

T.C.
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
KALP VE DAMAR CERRAHİSİ ANABİLİM DALI

DENEYSEL AORT OKLÜZYONUNDA OLUŞAN
İSKEMİ - REPERFÜZYON HASARINI AZALTMADA
N - ASETİLSİSTEİNİN YERİ

Uzmanlık Tezi

Dr. Gökalg ALTUN

Trabzon - 2003

T.C.
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
KALP VE DAMAR CERRAHİSİ ANABİLİM DALI

DENEYSEL AORT OKLÜZYONUNDA OLUŞAN
İSKEMİ - REPERFÜZYON HASARINI AZALTMADA
N - ASETİLSİSTEİNİN YERİ

Uzmanlık Tezi

Dr. Gökalp ALTUN

Tez Danışmanı: Yrd. Doç. Dr. Zerrin PULATHAN

Trabzon - 2003

İÇİNDEKİLER

Kısaltmalar	
Giriş	1
Genel Bilgiler	3
Materyal ve Metod	16
Bulgular	22
Tartışma	32
Sonuç ve Öneriler	37
Türkçe Özet	39
İngilizce Özet	40
Kaynaklar	41

KISALTMALAR	
AC	Akciğer
ADP	Adenozin difosfat
AMP	Adenozin monofosfat
ARDS	Erişkin Solunum Sıkıntısı Sendromu
ATP	Adenozin trifosfat
Böb.	Böbrek
CPK	Kreatin fosfokinaz
FCM	Flow cytometry=Akım sitometri
IL	İnterlökin
İ/R	İskemi-Reperfüzyon
KC	Karaciğer
KTÜ	Karadeniz Teknik Üniversitesi
LDH	Laktat dehidrogenaz
MDA	Malondialdehit
MPO	Miyeloperoksidaz
NAS	N-asetilsistein
PAF	Platelet Activated Factor=Trombosit Aktive Edici faktör
PMNL	Polimorfonükleer lökosit
SGOT	Serum glutamikoksaloasetik transaminaz
SH	Thiol grubu
TNF	Tümör nekrozitan Faktör

GİRİŞ

İskemi-reperfüzyon (İ/R) sendromunun yol açtığı lokal ve sistemik doku hasarı vasküler cerrahide önemli bir sorun olarak karşımıza çıkmaktadır. Başarılı bir müdahaleden sonra bile, alt ekstremitede fonksiyon bozukluğuna yol açan hatta amputasyon gerektiren; bazen de ölümle sonuçlanabilen Miyelonefropatik Metabolik Sendrom (Haimovici Sendromu) gibi durumlarla da karşılaşılabilir.⁽¹⁾

Son yıllarda operatif tekniklerdeki gelişmeler iskemik ekstremitelerin kurtarılması yönünde önemli ilerlemeler sağlamıştır. Tüm bunlara rağmen, günümüze kadar birçok araştırmacının yaptığı kalp, beyin, ekstremitte, bağırsak ve diğer organların iskemisine yönelik çalışmalarda, belirli iskemi süresi sonrası ortaya çıkan toksik reaktif oksijen metabolitlerinin doku hasarını daha da arttırdığı gösterilmiştir⁽²⁻⁸⁾. Reperfüzyon sırasında ortaya çıkan reaktif oksijen metabolitleri, tutulmuş ekstremitenin bütünlüğünü bozabilecekleri gibi, sistemik olarak kalp, bağırsak, beyin, akciğer, karaciğer, böbrekler, dalak gibi parankimal organlar üzerine de etki göstererek yaşamı tehdit edebilirler^(1,9-12). Reperfüzyon hasarı dediğimiz bu olay , serbest oksijen radikalleri, nötrofil aktivasyonu, doku infiltrasyonu ve mikrovasküler dolaşımın azalması sonucu ortaya çıkar.

× Akut arteriyel oklüzyon sonrasında oluşan İ/R hasarını önlemeye yönelik birçok çalışmanın ortak amacı, ekstremitte bütünlüğünün korunmasının yanısıra oluşabilecek sistemik etkilerin azaltılması ya da bütünüyle ortadan kaldırılmasıdır. Doğaldır ki bu olayı önlemeye yönelik yöntem ve ilaçların bulunması için öncelikle bu durumu başlatan nedenlerin ve olayların gelişiminin ortaya konması gerekmektedir. Bu konuda yapılan oldukça kapsamlı ve titiz çalışmalarda; reperfüzyon hasarı olarak adlandırılan bu olayda, iskemi sonrası kalsiyum yüklenmesi, asidoz, enerji sağlayan depoların boşalması ve bu olaylar sonrası oksijenle yeniden karşılaşma döneminde oluşan serbest oksijen radikallerinin başlattığı, hücre ölümü ile sonuçlanan nötrofil aktivasyonun rol oynadığı gösterilmiştir⁽¹³⁾. Antioksidan maddelerin kullanımı ile istenmeyen reperfüzyon hasarının

önlenmesine yönelik çalışmalar devam etmektedir. Bu amaçla , C ve E vitamini, süperoksit dismutaz, katalaz, lazaroidler, mannitol, allopurinol, desferrioksamin gibi sayıca daha da çoğaltabileceğimiz maddeler üzerinde çalışmalar yapılmıştır⁽¹⁴⁻²¹⁾.

Bu çalışmada ratların abdominal aortalarında deneysel İ/R modeli oluşturarak, reperfüzyon hasarının azaltılmasında N- asetilsistein'in (NAS) rolünü araştırdık. Bu etkiyi kanıtlamak için, hücre ölümü ve serbest oksijen radikalleri ile başlayan olayların son ürünü olan malondialdehiti (MDA) ve nötrofil aktivasyonunun belirteci olarak da miyeloperoksidazı (MPO) akciğer, karaciğer, kalp ve böbreklerde ölçtük; akım sitometrik olarak akciğerlerde nötrofil infiltrasyonunun kantitatif değerlendirilmesini yaptık. Parankimal organlardaki histopatolojik değişiklikleri inceleyerek, araştırmayı desteklemeye amaçladık.

GENEL BİLGİLER

Akut arter iskemisini takiben, ekstremitenin yeniden kanlandırılması ve normal dolaşımın sağlanması halen şiddetli doku hasarı ve sistemik komplikasyonları birlikte getirmektedir. Akut tıkanıklığın yeri ne kadar proksimalde ise, iskemi ve reperfüzyonun etkisi o denli ağırdır. Literatürde ölüm oranı % 15-52, amputasyon ise % 12-22 olarak belirtilmiştir⁽²²⁾.

En iyi cerrahi müdahaleden sonra bile yalnızca % 60-70 olguda tam düzelme sağlanabilmektedir⁽²³⁾. Bu artmış mortalite ve morbiditenin sebebi, reperfüzyon hasarının etkisi ile ortaya çıkan miyelonefropatik-metabolik sendromdur. Uzun süre iskemik kalmış ekstremitenin tekrar kanlandırılmasıyla ortaya çıkan serbest oksijen radikallerinin, endotel ve nötrofillerle etkileşerek, lipit peroksidasyonunu hızla artırması lokal ve sistemik birçok etkinin ortaya çıkmasına neden olur⁽⁶⁾. Hücre şişmesi, ödem, toksin ve miyoglobulin salınımı ile beraber serbest oksijen radikallerinin etkisi ile, akut böbrek yetmezliği, akciğer ödemi, ani erişkin solunum sıkıntısı sendromu, şok karaciğeri gibi sistemik hasarlar gelişebilir⁽²⁴⁾.

I/R hasarının mekanizmasının tam olarak anlaşılması hasarın çabuk ve en uygun şekilde önlenmesini sağlayacaktır. Klinikte uygulanabilecek stratejilerin geliştirilmesi için klinik olarak uygulanan tedavinin etkinliğinin doğru bir şekilde ölçülmesi gerekmektedir. Hayvan laboratuvarında intakt ekstremitede mikrovasküler hasarın ve doku hasarının morfolojik, biyokimyasal olarak ortaya konabilmesi halen sorun yaratmaktadır. Ekstremitenin ve fonksiyonlarının korunması birinci derecede önemlidir ancak bu doku korunmasının gözönünde olan bulgusudur, gerçekte önemli olan dokuların kurtarılmasıdır. Reperfüzyon hasarını önleyebilecek yöntemlerin geliştirilebilmesi öncelikle hasarın yoğunluğunun ve sağlam ekstremitede tedavinin etkin olabildiğinin gösterilmesi üzerine yoğunlaşmakla mümkün olacaktır. Tabii ki özellikle alt ekstremitede iskemi reperfüzyon

hasarının oluşumunun azalması için en önemli olan erken tanı ve mümkün olduğunca erken revaskülarizasyonun sağlanmasıdır⁽²²⁾.

İskemik-Hipoksik Hücre Hasarı

Glikolitik enerji üretiminin devam edebildiği hipoksiye zıt olarak iskemi, glikoliz için gerekli maddelerin ulaşımını da içine alır. İskemik dokularda glikolitik maddeler tükendikten veya metabolitlerin taşınmaması sonucunda glikolitik aktivite inhibe olduktan sonra, anaerobik enerji üretimi durur. Bu nedenle iskemi hipoksiden daha hızlı olarak dokuları hasarlar. İskemik hasar hücre hasarının en sık görülen klinik tipidir. Belli noktaya kadar farklı hücre tiplerinde değişken olmak üzere zedelenme tamir edilebilir ve kan akımının düzeltilmesi ile oksijen ve metabolik maddeler tekrar uygun hale gelirse hücre iyileşebilir (Reverzibl hücre zedelenmesi). İskemi süresinin daha da uzaması, hasar mekanizmalarının devamlı artması ile ilgisiz olarak hücre yapısı bozulmaya devam eder. Zamanla hücrenin enerji makinası tamir edilemez şekilde bozulur. Hücrede adenozin trifosfat (ATP) tükenir. Enerji oluşturmadaki yetersizlik, geri dönüşümsüz noktayı gösterir ve reperfüzyon ile hasarlı hücre kurtulamaz. Enerji mekanizması korunmuş olarak kalsa da, genomdaki ve membranlardaki tamir edilemez hasar hücre ölümüne neden olur (İrreverzibl hücre zedelenmesi, nekroz).

Reverzibl hücre hasarı

Hipoksinin ilk atak noktası hücrenin aerobik solunumudur. Hücre içinde oksijen azaldığında oksidatif fosforilasyon düşer ve ATP üretimi azalır. ATP tüketilmesi hücredeki pek çok sistemde yaygın etkilere sahiptir. Plazma membranındaki enerji bağımlı sodyum pompasının aktivitesi azalır. Sodyum hücre içinde birikir ve potasyum hücre dışına sızar. İzoosmotik suyun alınması ile hücre şişer. Hücre şişmesinin diğer nedeni katabolitlerin birikmesidir. Hücresel enerji metabolizması değişir. Oksijen seviyesi düştüğünde oksidatif fosforilasyon sona erer ve hücrede enerji üretimi glikolize dayanır. Sonuçta glikojen depoları hızla azalır. Glikoliz laktik asit ve inorganik fosfatların artımı ile sonuçlanır, hücre içi pH'ı düşer. Sonraki olay protein sentez aparatının yapısal parçalanmasında görülür, protein sentezi azalır. Reverzibl hücre zedelenmesinde fonksiyonel belirtiler görülebilir. Kalp kasının koroner tıkanmasından sonraki 60 saniye içinde kasılması biter. Halbuki kasılmama hücre ölümü anlamına gelmez.

İrreverzibl hücre zedelenmesi

İskemi sürerse geri dönüşümsüz hasar meydana gelir. İrreverzibl zedelenme morfolojik olarak mitokondrilerde şiddetli şişme, plazma membranında aşırı hasar ve lizozomda şişme ile karakterlidir. Mitokondrial matrikste büyük, kümeleşmiş amorf dansiteler gelişir. Membranlardan protein, enzim, koenzim ve ribonükleik asitlerin kaybı vardır. ATP'nin oluşumu için gerekli metabolitler sızdırılır, yüksek enerjili fosfatların daha ileri kaybı olur. Bu dönemde lizozomal membranlarda hasar gözlenir. Enzimlerini sitoplazmaya kaçıır, bunların aktivasyonu hücre komponentlerinin enzimatik sindirilmesine yol açar. Ölümden sonra hücre komponentleri ilerleyici olarak parçalanır, diğer hücreler tarafından fagosite edilir veya yağ asitlerine parçalanır. Yağ asitleri kalıntılarının kalsifikasyonu ile kalsiyum sabunları oluşumu görülebilir. Bu arada intrasellüler enzimlerin ve proteinlerin plazmaya geçmesi klinik olarak önem taşır. Organa spesifik bu moleküllerin artmış serum düzeyleri organ hasarını saptamada önem taşır.

İrreverzibl zedelenme mekanizmaları

İki olay irreverzibilitiyi karakterize eder. Birincisi belirgin ATP azalmasının neden olduğu olayları geri döndürmede yetersizlik. İkincisi membran fonksiyonunda belirgin bozukluk gelişimidir. Bir çok biyokimyasal mekanizmalar membran hasarına katkıda bulunur. Bunlar:

- a) Mitokondrial fonksiyon bozukluğu: mitokondrial permeabilite değişimi
- b) Membran fosfolipitlerinin kaybı: Fosfolipaz aktivasyonuna veya fosfolipitlerin sentezinde azalmaya sekonder olabilir.
- c) Hücre iskeletinde anomaliler: Hücre iskeleti filamanları plazma membranını hücre içine bağlayan bağlar olarak görev yapar. Sitozolik kalsiyumun artışı ile proteazların aktivasyonu hücre iskeletinin elemanlarında hasara neden olabilir.
- d) Reaktif oksijen ürünleri: Oksijen serbest radikalleri hücrede zedelenmeye neden olan aşırı toksik moleküllerdir.
- e) Lipit yıkım ürünleri: Membranlarda permeabilitede değişiklikler veya elektrofizyolojik değişikliklere neden olurlar.
- f) Hücre içi aminoasitlerin kaybı: Hipokside irreverzibl hasardan koruyan bazı aminoasitlerin (glisin) kaybı görülür, membran hasarına predispozisyon oluşturur.

Özet olarak hipoksi oksidatif fosforilasyonu etkiler, vital ATP sentezi azalır. Membran hasarı öldürücü hasar için kritiktir, hücre ölümüne yol açan biyokimyasal ve morfolojik değişikliklerde kalsiyum önemli bir medyatördür.

İskemi/reperfüzyon hasarı

Belli durumlar altında önceden iskemik duruma getirilmiş fakat ölmemiş hücredeki kan akımı düzeltildiğinde zedelenme paradoksal olarak artar ve hızlanmış olarak ilerler. Sonuç olarak dokular iskemik hasar sonucunda irreverzibl olarak zedelenmiş hücreler kaybolmaya devam eder. Bu İ/R hasarı özellikle önemlidir. Hücre yapısal olarak korunmuş ve nekroz henüz oluşmamıştır. Fakat biyokimyasal olarak etkilenmiştir ve reperfüzyon sırasında bütünlüğünü kaybeder. Reperfüzyon esnasında diğer yeni hasarlayıcı olayların, bir çok mekanizmaları ileri sürülmüştür. Serbest radikallerin oluşması sonrasında yeni hasar gelişir. Reaktif oksijen ürünleri, mitokondrial permeabilite değişimini daha ileri yönlendirebilir. İskemik hasar sitokinlerin üretimi, hipoksik parankimal ve endotelial hücrede artmış adezyon molekülleri ekspresyonu ile birliktedir. Bu ajanlar inflamasyona neden olarak ek zedelenmeye oluşturur.

Serbest radikallerin oluşturduğu hücre zedelenmesi

Membran hasarında önemli mekanizmalardan biri serbest radikallerin özellikle aktive oksijen ürünlerinin oluşturduğu zedelenmedir. Kimyasal ve radyoaktif zedelenme, oksijen ve diğer gazların toksisitesi, hücresel yaşlanma, fagositik hücrelerin mikropları öldürmesi, inflamatuvar hasar, makrofajlarla tümör yıkımı ve diğer olaylarda görülür. Serbest radikaller dış yörüngesinde tek paylaşılmamış elektron taşıyan kimyasal ürünlerdir. Bu stabil olmayan durumun yarattığı enerji, organik veya inorganik kimyasallar, proteinler, lipitler, karbonhidratlar gibi komşu moleküllerle reaksiyonlara girerek serbestleşir. Bu moleküller membran ve nükleik asitlerde anahtar moleküllerdir.

Reperfüzyon hasarı dokunun yeniden oksijenle karşılaşma periyodu sırasında üretilen toksik serbest oksijen radikallerine bağlı gelişmektedir. Membran hasarında önemli mekanizmalardan biri; serbest radikallerin özellikle aktive oksijen ürünlerinin oluşturduğu zedelenmedir. Hücreler serbest radikalleri uzaklaştırmak için çok sayıda mekanizmaya sahiptir ve böylece zedelenmeyi azaltır. Serbest radikaller stabil değildir ve genellikle spontan olarak gücünü kaybederler. Ayrıca birçok enzimatik ve nonenzimatik sistem serbest radikal inaktivite reaksiyonlarına katılır. Antioksidanlar, demir, bakır ve bir seri enzim (katalaz, süperoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz) bu maddelerden

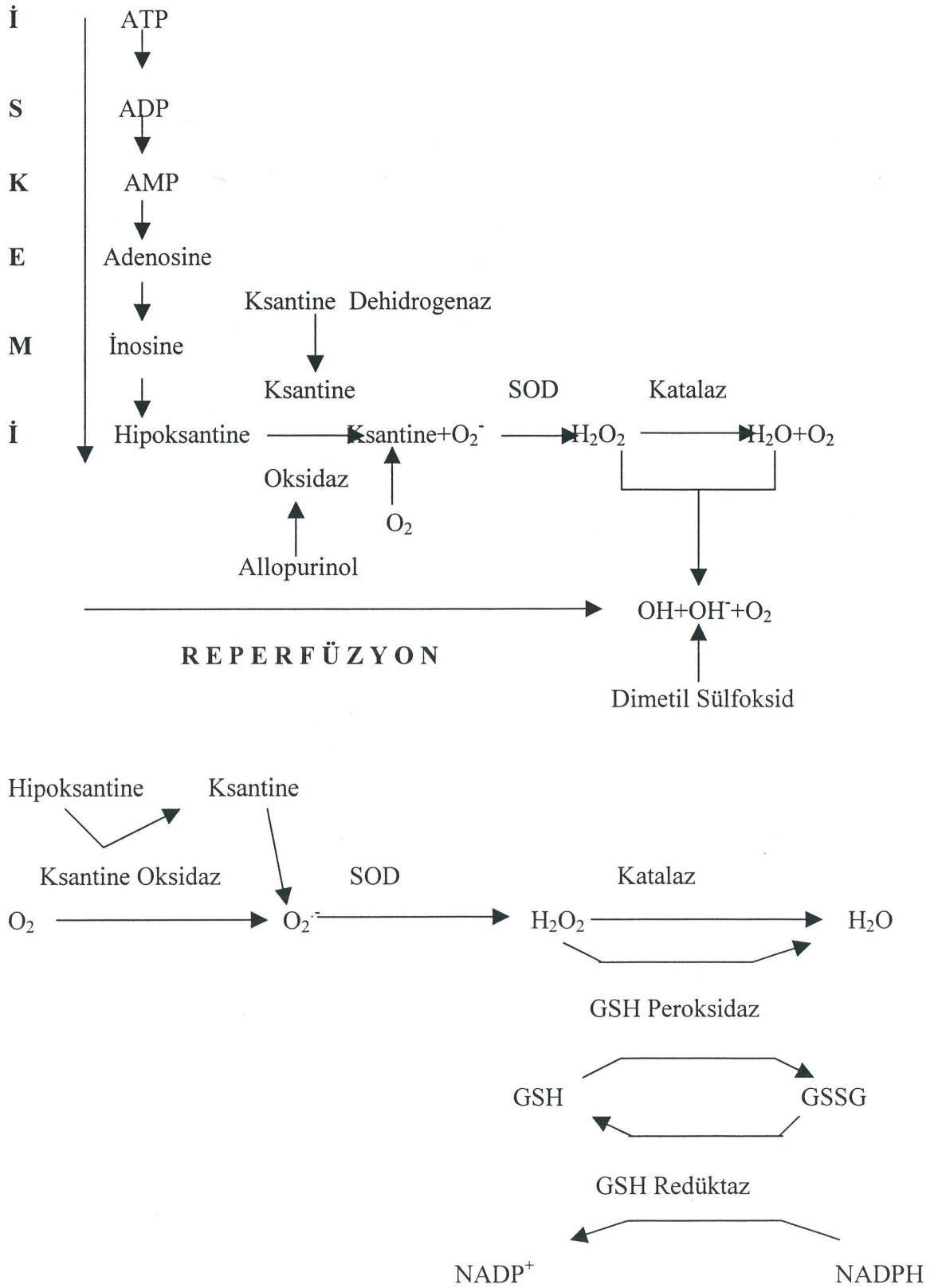
bazılarıdır^(Tablo1). Serbest oksijen radikallerinin etkisini önlemede mannitol, allopurinol, askorbik asit, süperoksit dismutaz gibi bazı maddeler denenmiştir ve deneysel olarak İ/R hasarını önlemede etkili oldukları gösterilmiştir⁽¹⁴⁻²¹⁾.

Serbest radikaller dış halkasında eşitlenmemiş bir elektron bulunan atom veya moleküllerdir. Hücresel solunum ile moleküler oksijenin % 98' i suya yıkılırken % 2' si süper oksit radikaline dönüşerek ortadan kalkar. Bu toksik molekül mikrosaniyeler içerisinde süperoksit dismutaz tarafından suya indirgenir. Normalde oluşan serbest radikallerden organizma, süperoksit dismutaz veya katalaz gibi intrasellüler enzimler aracılığıyla korunur. İskemi sırasında anaerobik metabolizma fonksiyonları çalışmaya başlar. Hücrenin asidik hale gelmesi ile membran sistemleri bozulur ve kalsiyum ile katyonlar hücre içine girerler. Aynı zamanda adenozin trifosfat, inozin ve hipoksantine indirgenir. Reperfüzyon esnasında hipoksantin, kalsiyumun etkisi ile moleküler oksijenden serbest oksijen radikallerine yıkılır^(Şema1). Oluşan serbest oksijen radikalleri, hasarlanmış hücre membranındaki yağ asit radikalleri ile etkileşerek lipid peroksidasyon reaksiyonunu oluşturur. Bunlar yaygın membran organel ve hücre hasarına neden olan otokatalitik reaksiyona neden olurlar, protein parçalanması ile sonuçlanan proteinlerin oksidatif modifikasyonuna yol açarlar. DNA'da tek zincirde kırılmalar oluşturarak, hücre yaşlanmasını hızlandırırlar. Bu etkiler, ekstremitenin bütünlüğünü bozabileceği gibi, sistemik olarak kalp, beyin, böbrekler, akciğer, karaciğer, dalak üzerine de etki göstererek yaşamı tehdit edebilir.

Tablo 1: Bazı major endojen antioksidanlar ve buldukları yerler ile işlevleri⁽²⁵⁾.

Adı	Bulunduğu Yer	İşlevi
Superoksid dismutaz (SOD) Cu, Zn SOD Mn SOD	Sitoplazma, Hücre yüzeyi ve mitokondri	O_2^- Katalizleyip H_2O_2 ye dismutasyonu $2O_2^- + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$
Katalaz	Peroksisomoz ve mitokondrial membran	$H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + O_2$
Glutatyon peroksidaz	Sitoplazma	$H_2O_2 + 2GSH \rightarrow 2H_2O + GSSG$
Glutatyon	İntrasellüler	Sellüler redüktant
Coenzim Q10 (Ubiquinone)	Hücre membranı	Aktif elektron taşıyıcısı
Vit E (α -tokoferol)	Sitoplazma ve plazma	Lipid peroksidasyon zinciri ve LDL reaksiyon kırıncısı
β -karoten (pro-Vit A)	Plazma	Oksidan LDL inhibisyonu
Vit C (Askorbik asid)	Sitoplazma ve plazma	direkt olarak antioksidan veya Vit E için kofaktör

Şema 1: İskemi reperfüzyon hasarının biyokimyasal mekanizmasının şematize edilmesi⁽¹⁾



İskemi-reperfüzyon hasarının kliniğe yansması

Arteriyel oklüzyonun erken dönemlerinde, rabdomiyoliz gibi çeşitli klinik durumlara sebep olan basit iskelet kası lezyonu görülür. Rabdomiyolizin derecesi, ağırlığı, genişliği ve devamlılığına bağlı olarak iki ana parametre oluşur.

1. Lokal etki. Sadece kas lezyonu.
2. Sistemik etki. İskemik kasın sürüklediği bir biyolojik sendrom.

Müdahale edilmemiş arteriyel oklüzyonun doğal seyri her safhasında, farklı derecede ve yaygınlıkta klinik ve metabolik bulgular gelişir.

İskemi (Devaskülarizasyon) fazının ana göstergeleri hastalar tarafından dayanılmaz olarak tariflenen ağrı, ciddi iskemi, ekstremitede rigidite veya rigor mortis ve ödemdir. İskemi fazı sırasında değişik derecede metabolik asidoz, yeni başlayan azotemi ile birlikte hiperkalemi ve miyoglobininuri görülebilir.

Revaskularizasyon fazının kliniğe yansması masif ödem, ekstremitte kompartman sendromları, şiddetli ağrı ve gangren olarak gözlenir. Asidoz ağırlaşmıştır. Hiperkalemi derecesi artar. Kreatin fosfokinaz (CPK, özellikle MM fraksiyonu), Laktat dehidrogenaz (LDH, özellikle LDH₄ ve LDH₅ subgrubu) ve serum glutamikoksaloasetik transaminaz (SGOT) değerleri artar. Miyoglobininuri ile birlikte oligoanuri gözlenir. Renal yıkım gelişerek akut renal yetmezliğe gidiş gözlenir. % 50 hastada hiperfosfatemi ve anuri ile birlikte hipokalsemi; nontravmatik rabdomiyolizisin diüretik fazındaki hastaların % 22-25'inde de hiperkalsemi gözlenir⁽¹⁾.

İskemi - reperfüzyon hasarının akciğer yansması

Özellikle alt ekstremitte İ/R dönemi sonrası ortaya çıkan uzak organ hasarında, akciğerler hedef organ konumundadır ve klinik olarak büyük önem taşımaktadır⁽²⁶⁾. Akut alt ekstremitte İ/R olayında ortaya çıkan akciğer hasarı önemli derecede postoperatif mortalite ve morbiditeye sebep olmaktadır. Hipoksemi, pulmoner hipertansiyon, azalmış akciğer kompliansı ve nonhidrostatik pulmoner ödem oluşan akciğer hasarının birer bulgusu olarak ortaya çıkmakta ve klinik olarak tamamen subklinik seyreden geçici bir durumdan (akut akciğer hasarı), ARDS' ye (Adult Respiratory Distress Syndrome = Erişkin Solunum Sıkıntısı Sendromu) kadar gidebilen ciddi bir tabloya yol açabilmektedir.

Akut alt ekstremitte iskemi-reperfüzyon dönemi sonunda ortaya çıkan akciğer hasarının mekanizması tam olarak bilinmemektedir. Plazmada ve dokuda artmış serbest oksijen radikalleri, çeşitli sitokinler (IL-6 / IL-8 / TNF-), trombosit aktive edici faktör

(PAF), eiocosanoid ve lökotrien salınımı gibi bir çok mekanizma bildirilse de bu konuda kesin bir görüş birliği ortaya konulamamıştır. Hasarı başlatan mekanizma ne olursa olsun sonuç olarak artmış polimorfonükleer lökosit (PMNL) aktivitesi, kemoatraksiyonu ve infiltrasyonu en sonunda PMNL degranülasyonuna sebep olmaktadır. Degranülasyon sonrası artan serbest oksijen radikalleri ve proteazlar akciğer endotel hasarına ve buna bağlı gelişen artmış pulmoner kapiller permeabiliteye sebep olmaktadır⁽²⁷⁾.

İskemi - reperfüzyon hasarının böbrek yansıması

İskemi-reperfüzyon döneminde renal hasar cerrahi ve anestezi yönünden önemli klinik sorunlar ortaya çıkarmaktadır. Ayrıca aortik cerrahi ve anestezi sırasında İ/R'a sekonder olarak görülen renal disfonksiyon da önemli ve sık morbidite ve mortaliteye neden olur. Postoperatif dönemde ortaya çıkan akut renal yetmezliğin neden olduğu kötü klinik prognoza, sepsis ve multipl organ yetmezliği gibi hayatı tehdit eden bir çok komplikasyon iştirak etmektedir⁽¹⁴⁾.

İskemi ve sonrasında reperfüzyonun sebep olduğu renal yetmezlikte temel olay pek çok sayıda hücrenin kaybı veya ölümü ile karakterize tübüler fonksiyon kaybıdır. Renal İ/R hasarı renal kan akımında azalma, azalmış glomerüler filtrasyon, artmış natriürezis ve bozulmuş konsantrasyon yeteneği ile karakterizedir. Artmış vasküler tonus ile otoregülasyon kapasitesi bozulur ve rekürren iskemilere daha duyarlı hale gelir. İskemiye uğramış böbrekte reperfüzyon sonrası rejenerasyona yönelik olarak epidermal büyüme faktörleri artar; ancak aynı dönemde açığa çıkan radikal artışı daha baskın olduğundan bu rejenerasyon geri planda kalır⁽²⁸⁾.

İskemi - reperfüzyon hasarının karaciğer yansıması

Karaciğer transplantasyonunu takiben gelişen karaciğer disfonksiyonu, patofizyolojik olarak İ/R hasarının benzeridir. İ/R dönemlerinde , diğer organ hücrelerinde olduğu gibi, hepatositlerde de serbest oksijen metabolitleri oluşur. Kupffer hücreleri aktivasyonu gözlenir. Sinusoid lümenlerinde masif olarak serbest oksijen radikalleri yapımı olur. Endotelial hücre harabiyeti, PMNL akümüülasyonu ve takibinde de kapiller tıkanıklık gözlenir. Karaciğer fonksiyon testlerinde bozulmalar gözlenir⁽²⁹⁾.

İskemi - reperfüzyon hasarının kardiyak yansıması

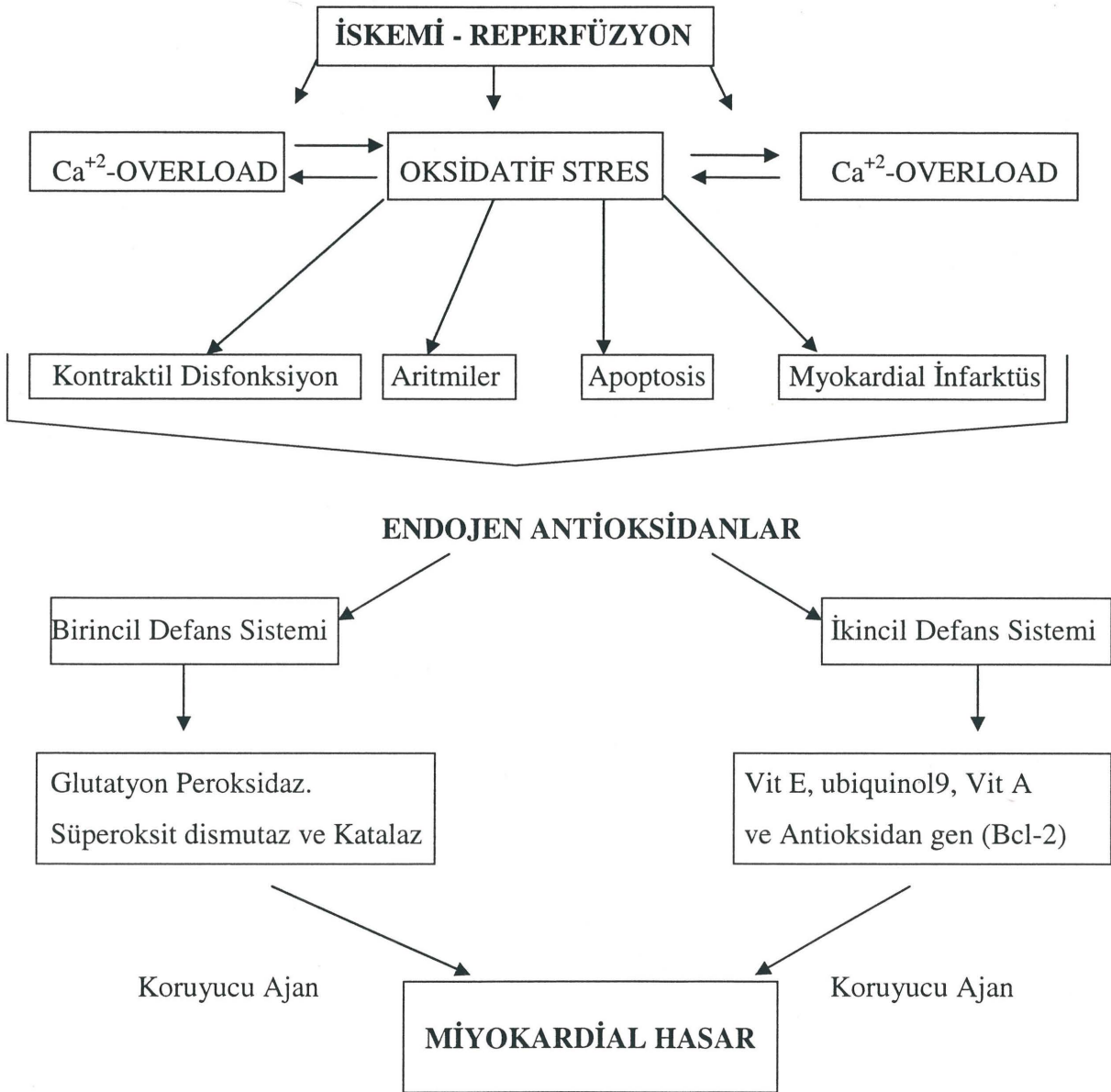
İ/R hasarı kalpte, hafiften ağıra doğru, reperfüzyon aritmileri, mikrovasküler hasar, reversibl mekanizmaların disfonksiyonu nedeniyle miyokardiyal stunning ve hücre ölümü gibi bir takım olaylara sebep olurlar⁽²⁵⁾

Bu olayların oluşumunda iki ana hipotez suçlanmaktadır.

1. Oksidatif stres.
2. Ca^{+2} yüklenmesi (overload) dir.

Bu iki hipotez birbiri içine o kadar çok girmiştir ki, her basamakta birbirlerini etkilemektedirler. Oksidatif stresin neden olduğu olaylar sonucunda, değişik sellüler proteinlerin fonksiyonel modifikasyonları membran permeabilitesinde ve konfigürasyonunda değişikliklere neden olurlar. Bu olaylar sonucunda sarkolemmal Ca^{+2} -ATPase pompasında ve Na^{+} - K^{+} ATPase aktivitesinde bozulmalar meydana gelir. Bu mekanizmalardaki değişimler Ca^{+2} çıkışında azalmaya, Ca^{+2} girişinde artmaya sebep olur^(Şema 2).

Şema 2: Kalpteki İ/R hasarında, oksidatif stres ve endojen antioksidanların patofizyolojik ve terapötik yaklaşımının şematize edilmesi⁽²⁵⁾.



N-ASETİLSİSTEİN (NAS)

N-Asetilsistein doğal bir amino asit olan L-sisteinin N-asetitillenmiş türevine verilen isimdir. Hammadde beyaz kristalize pudra şeklinde olup asetik kokuludur. Su ve alkolde serbest şekilde çözülebilir. Preparat olarak sıklıkla hazırlanan sodyum tuzu renksiz olup hidrojen sülfid koku ve tadındadır⁽³⁰⁾.

Asetilsistein sahip olduğu sülfidril grubu ile mukus glikoproteini içerisindeki disülfid bağlarını koparma yeteneği sayesinde mukoid ve mukopürülan sekresyonlar üzerine mukolitik etki gösterir. Solunum yollarında toplanan balgam yoğunluğunu ve yapışkanlığını azaltır., su gibi akıcı hale getirir. Bronşial sekresyonların atılımını ve solunumu kolaylaştırarak akciğer fonksiyonlarının düzenlenmesine yardımcı olur.

N-asetilsistein ayrıca, sahip olduğu nükleofilik serbest thiol (-SH) grubu aracılığıyla, oksidan radikallerin elektrofilik grubuyla etkileşime girerek, direkt antioksidan özellik gösterir. Moleküler yapısı ile hücre içine kolayca giren N-asetilsistein, burada deasetillenerek, L-sisteine dönüşür. L-sistein bir glutatyon prekürsörüdür ve glutatyon sentezini artırır. Glutatyon ise, endojen veya eksojen sitotoksik maddelerin ve oksidan radikallerinin hücreye zarar vermesini önleyen, hücre bütünlüğünün ve işlevlerinin devamı için çok önemli bir endosellüler mekanizmada temel rolü olan, yüksek reaktifte bir tripeptiddir. Bu yönüyle N-asetilsistein hücreleri hasardan koruyacak düzeyde glutatyon yapımı için birincil derecede önem taşımaktadır⁽³¹⁾.

Asetilsistein özellikle kistik fibrozisli hastalarda, yenidoğanlarda mekonyum ileusunda ve erişkinlerde mekonyum ileusuna benzer durumlarda bağırsaklara lokal olarak uygulanarak tıkaçın atılmasını sağlar. N-asetilsistein, asetaminofen overdozajında antidot olarak da kullanılmaktadır.

N-asetilsisteinin, iskemi-reperfüzyon hasarında kullanılmasındaki etki mekanizmalarını şöyle sıralayabiliriz⁽³²⁾:

- (a) Serbest oksijen radikalleri üzerine direkt protektif etki.
 - (aa) Sistein-sistein redoks mekanizması
 - (ab) Glutatyon ile bağlantı
- (b) Membranlardaki peptid ve enzimlerin -SH grupları ile formasyona girerek onların disülfid bağlarını koparmak yolu ile serbest oksijen radikalleri üzerine indirekt protektif etki.

- (c) Bir çok proces ve faktörleri düzenleme.
- (ca) Trombosit fonksiyonu
 - (cb) Düşük pH (iskemi) altında aksiyon
 - (cc) Nötrofillerle ilişki
 - (cd) ACE inhibisyonu
 - (ce) Koagülasyon modülasyonu
 - (cf) Adhesyon molekülleri yolu ile adhesif etki
 - (cg) Aritmogenesis modülasyonu.

MATERYAL VE METOD

Bu deneysel çalışma Karadeniz Teknik Üniversitesi (KTÜ) Tıp Fakültesi Etik Kurul onayı alındıktan sonra KTÜ Tıp Fakültesi Histoloji Anabilim Dalı Laboratuvarlarında yapıldı.

Çalışmada ağırlıkları 250-350 gram arasında değişen, KTÜ Tıp Fakültesi Cerrahi Araştırma ve Uygulama Laboratuvarında yetiştirilen Wistar-Albino türü 25 erkek rat kullanıldı. Ratlar kontrol grubu (Kontrol, n=5), iskemi-reperfüzyon grubu (İ/R, =10) ve N-asetilsistein verilen çalışma grubu (NAS, n=10) olmak üzere üç gruba ayrıldı.

İndüksiyon için inhalasyon yolu ile eter kullanılan ratların anestezisinin devamı için, intraperitoneal ketamine hidroklorid (Ketalar®, Parke-Dawis, 50 mg/ml flakon) 50 mg/kg uygulandı. İşlem boyunca ratların solunumları spontan olarak devam ettirildi. Bütün deneklere, abdomen temizliği takiben göbek üstü ve altı median laparotomi yapılarak, abdominal aort eksplorasyonu sağlandı. Bütün denekler bu işlemde sonra heparinize (100 IU/kg) edildi. Kontrol grubu ratlara, sadece laparotomi ve aort eksplorasyonu sağlandıktan sonra batın kapatıldı. İ/R grubu ratlarda, abdominal aorta eksplore edilip infrarenal düzeyden bulldog klemp ile aort oklude edildi. Batın kapatıldı. 4 saat iskemi süresinin sonunda, batın tekrar açılıp aortadaki oklüzyon kaldırıldı. 1 saatlik reperfüzyon süresini beklemek için, batın tekrar kapatıldı. NAS çalışma grubu ratlara, işlem olarak İ/R grubuna uygulananın aynısı yapıldı. Bu gruba diğer gruptan farklı olarak, aort oklüzyonu uygulamadan hemen önce 150 mg/kg NAS (Asist®, Hüsnü Arsan İlaçları A.Ş., 300 mg/3 ml ampul) intraperitoneal olarak uygulandı. İ/R süresinin bitiminde yüksek doz anestezik ajan verilerek, bütün denekler sakrifiye edildi. Laboratuvar çalışması için deneklerin akciğer, kalp, karaciğer ve böbrek gibi parankimal organlarından örnekler alındı.

Histopatolojik inceleme

Doku örnekleri % 10 formalinde tespit edildi. Doku takibi işleminden sonra parafin bloklar hazırlandı. Bunlardan 5 mikron kalınlıkta seri kesitler yapılarak hemotoksilen eozin ile boyandı.

Akciğer örneklerinde, bronşların ve kapiller haricindeki büyük damarların yoğun olduğu alanlar, bağ dokusunun fazla olduğu alanlar inceleme dışı bırakıldı. On büyük büyütmede (X40) alveol içi ve intertisyumdaki nötrofiller sayıldı⁽³³⁾. Akciğer dokusundaki konjesyon ve intertisyel ödem, Tassiopoulos ve arkadaşlarının tarif ettiklerine göre semikantitatif olarak değerlendirildi⁽³⁴⁾. Buna göre ödem için: 0 puan; ödem yok, 1+ ; fokal hafif ödem, 2+ ; fokal yoğun ödem, 3+ ; diffüz ödem,

Konjesyon için: 0 puan; konjesyon yok, 1+ ; fokal hafif konjesyon, 2+ ; fokal yoğun konjesyon, 3+ ; diffüz konjesyon olarak puanlandı.

Böbrek, karaciğer ve kalp örnekleri, ışık mikroskobu ile tüm sahalarda değerlendirildi. İncelemede Klausner kriterleri kullanıldı⁽³⁵⁾: Evre 0: normal böbrek görünümü, Evre 1: tüm sahalarda % 5' den az nekroz, Evre 2: tüm sahalarda % 5-25 nekroz, Evre 3: tüm sahalarda % 25-75 nekroz, Evre 4: tüm sahalarda % 75' den fazla nekroz. Ayrıca hücre şişmesi, vakuolizasyon, konjesyon ve infiltrasyon durumları da değerlendirildi⁽¹⁴⁾.

Akım sitometrik inceleme

Akım sitometrisi'nin (Flow cytometry, FCM) temel özelliği, hücrelerin büyüklüğüne, vizkositesine ve granülotisitesine bağlı olarak tek hücre düzeyinde araştırma olanağı sağlayan bir yöntem olmasıdır. Bu yöntem hücrelerin fiziksel ve biyolojik özelliklerinin kantitatif ölçümünün hızlı ve objektif olarak yapılmasına olanak sağlar⁽³⁶⁾.

Akım sitometrisinin temeli, Coulterin 1949 yılında bulduğu hücre sayısı ve volüm analizatörüne dayanır. Önce florokrom boyalarla işaretlenen örneklerden bir hücre süspansiyonu hazırlanır. Hidrodinamik odaklama denilen bir işlemle bir hücre süspansiyonu "sheath fluid" adı verilen hızlı hareket eden bir sıvı içine injekte edilir. Bu sıvı tipik olarak injekte edilen hücrelerden 10000 kez daha hızlı hareket eder. Daha hızlı hareket eden bu sheath fluid sayesinde hücreler tek sıra haline geçip "flow chamber"a ulaşırlar. Burada lazer ışığı ile uyarılarak görünür hale gelirler. Lazer kaynağı olarak genellikle Argon iyonu kullanılır. Hücreye bağlı fotokromun lazer ışınları ile aktifleşmesi,

ışığın yoğunluğuna bağlı olarak, hücrenin boyutu, iç yapısı, yüzey morfolojisi ve hücrelerin canlılığı hakkında bilgi verir.

Akciğer dokusunda nötrofil infiltrasyonu çalışılacak olduğundan, taze doku örnekleri kullanıldı. Akım sitometri analizi süspansiyon halindeki hücrelerden yapılacağı için, önce taze doku mekanik parçalanma yöntemi ile muamele edilerek hücre süspansiyonu hazırlandı. Hazırlanmış olan hücre süspansiyonundan 250-300 µl'lik bir miktarı nötrofiller için spesifik olan CD177 monoklonal antikorlarının 20 µl kadar konulup işaretlemelerin yapıldığı tüplerin üzerine eklendi. Tüpler, Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji Anabilim Dalı bünyesinde bulunan çift lazerli Coulter Epics Elite ESP FCM cihazından geçirilerek hücre sayımı yapıldı. Pozitiflikleri % olarak saptandı. Cihazın lazer ayarı polystyren kaplı partiküller içeren DNA Check (plastic beads) ile standartize edildi. Tüplerdeki hücreler sayıldıktan sonra 488 nm argon iyon lazer ile 15 mW'ta analize alındı. Hücre akım hızı numunedeki hücre yoğunluğuna göre ayarlandı. FCM'de boyanmış hücreler, hızlı bir şekilde yoğun lazer alanından geçirilirken hücreye bağlı florokromun lazer ışığı ile aktifleşmesi sağlandı. Boyanın floresan emisyonu hassas fototüp (Multiply Tubes, PMT's) tarafından belirlenerek amplifiye edildi ve FCM bilgisayarına aktarıldı.

Biyokimyasal parametreler

Malondialdehit (MDA) : Reperfüzyon fazında oksijenin yeniden ortama girmesiyle, yağ asit radikalleri oksijen ile birleşerek lipid peroksidasyon reaksiyonu oluşturmaktadır⁽⁶⁾. MDA lipoperoksidasyonunun bir ürünüdür ve oksidatif hasarın düzeyini göstermede, uygun bir değer olduğu bildirilmektedir⁽⁴⁴⁾.

Doku lipid peroksidasyon ölçümü, Buege ve Aust tarafından belirtilen, tiobarbitürük asid ile kolorimetrik reaksiyonu sonucu MDA konsantrasyonunun belirlenmesi metoduyla tayin edildi⁽³⁹⁾. Donmuş doku erimeye bırakılırken iki kez % 0.9 sodyum klorid solüsyonu ile yıkandı. Ondan sonra, içinde 50 mmol ph 7.6 Tris, 2 mmol EDTA ve 5 mmol butilade hidrokstitoluen bulunduran solüsyon ile homogenize edildi (50 mg doku/ 1 ml solüsyon). Homogenizasyon dakikada 13500 rpm kadardı. Homogenate, +4°C'de 15 dakika 20000 devirde santrifüje edildi. 1 birim yüzey materyali, içinde % 15 triklorasetik asid, % 0.375 tiobarbitürük asid, 0.25 M hidroklorik asid ve % 0.4 sodyum dodesilsülfat içeren stok solüsyonunun 2 birimi ile karıştırıldı. Bu karışım 30 dakika 95°C'de ısıtıldı. Ardından presipitat soğutulmuşken, 15 dakika 1000 devirde santrifüje

edildi. Yüzeydeki oluşumun absorbanası, 535 nm'de ölçüldü. 1, 1, 3, 3 tetraethoksi propane (Cat No: T9889) ile standartize edildi. Hesaplama yapılırken değişim katsayıları, böbrek için % 5.2, akciğer için % 4.8, karaciğer için % 5.1 ve kalp için ise % 5.3 olarak alındı. Materyalin protein konsantrasyonu, Lowry metoduna göre belirlendi⁽³⁸⁾. MDA konsantrasyonu nmol/mg protein olarak birimlendirildi.

Miyeloperoksidaz (MPO) : İ/R hasarında hücrel zedelenmede baş rol oynayan hücreler, PMNL'lerdir. MPO, nötrofillerde klorür varlığında H₂O₂'nin hipoklorik aside dönüşümünde etkilidir. PMNL etkinliğini belirlemek için MPO aktivitesi önemli bir parametredir.

Schierwagen ve arkadaşları doku MPO aktivitesinin tayinini, modifiye bir metotla tariflemişlerdir⁽³⁷⁾. Alınan doku örnekleri, sıvı azotta şok soğutmaya maruz bırakıldıktan sonra, ölçümler yapıncaya kadar -80°C de saklandı. Ölçümlerin yapılacağı zaman, donmuş dokular çözülmeye bırakılıp iki kez potasyum fosfat tamponu (pH 6.0, 50 mmol) ile yıkandıktan sonra, heksadesiltrimetil amonyum bromid (HETAB) süspansiyon tamponu (potasyum fosfat 50 mmol, % 0.5 HETAB, pH 6.0, 50 mg doku/1 ml tampon) ile homogenize edildi. Homogenizasyon dakikada 13500 rpm kadardı. Homogenizasyonun son 30 saniyesi öncesinde, homogenate donmuş ve çözünmüş ardışık iki hal almışken, +4°C'de 20000 devirde 15 dakika santrifüje edildi. Yüzeydeki materyal MPO ölçümü için toplandı. MPO aktivitesi ölçümünde, toplanan materyalin 100 µl'si, 37 °C'de, DMSO içinde eritilmiş 100 µl % 0.1'lik tetradimetilbenzid ve 50 mmol'lük potasyum fosfat tamponu (pH 5.4) ile muamele edilmiş 750 ml 0.5 mmol'lük hidrojen peroksid ile inkübe edildi. Enzim aktivitesi, fotometrik olarak 655 nm'de ölçüldü (Calbiochem, Cat No:475911). Hesaplama yapılırken değişim katsayıları (n= 5), böbrek için % 3.9, akciğer için % 4.3, karaciğer için % 5.0 ve kalp için ise % 5.2 olarak alındı. Materyalin protein konsantrasyonu, Lowry metoduna göre belirlendi⁽³⁸⁾. MPO aktivitesi U/mg protein olarak birimlendirildi.

İstatistiksel analiz

Çalışmamız verilerinin değerlendirilmesinde biyokimyasal, akım sitometrik ve patolojik parametreler kullanıldı. Akım sitometrik olarak bakılacak olan akciğerlerdeki nötrofil infiltrasyonun, değerlendirilmesinde ve biyokimyasal olarak değerlendirilecek olan dokulardaki miyeloperoksidaz aktivitesi ve malondialdehit konsantrasyonu tayinlerinde, üç grubun karşılaştırılmasında istatistiksel olarak Kuruskal Wallis Varyans analizi kullanıldı.

Patolojik inceleme sonucu bakılacak olan hücrelerdeki histopatolojik değişimler gibi niteliksel değişkenler için Ki-kare testi kullanıldı.

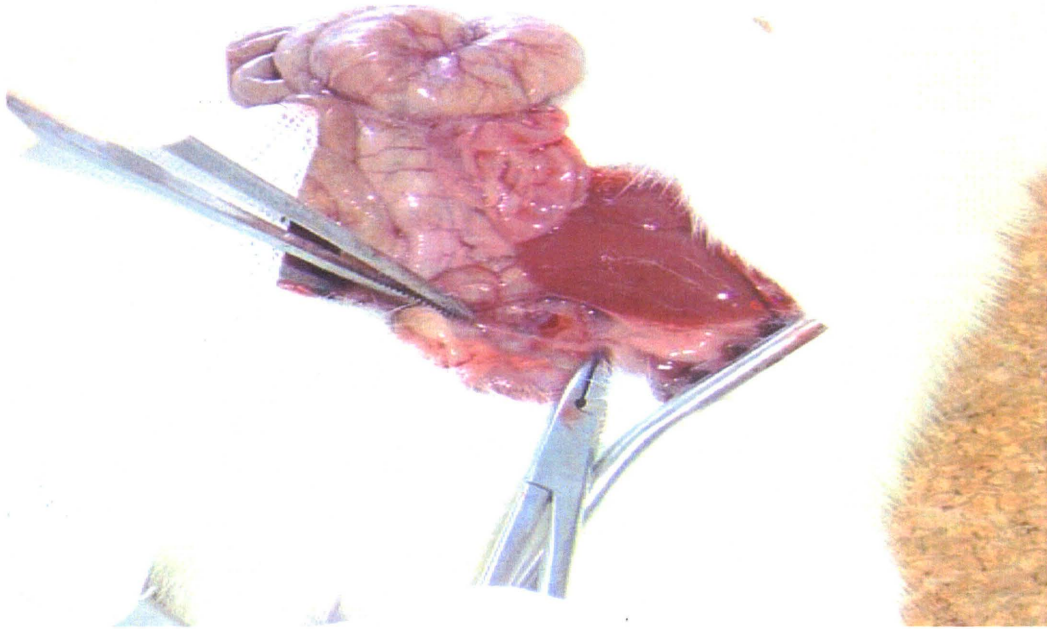
Resim 1: Eter İnhalasyonu ile indüksiyon yapılan deneklere intraperitoneal ilaç uygulanması.



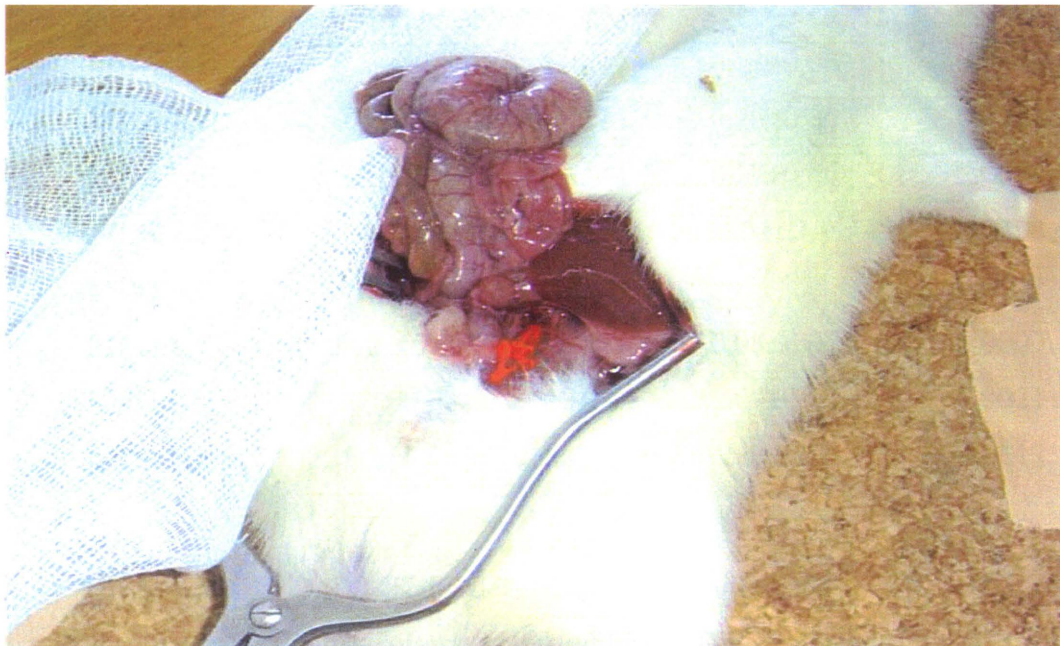
Resim 2: Göbek üstü ve altı batın insizyonu.



Resim 3:Abdominal aort ekspozuru.



Resim 4:Abdominal aortun bulldog klemp ile renal arterlerin altından oklude edilmesi.



BULGULAR

Tüm denekler çalışmayı tamamladı. Deney sırasında mortalite olmadı. İstatistiksel olarak kullanılan Kuruskal Wallis Varyant Analizinde $p < 0,05$; gruplar arasındaki ikişerli karşılaştırmalarda kullanılan Mann-Witney U testinde de $p < 0,016$ anlamlı olarak kabul edildi.

Tablo 2: Parametrelerin gruplara göre genel olarak değerlendirilmesi. (FCM: Akım sitometri; MDA: Malondialdehit; MPO: Miyeloperoksidaz; AC: Akciğer; KC: Karaciğer; Böb.: Böbrek.).

	Kontrol Grubu	İ/R Grubu	NAS Grubu	P
FCM %	14,2±2,3	14,4±1,8	5,6±1,2	0,0002
AC Patoloji	71,2±11,6	289,1±49,1	153,1±53,2	0,0001
MDA AC	0,3±0,07	0,4±0,19	0,24±0,06	0,0056
MDA KC	0,4±0,11	0,3±0,15	0,26±0,05	0,0012
MDA Böb.	0,3±0,04	0,4±0,04	0,27±0,05	0,0002
MDA Kalp	0,4±0,04	0,3±0,07	0,31±0,1	0,2358
MPO AC	1,3±0,2	4,5±2,1	3,7±1,24	0,0042
MPO KC	0,12±0,03	0,3±0,23	0,08±0,05	0,0007
MPO Böb.	0,00	0,09±0,04	0,09±0,04	0,0031
MPO Kalp	5,2±1,5	2,4±1,95	2,4±3,01	0,0617

MDA Kalp ve MPO Kalp değerlerini incelediğimizde $p > 0,05$ olduğundan istatistiksel olarak anlamsız olarak kabul edildiler. Diğer satırlarda $p < 0,05$ olduğundan

anlamli olarak kabul edildiler. Bulgularda MPO ve MDA değerlerinin, tek tek değerlendirilmesi aşağıdaki gibidir.

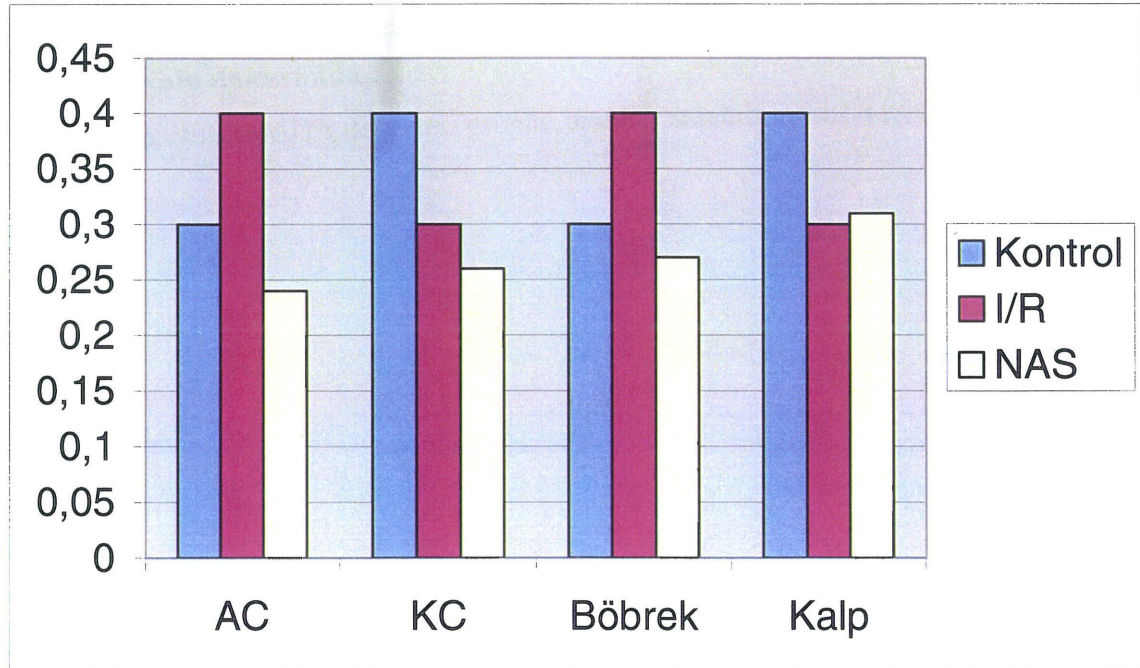
Malondialdehitin dokulardaki değerleri :

Tablo 3: Grupların MDA değerlerinin organlara göre tablo olarak gösterilmesi.

	Kontrol Grubu	İ/R Grubu	NAS Grubu	p
MDA AC	0,3±0,07	0,4±0,19	0,24±0,06	0,0056
MDA KC	0,4±0,11	0,3±0,15	0,26±0,05	0,0012
MDA Bb	0,3±0,04	0,4±0,04	0,27±0,05	0,0002
MDA Kalp	0,4±0,04	0,3±0,07	0,31±0,1	0,2358

(MDA konsantrasyonu nmol/mg protein olarak birimlendirilmiřtir.)

Grafik 1: Grupların MDA değerlerinin organlara göre grafik olarak gösterilmesi.



Grupların organlarda kendi aralarındaki değerlendirilmesinde:

MDA AC dokusunda :

MDA değeri İ/R grubunda kontrol grubuna göre yüksek bulunmuş ancak bu yükseklik anlamlı olarak değerlendirilmemiştir (p: 0.8). NAS verilen grupta ise MDA değeri İ/R grubuna göre anlamlı derecede düşük bulunmuştur (p: 0.0032). Ayrıca NAS verilen grupta MDA değeri kontrol grubu değerlerine göre de düşük bulunmuş ancak bu düşüklük istatistiksel olarak anlamlı değerlendirilmemiştir (p: 0.02).

MDA KC dokusunda :

KC dokusunda MDA değeri en yüksek kontrol grubunda bulunmuştur. MDA değerinde, İ/R grubunda kontrol grubuna göre anlamlı düşüklük vardır (p: 0.0143). NAS verilen grupta da MDA değerinde İ/R grubuna göre düşüklük vardır ancak istatistiksel olarak anlamlı değildir (p: 0.0191). MDA değeri NAS grubunda kontrol grubuna göre anlamlı olarak düşük bulunmuştur (p:0.022).

MDA Böbrek dokusunda :

Böbrek dokusunda MDA değeri İ/R grubunda kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek bulundu (p: 0.003). NAS verilen grupta ise MDA değeri İ/R grubuna göre anlamlı derecede düşüktü (p:0.0002). Kontrol grubuyla NAS grubu arasında anlamlı farklılık yoktu (p: 0.2703).

MDA Kalp dokusunda :

Kalp dokusunda MDA değerleri gruplar arasında anlamlı farklılık göstermemiştir.

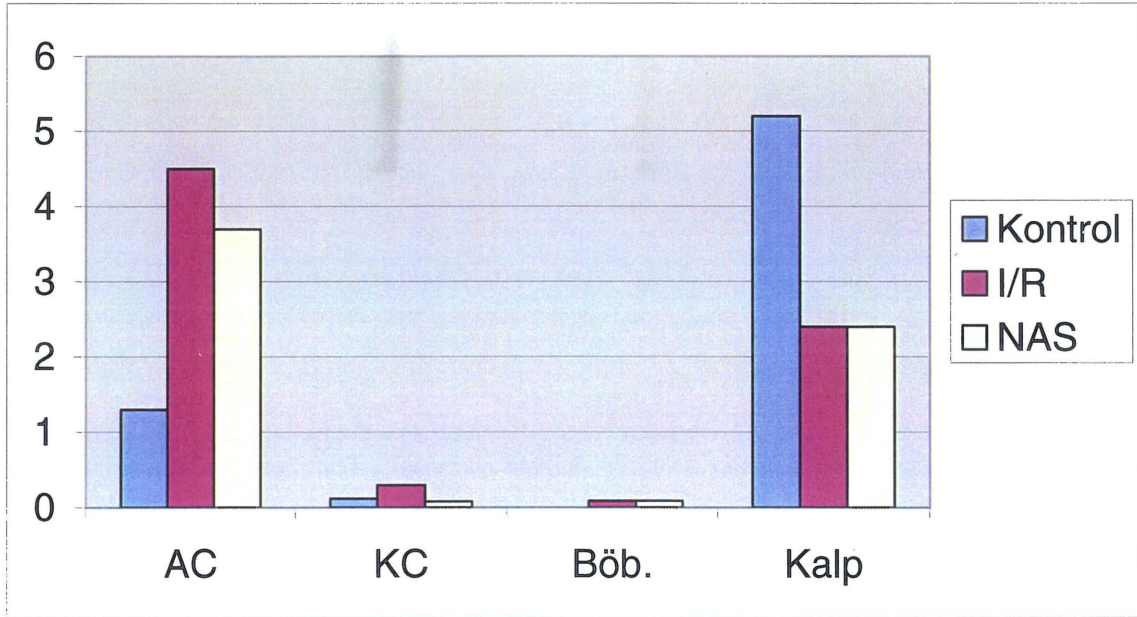
Miyeloperoksidazın dokulardaki değerleri :

Tablo 4: Grupların MPO değerlerinin organlara göre tablo olarak gösterilmesi.

	Kontrol Grubu	İ/R Grubu	NAS Grubu	p
MPO AC	1,3±0,2	4,5±2,1	3,7±1,24	0,0042
MPO KC	0,12±0,03	0,3±0,23	0,08±0,05	0,0007
MPO Bb.	0,00	0,09±0,04	0,09±0,04	0,0031
MPO Kalp	5,2±1,5	2,4±1,95	2,4±3,01	0,0617

(MPO aktivitesi U/mg protein olarak birimlendirilmiřtir)

Grafik 2: Grupların MPO değerlerinin organlara göre grafik olarak gösterilmesi.



MPO AC dokusunda :

MPO değeri akciğer dokusunda; İ/R grubunda kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (p: 0.0048). MPO değeri NAS verilen grupta İ/R grubuna göre düşük bulunmasına rağmen bu düşüklük istatistiksel olarak anlamlı değildi (p: 0.4497). Kontrol grubu ile NAS verilen grup arasında da anlamlı farklılık yoktu (p: 0.022).

MPO KC dokusunda :

MPO değeri karaciğer dokusunda İ/R grubunda kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (p: 0.0084). NAS verilen grupta ise İ/R grubuna göre anlamlı derecede düşük ve kontrol grubuna yakın değerler bulunmuştur (İ/R – NAS gruplarının karşılaştırmasında p: 0.0005, Kontrol - NAS gruplarının karşılaştırılmasında p: 0.2703).

MPO Böbrek dokusunda :

MPO değeri böbrek dokusunda İ/R grubunda kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek bulunmuş (p: 0.0022), ancak NAS verilen grupta anlamlı düşüklük gözlenmemiştir (p: 0.9097). Yine NAS verilen grupta MPO değerleri kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (p: 0.0022).

MPO Kalp dokusunda :

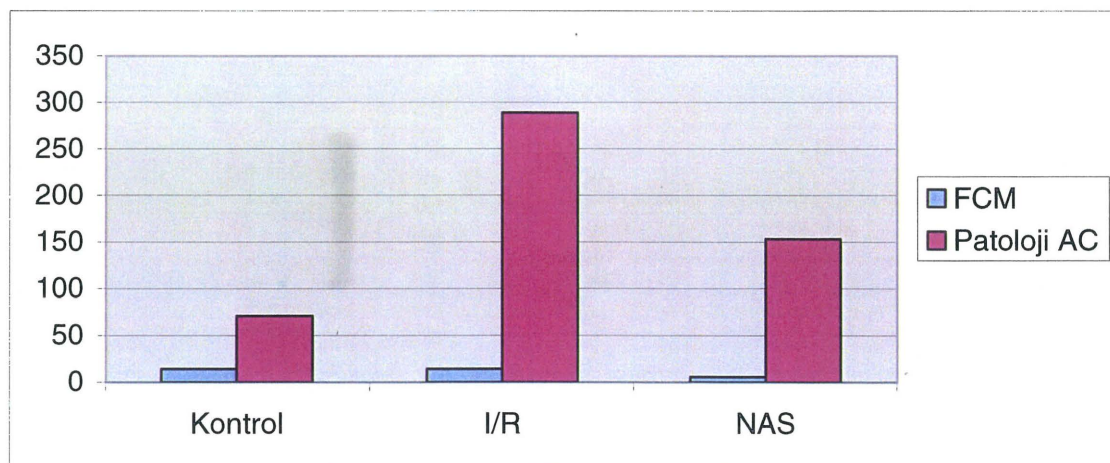
MPO değerleri kalp dokusunda gruplar arasında anlamlı farklılıklar göstermiyordu.

Akciğerlerdeki akım sitometrik ve histopatolojik değerlendirme :

Tablo 6: FCM ve histopatolojik olarak AC'lerdeki nötrofil infiltrasyonunun tablo olarak gösterilmesi.

	Kontrol Grubu	İ/R Grubu	NAS Grubu	p
FCM %	14,2±2,3	14,4±1,8	5,6±1,2	0,0002
AC Patoloji	71,2±11,6	289,1±49,1	153,1±53,2	0,0001

Grafik 4: FCM ve histopatolojik olarak AC'lerdeki nötrofil infiltrasyonunun grafik olarak gösterilmesi.



Akım sitometrik değerlendirme :

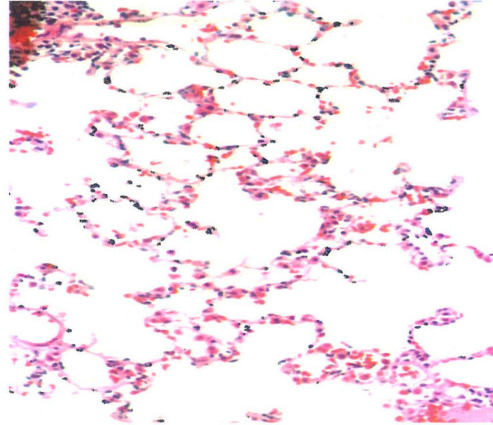
Akciğerlerin nötrofil infiltrasyonunun, akım sitometrik olarak % cinsinden nötrofil miktarı NAS verilen grupta hem kontrol hem de İ/R gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük bulundu (p: 0.0002).

Histopatolojik değerlendirme :

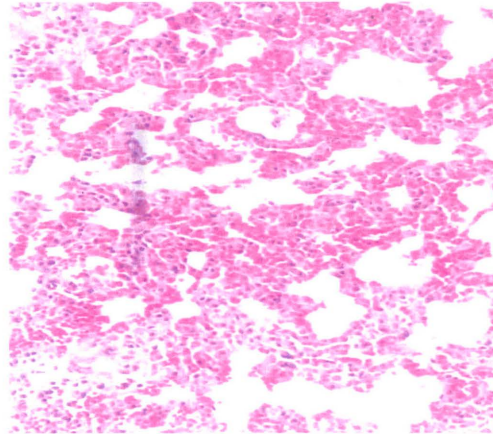
Histopatolojik olarak on büyük büyütme alanındaki PMNL sayıları, İ/R grubunda kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (p: 0.022). NAS verilen grupta ise PMNL sayıları İ/R grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük bulunmuştur

(p: 0.0004). NAS verilen grupta PMNL sayıları kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek kalmıştır (p: 0.0071).

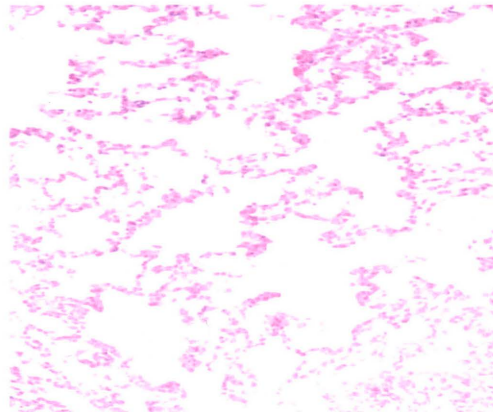
Resim 5: Kontrol, I/R ve NAS grubu ratların akciğerlerinin histopatolojik örnekleri. Gruplar arası konjesyon ve PMNL farkına dikkat.



Kontrol Akciğer

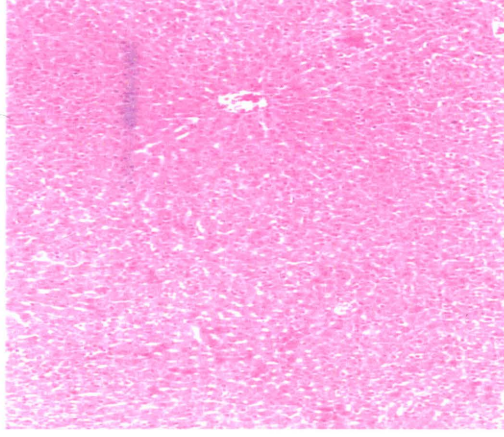


I/R Akciğer

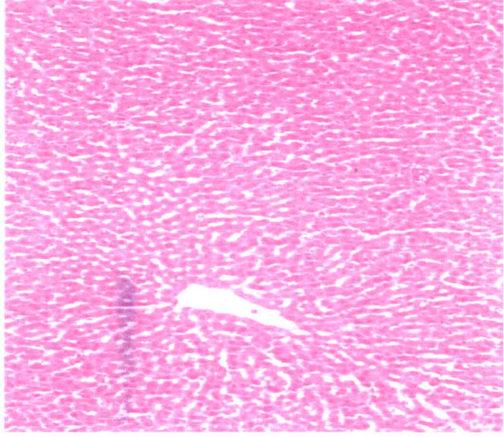


NAS Akciğer

Resim 6: Kontrol, İ/R, ve NAS gruplarının karaciğer doku örneklerinin histopatolojik kesitleri.



Kontrol Karaciğer

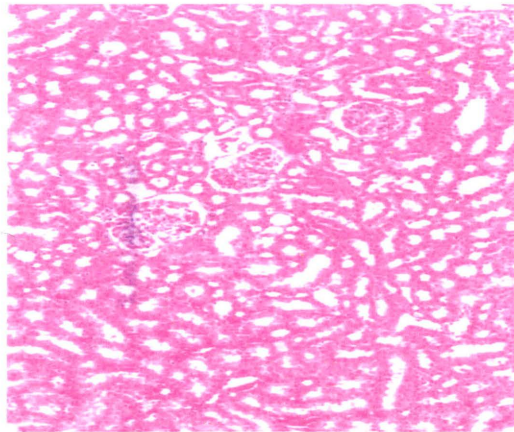


İ/R Karaciğer

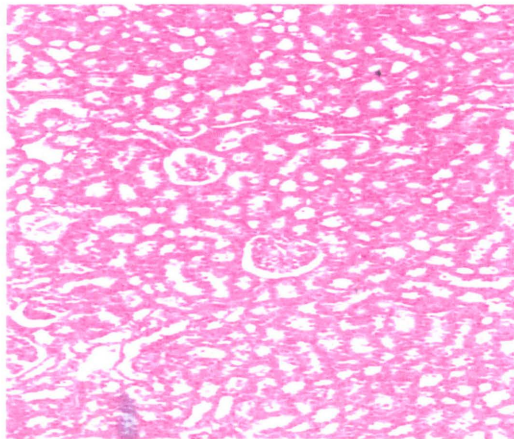


NAS Karaciğer

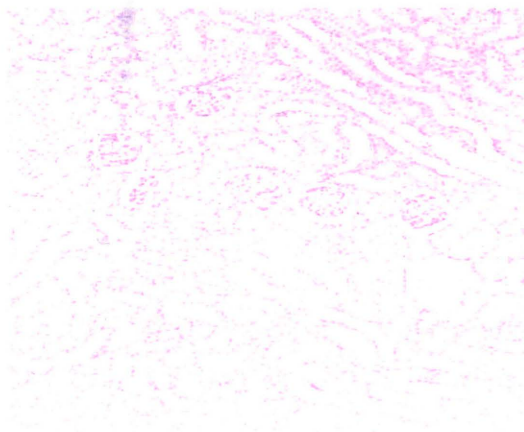
Resim 7: Kontrol, İ/R, ve NAS gruplarının böbrek örneklerinin histopatolojik görüntüleri



Kontrol Böbrek



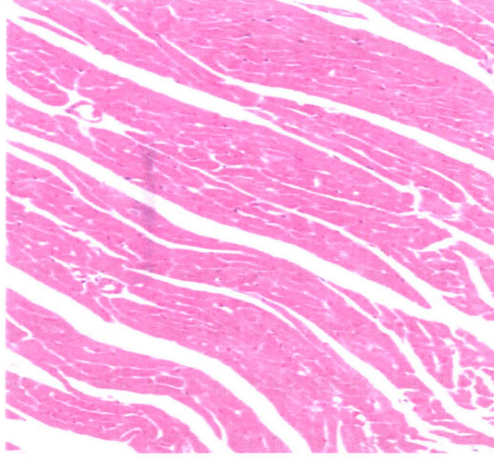
İ/R Böbrek



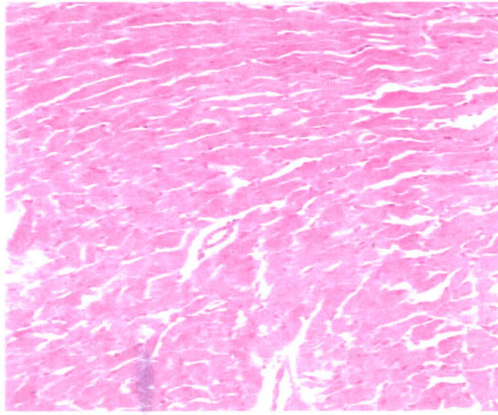
NAS Böbrek

Grupların böbrek örneklerinin histopatolojik kesitlerinin değerlendirilmesi, Klausner ve arkadaşlarının kriterlerine göre yapıldı⁽³⁵⁾. Ayrıca hücre şişmesi, vakuolizasyon, konjesyon ve infiltrasyon durumlarına göre de incelendi. Ancak gruplar arasında istatistiksel olarak fark gözlenmedi. Aynı durum karaciğer ve kalp doku örnekleri için de geçerlidir.

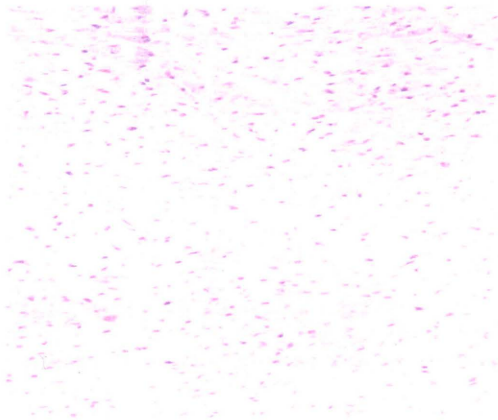
Resim 8: Kontrol, İ/R, ve NAS gruplarının kalp doku örneklerinin histopatolojik kesitleri.



Kontrol Kalp



İ/R Kalp



NAS Kalp

TARTIŞMA

Akut ekstremitte iskemisini takiben, ekstremitenin yeniden kanlandırılması ve normal dolaşımın sağlanması, oksijen kaynaklı serbest radikallerin oluşmasına ve ardından reperfüzyon hasarı ile yüksek mortalite ve morbiditeye neden olur⁽⁴¹⁾. Serbest radikaller ya direkt olarak, ya da hücrede bulunan antioksidan sistemleri yetersiz hale getirerek geri dönüşsüz hasar meydana getirebilmektedir⁽⁴²⁾. Reperfüzyon, iskemik doku için hayati bir olay olmasına rağmen süperoksit, hidroksil radikali ve hidrojen peroksit gibi serbest oksijen radikallerinin üretimine yol açarak hücre hasarı ve organ disfonksiyonuna yol açabilmektedir⁽²⁸⁾.

Pek çok çalışma sonucunda, hasarın yalnız iskemide değil reperfüzyon döneminde de artarak süregeldiği gösterilmiştir⁽⁴³⁾. İskemi sırasında hücre, biyomembran bütünlüğünü koruyamamakta, Ca^{++} ve fosfolipit A_2 salınımına neden olmaktadır. Artan biyomembran hasarı, poliansatüre yağ asitlerinin açığa çıkmasına ve yağ asidi radikallerinin oluşmasına yol açmaktadır. İskeminin bu safhasında oksijenin yeniden ortama girmesiyle, yağ asit radikalleri oksijen ile birleşerek lipit peroksidasyon reaksiyonu oluşturmaktadır⁽⁶⁾. Malondialdehit lipoperoksidasyonun bir ürünüdür ve oksidatif hasarın düzeyini göstermede, uygun bir değer olduğu bildirilmektedir⁽⁴⁴⁾. Serbest oksijen radikallerinin ateroskleroz, kanser ve inflamatuvar hastalıklar gibi birçok hastalıkta rolünün olduğu bilinmesine karşın, İ/R sendromu oksidatif hasarın en yoğun araştırıldığı alandır. Klinik uygulamada İ/R sendromunun en sık görüldüğü alanlar şok, akut arter tıkanıklıkları, damar yaralanmaları, kalp operasyonları sırasında aortun klempe edilmesi ve organ transplantasyonlarıdır⁽⁴⁵⁾. Hasarın boyutu iskeminin süresi, derecesi ve hedef organ ile ilgilidir⁽⁴⁶⁾.

İ/R sendromunda hasarın en aza indirilmesi için, birçok operatif teknik⁽⁴⁷⁾ ve ilaç denenmektedir. Son zamanlarda NAS, bu alanda popüler olarak araştırılmaktadır. NAS, birçok özelliğinden dolayı çeşitli klinik kullanım alanları bulmuştur. İçerdiği sülfidril

grubunun mukus glikoproteini içerisindeki disülfid bağlarını koparma yeteneği sayesinde bronkosekretolitik olarak yaygın kullanılmaktadır^(48,49,50). Ayrıca thiol grubu içeriğinden dolayı, asetaminofen zehirlenmesinin tetiklediği fulminan hepatik yetmezlikde başarıyla kullanılmaktadır⁽⁵¹⁾. Antinefrotoksik özelliğinden dolayı da radyografik kontrast ajan nefrotoksitesinde kullanım yeri vardır⁽³²⁾. Vazodilatasyon, nitrat düzeylerini arttırmak ve vasküler/platelet özellikleriyle antianginal etkileri mevcuttur. Kalp yetmezliği modülasyonu ve aterosklerotik süreçlerin stabilizasyonlarını da sağlayarak, kalp ve damar hastalıklarında genel kullanım alanı bulmuştur⁽³²⁾. NAS'ın İ/R hasarında kullanılmasındaki etki mekanizmalarını, ana başlıklar halinde tekrar sıralarsak; serbest oksijen radikalleri üzerine direkt protektif etki, membranlardaki peptid ve enzimlerin -SH grupları ile formasyona girerek onların disülfid bağlarını koparmak yolu ile serbest oksijen radikalleri üzerine indirekt protektif etki ve birçok proses ve faktörü düzenleme diye özetleyebiliriz⁽³²⁾.

NAS'ın İ/R sendromundaki değerini vurgulamak için, gerek tek başına gerekse diğer antioksidan özelliği olan ilaçlar ile karşılaştırmalı birçok çalışma yapılmıştır. Bu çalışmalarda genel olarak, NAS'ın İ/R sendromlarında hasarı azalttığı söylenmiş ve etkinliğinin daha da iyi gösterilmesi için çalışmaların geliştirilerek yapılması vurgulanmıştır^(29,52-61). Bu çalışmaların çoğu izole organ iskemi ve reperfüzyonu ile ilgilidir. İnfrarenal abdominal aortanın iskemi ve reperfüzyonunda karaciğer, akciğer, böbrek gibi organların dolaylı olarak etkilenmesi ile ilgili yapılmış deneysel çalışmalar çok azdır. Buradaki İ/R sendromunda NAS'inin etkinliğini araştıran bir deneysel çalışmaya ise rastlamadık. Çalışmamız bu konuda ilktir.

Deneysel hayvan çalışmalarında, gerek insan metabolizmasına yakın olmaları gerekse olaylara karşı verdikleri metabolik yanıtların insanlara benzerlik göstermeleri ve laboratuvar ortamında üretilmeleri, bakımı ve deneysel çalışma kolaylıklarından dolayı, ratlar yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu nedenlerden dolayı çalışmamız, ratlar üzerinde yapılmıştır.

Literatürde incelediğimiz NAS dozu, 100, 150, 225 ve 600 mg/kg gibi çeşitli miktarlarda bildirilmiştir. Kretschmar ve arkadaşlarının abdominal aort anevrizmektomisinden sonra görülen İ/R sendromunun düzeltilmesinde NAS ile mannitolü karşılaştırdıkları çalışmalarında, NAS dozu 150 mg/kg olarak belirtilmiştir⁽⁵⁷⁾. Çalışmamızın temelindeki abdominal aort oklüzyonu, adı geçen çalışma ile benzerlik gösterdiğinden aynı dozu uygulamayı uygun gördük.

NAS'in moleküler yapısı nedeniyle intravenöz, intramuskuler, peroral ve inhalasyon yollarıyla verilebilme özelliği vardır ve çalışmalarda çeşitli verilme yollarıyla uygulanmıştır. Biz de intravenöz uygulamayla aynı etkinliğe sahip olması nedeniyle, ilacı intraperitoneal vermeyi uygun bulduk.

İ/R sendromunda hasarlayıcı mekanizmalar hem biyokimyasal hem de hücresele düzeyde gerçekleşir. Biyokimyasal zedelenme esas olarak serbest oksijen radikalleri ile gerçekleşir. Serbest oksijen radikallerinin gösterilebilmeleri çok kısa ömürlü oldukları için son derece zordur. Lipit peroksidasyonun son ürünleri, aldehitler, hidrokarbon gazları ve MDA'dir. Özellikle biyolojik serbest oksijen reaksiyonları, lipit peroksidasyonun son ürünü olan MDA'in gösterilmesine dayanır⁽⁶²⁾. Hücresele hasarlanmanın temelini PMNL'ler oluşturur. MPO, nötrofillerde klorür varlığında H₂O₂'nin hipoklorik aside dönüşümünde etkilidir. Bu nedenlerden dolayı çalışmamızın biyokimyasal analiz bölümünde MDA ve MPO gibi parametrelerin ölçümleri yapılmıştır. Yine özellikle akciğerlerdeki nötrofil değerlerinin gruplar arasındaki farklılıklarını gösterebilmek için, akım sitometrik analizler yapma ihtiyacı duyduk. Çalışmamızın veri olanaklarını desteklemek için, parankimal organlarda histopatolojik inceleme yapmayı da uygun bulduk.

Akciğerler, İ/R sendromlarında mortalite ve morbiditeyi etkileyen en önemli hedef organ konumundadır. Zimon ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, akut alt ekstremitte iskemisi gelişen ve cerrahi tedavi uygulanan 70 hastada, erken postoperatif dönemde % 64 oranında pulmoner komplikasyon bildirmişler ve pre-operatif iskemi süresi ile oluşan akciğer hasarının şiddeti arasında belirgin bir korelasyon göstermişlerdir⁽⁶³⁾. Çalışmamızda akciğer dokusuna genel olarak baktığımızda İ/R hasarının birer göstergesi olan MDA ve MPO'ın, İ/R yapılan grupta kontrol grubuna göre yüksek ve NAS verilen grupta İ/R yapılan gruba göre sayısal olarak düşük olduğu görülmüştür. Ancak istatistiksel olarak NAS grubunda anlamlı düşüklük MDA değerlerinde saptandı. Bu bulgular literatürle uyumludur^(25,56). Akciğerde MPO aktivitesi İ/R grubunda kontrol grubuna göre anlamlı derecede yükselmiştir. Birçok yazar MPO'ın AC İ/R hasarını göstermede iyi bir endikatör olduğunda hemfikirdir^(25,64,65). Bizim çalışmamızın sonuçları da bunu göstermektedir. Çalışmamızda NAS verilen grupta MDA değerleri bir miktar düşse de bu istatistiksel olarak anlamlı değildi. De Backer bir klinik çalışmasında kardiopulmoner bypass yapılan hastaların bir grubuna NAS vermiş ve bu grubun bronkoalveolar lavaj sıvısında MDA değerlerini düşük bulmuştur⁽⁶⁴⁾. Diğer organlarda da MDA değerlerini incelerken, şaşırtıcı

olarak karşımıza çıkan yalnızca anestezi uygulanan kontrol grubunda, MDA düzeylerinin diğer tüm gruplardan yüksek bulunmasıdır. Sağdıç ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada aynı sonuçlar ortaya çıkmış olup, onlar da inceledikleri başka çalışmalarda kontrol gruplarında elde edilen sonuçların, aynı olduğunu görmüşlerdir⁽⁴¹⁾. İ/R sonrası MDA düzeylerinin kontrol grubuna oranla daha düşük bulunması, İ/R ile tetiklenen bazı radikal tutucu endojen mekanizmaların harekete geçtiğini düşündürmektedir. Bu mekanizmaların tükenmesiyle uzun zaman içinde MDA düzeylerinin daha yükselmesi beklenebilir. Çalışmamızın daha uzun reperfüzyon süreleri uygulanarak tekrarlanması, bu konuda daha ayrıntılı bilgi sağlayacaktır.

Akciğerin akım sitometrik ve histopatolojik incelemelerinde, akciğer nötrofil infiltrasyonu, NAS grubunda diğer gruplara nazaran anlamlı olarak azalmış olarak bulundu. Punch ve arkadaşları serbest oksijen radikal inhibitörlerinin akut alt ekstremitte İ/R olayı sonrası ortaya çıkan pulmoner mikrovasküler permeabilite artışı ve nötrofil akümülyasyonunu engellediğini göstermişlerdir⁽⁶⁶⁾. Çalışmamızda, İ/R modelinde uzak organ olarak akciğer hasarı gösterilmiş olup, NAS'in bu hasarı özellikle nötrofil infiltrasyonunu baskılayarak ve diğer parametreleri olumlu yönde etkileyerek engellediği görülmektedir.

İ/R sendromlarında karaciğer hasarı diğer organlara göre nadir ve geç görülür. Nakano ve arkadaşları özellikle karaciğer transplantasyonundan sonra donöre karşı oluşan adverse klinik durumlarda, hipotansiyonla kendini belli eden iskemik klinik hallerde veya oral alınan ilaçların karaciğer üzerine toksik etkisiyle oluşan GSH'ın azaldığı olayların düzeltilmesinde, NAS ile ön tedavinin faydalı olduğu göstermişlerdir⁽²⁹⁾. Çalışmamızda karaciğer MDA değerleri, İ/R ve NAS gruplarında kontrol grubuna göre istatistiksel açıdan anlamlı derecede düşük bulunmasına rağmen İ/R ile NAS grupları arasında istatistiksel anlamlılık bulunamamıştır. Karaciğer MPO değerleri İ/R grubunda anlamlı olarak yükselmiş ve NAS uygulanan grupta kontrol grubu değerlerine yaklaşmıştır. Bu bulgu alt ekstremitte İ/R sendromunda KC hasarının engellenmesinde NAS in etkili olduğunu göstermektedir. Bizim bulgularımız Weinbroum, Şenkaya ve Gaines'inkilerle uyumludur^(53,22,67). Eğer reperfüzyon süresi uzatılırsa hasarın daha bariz olarak karşımıza çıkması olasıdır.

İ/R sendromlarında kliniğe akciğer bulgularıyla beraber en sık böbrek bulguları hakim olur. Reperfüzyon sonrası iskemik dokudan dolaşıma karışan laktat, potasyum ve

myoglobulin yaşamı tehdit edebilen myoglobinürik renal yetmezliğe neden olabilmektedir⁽⁶⁵⁾. Bu nedenle İ/R sendromunda renal hasarı azaltıcı birçok çalışma yapılmıştır^(14,28,55,59).

Çalışmamızda böbrek MDA değerleri İ/R grubunda anlamlı derecede yükselmiş, NAS verilen grupta kontrol değerlerine yakın ölçüde düşmüştür. Bu sonuç böbrek dokusunda MDA aktivitesinin NAS ile düştüğünü; başka bir deyimle NAS in böbrek dokusunu İ/R hasarından koruduğunu göstermektedir. Böbrek MPO değerlendirilmesinde ise İ/R grubunda yüksek değerler elde edilmiş ancak NAS bu değerleri anlamlı ölçüde düşürememiştir. Literatürde İ/R sendromunda NAS kullanımının böbrek üzerine olan etkisini araştıran bir çalışmaya rastlamadık.

Çalışmamızda kalp hasarını incelediğimizde MDA ve MPO değerlerinde anlamlı değişiklikler yoktu. Dhalla'ya göre içerdiği thiol grubundan ötürü NAS İ/R da güçlü bir savunma sistemi oluşturmaktadır⁽²⁵⁾. Biz bu etkiyi kalpte gözlemlemedik ancak daha uzun reperfüzyon süreleriyle yapılacak çalışmalarda bu etki gösterilebilir.

Çalışmamızdaki histopatolojik incelemeler ışık mikroskopisinde yapıldı. Bu incelemeye göre akciğerdeki konjesyon ve PMNL infiltrasyonu, NAS verilen grupta verilmeyene göre anlamlı derecede düşük bulunmuştur. NAS, akciğer dokusunda İ/R sonrasında konjesyonu ve lökosit infiltrasyonunu azaltmaktadır. Akut arter tıkanıklığı ve reperfüzyon sonrasında % 64 oranında gelişebilen akciğer komplikasyonlarını önlemede de NAS'inin klinikte kullanılabileceğini göstermektedir. Işık mikroskopisinde kalp, karaciğer ve böbrek örneklerinde belirgin farka rastlanılmadı. Bu çalışmanın, diğer çalışmalarda olduğu gibi, elektron mikroskopik düzeyde yapılmasının bu anlamda daha büyük katkı sağlayacağı inancındayız.

Sonuç olarak, klinik olarak farklı kullanım alanları bulan NAS'in İ/R sendromunda kullanılması, hem bizim hem de diğer çalışmaların ışığında hasarı azaltıcı faydaları bulunmaktadır. Bu çalışmada İ/R hasarın NAS ile önlenebiliyor olması, en belirgin olarak akciğer ve böbrek dokuları üzerinde görülmüştür. Ancak verilerin daha sağlıklı olması için bu deneysel model geliştirilip zenginleştirilebilir. Bu çalışmalar yapıldıktan sonra NAS'in klinik kullanım alanlarında, İ/R sendromları daha üst sıralara çıkabilir.

SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada aortada deneysel İ/R sendromu oluşturarak NAS'in reperfüzyon hasarını azaltmadaki rolü, bazı biyokimyasal ve patolojik incelemelerle araştırılmıştır ve aşağıdaki sonuçlar elde edilmiştir:

1. Akciğer dokusunda MDA değeri, NAS verilen grupta verilmeyen gruba göre anlamlı derecede düşük bulunmuştur (p: 0.0032).
2. Akciğer dokusunda MPO aktivitesi, İ/R grubunda anlamlı derecede yükselmiş ancak NAS verilen grupta anlamlı düşüklük bulunmamıştır (p: 0.4497).
3. Akciğerde akım sitometrik incelemedeki PMNL sayısı, NAS verilen grupta İ/R grubundan anlamlı derecede düşük bulunmuştur (p: 0.0002).
4. Akciğerin histopatolojik incelemesinde, birim alandaki lökosit sayısı İ/R grubunda kontrol grubuna göre anlamlı yüksek (p: 0.002); NAS verilen grupta ise İ/R grubundan anlamlı derecede düşük bulunmuştur (P: 0.0004).
5. Karaciğerde MDA değeri, hem İ/R hem de NAS gruplarında kontrol grubuna göre anlamlı derecede düşük bulunmuş (p: 0.0143), ama NAS grubunda İ/R grubuna göre anlamlı düşüklük bulunmamıştır (P: 0.191).
6. Karaciğerde MPO aktivitesi, İ/R grubunda artmış, NAS verilen grupta anlamlı derecede azalmıştır (p. 0.0005).
7. Böbrek MDA değerleri, İ/R grubunda anlamlı derecede artmış (p: 0.003), NAS verilen grupta ise kontrol grubuna yakın değerler elde edilmiştir (p: 0.2703).
8. Böbrek MPO aktivitesi, İ/R grubunda anlamlı derecede artmış (p: 0.0022), ancak NAS verilen grupta düşme görülmemiştir (p: 0.9097).
9. Kalpde MDA değerleri, İ/R ve NAS gruplarında farklı bulunmamıştır.
10. Kalp MPO aktivitesi, gruplar arası farklılık göstermemiştir.
11. Işık mikroskopta histopatolojik incelemeye göre, akciğer lökosit sayısının İ/R grubunda arttığı (p: 0.002), NAS verilen grupta anlamlı olarak düştüğü saptandı

($p: 0.004$). Diğer organların incelemedesinde gruplar arasında anlamlı farklılık bulunmadı. Bu durum İ/R süreleri ile ilgili olabilir.

12. Hücrenel hasarın ve NAS'in bunu azaltıcı etkisinin olup olmadığı elektron mikroskopik inceleme ile daha iyi ortaya konulabilir.
13. Bu çalışma farklı iskemi ve reperfüzyon süreleri ile tekrarlanabilir.
14. NAS değişik dozlarda verilerek, ilacın en etkin verilif miktarı araştırılabilir.
15. Oldukça farklı alanlarda ve değişik dozlarda kullanım alanı bulan NAS, İ/R sendromlarında da kullanılabilir. Yan etki araştırmalarına ihtiyaç vardır.

Deneyisel Aort Oklüzyonunda Oluşan İskemi - Reperfüzyon Hasarını Azaltmada N-Asetilsisteinin Yeri

İskemi düzeltildikten sonra oluşan reperfüzyon sendromunda, iskemik organ dışındaki organlarda da hasar gelmekte ve bu klinik durum mortalite ve morbiditeyi arttırmaktadır. N-asetilsistein (NAS) klinikte daha çok bronkosekretolitik ve asetaminofen zehirlenmelerinde antidot olarak kullanılan bir ilaçtır. NAS'in ayrıca antioksidan özelliği de vardır. İlacın antioksidan etkisini kanıtlamak için ratlarda deneyisel iskemi-reperfüzyon (İ/R) modeli oluşturduk.

Çalışmamızda Wistar-albino türü 25 erkek rat, 3 gruba ayrıldı. Kontrol grubuna (n: 5) sadece aort eksplorasyonu yapıldı ve 5 saat anestezi altında tutuldu. İ/R grubunda (n: 10) abdominal aort renal arterlerin altından 4 saat süreyle kleplendi. Ardından klemp alınarak 1 saat reperfüzyona bırakıldı. NAS grubuna (n: 10) yukarıdaki işlemden farklı olarak aortik kross klemp konulmadan hemen önce intraperitoneal olarak 150 mg/kg NAS verildi. İşlem sonunda bütün ratlar sakrifiye edilerek parankimal organları alındı. Bu dokularda iskemi ve reperfüzyon hasarının göstergesi olan Malondialdehid (MDA) ve Miyeloperoksidaz (MPO) miktarlarına bakıldı. Ayrıca histopatolojik ve akım sitometrik inceleme yapıldı.

Dokulardaki MDA ve MPO değerlerine bakıldığında, NAS'inin İ/R hasarını azaltıcı etkisi gözlemlendi. Akciğerlerdeki akım sitometrik ve histopatolojik çalışmada NAS'inin lökosit infiltrasyonunu azaltıcı etkisi bulundu. Işık mikroskobisiyle yapılan histopatolojik incelemelerde diğer organlarda belirgin farklılığa rastlanılmadı.

Sonuç olarak NAS; parankimal organlarda özellikle de akciğerlerdeki iskemi ve reperfüzyon hasarını azaltmaktadır. Çalışmamız bunu destekler yöndedir. Klinik uygulama öncesinde farklı İ/R süreleri ve değişen NAS dozları ile birlikte daha farklı parametreler araştırılarak yapılacak çalışmalardan sonra İ/R sendromunda NAS'in kullanımı önerilebilir.

Use of N-Acetylcysteine in Ischemia - Reperfusion Injury following Experimental Aort Occlusion

In reperfusion syndrome; which occurs following improvement of ischemia, usually non-ischemic organs are injured as well as the ischemic organs, consequently resulting with additional morbidity and mortality. NAS is mainly used as a bronchosecretolytic or an antidote in acetaminophene toxicity in clinical practice. It also possesses antioxidant properties. We have planned a study to assess antioxidant properties of NAS on I/R in a rat model.

In our study, we used three groups of Wistar-albino rats (total number of rats =25). Control group (n=5) received only aort exploration under 5 hour-long anesthesia. I/R group's (n=10) abdominal aorts were clamped just inferior to the renal artery for 4 hours following. Then, clamps were removed and reperfusion was allowed for one hour. NAS group (n=10) received same procedure as I/R group and additionally treated with 150 mg/kg NAS intraperitoneally, prior to aortic cross clamp placement. After these procedures, all mice in each group were sacrificed and their parenchymal organs were obtained. These organs were subjected to malondialdehyde (MDA) and myeloperoxidase (MPO) level measurements and histopathologic and flow cytometric evaluations.

When MDA and MPO levels were considered, NAS group showed a smaller I/R injury. In addition, PMNL infiltration was smaller in evaluation of lungs of NAS group by flow cytometry and histopathologic. There was no difference between groups in light microscopy.

To conclude, NAS reduces ischemia and reperfusion injury in parenchymal organs and especially in lungs in a rat model. However, further studies using prolonged reperfusion periods, different doses of NAS and additional parameters needed to be undertaken prior to the clinical use of NAS in I/R syndrome.

KAYNAKLAR

1. Ascer E, Holier HL, Strandness DE, Haimovici H: Metabolic complications of acute arterial occlusion and skeletal muscle ischemia: myonephropatic-metabolic syndrome. Haimovici's Vascular Surgery Principles and Techniques, Cambridge, Blackwell Science. 1996 pp: 509-30.
2. Punkt K, Welt K, Scahaffranietz L: Changes of enzyme activities in the rat myocardium caused experimental hypoxia with and without ginkgo biloba extract pretreatment. *Acta Histochem*, 97: 67-79, 1995.
3. Brown JM, Grosso MA, Whiteman GS: The coincidence of myocardial reperfusion injury and hydrogen peroxide production in the isolated rat heart. *Surgery*, 105: 496-501, 1989.
4. Hammond B, Kontos HA, Hess ML: Oxygen radicals in the adult respiratory distress syndrome, in myocardial ischemia and reperfusion injury, and in cerebral vascular damage. *Can J Physiol Pharmacol*, 63: 173-187, 1985.
5. Flamm ES, Demopoulos HP, Seligman ML: Free radicals in cerebral ischemia. *Stroke*, 9: 445-7, 1978.
- 14 6. Ikezawa T, Nishikimi N, Oba Y: Lipid peroxides in the mechanism of ischemia-reperfusion injury in skeletal muscle. *Vasc Surg*, 27: 191-201, 1993.
7. Lindsay TF, Liauw S, Romanschin AD: The effect of I/R on adenine nucleotide metabolism and xanthine oxidase production in skeletal muscle. *J Vasc Surg*, 12: 8-15, 1990.
8. McCord JM: Oxygen-derived free radicals in post ischemic tissue injury. *N Engl J Med*, 312: 159-163, 1985.
9. Quinones-Baldrich W: Acute arterial and graft occlusion. In Moore W (ed); *Vascular Surgery*, Philadelphia, WB Saunders Co. 1993, pp 648-672.
10. Sciamanma MA, Lee CP: Ischemia-reperfusion induced of forebrain in mitochondria and protection by ascorbate. *Arch Biochem Biophts*, 305: 215-224, 1993.

11. Blaisdell FW: The reperfusion syndrome. *Microcirc Endothelium Lymphatics*, 5: 127, 1989.
12. Rubin b, Chang G, Liauw S: Phospholipid peroxidation deacylation and remodeling in post ischemic skeletal muscle. *Am J Physiol*, 263: 1695-1702, 1992.
13. Hearse DJ: Ischemia, reperfusion, and the determinants of tissue injury. *Cardiovasc Drug and Ther*, 767-76, 1990.
14. Berkan Ö, Yıldız E, Ayan S, Gökçe G: Ratlarda geçici abdominal aort oklüzyonu sonrasında oluşan renal hasarın azaltılmasında askorbik asidin rolü. *Damar Cerrahisi Dergisi*, 1; 17-20, 2002.
15. Rhoden EL, Pereira-Lima L, Teloken C, Lucas ML: Beneficial effect of alpha-tocopherol in renal ischemia-reperfusion in rats. *Jpn J Pharmacol*, Oct; 87(2): 164-6, 2001.
16. Jones SP, Hoffmeyer MR; Sharp BR, Lefer DJ: Role of intracellular antioxidant enzymes offer in vivo myocardial ischemia and reperfusion. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, Jan; 284(1): H277-82, 2003.
17. Serteser M, Koken T, Kahraman A, Yilmaz K: Changes in hepatic TNF-alpha levels, antioxidant status, and oxidation products after renal ischemia-reperfusion injury in mice. *J Surg Res*, Oct; 107(2): 234-40, 2002.
18. Nediani C, Perna AM, Liguori p, Formigli L: Beneficial effects of the 21-aminosteroid U 74389G on the ischemia-reperfusion damage in pig hearts. *J Mol Cell Cardiol*, Oct; 29(10): 2825-35, 1997.
19. Falck G, Schjott J, Jynge P: Hyperosmotic pretreatment reduces infarct size in the rat heart. *Physiol Res*, 48(5): 331-40, 1999.
20. Vriens MR, Marinelli A, Harinck HI, Zwinderman KH: The role of allopurinol in human liver ischemial reperfusion injury: a prospective randomized clinical trial. *Hepetogastroenterology*, Jul-Aug; 49(46): 1069-73, 2002.
21. Pincemail j, Defraigne JO, Detry O, Franssen C: Ischemia-reperfusion injury of rabbit kidney: Comparative effects of desferrioxamine and N-acetylcysteine as antioxidants. *Transplantation proceedings*, 32, 475-6, 2000.
22. Şenkaya I, Ökten B, Saba D, Güven H: İskelet kası iskemi reperfüzyon hasarının azaltılmasında tiklopidin. *GKDÇD*, 7: 5, 405-10, 1999.

23. Homer-Vanniasinkam S, Gough MJ: Role of lipid mediators in the pathogenesis of skeletal muscle infarction and oedema during reperfusion after ischemia. *Br J Surg*, 81: 1500-3, 1994.
24. Groeneveld AB, Raijmakers PG, Ravwerda JA, Hack CE: The inflammatory response to vascular surgery-associated ischemia and reperfusion in man: effect on postoperative pulmonary function. *Eur J Vasc Endvasc Surg*, 14: 351-9, 1997.
- 42 25. Dhalla NS, Elmoselhi AB, Hata T, Makino N: Status of myocardial antioxidants in ischemia-reperfusion injury. Review. *Cardiovascular Research*, 47: 446-456, 2000.
26. Fantini GA, Conte MS: Pulmonary failure following lower torso ischemia: clinical evidence for a remote effect of reperfusion injury. *Am J Surg*, 61: 316-9, 1995.
27. İsbir S, Akgün S, Ak K, Zeybek Ü, Aydın M: Akut alt ekstremité iskemii/reperfüzyon hasarının akciğer serbest oksijen radikalleri üzerine olan etkisi. *TGKDCD*, 8: 2, 629-31, 2000.
- 19 28. Rahman A, Üstündağ B, Çekirdekçi A, Özercañ İH: Renal iskemii-reperfüzyon hasarının azaltılmasında trimetazidinin rolü: Deneysel çalışma. *Damar Cerrahisi Dergisi*, 3: 1-6, 2000.
- 29 29. Nakano H, Boudjema K, Jaeck D, Alexandre E, Imbs P: Amelioration of hepatocellular integrity and inhibition of sinusoidal oxidative stress by N-acetylcysteine pretreatment in cold ischemia-reperfusion injury of rat liver. *Eur Surg Res*, 28: 245-255, 1996.
30. Mucolytic Agents 48: 24, Acetylcysteine. *AHFS Drug Information*, 2622-4, 2001.
31. Bulger EM, Maier RV: Antioxidants in critical illness. *Arch Surg*, 136: 1201-1207, 2001.
- 28 32. Sochman J: N-acetylcysteine in acute cardiology: 10 years later. What do we know and what would we like to know?!. *Journal of the American College of Cardiology*, 39 (9): 1422-8, 2002.
- 10 33. Baltarlı A, Çolakođlu N, Önem G, Gökşin İ: İskemik preconditioning, sıçanlarda bilateral alt ekstremité iskemii/reperfüzyonuna bağlı gelişen akciğer hasarını artırır. *TGKDCD*, 8: 1, 537-9, 2000.
- 11 34. Tassiopoulos AK, Carlin RE, Gao Y: Role of nitric oxide and tumor necrosis factor on lung injury caused by ischemia/reperfusion of the lower extremities. *J Vasc Surg*, 26: 647-56, 1997.

- 17 35. Klausner JM, Paterson IS, Kobzik L: Vasodilating prostaglandins attenuate ischemic renal injury only if thromboxane is inhibited. *Ann Surg*, 82: 1026-1060, 1989.
- 18 36. Yılmaz MT, Deniz G: Flow Cytometry ve tıpta kullanımı. İstanbul Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü İmmunoloji Anabilim Dalı, İstanbul. 1997; s.1-9.
37. Schierwagen C, Bylund-Fellenius AC, Lundberg C: Improved method for quantification of tissue PMN accumulation by myeloperoxidase. *J Pharmacol Methods*, 41: 313-19, 1990.
- 16 38. Lowry OH, Roseburgh NL, Farr AL, Randel RI: Protein measurement with folin phenol reagent. *J Biol Chem*, 193: 265-275, 1951.
39. Buege TA, Aust SD: Microsomal lipid peroxidation . *Methods Enzymol*, 52: 302-310, 1978.
40. Zhou S, Palmeira CM, Wallace KB: Doxorubicin-induced persistent oxidative stress to cardiac monocytes. *Toxicology Letters*, 121: 151-7, 2001.
- 17 41. Sağdıç K, Ener S, Gür E, Yılmaz M: İskelet kası iskemi reperfüzyon hasarının azaltılmasında sodyum askorbat. *Damar Cerrahisi Dergisi*, 2: 51-7, 1996.
- 18 42. McCord JM: The evolution of free radicals and oxidative stress. *Am J Med*, 108: 652-9, 2000.
- 20 43. Bozkurt AK: Deneysel iskemi-reperfüzyon hasarının önlenmesinde pentoksifilin rolü. *Damar Cerrahisi Dergisi*, 3: 101-4, 2001.
- 15 44. Ji LL: Exercise, oxidative stress, and antioxidants. *Am Sports Med*, 24(6): 20-6, 1996.
- 21 45. Aksoy BS, Aktan AÖ: İskemi reperfüzyon hasarında serbest radikallerin rolü. *Aktüel Tıp Dergisi*, 5(7): 50-3, 2000.
- 22 46. Oredsson S, Arlock P, Plate G, Quarfordt P: Metabolic and electrophysiological changes in rabbit skeletal muscle during ischemia and reperfusion. *Eur J Surg*, 159: 3-8, 1993.
- 23 47. Defraigne JO, Pincemail J, Laroche C, Blaffart F, Limet RN: Successful controlled limb reperfusion after severe prolonged ischemia. *J Vasc Surg*, 26: 346-50, 1997.
- 24 48. Walsh TS, Lee A: N-acetylcysteine administration in the critically ill. *Review. Intensive Care Med*, 25(5): 432-4, 1999.

- 25 49. Damenighetti G, Quattropani C, Schaller MD: Therapeutic use of N-acetylcysteine in acute lung diseases. Review. *Rev Mal Respir*, 16(1): 29-37, 1999.
- 26 50. Ruffmann R: Reactive oxygen species in acute lung injury. *Eur Respir J*, 12(6): 1486, 1993.
- 27 51. Kaeys R, Harrison PM, Wendon JA, Forbes A, Gove C, Alexander GJM, Williams R: Intravenous acetylcysteine in paracetamol induced fulminant hepatic failure : A —prospective controlled trial. *BMJ*, 303: 1026-1029, 1991.
- 30 52. Chen L, Seaber A, Nasser R, Stamler JS, Urbaniak JR: Effects of S-nitroso-N-acetylcysteine on contractile function of reperfused skeletal muscle. *Am J Physiol*, 274(43): R822-R829, 1998.
- 31 53. Weinbroum AA, Kluger Y, Ben-Abraham R, Shapira I, Karchevski E, Rudick V: Lung preconditioning with N-acetyl-L-Cysteine prevents reperfusion injury after liver no flow-reflow: a dose-response study. *Transplantation*, 71(2): 300-6, 2001.
- 32 54. Weinbroum AA, Rudick V, Ben-Abraham R, Karchevski E: N-acetyl-L-cysteine for preventing lung reperfusion injury after liver ischemia-reperfusion. *Transplantation*, 69(5): 853-9, 2000.
- 33 55. Pincemail J, Defraigne JO, Detry O, Franssen C, Meurisse M, Limet R: Ischemia-reperfusion injury of rabbit kidney: Comparative effects of desferrioxamine and N-acetylcysteine as antioxidants. *Transplantation Proceedings*, 32: 475-6, 2000.
- 34 56. Demir S, Inal-Erden M: pentoxifylline and N-acetylcysteine in hepatic ischemia/reperfusion injury. *Clinica Chimica Acta*, 275: 127-135, 1998.
- 35 57. Kretzschmar M, Klein U, Palutke M, Schirrmeister W: Reduction of ischemia-reperfusion syndrome after abdominal aortic aneurysmectomy by N-acetylcysteine but not mannitol. *Acta Anaesthesiol Scand*, 40: 657-664, 1996.
- 36 58. Vivot C, Stump DD, Schwartz ME, Theise ND, Miller CM: N-acetylcysteine attenuates cold ischemia/reperfusion injury in the isolated perfused rat liver. *Transplantation Proceedings*, 25(2): 1983,4, 1993.
- 37 59. Dimari J, Megyesi J, Udvarhelyi N, Price P, Davis R, Safirstein R: N-acetylcysteine ameliorates ischemic renal failure. *Am J Physiol*, 272(41): 292-8, 1997.
- 38 60. Menasché P, Grousset C, Gauduel Y, Mouas C, Piwnica A: Maintenance of the myocardial thiol pool by N-acetylcysteine. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 103: 936-44, 1992.

- 39 61. Heller AR, Groth G, Heller SC, Nebe T, Quintel M, Koch T: N-acetylcysteine reduces respiratory burst but augments neutrophil phagocytosis in intensive care unit patients. *Crit Care Med*, 29: 272-6, 2001.
- 40 62. Draper HH, Hadley M: Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Methods Enzymol*, 186: 421-31, 1990.
- 41 63. Zimon IN, Mavlianova NA: Respiratory disorders in patients with acute arterial occlusion of legs and ischemic syndrome. *Khirurgiia*, 16-8, 1997.
- 43 64. De Backer WA, Amsel B, Jorens PG, Bossaert L, Hiemstra PS, van Noort P, van Overveld FJ: N-acetylcysteine pretreatment of cardiac surgery patients influences plasma neutrophil elastase and neutrophil influx in bronchoalveolar lavage fluid. *Intensive Care Med*, 22: 900-8, 1996.
- 44 65. Grisotto PC, dos Antos AC, Coutinho-Netto J, Cherri J, Piccinato CE: Indicators of oxidative injury and alterations of the cell membrane in the skeletal muscle of rat submitted to ischemia and reperfusion. *Journal of Surgical Research*, 92: 1-6, 2000.
- 45 66. Punch J, Rees R, Cashmer B, et al: Acute lung injury following reperfusion ischemia in the hind limbs of rats. *J Trauma*, 31: 760-5, 1991.
- 47 67. Gaines G, Welborn III MB, Moldawer LL, Huber TS, Harward TRS, Seeger JM: Attenuation of skeletal muscle ischemia/reperfusion injury by inhibition of tumor necrosis factor. *J Vasc Surg* 29: 370-6, 1999.
68. Bayersdorf F, Mitrev Z, Ihnken K, Schmiedt W, Sarai K: Controlled limb reperfusion in patients having cardiac operations. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 111: 873-81, 1996.