

Ratlarda Geçici Abdominal Aort Oklüzyonu Sonrasında Oluşan Renal Hasarın Azaltılmasında Askorbik Asidin Rolü

Özal Berkan*, Esin Yıldız**, Semih Ayan***, Gökhan Gökçe***, Hakan Kılıçaslan***, İlhan Günay*, Kasım Doğan*

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Radiyasyon Anabilim Dalı

ÖZET

Amaç: Çalışmanın amacı, distal abdominal aortada akut oklüzyon sonucunda ortaya çıkan geçici iskemi ve reperfüzyonun böbrek dokusu üzerinde yaptığı hasarı ve askorbik asidin bu hasarı önlemedeki etkisini incelemektir.

Materyal ve Metod: Çalışmaya alınan 19 adet rat üç gruba ayrıldı. Kontrol grubundaki ratlarda (Grup 1), hiçbir girişim yapılmadan batin açıldı ve tekrar kapatıldı. İskemi reperfüzyon (İ/R) grubunda (Grup 2) infrarenal aortaya klemp konularak 3 saat iskemi ve 1 saat reperfüzyon oluşturuldu. Askorbik asit verilen ratlarda da (Grup 3) aynı işlem yapıldı, ancak 5 gün önceden askorbik asit verilmeye başlandı. Ratlardan doku örnekleri alındı ve hemotoksilen eosin boyası ile boyandı. Böbreklerdeki patolojik değişikliklerin derecesini ifade edebilmek için, Evre 0 ile 4 arasında değişen puanlama sistemi kullanılarak hasar skoru hesaplandı.

Sonuçlar: Kontrol grubuna göre, 2. ve 3. gruplarda bulanık şişme, ödem ve konjesyon daha belirgindi. Kontrol grubunun hasar skor puanı 0.6, 2. grubun 2.14, 3. grubun 1.85 olarak hesaplandı. Böbreklerde oluşan hasar, 3. grupta 2. gruba göre daha azdı ($p<0.05$).

Tartışma: Distal abdominal aortanın oklüzyonu sonucunda oluşan geçici iskemi ve reperfüzyonun böbrek dokusu üzerinde yaptığı hasarı önlemede askorbik asidin yararlı etkisi olduğu görüldü.

Anahtar Kelimeler: Askorbik asit, böbrek hasarı, aort oklüzyonu, iskemi reperfüzyon.

SUMMARY

THE ROLE OF ASCORBIC ACID ON REDUCING RENAL INJURY DUE TO TRANSIENT ABDOMINAL AORTIC OCCLUSION IN RATS

Objective: The aim of this study was to investigate renal injury due to ischemia/reperfusion (I/R) after transient acute distal abdominal aortic occlusion and to evaluate the effect of ascorbic acid on these alterations.

Material and Method: Nineteen rats were divided into three groups. Rats in the control group (Group 1) were undertaken laparotomy and closed after exploration of abdominal aorta. In the I/R group (Group 2), the infrarenal aorta of the rats were clamped for a period of 3 hours. After the ischemic period, aortic clamping was removed and waited for 1 hour of reperfusion period. The rats in the ascorbic acid group (Group 3) were administered sodium ascorbic acid commencing from 5 days before experimental procedure. The animals were sacrificed and the histological specimens of the lungs were examined. The pathological changes in the lungs were ranged between stage 0+ and 4 correlated to the level of increasing injury.

Result: Edema, congestion and hydropic degeneration were more prominent in the specimens of group 2 and 3 as compared to the control group. The average scores were 0.6, 2.14, 1.85 in the groups 1,2,3, respectively. Group 3 was associated with lesser degrees of renal injury as compared to the second group ($p<0.05$).

Conclusions: Pretreatment with ascorbic acid was beneficial in prevention of renal injury due to ischemia/reperfusion after transient acute distal abdominal aortic occlusion

Key Words: Ascorbic acid, renal injury, aortic occlusion, ischemia reperfusion

Alt ekstremitelerde akut arteriyel oklüzyon sonrasında ortaya çıkan myonefropatik sendrom ölümle sonuçlanabilen ciddi komplikasyonlara neden olabilmektedir [1]. Ser-

best oksijen radikalleri iskemi reperfüzyon hasarına bağlı olarak ortaya çıkmakta ve hedef organlardaki hasar oluşumunda önemli rol oynamaktadırlar [2,3]. Güçlü bir antioksidan olan as-

korbbik asit indirgeyici etkisiyle serbest oksijen radikallerini ortamdan kaldırmakta ve sebep oldukları hasarı önlemektedir [4,5,6].

Bu çalışmada, abdominal aortada akut oklüzyon sonucunda ortaya çıkan geçici iskemi ve reperfüzyonun böbrek dokusu üzerinde yaptığı hasar ve askorbik asidin bu hasarı önlemedeki etkisi histopatolojik yönden araştırıldı.

MATERYAL VE METOD

Ağırlıkları 210 - 295 gr arasında olan aynı ortamda yaşamış ve aynı şekilde beslenmiş 19 adet Wistar albino cinsi beyaz rat çalışmaya alındı. Ratlar kontrol grubu (Grup 1), iskemi reperfüzyon grubu (Grup 2) ve askorbik asit verilen çalışma grubu (Grup 3) olmak üzere üç gruba ayrıldı. Oda havasında, 20 C°'de, Ketamine HCl (Ketalar-Eczacıbaşı) 40 mg /kg + xylazine (Rompun-Bayer) 5 mg/kg sol ön ayak adalesine intramusküler yolla uygulanarak anestezi sağlandı. İşlem boyunca ratlar solunumları spontan olarak devam edecek şekilde uyutuldu. Anestezi sonrasında batin yaklaşık 4 cm'lik orta hat insizyonla ksifoidin hemen altından pubisin 0.5 cm üzerine kadar açıldı.

Sadece anestezi verilen 1. gruptaki ratlarda, batin açıldı ve abdominal aorta eksplere edildikten sonra hiçbir girişim yapılmadan tekrar 4/0 atravmatik sütür ile kapatıldı (n=5). I/R oluşturulan 2. grupta batin açıldıktan sonra abdominal aorta eksplere edildi ve infrarenal aortaya klemp (vascu stadd mini-scalan) konularak batin kapatıldı (n=7). 3 saatlik iskemi süresinin sonunda batin sütürleri alınarak aortadaki klemp kaldırıldı ve batin tekrar kapatılarak 1 saatlik reperfüzyon süresi beklendi. Askorbik asit verilen 3. grupta da bu işlemin aynısı yapıldı (n=7). Bu gruptaki ratlara 5 gün önceden 50 mg/kg/gün İM olarak sodyum askorbat (Redoksan) verildi. Yapılan işlem tamamlandıktan sonra ratlara yüksek doz anestezi verilerek ratlar sakrifiye edildi ve böbrekleri çıkartılarak formalinde fikse edildi. Gözlemler, deneyin ve alınan örneklerin ayrıntılarını bilmeyen tarafsız bir patoloğ tarafından yapıldı. Her üç grupta bulunan ratlardan doku örnekleri alındı ve parafin bloklar hazırlandı. Bu parafin bloklardan seri kesitler yapılarak hemotoksilen eozin boyası ile boyandı. Histopatolojik incelemede; Klausner'in ortaya koyduğu kriterleri modifiye edilerek hasar skor puanı hesaplandı [7]. Hesaplama yapı-

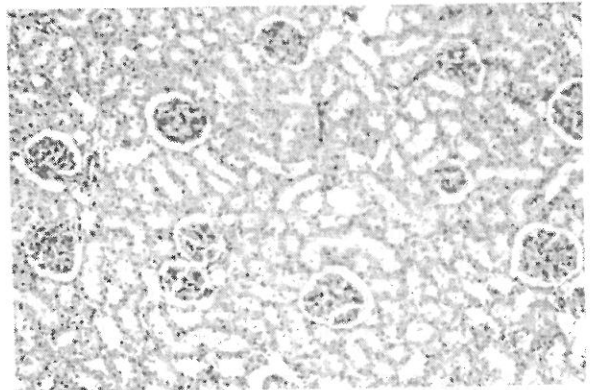
lırken proksimal ve distal tübüler epitelde bulanık şişme ile tübüler nekroz varlığı, infiltrasyon, ödem ve konjesyon baz alındı ve 0 ile +4 arası derecelendirme yapıldı. Buna göre; Evre 0, değişiklik yok; Evre 1: Tüm bölgelerde %5'den az hafif derecede değişiklikler; Evre 2: Tüm sahalarında %5-25 oranında yer alan orta derecedeki değişiklikler; Evre 3: %25-75 arasında yer alan multifokal değişiklikler; Evre 4: %75'in üzerinde olan ileri derecede ve yoğun değişiklikler olarak puanlama yapıldı.

İstatistiksel olarak kontrol grubu (Grup 1), I/R grubu (Grup 2) ve C vitamini verilen grup (Grup 3) ikiyeşerli olarak kendi aralarında Mann Whitney testi ile karşılaştırıldılar. P değerinin 0.05'in altında olması (p<0.05) anlamlı kabul edildi.

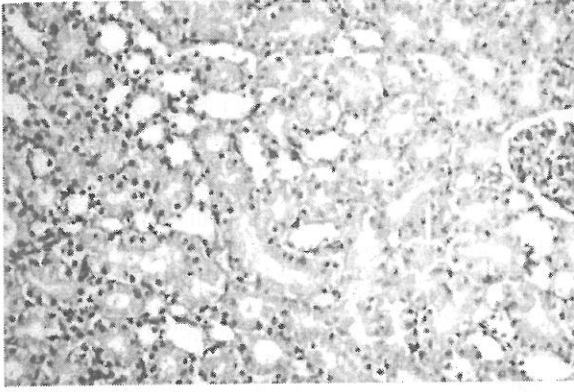
SONUÇLAR

Histopatolojik değerlendirmede kontrol grubunda normale yakın bir böbrek dokusu görüldü (Resim 1). Grupların hiçbirisinde tübüler nekroz yoktu. İkinci ve üçüncü grupta, kontrol grubuna göre bulanık şişme, ödem ve konjesyon daha belirgindi (Resim 2). Üçüncü grup, ikinci grup ile kıyaslandığında, 3. grupta bulanık şişmenin daha az olduğu görüldü (Resim 3). Ayrıca, infiltrasyon ve konjesyon da daha azdı.

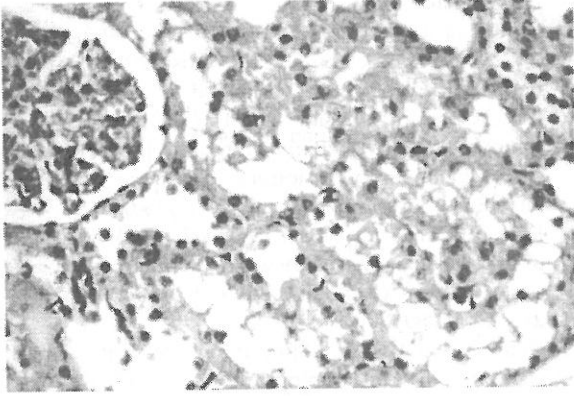
Böbreklerdeki patolojik değişikliklerin derecesini ifade edebilmek için kullanılan semikantitatif değerlendirmede, kontrol grubunun hasar skor puanı 0.6 olarak bulundu. Kontrol grubunun hasar skor puanı hesaplanırken, ortalaması alınan puan değerleri 0 ile +1 arasında değişmekteydi. İkinci ve üçüncü grubun hasar skor puanı hesaplanırken ise ortalaması alınan puan değerleri +1 ile +3 arasında değişmekteydi. Ha-



Resim 1: Normal böbrek dokusu (HE,x75)



Resim 2: Böbrek proksimal ve distal tüp epitel hücrelerinde bulanık şişme, ödem; evre 3 (HE,x 150)



Resim 3: Böbrek proksimal tüp epitel hücrelerinde bulanık şişme; evre 2 (HE,x 300)

zırlanan preperatların hiçbirisinde +4'e uyan yoğunlukta bulgular yoktu. Bu değerlere göre hesaplanan 2. grubun hasar skor puanı 2.14 olarak bulundu. Kontrol grubu ile 2. grup karşılaştırıldıklarında aralarında istatistiksel olarak anlamlı fark görüldü ($p<0.05$). Üçüncü grubun hasar skor puanı 1.85 olarak hesaplandı. Kontrol grubu ile 3. grup, hasar skor puanları yönünden karşılaştırıldıkları zaman aralarında istatistiksel olarak anlamlı fark vardı ($p<0.05$). Alt ekstremitelerde oluşan I/R sonucunda böbreklerde hasar olduğu gözlemlenen ikinci ve üçüncü gruptaki ratlar kendi aralarında karşılaştırıldıklarında, askorbik asit verilen 3. grubun hasar skoru puanı 2. gruba göre daha düşük bulundu. Bu iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark vardı ($p<0.05$).

TARTIŞMA

Renal I/R injürisi cerrahi ve anestezi yönünden önemli klinik sorunlar ortaya çıkartmakta-

dır. Ayrıca aortik cerrahi ve anestezi sırasında I/R'a sekonder olarak görülen renal disfonksiyonun da önemli ve sık morbidite ve mortaliteye neden olduğu çeşitli yayınlarda bildirilmiştir [8]. 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 [9,10]. Yapılan çalışmalarda I/R hasarı sonucunda böbreklerin de dahil olduğu birçok doku ve organda patolojik değişikliklerin olduğu gösterilmiştir [2,3,6]. Bu çalışmada ise alt ekstremitelerde oluşan geçici I/R sonrasında böbreklerde ne ölçüde hasar meydana geldiğini ve oluşabilecek hasarı önlemede askorbik asidin koruyucu etkisinin olup olmadığı araştırıldı. Bu amaçla böbreklerden alınan histopatolojik doku örnekleri incelendi.

I/R hasarı sonrasında ksantin oksidaz, süperoksit, hidroksil radikali ve hidrojen peroksit gibi serbest oksijen radikalleri ortaya çıkmaktadır [2,3]. Ortaya çıkan bu toksik SOR, yağ asit radikalleri ile etkileşerek lipid peroksidasyon reaksiyonunu oluşturarak hücre hasarına yol açarlar [11]. Bu mekanizmaya bağlı olarak alt ekstremitelerde oluşan I/R sonrasında böbreklerde de hasar meydana gelmektedir [10]. Bu hasarın oluşumunda, kompleks bir inflamatuvar döngünün başlaması ile sitokinler, interlökinler, tümör nekrozis fakör, serbest oksijen radikalleri gibi etkenlerin neden olduğu bir mekanizmanın da rol oynadığı düşünülmektedir [12].

Çalışmamızda, I/R uygulanan grup ile kontrol grubu arasında histopatolojik yönden önemli farklılıklar bulundu. I/R uygulanan 2. grupta daha fazla konjesyon, infiltrasyon ve bulanık şişme görüldü. Ancak preperatların hiçbirisinde +4'e uyan yoğunlukta bulgular yoktu. Bu sonuçlar, alt ekstremitelerde oluşan I/R hasarına bağlı olarak böbreklerde olumsuz değişikliklerin ortaya çıktığını ileri süren çalışmalarla, paralellik göstermektedir. Evre 4'e ait bulguların olmaması ise direk renal arterlere klemplenebilmesi sonucu oluşacak hasar kadar yoğun değişikliklerin gelişmediğini düşündürmektedir. Semikantitatif değerlendirmede, 2. grubun hasar skor puanı 2.14, 1. grubun hasar skor puanı ise 0.6 olarak hesaplandı. Bu iki grup karşılaştırıldığında zaman aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark çıktı ($p<0.05$).

I/R sonrasında ortaya çıkan SOR'lerinin

olumsuz etkileri ortadan kaldırmak için çeşitli maddeler denenmiştir. Bunlar arasında süperoksit dismutaz, allopürinol, katalaz, lipid peroksidaz, mannitol gibi maddeler de yer almaktadır [13]. Anti oksidan maddelerin, mikrovasküler permeabilite artışını ve nötrofil akümülyasyonunu önleyerek, I/R sonrasında ortaya çıkan uzak doku ve organ hasarına karşı koruyucu etkiye sahip oldukları gösterilmiştir [13,14]. Bu maddeler arasında yer alan askorbik asit, suda eriyen endojen kaynaklı bir antioksidandır. C vitamini hücre içi Ca birikimini ve SOR hasarını baskılayarak reperfüzyon hasarını azaltır. Askorbik asit membran içindeki ve ekstraselüler sıvılardaki lipid peroksidasyonunu önler, süperoksit ve hidroksil radikali ile kolayca reaksiyona girerek onları ortamdaki temizler. Böylece güçlü indirgeyici etkisiyle serbest oksijen radikallerini ortamdaki kaldırarak, sebep oldukları hasarı da önler [4,5]. Fiziksel stres plazma askorbik asit seviyesinde düşüğe neden olur. Askorbik asit oral veya parenteral yolla dışardan verildiğinde, plazma seviyesi geçici olarak normale döner ve stres sona erinceye kadar bu seviyesini korur. Bu çalışmada I/R olayı gerçekleşmeden önce C vitamin seviyesini yükseltmek amacı ile yapılan işleminden önceki 5 günlük sürede yüksek dozda askorbik asit verildi. Sonuçlarımız değerlendirildiğinde, I/R sürecine maruz kalan 2. ve 3. grupta belirgin böbrek değişikliklerinin olduğu gözlemlendi. Ayrıca her iki grupta hesaplanan hasar skor puanları kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulundu. Bununla birlikte askorbik asit verilen 3. grup, 2. grup ile karşılaştırıldığında, özellikle proksimal tubuluslardaki bulanık şişmenin daha az ortaya çıktığı görüldü. Böbreklerdeki hasar skor puanı da 3. grupta daha düşük bulundu. Bu bulgular askorbik asidin I/R'a bağlı böbrek hasarını önlemede etkili olduğunu göstermektedir. Bu sonucu düşündüren neden, iki grup arasındaki tek değişkenin, üçüncü grupta kullanılan askorbik asit olması ve gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmasıdır.

Histolojik değerlendirmeler sonucunda, distal abdominal aortanın oklüzyonuna bağlı olarak gelişen geçici iskemi/ reperfüzyonun böbrek dokusu üzerinde yaptığı hasarı önlemede askorbik asidin yararlı etkisi olduğu görüldü.

KAYNAKLAR

1. Haimovici H: Metabolic complications of acute arterial occlusion and skeletal muscle ischemia: myoneuropathic-metabolic syndrome. Ascer E, Holier HL, Strandness DE, Towne JB; Haimovici's Vascular Surgery Principles and Techniques, Cambridge, Blackwell Science. 1996 pp:509-30.
2. Ferrari R, Ceconi C, Curelo S, et al. Roles of oxygen free radicals in ischemic and reperfused myocardium. *Am J Clin Nutr* 53: 215-22, 1991.
3. Nelson K, Herndon B, Reisz G. Pulmonary effects of ischemic limb reperfusion: evidence for a role for oxygen-derived radicals. *Crit Care Med* 19: 360-3, 1991.
4. Sağdıç K, Ener S, Gür E, ve ark. İskelet kası iskemi reperfüzyon hasarının azaltılmasında sodyum askorbat. *Damar Cerrahisi dergisi* 51-7, 1996.
5. Lagerwall K; Madhu B; Daneryd P; Schersten T; Soussi B. Purine nucleotides and phospholipids in ischemic and reperfused rat skeletal muscle: effect of ascorbate. *Am J Physiol* 272: H 83-90, 1997.
6. Kearns SR, Kelly CJ, Barry M, et al. Vitamin C reduces ischaemia-reperfusion-induced acute lung injury. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 17: 533-6, 1999.
7. Klausner JM, Paterson IS, Kobzik L, et al. Vasodilating prostaglandins attenuate ischemic renal injury only if thromboxane is inhibited. *Ann Surg* 209: 219-224, 1989.
8. Gelman S. The pathophysiology of aortic cross-clamping and unclamping. *Anesthesiology* 82:1026-1060, 1995.
9. McCarthy JT. Prognosis of patients with acute renal failure in the intensive care unit: A tale of two eras. *Mayo Clin Proc* 71: 117-126, 1996.
10. Frank RS, Moursi MM, Podrazik RM, et al. Renal vasoconstriction and transient declamp hypotension after infrarenal aortic occlusion: Role of plasma purine degradation products. *J Vasc Surg* 7: 515-523, 1988.
11. Ikezawa T, Nishikimi N, Oba Y, et al. Lipid peroxides in mechanism of ischemia/reperfusion injury skeletal muscle experimental studies. *Vasc Surg* 20: 191-201, 1993.
12. Daemen MA, Van De Ven MV, Heineman E, Burman WA. Involvement of endogenous interleukin 10 and tumor necrosis factor-alpha in renal ischemia-reperfusion injury. *Transplantation* 67: 792-800, 1999.
13. Gianello P, Saliez A, Bufkenz X, et al. EUK 134, a synthetic superoxide dismutase and catalase mimetic protects rat kidneys from ischemia-reperfusion-induced damage. *Transplantation* 62: 1664-66, 1996.
14. Cohen SM, Siddiqi FA, Darakchiev B, Fantini GA, Hariri RJ, Barie PS. Attenuation of acute lung injury caused by hind-limb ischemia-reperfusion injury by butyrolactone anti-inflammatory agent FL1003. *J Trauma* 43: 247-52, 1997.