

DENEYSSEL ARAŞTIRMA / EXPERIMENTAL RESEARCH

APROTİNİNİN DENEYSSEL AORTİK İSKEMİ-REPERFÜZYON MODELİNDE BÖBREK HASARINA ETKİSİ

THE EFFECT OF APROTININ ON RENAL INJURY IN AN EXPERIMENTAL MODEL OF AORTIC ISCHEMIA-REPERFUSION

Murat KARABAGGA*, İlker KIRIŞI*, Nigar YILMAZ**, İrfan ALTUNTAŞI**, Nermin KARAHAN***, Hüseyin OKUTAN*
Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi, Kalp ve Damar Cerrahisi Anabilim Dalı*, Biyokimya Anabilim Dalı**, Patoloji Anabilim Dalı***, Isparta

Özet

Amaç: Bu çalışmanın amacı, rat infrarenal abdominal aortasında (AA) oklüzyon-reperfüzyon sonrası, böbreklerde oluşan iskemireperfüzyon (R) hasarına aprotininin etkisini araştırmaktır.

Yöntem: Yirmi dört adet Wistar-Albino rat rastgele ve eşit sayıda (n=8) olarak üç gruba ayrıldı. Kontrol grubunda, laparotomi ve AA diseksiyonu yapıldı ama oklüzyon uygulanmadı. Aortik R grubunda, AA'ya kros-klemp konularak 30 dk iskemide ve kros-klemp kaldırılarak 60 dk reperfüzyon uygulandı. Aortik R + aprotinin grubunda aortik R'e ek olarak, kros-klemp kaldırıldıktan 5 dk önce 40000 KIU/kg dozunda aprotinin intravenöz bolus olarak verildi. Rat böbrek dokularında malondialdehid (MDA), süperoksit dismutaz (SOD), katalaz ve glutatyon peroksidaz düzeyleri ölçüldü. Ayrıca böbrek doku örnekleri histopatolojik olarak incelendi.

Bulgular: Biyokimyasal incelemede, MDA ve SOD doku düzeyleri aortik R ile anlamlı derecede arttı (p<0.05 kontrol ile karşılaştırıldığında) ve aprotinin uygulaması ile anlamlı derecede azaldı (p<0.05 aortik R ile karşılaştırıldığında). Ancak, gruplara ait katalaz ve glutatyon peroksidaz doku düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı (p>0.05). Histopatolojik incelemede, glomerüllerde fokal nekroz, Bowman kapsül aralığında genifleme, tübülüs epitelinde nekroz, tübülüsde dilatasyon ve damarlarda konjesyon parametreleri aortik R ile anlamlı derecede arttı (p<0.05 kontrol ile karşılaştırıldığında) ve aprotinin uygulaması ile anlamlı derecede azaldı (p<0.05 aortik R ile karşılaştırıldığında). Tübülüs epitelinde dejenerasyon ve interstisyel iltihabi hücre infiltrasyonu ise aortik R ile anlamlı derecede arttı (p<0.05 kontrol ile karşılaştırıldığında) ve aprotinin uygulaması ile azaldı (p>0.05 aortik R ile karşılaştırıldığında).

Sonuç: Sonuçlarımız, aprotininin infrarenal AAR'ın böbrek hasarında koruyucu etkinliği olduğunu düşündürmektedir. (Damar Cer Der 2007;16(2):9-18)

Anahtar Kelimeler: abdominal aorta, aprotinin, böbrek, iskemireperfüzyon

Abstract

Purpose: Purpose of this study is to examine the effect of aprotinin on ischemia-reperfusion (IR) injury that occurs in kidneys after occlusion-reperfusion of infrarenal abdominal aorta (IAA) in rats.

Methods: Twenty-four Wistar-Albino rats were randomised in equal numbers (n = 8) into three groups. Control group underwent laparotomy and IAA dissection but not occlusion. Aortic IR group underwent 30 min of ischemia by clamping of IAA and 60 min of reperfusion by declamping of IAA. Aortic IR + aprotinin group underwent aortic IR and received 40000 KIU/kg intravenous bolus of aprotinin 5 min before declamping. Tissue levels of malondialdehyde (MDA), superoxide dismutase (SOD), catalase and glutatyon peroxidase were measured in rat kidney specimens. Histological examination of the kidney tissue specimens was also done.

Results: Biochemical analysis showed that, aortic IR significantly increased (p<0.05 vs control) while aprotinin significantly decreased (p<0.05 vs aortic IR) the levels of MDA and SOD. There was no statistically significant difference between the levels of catalase and glutatyon peroxidase in the groups (p>0.05). Histological examination showed that aortic IR significantly increased (p<0.05 vs control) while aprotinin significantly decreased (p<0.05 vs aortic IR) the parameters of focal necrosis in glomerulus, dilatation of Bowman's capsule, necrosis in tubular epithelium, tubular dilatation and congestion of blood vessels. Aortic IR also significantly increased (p<0.05 vs control) while aprotinin decreased (p>0.05 vs aortic IR) the parameters of degeneration of tubular epithelium and interstitial inflammatory infiltration.

Conclusion: Once daily low-molecular-weight heparin is as safe and effective as twice daily regimen for the treatment of DVT. This well tolerated, cost saving and easier regimen may be the first choice for the treatment. (Turkish J Vasc Surg 2006;15(3):15-19).

Keywords: Our results indicate that aprotinin has protective effects on aortic IR induced renal injury. (Turkish J Vasc Sur 2007;16(2):9-18)

Dr. İlker Kiriş

Turan Mh. 126. Cd. Okur Sitesi No:22/1,
32040, Isparta
Tel: 246 2329503
Fax: 246 2326280
e-mail: kirisilker@yahoo.com

GİRİŞ

İskemi-reperfüzyon (İR) hasarı vasküler cerrahide sıkça karşılaşılan önemli bir sorundur. Alt ekstremitelerde akut İR hasarı özellikle aort cerrahisinde abdominal aortaya geçici kros-klemp uygulanmasında ve tek veya çift taraflı akut femoral arter tıkanıklıklarında ortaya çıkmaktadır. İskemik kalan ekstremitelerde lokal doku hasarı, iskemik alanındaki bölgelerde de uzak organ hasarı olabilmektedir. Lokal etkiler klemp distalinde damarlarda ve kas dokusunda görülürken, sistemik etkiler de başlıca beyin, kalp, akciğer, böbrekler olmak üzere hemen tüm organlarda görülür. Özellikle alt ekstremitelerde İR periyodları sonrasında oluşan uzak organ hasarında böbrekler hedef organ konumundadır ve bu durum klinik olarak önem taşımaktadır⁽¹⁾.

İR periyodları sırasında, mikrovasküler fonksiyonların bozulması ile hem direkt olarak etkilenen organda hem de sistemik inflamatuvar yanıt aracılığıyla uzak organlardaki arteriyollerde bozulmuş endotel baskımlı dilatasyon oluşur. Bu patolojik süreçte kapiller yatakta artmış süzgeç filtrasyonu ve lökosit tıkaçları, postkapiller venüllerde plazma proteinleri ve lökosit ekstrasvazasyonu oluşur. Bu etkiler mikrosirkülasyonun her kademesinde artmış oksijen radikali üretimi ile ortaya çıkmaktadır⁽²⁾. Serbest oksijen radikalleri, lipid peroksidasyonu ile hücre zarı yapısını bozar, hücre zarı transport sisteminin çalışmasını engeller. Ayrıca proteinlerin oksidatif modifikasyonu ile hücresel enzimlerin işlevlerini kaybetmesine yol açar ve DNA üzerinde oluşturdıkları hasar ile de hücresel ATP üretimini engelleyerek enerji üretiminin bozulmasına sebep olurlar.

Aprotinin, sıvı akciğerlerinden elde edilen ve moleküler ağırlığı 6512 Dalton ağırlığında olan bir serin proteaz inhibitörüdür⁽³⁾. Aprotinin tek polipeptit zincirde birbirine 3 disülfid bağıyla bağlı 58 amino asitten oluşmaktadır. Aprotinin kallikrein-kinin sistemi aktivasyonunu inhibe eder. Aprotinin kalp cerrahisinde genel olarak perioperatif kan kayıplarını engellemek amacıyla kullanılmaktadır. İR hasarında, polimorfonükleer (PMN) lökositlerin ürettiği serbest oksijen radikallerinin, kompleman aktivasyonunun ve sitokinlerin etkili olduğu ispatlanmıştır⁽⁴⁾. Plazma

lökosit seviyelerinin azaltılmasıyla İR hasarının azaltılabileceği ve alt ekstremitelerde İR'a yol açan patolojik durumlarda anti-inflamatuvar ajanların lökosit aktivasyonunu azaltarak İR hasarını belirgin seviyelerde düşürdüğü bilinmektedir^(5,6). Buna ek olarak anti-inflamatuvar etkinliğe sahip olan aprotininin hepatik İR hasarında koruyucu etkinliğe sahip olduğu gösterilmiştir⁽⁷⁾.

Aprotininin, İR'a bağlı karaciğer⁽⁷⁾, kalp⁽⁸⁾ ve akciğerde⁽⁹⁾ oluşan hasarlara karşı koruyucu etkinliğinin bilinmesine rağmen, abdominal aort cerrahisinde alt ekstremitelerde İR hasarında uzak organ hasarı olarak böbrekler üzerindeki etkileri henüz yeterince araştırılmamıştır. Bu çalışmanın amacı, rat infrarenal abdominal aortasında okluzyon-reperfüzyon sonrasında, böbreklerde oluşan İR hasarına aprotininin etkisini araştırmaktır.

METOD

Bu çalışmada ortalama ağırlıkları 200-250 gr olan 24 adet Wistar-Albino rat kullanıldı. Ratlar deney öncesi bir hafta süre ile tel kafeslerde 12 saat gece 12 saat gündüz ritiminde, ortam sıcaklığı 24-26°C ve nem oranı %50-60 olacak şekilde tutuldu. Ratların beslenmesinde standart ticari pellet yemi ve fahır içme suyu kullanıldı. Tüm ratların bakımları, Tıbbi Araştırmalar Ulusal Derneği tarafından biçimlendirilen 'Deney Hayvanlarının Bakım Prensipleri'ne ve Laboratuvar Hayvan Kaynakları Enstitüsü tarafından hazırlanan Ulusal Sıvı Enstitüsü tarafından yayınlanan (NIH baskı no.85-23, 1985 revize edildi) 'Laboratuvar Hayvanlarının Bakım ve Kullanımı' için Klavuz'una uygun olarak yapıldı. Çalışma protokolü ve deneysel metod için etik kurul onayı alındı (08.11.2005 tarih ve 11/32 sayılı Etik Kurul kararı).

Deney Modeli

Yirmi dört rat rastgele ve eşit sayıda (n=8) olacak şekilde üç gruba ayrıldı. Kontrol grubunda (n=8), diğer gruplara uygulanan cerrahi işlemin stresi ve süresi eşit olacak şekilde laparotomi ve AA diseksiyonu yapıldı ancak AA'ya okluzyon uygulanmadı. Aortik İR grubunda (n=8) laparotomi ve AA diseksiyonu ardından AA'ya 30 dakika süre ile travmatik

mikrovasküler klemp ile oklüzyonu takiben klemp kaldırılarak 60 dakikalık reperfüzyon uygulandı. Aortik α R + aprotinin grubunda (n= 8), 30 dakika iskemi ve 60 dakika reperfüzyona ek olarak, klemp kaldırılmadan 5 dakika önce kuyruk veninden 40 000 KÜ/Kg aprotinin (Trasylol®, Bayer, Germany) verildi.

Aortik İskemi-Reperfüzyon

Deney başlangıcında, intramusküler enjeksiyonla 50 mg/kg ketamine hydrochloride (Ketalar® flakon, Parke-Davis, USA) verilerek anestezi sağlandı. α flam bir α sıtma lambası altında ratlar supin pozisyonda iken gerçekleştirildi. Ratlara ciltleri aseptik olarak hazırlanarak orta hat laparotomi yapıldı ve 10 ml α ık izotonik solüsyonu α v dengmesini korumak için intraperitoneal olarak verildi. α AA, barsakların α lak gazı bez yardımıyla uzaklaştırılması ardından dikkatli bir şekilde eksplore edildi. α AA'ya, travmatik olmayan bir mikrovasküler klemp (vascu-statts II, midi straight 1001-532; Scanlan Int., St. Paul, MN, USA) konuldu ve α s ve α v kaybını en az miktara indirmek için batın insizyonu geçici olarak plastik örtü ile sarılarak kapatıldı. 30 dakika sonra batın açılarak α AA'daki mikrovasküler klemp kaldırıldı ve 60 dakika süreyle reperfüzyon sağlandı. Aortik iskemi, klemp konulduğunda distal aortada pulsasyonun kaybolması ve reperfüzyon ise klempin kaldırılması sonrası distal aortada pulsasyonun geri gelmesiyle onaylandı. Böylece no-reflow fenomeni ekarte edildi. Reperfüzyon süresi sonunda tüm ratlar dekapitasyon yoluyla öldürüldü ve her iki böbrek enzimatik ve histopatolojik incelemeler için batından çıkarıldı. Böbrekler, biyokimyasal incelemeler yapılmaya kadar -78°C ' de saklandı.

Biyokimyasal İşlemler

Dondurulmuş böbrek doku örneklerinin ağırlıkları ölçüldü ve buz banyosunda, %0.05 sodium azide içeren 100 mmol/L fosfat tamponu (pH 7.4) içinde homojenize edildi (Ultra Turrax T25, Janke & Kunkel GmbH & Co., KG Staufen, Almanya) (1:10, w/v). Homojenat 30 dakika süreyle sonike edildi (Bandelin, Sonoplus UW 2070, Berlin, Almanya) ve ardından santrifüj edildi (10 dakika boyunca 5000 g). Elde edilen süpernatantlar, biyokimyasal incelemeler için

kullanılmaya kadar -78°C ' de saklandı. Süpernatant protein içeriği Lowry yöntemi ile saptandı⁽¹⁰⁾.

Malondialdehit Ölçümü

Reperfüzyon süreci sonunda artan serbest radikal yapımının bir göstergesi olan malondialdehit (MDA) düzeyleri, Draper ve Hadley'in çift α sıtma yöntemi ile saptandı⁽¹¹⁾. Yöntemin temeli, tiobarbituric asidin (TBA) MDA ile reaksiyonu sırasında oluşan rengin spektrofotometrik ölçümüdür. Bu amaçla, her bir santrifüj tüpünde, 0.5 ml süpernatana 100 g/L trichloroacetic asitten 2.5 mL eklendi ve tüpler 15 dakika süreyle kaynatıldı su banyosuna konuldu. Tüpler, musluk suyunda soğutulduktan sonra, 10 dakika boyunca 1000 g hızda santrifüj edildi. Bir test tüpünde, 2 mL süpernatana 1 mL 6.7 g/L TBA solüsyonuna eklendi ve tüp 15 dakika süreyle kaynatıldı su banyosuna konuldu. Solüsyon musluk suyunda soğutulduktan sonra 532 nm'de bir spektrofotometre (Shimadzu UV-1601) kullanılarak absorbans ölçüldü. MDA konsantrasyonu, MDA-TBA kompleksinin ekstinksiyon katsayısı kullanılarak hesaplandı (ekstinksiyon katsayısı $\epsilon = 1.56 \times 10^5 \text{ cm}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$) ve (nmol/mg protein) olarak ifade edildi.

Süperoksit Dismutaz Ölçümü

Süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesi, Spitz ve Oberley'e ait yöntemler kullanılarak ölçüldü⁽¹²⁾. SOD aktivitesinin tayini, 2-(4-iodofenol)-3-(4-nitrofenol) -5-feniltetrazolium klorid ile reaksiyona girerek kırmızı bir formazan boya oluşturan süperoksit radikallerini üreten ksantin ksantin oksidaz reaksiyonu temel alınarak yapıldı. SOD aktivitesi bu reaksiyonunun inhibisyon derecesi olarak saptandı. Sonuçlar (U/mg protein) olarak ifade edildi.

Katalaz Ölçümü

Katalaz (KAT) aktivitesi, Aebi'nin yöntemine göre ölçüldü⁽¹³⁾. Bu yöntemin prensibi, hidrojen peroksidin (H_2O_2) parçalanma hızının hız sabitinin (s^{-1} , k) belirlenmesi esasına dayanır. Hız sabiti, $k = (2.3/\Delta t)(a/b) \log (A_1/A_2)$ formülü kullanılarak hesaplandı. Formülde; A_1 : 0. saniye, A_2 : 15. saniye absorbans değerlerini, a: dilüsyon faktörü, b: süpernatant protein içeriğini göstermektedir. Sonuçlar, (k/mg protein) olarak ifade edildi.

Glutasyon Peroksidaz Ölçümü

Glutasyon peroksidaz (Gprx) aktivitesi Paglia ve ark.'nın metoduna göre çalışıldı⁽¹⁴⁾. Glutasyon peroksidaz hidrojen peroksidaz varlığında redükte glutasyonun (GSH) okside glutatona (GSSG) yükseltgenmesini katalize eder. Hidrojen peroksidin bulunduğu ortamda GSH-Px'in olufturduğu GSSG, glutasyon redüktaz ve NADPH yardımı ile GSH'a indirgenir. GSH-Px aktivitesi, NADPH'nin NADP⁺ya yükseltgenmesi sırasındaki absorbans azalmasıyla 340 nm'de okunmasıyla hesaplandı ve ünite/gram (U/gr) doku proteini şeklinde belirtildi.

Histolojik Değerlendirme

Doku örnekleri % 10'luk tamponlu nötral formaldehit solüsyonunda 24 saat fiske edildi. Örneklerin tümü doku takip cihazında (Shandon Patcenter) rutin takibe alınarak parafin bloklar hazırlandı. Bu parafin bloklardan mikrotom (Leica Rotary) ile her doku örneği için 5 µm kalınlığında seri kesitler hazırlanarak hemotoksilen Eozin (HE) boyası ile boyandı. İbık mikroskobu ile histopatolojik incelemeye tabi tutuldu. Böbrek dokuları; glomerüllerde skleroz, glomerüllerde fokal nekroz, bowman kapsül aralığında genifleme tübülüs epitelinde dejenerasyon, tübülüs epitelinde nekroz, tübülüslerde dilatasyon, interstisyel iltihabi hücre infiltrasyonu, damarlarda konjesyon, damar duvarında kalınlaşma ve interstisyumda fibrozis parametreleri yönünden incelendi.

Glomerüllerde skleroz, damarlarda konjesyon, damar duvarında kalınlaşma, tübülüslerde dilatasyon ve interstisyumda fibrozis yönünden bulgu yok negatif (-) ve bulgu var pozitif (+) olarak derecelendirildi. Tübülüs epitelinde dejenerasyon, tübülüs epitelinde nekroz, interstisyel iltihabi hücre infiltrasyonu, bowman kapsül aralığında genifleme ve glomerüllerde

fokal nekroz bulgusu yok negatif (-), bulgu var ise kendi içinde hafif (+), orta (++) ve fiddetli (+++) olarak derecelendirildi. Histopatolojik bulguların gruplara göre ortalama skorları (-) bulgu yok 0 puan, (+) hafif 1 puan, (++) orta 2 puan ve (+++) fiddetli 3 puan olarak derecelendirilerek hesaplandı.

İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analiz yapılmasında bir bilgisayar programı (SPSS ver. 13, SPSS Inc., Chicago, IL; USA) kullanıldı. Sayısal değişkenler 'ortalama±standart sapma' şeklinde sunuldu. Biyokimyasal verilerin istatistiksel olarak değerlendirilmesi sırasında gruplar arasında ki farkların incelenmesinde tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve ardından Tukey's honestly significant difference testi kullanıldı. P değerinin 0.05'den küçük olması istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Histopatolojik bulguların istatistiksel değerlendirilmesi sırasında gruplar arasındaki anlamlı farkların belirlenmesinde Kruskal-Wallis testi, iki grup arasındaki farkın belirlenmesinde de Mann-Whitney U testi kullanıldı. Kruskal-Wallis testi için p<0.01 değerleri ve Mann-Whitney U testi için p<0.05 değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

BULGULAR

Biyokimyasal Değerlendirme

Gruplara ait rat böbrek dokularındaki MDA (nmol/mg protein), SOD (U/mg protein), katalaz (k/mg protein) ve glutasyon peroksidaz (U/gr protein) düzeyleri Tablo 1'de gösterilmiştir.

Aortik <R grubundaki MDA ve SOD düzeyleri kontrol grubundaki düzeylere göre anlamlı derecede daha yüksekti (p<0.05). Aortik <R + aprotinin grubundaki MDA ve SOD düzeyleri ise aortik <R grubundaki düzeylere göre anlamlı derecede daha düflüktü (p<0.05). Gruplara ait katalaz ve glutasyon peroksidaz

Tablo 1. Gruplara ait biyokimyasal değerlendirme sonuçları.

	MDA (nmol/mg protein)	SOD (U/mg protein)	Katalaz (k/mg protein)	Glutasyon peroksidaz (U/gr protein)
Kontrol	25.06 ± 2.33	8.52 ± 0.46	0.03 ± 0.01	1.28 ± 0.18
Aortik <R	30.40 ± 3.23 *	9.56 ± 0.35 *	0.03 ± 0.03	1.30 ± 0.10
Aortik <R + aprotinin	25.03 ± 3.52	8.80 ± 0.43	0.02 ± 0.01	1.32 ± 0.07

* = diğer gruplarla karşılaştırıldığında p < 0.05, MDA = malondialdehit, SOD = superoksit dismutaz

düzeyleri birbiri ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı ($p>0.05$).

Histolojik Değerlendirme

Gruplara ait histolojik değerlendirme sonuçları Tablo 2’de gösterilmiştir. Kontrol grubuna ait böbrek doku kesitlerinin mikroskopik değerlendirilmesinde herhangi bir histopatolojik değişiklik saptanmadı (Tablo 2), (Resim 1).

Aortik <R grubunda glomerüllerde fokal nekroz, bowman kapsül aralığında genifleme, tübülusta dilatasyon ve damarlarda konjesyon bulgusu (+) hafif derecede iken, tübülüs epitelinde dejenerasyon ve interstisyel iltihabi

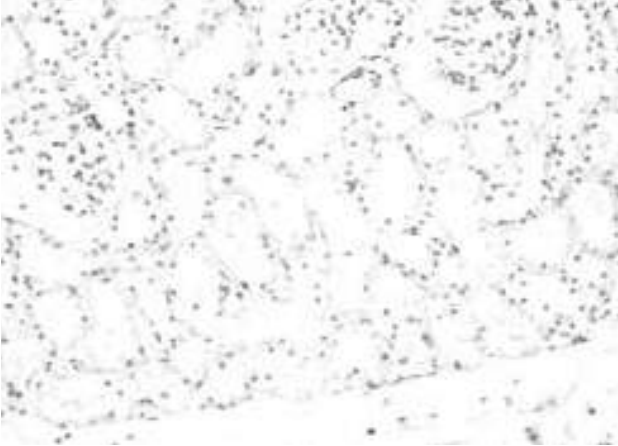
hücre infiltrasyonu (++) orta derecede tespit edildi. Tübülüs epitelinde nekroz (+++) ise şiddetli derecede bulundu. Aortik <R grubunda glomerüller skleroz, damar duvarında kalınlaşma ve interstisyumda fibrozis bulgusu saptanmadı (Tablo 2), (Resim 2).

Aortik <R + aprotinin grubunda tübülüs epitelinde dejenerasyon, tübülüs epitelinde nekroz ve interstisyel iltihabi hücre infiltrasyonu bulgusu (+) hafif derecede iken glomerüller skleroz, glomerüllerde fokal nekroz, Bowman kapsül aralığında genifleme, tübülusta dilatasyon, damarlarda konjesyon, damar duvarında kalınlaşma ve interstisyumda fibrozis bulgusu saptanmadı (Tablo 2), (Resim 3).

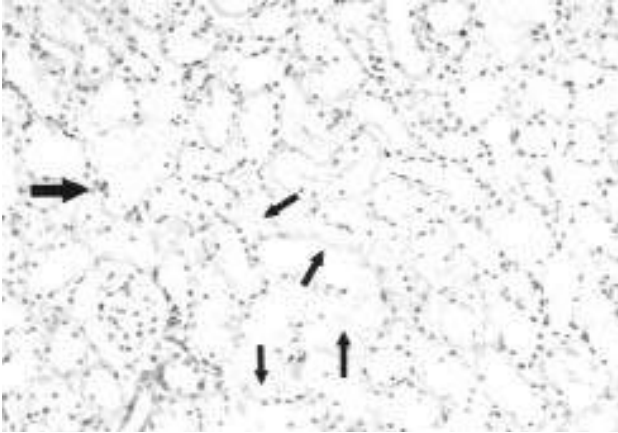
Tablo 2. Gruplara ait biyokimyasal değerlendirme sonuçları.

	Kontrol (n=8) (Grup I)					Aortik <R (n=8) (Grup II)					Aortik <R + aprotinin (n=8) (Grup III)					Kruskal- Wallis P	Mann- Whitney U P < 0.05
	-	+	+	+	OS	-	+	+	+	OS	-	+	+	+	OS		
			+	+				+	+				+	+			
				+					+					+			
Glomerüllerde Skleroz	8	0	0	0	-	8	0	0	0	-	8	0	0	0	-	p>0.05	Anlamlı değil
Glomerüllerde Fokal Nekroz	8	0	0	0	-	2	4	2	0	+	8	0	0	0	-	p<0.01	I-II, II-III
Bowman Kapsül Aralığında Genifleme	8	0	0	0	-	2	5	1	0	+	8	0	0	0	-	p<0.01	I-II, II-III
Tübülüs Epitelinde Dejenerasyon	8	0	0	0	-	0	2	5	1	++	3	3	1	1	+	p<0.01	I-II, I-III
Tübülüs Epitelinde Nekroz	8	0	0	0	-	0	1	2	5	+++	2	4	1	1	+	p<0.001	I-II, II-III, I-III
Tübülusta Dilatasyon	8	0	0	0	-	3	4	1	0	+	8	0	0	0	-	p<0.01	I-II, II-III
İnterstisyel İltihabi Hücre İnfiltasyonu	8	0	0	0	-	1	1	4	2	++	2	4	1	1	+	p<0.01	I-II, I-III
Damarlarda Konjesyon	8	0	0	0	-	3	4	1	0	+	8	0	0	0	-	p<0.01	I-II, II-III
Damar Duvarında Kalınlaşma	8	0	0	0	-	8	0	0	0	-	8	0	0	0	-	p>0.05	Anlamlı değil
İnterstisyumda Fibrozis	8	0	0	0	-	8	0	0	0	-	8	0	0	0	-	p>0.05	Anlamlı değil

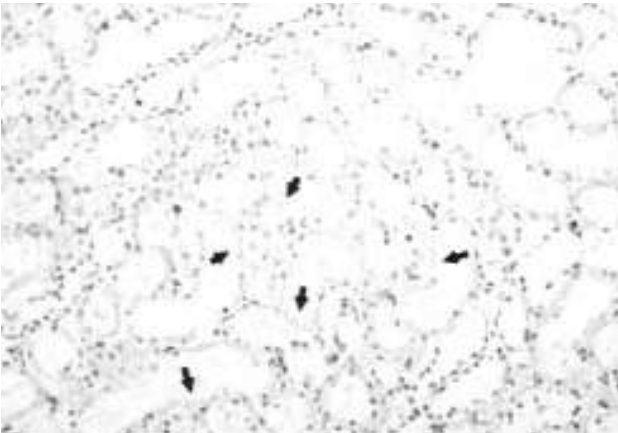
OS = ortalama skor



Resim 1. Kontrol grubuna ait normal böbrek dokusu. Sağlıklı glomerül ve tübülüs hücrelerinin yakından görünümü (100X HE).



Resim 2. Aortik αR grubuna ait tübülüs epitel hücrelerinde nekroz (ince ok) ve bir glomerülde nekroz (kalın ok). Tübülüs epitel hücrelerinde anlamlı derecede nükleus kaybı saptandı (100xHE).



Resim 3. Aortik αR + aprotinin grubuna ait tübülüs epitelinde nekroz, aortik αR grubuna göre anlamlı derecede daha az saptandı (100X HE).

Aortik αR grubunda, glomerüllerde fokal nekroz, Bowman kapsül aralığında genifleme, tübülüs epitelinde dejenerasyon, tübülüs epitelinde nekroz, tübülüste dilatasyon, interstisyel iltihabi hücre infiltrasyonu ve damarlarda konjesyon parametreleri kontrol grubundaki eşdeğer parametrelere göre anlamlı derecede daha yüksekti ($p < 0.05$). Aortik αR + aprotinin grubunda ise glomerüllerde fokal nekroz, Bowman kapsül aralığında genifleme, tübülüs epitelinde nekroz, tübülüste dilatasyon ve damarlarda konjesyon parametreleri aortik αR grubundaki eşdeğer parametrelere göre anlamlı derecede daha düşüktü ($p < 0.05$). Aortik αR + aprotinin grubunda tübülüs epitelinde dejenerasyon ve interstisyel iltihabi hücre infiltrasyonu aortik αR grubundaki değerlere göre daha düşüktü ama aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p > 0.05$).

TARTIŞMA

Bu çalışmanın sonuçları, aprotininin infrarenal aortik αR'a bağlı renal hasarda koruyucu etkinliği olduğunu düşündürmektedir. Bu düşüncüyü destekleyen ana bulgular aortik αR + aprotinin grubundaki MDA ve SOD değerlerinin aortik αR grubundaki değerlere göre anlamlı derecede düşük bulunmasıdır. Ayrıca, histopatolojik değerlendirmede aprotinin uygulaması ile aortik αR'un oluşturduğu doku hasarının anlamlı derecede azaldığı görüldü.

MDA poliansatüre yağ asitlerinin peroksidasyon ve arafidonik asit metabolizma ürünüdür⁽¹¹⁾. Serbest oksijen radikallerinden hidroksil radikali iskemik dokuda nötrofillerin kemotaksisi ve adezyonu sonrası NADPH aracılı bakteri fagositozunda oluşur ve reperfüzyon aşamasında sistemik dolaşıma geçer. Hidroksil radikali hücre lipid membranından bir elektron çalarak hidrojeni ayırır ve H_2O molekülü ile yağ asidi radikali oluşturarak bir zincirleme reaksiyon başlatır. Bu zincirleme reaksiyonların sonunda da MDA oluşur. Plazma ve doku MDA düzeyleri lipid peroksidasyonu miktarının bir göstergesidir⁽⁵⁾. Bu çalışmada MDA düzeyleri aortik αR grubunda kontrol grubuna göre anlamlı yüksek bulundu. Joannidis ve ark.⁽¹⁵⁾ renal arterin klemplenmesine bağlı αR hasarında plazma MDA seviyelerinde anlamlı yükselme saptamışlardır. Li ve ark.⁽¹⁶⁾ da renal αR hasarında

'Calsitonin Gene Related Peptid' etkinliğini araştırmışlar ve böbrek doku MDA düzeylerinde anlamlı artış tespit etmişlerdir. Köksel ve ark. (17) alt ekstremite α R hasarında iloprost'un etkinliğini araştırmışlar, aortik α R grubunda akciğer dokusunda MDA'nın artmış olduğunu bulmuşlardır. Çalışmamızda saptanan böbrek doku MDA düzeyleri literatür bilgisiyle uyumlu olup serbest oksijen radikallerine bağlı böbrek α R hasarında MDA'nın anlamlı derecede yükseldiğini göstermektedir. Shimoyama ve ark. (18) akciğer transplantasyonu modelinde α R'a bağlı olarak yükselen akciğer dokusu MDA seviyelerinin α R grubuna aprotinin eklenmesiyle anlamlı derecede azaldığını bulmuşlardır. Eren ve ark. (19) da normotermik iskemik akciğer modelinde aprotinin'in α R hasarına etkisini incelemişler ve α R grubuna aprotinin eklenmesiyle akciğer doku MDA seviyelerinde anlamlı düşüş saptamışlardır. Aortik α R + aprotinin grubuna ait MDA düzeylerinin aortik α R grubundaki değere göre anlamlı derecede düşük bulunması bu çalışmaların sonuçları ile uyumluluk göstermektedir. Aprotinin uygulaması ile MDA düzeylerindeki anlamlı düşüş, aprotinin, aortik α R'a bağlı oluşan lipid peroksidasyonu azaltmış olduğunu düşündürmektedir.

SOD bir metalloenzimdir ve oksijeni metabolize eden bütün hücrelerde bulunur. Süperoksidin hidrojen peroksida dönüşümü reaksiyonunu katalizler. SOD, bu reaksiyonda hem oksidan hemde redüktan olarak hareket eder ve bilinen en hızlı etki gösteren enzim sistemidir ancak difüzyon hızı sınırlıdır (20). SOD serbest oksijen radikalleriyle oluşan hasara karşı, katalaz ve glutatyon enzim sistemiyle birlikte çalışan bir savunma mekanizmasıdır. Böylece oluşan hidrojen peroksit, katalaz veya glutatyon peroksidaz enzimleri tarafından su ve oksijene indirgenmektedir. SOD'un görevinin aerobik organizmalar, süperoksitin zararlı etkilerine karşı korumak olduğu sanılmaktadır (12,21). Çalışmamızda, aortik α R grubuna ait SOD enzimi düzeyleri hem kontrol hem de aortik α R + aprotinin grubundaki düzeylere göre anlamlı derecede yüksek bulundu. Baker ve ark. (22) renal arter klempleniyle böbrek α R hasar modelinde α R periyodunda SOD'nin böbrek dokusunda anlamlı derecede artmış olduğunu saptamışlardır. Aynı çalışmada α R grubunda perfüzyondan önce SOD enzimi ile antioksidan terapi

yapılmış ve α R hasarının anlamlı derecede azaldığı saptanmıştır. Hoch ve ark. (23) ise köpeklerde alt ekstremite α R modelinde mannitol ve SOD enziminin nöromusküler koruyucu etkinliği olduğunu saptamışlardır. Nader ve ark. (24) asit aspirasyonu ile yaralanan rat akciğerlerinde hiperoksijen tedavisi ile oluşan α R hasarında serin antiproteaz uygulamaları ile akciğer doku SOD seviyelerinin anlamlı ölçüde düştüğünü saptamışlardır. Çalışmamızda SOD düzeylerinin aortik α R ile anlamlı artış, aortik α R'a bağlı olarak artmış serbest oksijen radikali miktarını düşündürmektedir. Aprotinin uygulaması ile SOD düzeylerinin anlamlı derecede azalması ise bir serin proteaz inhibitörü olan ve anti-inflamatuar özelliği kanıtlanmış olan aprotinin'in oksidatif stresi azaltmış olduğunu düşündürmektedir. Aprotinin uzak organ hasarındaki en önemli mekanizmalardan biri olan nötrofil adezyonunu ve kemotaksisini inhibe ederek süperoksit anyonu oluşumunu inhibe etmiş olabilir.

Katalaz, her biri 500 amino asitten oluşan dört hem proteini içeren tetramer yapıda bir hemoproteindir. Katalaz iki hidrojen peroksit molekülünden birini elektron vericisi, diğersini de elektron alıcısı olarak kullanarak su ve oksijen meydana getirir (13). Çalışmamızda, gruplara ait katalaz enzim düzeyleri birbirleri ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı. Çalışmamızda aortik α R grubunda katalaz enzim düzeylerinde anlamlı artış olmamasının nedeni α R hasar gelişimi sırasında oluşan süperoksit anyonunun miktarının SOD tarafından yeterli derecede elimine edilerek katalaz enziminin artmış aktivitesine gerek kalmaması olabilir. Ayrıca, aortik α R + aprotinin grubuna ait katalaz enzim düzeyi kontrol grubuna göre daha düşüktü. Bu durum hücrelerin normal fizyolojik döngüleri sırasında oluşan ve yine normal katalaz enzim düzeyleri ile elimine edilen fizyolojik sıvılardaki H_2O_2 'nin oluşmaması ile açıklanabilir. Ancak Broche ve ark. (25) pediatrik açık kalp operasyonlarında oksidatif stres ve aprotinin üzerine yaptıkları bir çalışmada, aprotinin verilmeyen hastalarda operasyon sırasında plazmada katalaz enziminin anlamlı derecede yükseldiğini saptamışlardır. Benzer olarak Narang ve ark. (26) ratlarda miyokardial α R sonrası katalaz doku düzeylerinin anlamlı derecede artmış olduğunu saptamışlardır.

Glutasyon peroksidaz prostetik grup olarak selenyum içeren tetramerik glikoprotein yapısında bir enzimdir. indirgenmiş glutasyon tarafından hidrojen peroksit ve lipid peroksidlerinin parçalanmasını katalize eder, böylece membran lipidlerini ve hemoglobini peroksidlerin oksidasyonuna karşı korur. Glutasyon peroksidaz lipid peroksidi alkole ve hidrojen peroksiti de H₂O'ya indirger. Spesifik hidrojen verici olarak glutasyonu kullanır. Peroksi radikallerine afinitesi katalazdan daha fazladır. Çalışmamızda, gruplara ait glutasyon peroksidaz enzim düzeyleri birbirleri ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı. Glutasyon peroksidaz, katalaz gibi enzim sistemi içinde birbirine yakın düzeylerde hidrojen peroksiti substrat olarak kullanır ve H₂O oluşumunu katalizlerler. Çalışmamızda aortik α R grubunda glutasyon peroksidaz enzim düzeylerinde anlamlı artış olmamasının nedeni α R hasarı oluşumunu sırasında meydana gelen süperoksit anyonunun miktarının antioksidan kapasite içinde SOD tarafından yeterli derecede elimine edilerek glutasyon peroksidaz enziminin artmış aktivitesine gerek kalmaması olabilir. Çalışmamızdan farklı olarak Rahman ve ark.⁽²⁷⁾ kardiyo-pulmoner bypass sırasında aprotinin kullanılan grupta glutasyon peroksidaz düzeylerinin kullanılmayan gruba göre daha düşük olduğunu saptamışlardır. İhan ve ark.'nın⁽²⁸⁾ tavşan spinal kord α R hasarında nebilolol'ün etkinliğinin araştırıldığı çalışmada da α R gruplarında spinal kord dokusunda glutasyon peroksidaz düzeyleri anlamlı derecede yüksek bulunmuştur.

Çalışmamızdaki histolojik değerlendirmede aortik α R ile doku hasarı parametrelerinde anlamlı artış saptandı. Bu histopatolojik bulgular bize alt ekstremité α R hasarında böbreklere ciddi lökosit infiltrasyonu olduğunu düşündürmektedir. Bunun sonucunda da nötrofil aracılı doku hasarı tübülüs epitelinde dejenerasyon ve nekroza neden olmuştur olabilir. Özer ve ark.⁽²⁹⁾'nin tavşan renal arter klempe modelinde yaptıkları çalışmada histolojik olarak tübül epitel nekrozu incelenmiş ve α R grubundaki epitelyal nekroz α R grubuna aprotinin eklenmesiyle anlamlı derecede azaldığı görülmüştür. Bu bulgular çalışmamızdaki histolojik bulgularla benzerlik göstermektedir. Alt ekstremité α R hasarında çoklu organ disfonksiyonunu araştıran Yassin ve ark.⁽³⁰⁾ da akciğer, karaciğer ve

böbrekte oluşan histopatolojik değişiklikleri incelemişler ve α R gruplarının karaciğer ve böbrek histopatolojik incelemelerinde anlamlı farklılık bulmuşlardır, sadece uzun süreli α R hasarına uğrayan akciğer dokusunda kapiller konjesyon ve PMN infiltrasyon parametrelerinin diğer gruplara göre anlamlı derecede artmış saptamışlardır. Bengisun ve ark.⁽³¹⁾ ise köpek alt ekstremitesinde α R modelinde akciğer dokusundaki sistemik inflamatuvar yanıt ve prostaglandin E1'in etkilerini araştırmışlar ve α R grubunda akciğer dokusunda nötrofil birikimi görülürken, α R grubuna prostaglandin E1 eklenmesi ile akciğer dokusunda nötrofil birikiminin oluşmadığı saptanmıştır. Tüm bu çalışmaların sonuçları alt ekstremité α R periyodunda iskemik periyod sonrası reperfüzyon döneminde tüm organ sistemlerinde inflamatuvar sürecin aktive olduğunu düşündürmektedir. Çalışmamızın sonuçları da, aprotinin'in anti inflamatuvar etkinliğinin lökosit infiltrasyonunu inhibe ettiği ve böylece nötrofillerin adezyonunu ve kemotaksisini önleyerek nötrofil aracılı doku hasarını azaltmış olduğunu düşündürmektedir.

Bu çalışmada deneysel aortik α R modelinde böbrek hasarı üzerine aprotinin'in etkisi araştırıldı. α R grubundaki böbrek doku MDA değerlerindeki anlamlı artış böbrek dokusundaki oksidatif stresin bir göstergesi olabilir. α R grubundaki böbrek dokularındaki histopatolojik değişiklikler ise iskeminin gerçekleştirdiği organ dışında da nötrofil kemotaksisi ve adezyonunun aktive edildiğinin bir bulgusu olabilir. Çalışmamızda alt ekstremité α R'un böbrek hasarına yol açtığı bulunmuştur. Yine çalışmamızda aortik α R + aprotinin grubunda MDA değerlerinin anlamlı azalma saptanması oksidatif stresin azaldığına ve nötrofil aracılı sistemik inflamatuvar yanıtın inhibe edildiğine işaret etmektedir. Ayrıca aprotinin uygulanan grupta histopatolojik değişimlerin aortik α R grubuna göre daha hafif olması nötrofil kemotaksisinin ve adezyonunun aprotinin tarafından inhibe edilmesine bağlı olabilir. Gruplara ait KAT ve Gprx değerlerinin birbirlerinden anlamlı derecede farklı olmamaları bu enzimlerin, antioksidan kapasite içinde enzimlerin aktive olmasına gerek kalmadan SOD tarafından aortik α R hasarının durdurulmuş olmasına bağlı olabilir.

Sonuç olarak infrarenal aortik kros-klempin neden olduğu alt ekstremitelerde böbreklerde uzak organ hasarı gelişmektedir ve aprotininin bu hasarı azaltmaktadır. Aprotinin'in bu etkisinin hangi mekanizmalar ile gerçekleştiğinin saptanması için yeni çalışmalarına ihtiyaç vardır. Bununla birlikte insanlarda infrarenal abdominal aort klemplenmesine bağlı böbreklerdeki uzak organ hasarının aprotinin ile azaltılmasına ilişkin klinik çalışmalar yapılması ile bu tedavinin klinik kullanıma girebileceği düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

1. Nordstrom M, Lindblad B, Bergqvist D, Kjellstrom T. A prospective study of the incidence of deep-vein thrombosis within a defined urban population. *J Intern Med* 1992; 232:155-160
2. Koopman MMW, Prandoni P, Piovella F, Ockelford PA, Brandjes DPM, van der Meer J, et al. Treatment of venous thrombosis with intravenous unfractionated heparin administered in the hospital as compared with subcutaneous low-molecular-weight heparin administered at home. *N Engl J Med* 1996; 334:682-687
3. Bocalon H, Elias A, Chale JJ, Cadene A, Gabriel S. Clinical outcome and cost of hospital vs home treatment of proximal deep vein thrombosis with a low-molecular-weight heparin. *Arch Intern Med* 2000; 160: 1769-1773
4. Lensing AWA, Prins MH, Davidson BL, Hirsh J. Treatment of deep vein thrombosis with low-molecular-weight heparins. *Arch Intern Med* 1995; 155:601-607
5. Leizorovicz A. Comparison of the efficacy and safety of low molecular weight heparins and unfractionated heparin in the initial treatment of deep vein thrombosis. *Drugs* 1996; 52 (suppl 7):30-37.
6. Lindmarker P, Holmström M. Use of low molecular weight heparin, once daily, for the treatment of deep vein thrombosis. A feasibility and health economic study in an out patient setting. *J Intern Med* 1996; 240:395-401
7. Boneu B, Navarro C, Cambus JP, Caplain H, d'Azemar P, Necciari J, et al. Pharmacodynamics and tolerance of two nadroparin formulations delivered for 10 days at therapeutic dose. *Thromb Haemost* 1998; 79: 338-341
8. Hirsh J, Levine MN. Low molecular weight heparin. *Blood* 1992; 79: 1-17
9. Hull RD, Rascob GE, Pineo GF, Green D, Trowbridge AA, Elliott CG, et al. Subcutaneous low-molecular-weight heparin compared with continuous intravenous heparin in the treatment of proximal vein thrombosis. *N Engl J Med* 1992; 326:975-982
10. Prandoni P, Lensing AWA, Büller HR, Carta M, Cogo A, Vigo M, et al. Comparison of subcutaneous low-molecular-weight heparin with intravenous standard heparin in proximal deep vein thrombosis. *Lancet* 1992; 339:441-445
11. Harrison L, Mc Ginnis J, Crowther M, Ginsberg J, Hirsh J. Assessment of out-patient treatment of deep-vein thrombosis with low-molecular-weight heparin. *Arch Intern Med* 1998; 158:2001-2003
12. Levine M, Gent M, Hirsh J, Leclerc J, Anderson D, Weitz J, et al. A comparison of low-molecular-weight heparin administered primarily at home with unfractionated heparin administered in the hospital for proximal deep vein thrombosis. *Thromb Haemost* 1996; 334:677-681
13. Lindmarker P, Holmström M, Granqvist S, Johnson H, Lockner D. Comparison of once-daily subcutaneous Fragmin with continuous intravenous unfractionated heparin in the treatment of deep vein thrombosis. *Thromb Haemost* 1994; 72:186-190.
14. Fiessinger JN, Lopez FM, Gatterer E, Granqvist S, Kher A, Olsson CG, et al. Once-daily subcutaneous Dalteparin, a low molecular weight heparin, for the initial treatment of acute deep vein thrombosis. *Thromb Haemost* 1996; 76:195-199.
15. Luomanmaki K, Granqvist S, Hallert C, Jauro I, Ketola K, Kim HC, et al. A multicentre comparison of once-daily subcutaneous dalteparin low molecular weight heparin and continuous intravenous heparin in the treatment of deep vein thrombosis. *J Intern Med* 1996; 240:85-92.
16. Charbonnier BA, Fiessinger JN, Banga JD, Wenzel E, d'Azemar P, Sagnard L. Comparison of a once daily with a twice daily subcutaneous low molecular weight heparin regimen in the treatment of deep vein thrombosis. *Thromb Haemost* 1998; 79:897-901