orantılı olması beklenebilir. Nötrofil infiltrasyonunun, böbrek, barsak, kalp, beyin ve

karaciğer ve gibi birçok organda iskemi reperfüzyon hasarının oluşumunda kilit role sahip olduğu düşünülmektedir (71, 76). MPO aktivitesi, polimorfonükleer lökosit (PMNL) infiltrasyonunun bir göstergesi olarak kullanılmaktadır (77). İskemi reperfüzyon hasarı sırasında MPO düzeyleri, oluşan PMNL infiltrasyonu nedeniyle artabilir. Biz de, kontrol grubuna ait MPO düzeylerini grup IV ve V' e göre anlamlı derecede yüksek bulduk, grup III e göre anlamlı derecede olmasa da yüksekti. Bu sonuç, bizim çalışmamızda, deney gruplarındaki tedavinin etkin olduğunu biyokimyasal olarak göstermektedir.

Bu çalışmada, kontrol grubunda, MPO, SOD, aktiviteleri ve MDA düzeyinin anlamlı derecede yüksek olması ve GSH aktivitesinin anlamlı derecede düşük olması infrarenal aortik iskemi reperfüzyon sonrası renal hasar oluşumu sırasında serbest oksijen radikalleri, lipid peroksidasyonu ve nötrofil infiltrasyonunda artış olduğunu düşündürmektedir. Diğer 4 grupta, kontrol grubuna göre, MPO, SOD, aktiviteleri ve MDA düzeyinin anlamlı derecede daha düşük olması ve GSH aktivitesinin anlamlı derecede yüksek olması ise, reperfüzyonun erken safhasında venöz kan alınmasının ve mannitol verilmesinin, İskemik periodta oluşan metabolitlerin (Serbest oksijen radikalleri, myoglobin, potasyum, laktik asit...vs). reperfüzyonun erken fazında sistemik sirkülasyona katılmadan uzaklaştırılmasının infrarenal aortik iskemi reperfüzyon sonrası renal hasarı azaltması ile açıklanabilir.

Çalışmamızda böbrek dokuları histopatolojik olarak incelendiğinde, iskemi reperfüzyon sonrası kontrol grubunda orta (multifokal) derecede tubuler nekroz gözlemlendi. Diğer tüm çalışma gruplarında iskemi ve reperfüzyon sonrası hafif (fokal) derecede tubuler nekroz gözlemlendi. Histopatolojik verilere ait ortalama skorlar ile sham grubu ile kontrol grubu karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı ( $p = 0.012$ ) ve bu sonuç bize yöntemimizin doğru olduğunu göstermektedir. Kontrol grubu ile grup III karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlıydı ( $p = 0.043$ ). Kontrol grubu ile grup IV karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı ( $p = 0.043$ ). Kontrol grubu ile grup V karşılaştırıldığında aradaki fark istatistiksel olarak anlamlıydı ( $p = 0.003$ ). Kontrol grubu ile diğer çalışma grupları arasındaki bu anlamlı fark da tedavilerin başarılı olduğunu ifade etmektedir. Grup III, IV ve V in histopatolojik değerleri kendi aralarında karşılaştırıldığında ise istatistiksel olarak

anlamli fark saptanmadı. Elde edilen bu sonuçlar uyguladığımız izole ve kombine yöntemlerin doğruluğunu histopatolojik olarak göstermiştir.

Çalışmamız, reperfüzyonun erken safhasında venöz kan alınmasının ve mannitol verilmesinin, deneysel infrarenal aortik okluzyon reperfüzyon modelinde uzak organ iskemi reperfüzyon hasarını azalttığını gösteren ilk çalışma olması açısından önemlidir. Ayrıca bu deneysel modelde alınan sonuçların, yeni klinik ve deneysel çalışmalar yapılarak desteklenmesine ihtiyaç vardır.

## SONUÇ

Sonuç olarak, bu deneysel çalışma göstermiştir ki, reperfüzyonun erken safhasında venöz kan alınması ve/veya mannitol verilmesi, rat infrarenal aortik iskemi reperfüzyon modelinde, böbreklerde oluşan iskemi reperfüzyon hasarını azaltır. Yine bu çalışma göstermiştir ki, venöz kan alınması ve mannitol verilmesinin kombine yapılması, rat infrarenal aortik iskemi reperfüzyon modelinde, böbreklerde oluşan iskemi reperfüzyon hasarını daha fazla azaltır. Ayrıca aortik iskemi reperfüzyon sonrası böbrek hasarını azaltmaya yönelik yaptığımız bu deneysel modelde alınan sonuçların, yeni klinik ve deneysel çalışmalar yapılarak desteklenmesine ihtiyaç vardır.

## ÖZET

### **Alt Ekstremitte İskemisi Sonrası Reperfüzyonun Erken Safhasında Venöz Kan Uzaklaştırılması ve Mannitol kullanımının Renal Hasar Üzerine Etkisi.**

**Dr Fahri Adalı**

Alt ekstremitelerin iskemi reperfüzyonu sonrası aktive olan bazı sistem ve toksik medyatörlerin etkisi ile uzak organlarda (böbrek, akciğer..gibi) hasar oluşmaktadır.

Bu deneysel çalışmamızda; abdominal aortanın belirli bir süre klemplenmesi sonucu oluşturulan geçici iskemi sonrası, reperfüzyonun erken safhasında venöz kan uzaklaştırılması ve mannitol kullanımının renal hasarı önlemede etkisini araştırmak amaçlandı.

Çalışmamızda 30 adet erişkin Wistar Albino cinsi rat kullanıldı ve her grupta 6 adet rat olacak şekilde beş gruba ayrıldı. Gruplar; I. grup sham grubu, II. grup infrarenal abdominal aortanın travmatik mikrovasküler klemp ile klemplenerek 180 dakika iskemi oluşturulan ve 120 dakika süresince reperfüze edilen grup olan kontrol grubu, III. grup iskemi reperfüzyon + 1 cc venöz kan alınan grup, IV. grup iskemi reperfüzyon + mannitol verilen grup, V. grup ise iskemi reperfüzyon + mannitol verilen + 1 cc venöz kan alınan grup olarak oluşturuldu.

Reperfüzyon süresi sonunda tüm hayvanlar sakrifiye edilerek biyokimyasal ve histopatolojik incelemeler için böbrek dokuları alındı. Biyokimyasal açıdan oksidatif hasarın tayini için MPO, SOD, GSH-Px; lipid peroksidasyonu tayini için MDA almak üzere 4 parametre çalışıldı. Histopatolojik parametreler tubuler nekroz gradelemesine göre yapıldı (grade 0, grade 1, grade2, grade 3). Sonuçlar, istatistiksel olarak incelenerek karşılaştırıldı.

İskemi reperfüzyon sonrasında böbrek dokusunda MPO, SOD aktiviteleri ve MDA düzeyleri istatistiksel olarak anlamlı derecede artmıştır, GSH aktivitesi ise istatistiksel olarak anlamlı derecede azalmıştır. Reperfüzyonun erken fazında venöz kan alınan grupta SOD aktivitesi ve MDA düzeylerinin kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede azalmıştır, MPO düzeyinde ise istatistiksel olarak anlamlı olmasada artış saptanmıştır, GSH aktivitesi ise istatistiksel olarak anlamlı derecede azalmıştır. Dokuların histopatolojik açıdan değerlendirilmesi sonucunda ise; kontrol grubundaki ratların böbrek hasarı Grade II olarak gözlenirken, diğer deney gruplarında ise ratların böbrek hasarları grade I olarak gözlendi. Histopatolojik olarak deney gruplarında böbrek hasarının gerilediği görüldü.

Sonuç olarak, alt ekstremitte iskemi reperfüzyon modelinde, venöz kan alınmasının ve mannitol tedavisinin böbreklerde reperfüzyon hasarını azalttığı gösterilmiştir.

## **SUMMARY**

### **Impact of mannitol use and venous blood exclusion on renal injury at the early phase of reperfusion after lower extremity ischemia.**

**Dr. Fahri Adalı**

Effects of some systems and toxic mediators activated after ischemia and reperfusion in lower extremities cause injuries in distant organs (kidneys, lungs .. etc.).

This experimental study our aim was to investigate the effects of collecting venous blood and use of mannitol over preventing renal damage in early reperfusion phase after ischemia depending on temporary abdominal aortic clamping.

In our study, 30 adult Wistar Albino rats were used and divided into five groups with 6 rats for each group. Groups were; Group I: sham group, Group II. control group of 120 minutes reperfusion after 180 minutes ischemia with cross-clamping from infrarenal abdominal aorta with a microvascular clamp, Group III: ischemia reperfusion group with 1 cc of venous blood taken, Group IV. ischemia-reperfusion group with mannitol administration, Group V the ischemia reperfusion group given mannitol and 1 cc of venous blood excluded additionally.

At the end of reperfusion period all animals sacrificed and kidney tissues were collected for biochemical and histopathological examination. 4 parameters including MPO, SOD, GSH-Px, for determination of oxidative damage from the biochemical side and MDA for determination of lipid peroxidation, were studied. The results were examined statistically.

Histopathological parameters were graded as seen in table 2. After ischemia reperfusion, increase in MPO SOD activities and MDA levels were statistically



significant in the kidney tissues while GSH activity decreased statistically significantly.

In early reperfusion phase SOD activity and MDA levels decreased statistically significant in the venous blood collection group compared with the control group; the MPO level increased but this increase was not statistically significant and the GSH activity decrease was statistically significant.

Histopathological evaluation of tissue as a result, kidney damage in rats in the control group observed as Grade II, the rats in the other experimental groups was observed as grade I.

As a result, in lower extremity ischemic reperfusion model, venous blood excluding and mannitol treatment caused decreasing in the renal reperfusion injury.

## KAYNAKLAR

- 1- Majino G., Jorris I.: Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of the cell death. *Am. J. Pathol.* 1995; 146:3-9.
- 2- Welbourn CR, Goldman G, Paterson IS, Valeri CR, Shepro D, Hechtman HB. Pathophysiology of ischaemia reperfusion injury: central role of the neutrophil. *Br J Surg* 1991; 78:651-5.
- 3- Zimmerman BJ, Granger DN. Reperfusion injury. *Surgical Clinics of North America* 1992; 72:65-83.
- 4- Joyce M, Kelly C, Winter D et al. Pravastatin, a 3-hydroxy-3- methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitor, attenuates renal injury in an experimental model of ischemai-reperfusion. *Journal of Surgical Research* 2001; 101:79-84.
- 5- Gelman S. The pathophysiology of aortic cross-clamping and unclamping. *Anesthesiology* 1995; 82:1026-1060.
- 6- Klausner JM, Paterson IS, Kozbik L, Valeri R, Shepro D, Hechtman HB. Oxygen free radicals mediate ischemia- induced lung injury. *Surgery* 1989; 105:192-9.
- 7- Bengisun U, Koksoy C, Bengisun JS, Bayraktaroglu G, Camur A, Aras N. Ischemia and reperfusion injury: prevention of pulmonary hypertension and leukosequestration following lower limb ischemia. *Prostagland Leukot Essent Fatty Acids* 1997; 56:117-120.
- 8- Grace PA. Ischemia-reperfusion injury. *Br J Surg* 1994; 81:637.
- 9- Seekamp A, Ward PA. Ischemia-reperfusion injury. In: Oppenheim JJ, editor. *Inflammatory disease therapy*. Basel: Birkhauser Verlag; 1993. p. 137-52.
- 10- Prem JT, Eppinger M, Lemmon G, Miller S, Nolan D, Peoples J. The role of glutamine in skeletal muscle ischemia/reperfusion injury in the rat hind limb model. *Am J Surg* 1999; 178:147-150.
- 11- Klausner Jm, Paterson IS, Valeri R, Hechtman HB. Limb ischemia induced increase in permeability is mediated by leucocytes and leukotriens. *Ann Surg* 1988; 208:755-60.
- 12- Grace PA. Ischaemia-reperfusion injury. *British J of Surgery* 1994; 81:637-647.
- 13- Delabar JM, Nicole A, D'auriol L et al. Cloning and sequecing of a rat CuZn Superoxide dismutase cDNA *Eur J Biochem* 1987; 166:181-187.
- 14- Lin E, Lowry SF, Calvano SE. The systemic response to injury. Schwartz SI (ed), *Principles of Surgery*. Mc Graw-Hill 7th Edition 1999; Vol I: 13-32.

- 15- Semenza GL. Cellular and molecular dissection of reperfusion injury ROS within and without. *Circ Res.* 2000; 86:117-118.
- 16- Parks D. A., Granger D. N.: Contributions of ischemia and reperfusion to mucosal lesions formation. *Am. J. Physiol.* 1986; 250: G749-753.
- 17- Damjanov I, Linder J. Cell injury and cellular adaptations. *Anderson's Pathology. Tenth Edition. Volum 1: 357-365.*
- 18- Wilhelm J. Metabolic aspects of membrane lipid peroxidation. *Acta Univ Carol Med Monogr* 1990; 137:1-53.
- 19- Kılınç K, Kılınç A. Oksijen toksisitesinin aracı molekülleri olarak oksijen radikalleri. *Hacettepe Tıp Dergisi*, 2002; 33(2):110-8.
- 20- Reilly PM, Schiller HJ, Bulkley GB. Pharmacologic approach to tissue injury mediated by free radicals and other reactive oxygen metabolites. *The Am J Off Surgery*, 1991; 161:488-503.
- 21- Ertan T, Soran A, Kılıç M, Aşlar AK, Koç M, Cengiz Ö. Kan Malondialdehid ve total antioksidan seviyesinin(TAS) önemi. *Cerrahi Tıp Bülteni* 2001; 2;4:154-167.
- 22- Cuzzocrea S., Riley D. P., Caputi A. P., Salvemini D.: Antioxidant Therapy: A new pharmacological approach in shock, inflammation, and ischemia/reperfusion injury. *Pharmacol. Rev.* 2001; 53:135-159.
- 23- Fridovich I. The biology of oxygen radicals. *Science* 1978; 201:875-880.
- 24- Kellogg EW, Fridovich I. Superoxide, hydrogen peroxide, and singlet oxygen in lipid peroxidation by a xanthine oxidase system. *J Biol Chem* 1975; 250:8812-8817.
- 25- Kim K, Rhee SG, Stadman ER, Nonenzymatic cleavage of proteins by reactive oxygen species generated by dithiothreitol and iron. *J Biol Chem* 1985; 260:394-397.
- 26- White BC, Grossman LI, Krause GS. Brain injury by global ischemia and reperfusion: a theoretical perspective on membrane damage and repair. *Neurology*, 1993; 43:1656-1665.
- 27- İşlekel H, İşlekel S, Güner G. Biochemical mechanism and tissue injury of cerebral ischemia and reperfusion. URL: <http://med.ege.edu.tr/~norolbil/5.2000/NBD09200.html>.
- 28- Rice-Evans CA. Formation of free radicals and mechanisms of action in normal biochemical processes and pathological states. In: Rice-Evans CA, Burdon RH. *Free radical damage and its control*. England, Elsevier Science Press, 1994; 9:131-153.
- 29- Huang HY, Helzlsouer KJ, Appel LJ. The effects of vitamin C and vitamin E on oxidative DNA damage: Results from a randomized controlled trial. *Cancer Epidemiology, Biomarkers& Prevention* 2000; 9:647-652.

- 30- Marnett LJ. Oxyradicals and DNA damage. *Carcinogenesis* 2000; 21;3:361-370.
- 31- Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev.* 1991; 43:109–142.
- 32- Vanhoutte PM, Mombouli JV. Vascular endothelium: Vasoactive mediators. *Prog Cardiovasc Dis.* 1996; 39:229–238.
- 33- Davies MG, Juynh TTT, Hagen PO: Endothelial physiology. In: Grace PA, Mathie RT, eds. *Ischemia- Reperfusion Injury*. London, Blackwell Science, 1999; pp: 157- 79.
- 34- Kvietys PR, Granger DN: Endothelial cell monolayers as a tool for studying microvascular pathophysiology. *Am J Physiol* 1997; 273:1189-99.
- 35- Kadayıfçı A. Dahiliye- Nefroloji. 1. Baskı Ankara: Atlas Kitapçılık. 2001; 199-299.
- 36- Vargas AV, Krishnamurthi V, Masih R, Robinson AV, Schulak JA. Prostaglandin E1 attenuation of ischemic renal reperfusion injury in the rat *J Am Coll Surg* 1995; 180:713-717.
- 37- Olthoff KM, Wasef E, Seu P, Imagawa DK, Freischlag JA, Hart J et al. PGE1 reduces injury in hepatic allografts following preservation. *J Surg Res* 1991; 50:595-601.
- 38- Vanhoutte PM, Perault LP, Vilaine JP. Endothelial dysfunction and vascular disease. Editör: Gabor M Rubanyi, Victor J. Dzau, Marcel Dekker Inc. *The endothelium and clinical practice*. NY 1997; 265-289
- 39- Barry MC, Wang JH, Kelly CJ, Sheehan SJ, Redmond HP, Bouchier-Hayes DJ: Plasma factors augment neutrophil and endothelial activation during aortic surgery. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 1997; 13:381-7.
- 40- Barry MC, Kelly C, Burke P, Sheehan S, Redmond HP, Bouchier-Hayes DJ: Immunological and physiological responses to aortic surgery: effect of reperfusion on neutrophil and monocyte activation and pulmonary function. *Br J Surg* 1997; 84:513-9.
- 41- Upperman JS, Deitch EA, Guo W, Lu Q, Xu D: Posthemorrhagic shock mesenteric lymph is cytotoxic to endothelial cells and activates neutrophils. *Shock* 1998; 10:407-14.
- 42- Granger DN. Role of xanthine oxidase and granulocytes in ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol*, 1988; 255:1269-1275.
- 43- Terzi C, Kuzu A, Tanık A, Kale T, Aşlar K, Elhan A. Sıçanlarda intestinal iskemide profilaktik kısa ve uzun süreli yüksek doz Allopurinol kullanımının mortaliteye etkisi. *Klinik ve Deneysel Cerrahi* 2000; 8;1:10-16.

- 44- 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; 24:1339-44.
- 45- Fischer JE, Fegelman E, Johannigman J. Surgical complications. Schwartz SI (ed), *Principles of Surgery*. Mc Graw-Hill 7th Edition 1999, Vol 1: 441-483.
- 46- Burtis CA., Ashwood ER: *Tietz textbook of clinical chemistry*, W.B. Saunders Company, 3rd ed. 1999; 21:541-616.
- 47- Suwa T., Hogg J.C., Klut M.E., Hards J., Eeden S.F. Interleukin-6 changes deformability of neutrophils and induces their sequestration in the lung. *Am J Resp* 2001; 163:970-976.
- 48- Hierholzer C., Kalff J.C, Audolfsson G, Billiar T.R., Tweardy D.J., Bauer A.J. Molecular and functional contractile sequelae of rat intestinal ischemia / reperfusion injury. *Transplantation* 1999; 68:1244-1254.
- 49- Sun Z, Wang X, Lasson A, Bojesson A, Annborn M, Andersson R. Effects of inhibition of PAF, ICAM-1 and PECAM-1 on gut barrier failure caused by intestinal ischemia and reperfusion. *Scand J Gastroenterol* 2001; 36;1:55-65.
- 50- Ohno H., Matsuura N., Ishikawa M. Serum Mn-SOD in patients with Diabetes Mellitus and Thyroid Dysfunction as Judged by an ELISA. *Horm. Metab. Res.* 1991; 23:449-451.
- 51- Wheeler CR., Salzman JA. Automated Assay for Superoxide Dismutase, Catalase, Glutathione Peroxidase and Glutathione Reductase Activity. *Anal Biochem.* 1990; 184:193-199..
- 52- Goth L. A simple Method for Determination of serum catalase activity and revision of reference range. *Clinica Chimica Acta.* 1991; 196:143-152.
- 53- Fernandez V., Simitzu K. Effects of hyperthyroidism on rat liver Glutathione Metabolism. 1991; 129(1):85-91.
- 54- Schiller H.J., Andreoni K.A., Bulkley G.B.: Free radical ablation for the prevention of post-ischemic renal failure following renal transplantation. *Klin Wochenschr* 1991; 69:1083-1094.
- 55- Emerson T.E.: Unique features of albumin: a brief review. *Crit Care Med* 1989; 17:690-694.
- 56- Özbal Y. Temel immünoloji. I. Baskı. İstanbul. Nobel tıp kitabevleri 2000; 51-53.
- 57- Slater TF. Free radical mechanisms in tissue injury. *Biochemistry* 1984; 222:1-5

- 58- Okhawa H, Ohishi N. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.* 1979; 95:351-8.
- 59- Enli Y, Oztekin O, Pinarbasili RD. The nitroxide tempol has similar antioxidant effects as physiological levels of 17beta-oestradiol in reversing ovariectomy-induced oxidative stress in mice liver and kidney. *Scand J Clin Lab Invest.* 2009; 69(4):526-534.
- 60- Knight KR, Zhang B, Morrison WA, Stewart AG. Ischaemia-reperfusion injury in mouse skeletal muscle is reduced by N-nitro-L-arginine methyl ester and dexamethasone. *Eur J of Pharmacol* 1997; 332:273-278.
- 61- Winterbourn CC, Hawkings RE, Brian M, Carrel RW. The estimation of red cells superoxide dismutase activity. *J Lab Clin Med* 1975; 85:337-342.
- 62- Sucu N, Unlu A, Tamer L, et al. Effects of trimetazidine on tissue damage in kidney after hind limb ischemia- reperfusion. *Pharmacol Res* 2002; 46:345-349.
- 63- Kuzu MA, Köksoy C, Kale İT, Tanık A, Terzi C, Elhan AH, Reperfusion injury delays healing of intestinal anastomosis in a rat. *Am J of Surgery* 1998; 176:348-351.
- 64- Kohlman- Trigoboff D., Gongora E, Stanford J, Smith BM. Risk factors associated with acute lower extremity ischemia after coronary revascularization. *Journal of Vascular Surgery* 2002; 20 (3):78- 83.
- 65- Cohen IK, Diegelmann RF, Yager DR, Wornum III IL, Graham MF, Crossland MC. Wound care and wound healing. Schwartz SI (ed), *Principles of Surgery.* Mc Graw-Hill 7.th edition 1999; 1: 263- 295.
- 66- Yasin MM, Barros D'Sa AA, Parks G, Abdulkadir AS; Halliday I, Rowlands BJ. Mortality following lower limb ischemia- reperfusion: A systemic inflammatory response. *World J Surgery* 1996 Oct; 20 (8): 961- 6.
- 67- Hardy SC, Homer - Vanniaskinkam S, Gough MJ. The triphasic pattern of skeletal muscle blood flow in reperfusion injury: An experimental model with implications for surgery on the acutely ischaemic lower limb. *Eur J Vasc Surg* 1990;4:587-90.
- 68- Hong RW, Rounds JD, Helton WS, et al. Glutamine preserves liver glutathione after hepatic injury. *Ann Surg*1992;215:114-9.
- 69- Wehrens XHT, Rouwet EV, Egbrink MGA, Slaaf DW, Ramsay G. Effects of experimental lower limb ischemia-reperfusion injury on the mesenteric circulation *British Journal of Surgery* Volume 89 February 2002- Issue 2 Page 185.
- 70- Folden DV, Gupta A, Sharma AC et al. Malondialdehyde inhibits cardiac contractile function in ventricular myocytes via a p38 mitogen-activated protein kinase-dependent mechanism. *Br J Pharmacol* 2003; 139:1310-1316.

- 71- Sakamoto N, Sun Z, Brengman M et al. Hepatic reticuloendothelial system dysfunction after ischemiareperfusion: Role of P-selectin-mediated neutrophil accumulation. *Liver Transplantation* 2003; 9:940-948.
- 72- Kacmaz A, Polat A, User Y ve ark. Octreotide improves reperfusion-induced oxidative injury in acute abdominal hypertension in rats. *Journal of Gastrointestinal Surgery* 2004; 8:113-119.
- 73- Okutan H, Savas C, Delibas N. The antioxidant effect of melatonin in lung injury after aortic occlusion-reperfusion. *Interactive CardioVascular and Thoracic Surgery* 2004; 3:519-522.
- 74- Bozkurt A.K. Deneysel iskemi-reperfüzyon hasarının önlenmesinde pentoksifillinin rolü. *Damar Cerrahisi Dergisi* 2001; 3:101-104.
- 75- Nielsen F, Mikkelsen BB, Nielsen JB et al. Plasma malondialdehyde as biomarker for oxidative stres: reference interval and effects of life-style factors. *Clinical Chemistry* 1997; 43:1209-1214.).
- 76- Suleiman M, Cury PM, Pestana JOM et al. FTY 720 prevents renal T-cell infiltration after ischemia/reperfusion injury. *Transplantation Proc* 2005; 37:373-374.
- 77- Chatterjee PK, Todorovic Z, Sivarajah A et al. Inhibitors of calpain activation (PD150606 and E- 64) and renal ischemiareperfusion injury. *Biochemical Pharmacology* 2005; 69:1121-1131.