

# İSKEMİK PRECONDITIONING, SIÇANLARDA BİLATERAL ALT EKSTREMİTE İSKEMİ/REPERFÜZYONUNA BAĞLI GELİŞEN AKCİĞER HASARINI ARTIRIR

ISCHEMIC PRECONDITIONING INCREASES THE LUNG INJURY CAUSED BY ISCHEMIA-REPERFUSION OF THE LOWER EXTREMITIES IN RATS.

\*Dr. Ahmet BALTALARLI, \*\*Dr. Nagihan ÇOLAKOĞLU, \*Gökhan ÖNEM, \*İbrahim GÖKŞİN,  
\*Dr. Oya RENDECİ, \*Dr. Mustafa SAÇAR

\*Pamukkale Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Göğüs Kalp Damar Cerrahi Anabilim Dalı, \*\*Patoloji Anabilim Dalı, DENİZLİ

Adres: Dr. Ahmet BALTALARLI, Pk:283,20100 / DENİZLİ  
e-mail: ahmetbaltalarli@superonline.com

## Özet

Abdominal aortaya klemp konması akciğer hasarına yol açabilir. Bu çalışmanın amacı, hayvanlarda oluşturulan gövde alt yarısı iskemik reperfüzyon (İR) modeli yardımıyla, iskemik preconditioning'in (İPC) akciğer hasarı üzerinde etkisi olup olmadığını araştırmaktır.

Wistar albino cinsi 25 sıçan randomize olarak 3 gruba ayrıldı. İR grubunda (n=10), distal abdominal aortaya 3 saat süreyle klemp kondu, 1 saat süreyle reperfüzyonda kalındı ve iskemik reperfüzyon hasarı oluşturuldu. İPC grubunda (n=10), iskemik ve reperfüzyon öncesinde 5'er dakikalık 3 adet kısa iskemik ve reperfüzyon periyodu ile preconditioning sağlandı. Kontrol grubu (n=5) hayvanlara aortik oklüzyon uygulanmaksızın sham operasyonu yapıldı.

İPC uygulanan deneklerin akciğerlerinde anlamlı derecede daha fazla nötrofil infiltrasyonu (nötrofil sayısı: İPC grubunda 57.6±15.9, İR grubunda 31.2±6.2, p<0.0001) ve ödem saptandı (ortalama ödem skoru: İPC grubunda 2+, İR grubunda 1.7+, p<0.002).

Aortik oklüzyon öncesinde uygulanan iskemik preconditioning, akciğerde nötrofil sekestrasyonu ve hasarın artmasına yol açabilir.

Anahtar kelimeler: İskemik preconditioning, akciğer hasarı, aortik oklüzyon

## Summary

Aortic clamping on abdominal aorta may predispose to lung injury. The aim of this study was to determine whether ischemic preconditioning (IPC) could have any effect on lung injury in the animal model of lower torso ischemia-reperfusion (IR).

Twenty-five wistar albino rats were randomized into three groups. In IR group (n=10), ischemia reperfusion injury was induced by infrarenal aortic clamping for 3 hours and reperfusion for 1 hour. In IPC group (n=10), the ischemia-reperfusion was preconditioned with three brief periods of 5 min. ischemia and 5 min. reperfusion. Control group (n=5) animals were sham operated without vascular occlusion.

In IPC group, there are significantly higher neutrophil infiltration in the lungs (neutrophil counts: 57.6±15.9 in IPC group, 31.2±6.2 in IR group, p<0.0001) and edema (mean edema score: 2+ in IPC group, 1.7+ in IR group, p<0.002).

It is concluded that IPC before the aortic occlusion increase the

neutrophil sequestration and augments the lung injury process.

Keywords: Ischemic preconditioning, lung injury, aortic occlusion.

## Giriş

Geçici alt ekstremite iskemisi ve reperfüzyonunun (İR), akciğer hasarına neden olduğu bilinmektedir [1-3]. Bu durum, iskemiyeye bağlı olarak polimorf hücreli nötrofillerin (PMN) aktivasyonu ve akciğerlerde sekestrasyonuna sonucu ortaya çıkmaktadır [3].

İskemik "preconditioning" (İPC), uzun süreli bir iskemik dönem öncesinde, dokunun direncini artırabilmek için, aynı dokunun kısa süreli iskemik ve reperfüzyon periyotlarına maruz bırakılarak direncinin artırılmasıdır [4]. İPC'in kalp adalesi üzerindeki faydalı etkisi bilinmekte ve klinikte de kullanılmaktadır. Ancak iskelet kası üzerindeki faydalı etkilerinin kalp adalesine göre daha az olduğu düşünülmektedir [5,6]. Hem iskelet kası İPC'in etkilerini değişik bir bakış açısıyla değerlendirmek ve hem de alt ekstremite iskemisine bağlı ortaya çıkabilecek olan akciğer hasarını azaltmaya yönelik alternatif bir metot ortaya koyabilmek amacıyla bu çalışma planlanmıştır.

## Materyal ve Metot

Çalışmada 25 dişi, Wistar cinsi, beyaz sıçan kullanıldı. Periton içerisine 30 mg/kg ketamine ve 6 mg/kg xylazin verilerek anestezi sağlandı. Boyun bölgesine yapılan insizyon ile sol juguler ven diseksiyon edilip; aortik klemp öncesi buradan 1000 Ü/kg heparin verildi. Bütün deneklerde orta hattın yapıları kesi ile batın açıldı. Renal arterlerin distalinden abdominal aorta eksplore edildi. İR (iskemi-reperfüzyon) grubunda (n=10) abdominal aortaya 3 saat süreyle klemp (Yaşargil anevrizma klipsi, Aesculap) kondu; bir saat süreyle reperfüzyonda bekletildi. İPC grubunda (n=10) ise 5'er dakikalık 3 adet iskemik ve reperfüzyon periyodu sonrasında 2 saat 45 dakikalık iskemik ve 45 dakikalık reperfüzyon periyodu oluşturuldu; böylece toplam iskemik ve reperfüzyon süresinin aynı olması sağlandı. Kontrol grubundaki (n=5) deneklere ise sadece cerrahi diseksiyonlar yapıldı ve 4 saat süreyle batınları açık olarak bekletildi.

İşlem sonrası, trakea ve akciğerler çıkarıldı. Bir branül yardımı ile sol akciğere bronkoalveoler lavaj yapıldı. Üç defa 2 ml serum fizyolojik verildi ve aspire edildi. Elde edilen sıvılar

santrifüj (10 dak, 1000g) edildikten sonra -30 derecede saklandı.

Sağ akciğer %10 formalinde fikse edildi. Sağ orta lobdan 3 adet doku örneği alındı. Doku takibi işleminden sonra parafin bloklar hazırlandı bunlardan 6 µ kalınlıkta seri kesitler yapılarak hemotoksilen eosin ile boyandı. Bronşların ve kapiller haricindeki büyük damarları yoğun olduğu alanlar, bağ dokusunun fazla olduğu bölgeler inceleme dışı bırakıldı. On büyük büyütme alanında, alveol içerisindeki ve interstisyumdaki nötrofiller sayıldı. Akciğer dokusundaki konjesyon ve interstisyel ödem semikantitatif olarak değerlendirildi. Daha önceden Tassiopoulos ve arkadaşları tarafından kullanılan skorlama sistemi modifiye edilerek ödem ve konjesyon ayrı ayrı değerlendirildi [7]. Buna göre ödem: 0 puan, ödem yok; 1+, fokal hafif ödem; 2+, fokal yoğun ödem; 3+, diffüz ödem; konjesyon için: 0, konjesyon yok; 1+, fokal hafif konjesyon; 2+, fokal yoğun konjesyon; 3+, diffüz konjesyon olarak puanlandı.

İstatistiksel değerlendirme:

İskemiye maruz kalan İPC ve İR grupları birbirleri ve Kontrol grubu ile ikişerli şekilde Mann Whitney testi ile karşılaştırıldı. P değerinin 0.05'in altında olması anlamlı kabul edildi.

## Sonuçlar

Histopatolojik değerlendirmeye göre dört saatlik deney süresinin sonunda iskemi ve reperfüzyona maruz kalan İR ve İPC gruplarında, intraalveoler ve interstisyel belirgin derecede polimorf nüveli lökosit (PMN) birikimi saptandı. Alveol içerisinde yer yer proteinden zengin eksuda odakları görülmekteydi. "Sham" operasyonu yapılan kontrol grubundaki deneklerde normale yakın bir akciğer histolojisi gözlemlendi (Tablo 1).

	PNL sayısı	Ödem	Konjesyon
Kontrol grubu	10.8±2	1	0
İR grubu	31.2±6.2†	1.7†	1†
İPC grubu	57.6±15.9‡	2‡	1.8†

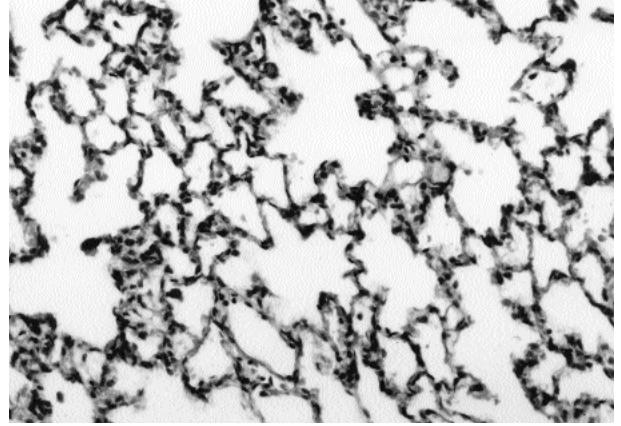
Tablo 1: Akciğer dokusunda 10 büyük büyütme alanındaki polimorf hücreli lökosit (PNL) sayıları, semikantitatif ödem ve konjesyon puanları.

†: Kontrol grubundan istatistiksel olarak anlamlı derecede farklı (p<0.05)

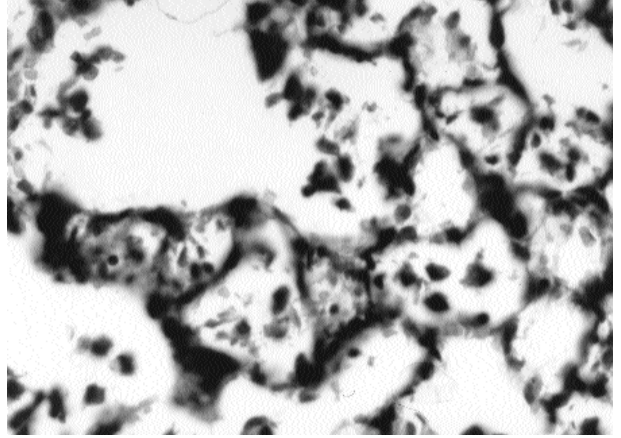
‡: İR grubundan istatistiksel olarak anlamlı derecede farklı (p<0.05)

Ön büyük büyütme alanındaki PMN sayımına göre İPC grubunda (57.6±15.9) lökosit; İR grubunda (31.2±6.2) lökosit saptandı (Resim1,2,3). Gruplar arasındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlıydı (p<0.0001). Kontrol grubu deneklerin akciğerlerinde ortalama (10.8±2) PMN sayıldı; bu değer iskemiye maruz kalan İPC ve İR gruplarında diğer her iki gruptan da istatistiksel olarak anlamlı oranda daha düşüktü (p<0.001).

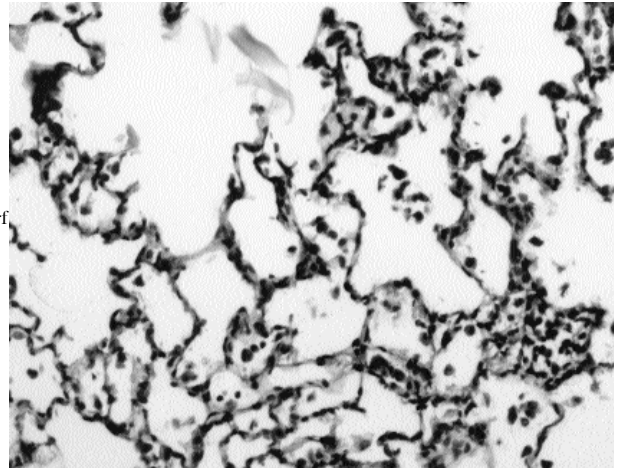
Semikantitatif değerlendirmede ortalama ödem puanı: sham grubunda 1+, İR grubunda 1.7+, İPC grubunda 2+; ortalama konjesyon puanı: sham grubunda 0, İR grubunda 1+, İPC grubunda 1.8+ olarak gerçekleşti. Yapılan karşılaştırmada İR ve İPC grubunda, sham grubundan istatistiksel olarak anlamlı derecede daha fazla (p<0.001) ödem geliştiği bulundu. İPC grubundaki doku ödemi ise İR grubundan daha fazlaydı (p<0.002). İPC grubunun ortalama konjesyon puanı sham



Resim 1: Normal akciğer dokusu. Kontrol grubu (Hematoksilen eosin, 100X)



Resim 2: İntraalveoler hemoraji ve iltihabi hücreler. İR grubu (Hematoksilen eosin, 400X)



Resim 3: İnterstisyumda ve intraalveoler hemoraji ve yoğun iltihabi hücre toplulukları. İPC grubu. (Hematoksilen eosin, 100X).

İR grubundan anlamlı derecede daha yüksekti (p<0.001). İR grubunda da sham grubuna göre daha fazla konjesyon gelişti. (p<0.05). İPC grubunda İR grubuna göre daha fazla konjesyon gelişmesine rağmen bu farklılık istatistiksel olarak anlamlı düzeye ulaşmadı (p>0.05).

BAL sitolojilerinde sadece İPC grubundaki 1 hayvanda nötrofil saptandı; diğerlerinde sadece makrofaj vardı.

## Tartışma

İskemik PC'in olumlu etkisi ilk defa Murry tarafından myokard dokusunda gösterilmiştir [4]. Miyokard dokusu ile ilgili çalışmalar ön planda olmakla beraber karaciğer, böbrek, akciğer ve iskelet kası ile ilgili çok sayıda çalışma bildirilmiştir [4-10]. Mounsey ve arkadaşları, iskemik preconditioning sonrası iskelet kasındaki canlılığın %25 daha iyi olduğunu bildirmektedir [5]. Ayrıca, postiskemik kapiller perfüzyonun preconditioning yapılanlarda daha yüksek olduğu da bildirilmektedir [6]. Ancak iskelet kasına uygulanan İPC ile ilgili çalışmalarda iskeminin ve preconditioning'in akciğerlerde olumsuz etkisi olabileceği gözden kaçmaktadır. Bu çalışmada İPC'in iskelet kası üzerindeki olumlu ya da olumsuz etkileri değil, akciğerler üzerindeki indirekt etkisi araştırılmıştır ve akciğer hasarını artırdığı saptanmıştır.

İskemi ve reperfüzyona maruz kalanlarda sham grubundan daha fazla PNL infiltrasyonu, ödem ve konjesyon gözlenmiş olması, Tassiopoulos ve arkadaşları tarafından da bildirildiği gibi abdominal aortanın geçici oklüzyonuna bağlı akciğer hasarı meydana gelebileceğini bir kez daha ortaya koymuştur [7]. Otuz dakika iskemi 120 dakika reperfüzyon sonrasında dahi akciğer dokusunda miyeloperoksidaz aktivitesi ve BAL'da PMN sayısının arttığı bildirilmektedir [11]. Ancak akciğer dokusunda gördüğümüz nötrofillerin BAL sitolojisinde görülmemiş olması 1 saatlik reperfüzyon süresinin yeterli olmadığını göstermektedir.

Nötrofil aktivasyonu, reperfüzyona bağlı oluşan uzak organ hasarında en önemli rolü oynar. Akciğerler belki de bu olaydan en fazla etkilenen organdır. Nötrofillerin akciğer endoteline adezyonu sonrası proteolitik enzimler ve oksijen serbest radikalleri açığa çıkar buna bağlı akciğer hasarı gelişir [12,13]. Akciğerdeki nötrofil infiltrasyonu ve dokudaki ödem miktarını İPC uygulananlardan anlamlı derecede daha yüksek bulduk. Literatürde İPC'in akciğerler üzerindeki dolaylı etkisini gösteren bir çalışma bulunmamaktadır. İskelet kasına uygulanan İPC sonrası doku miyeloperoksidaz aktivitesinde ve kan tümör nekroz faktör düzeylerinde azalma, doku redükte glutatyon miktarı ve nitrik oksit metabolitlerinde artma olduğu bildirilmiştir [14]. Bütün bunlar İPC'in, uygulandığı dokuda enflamatuvar cevabı azalttığını göstermektedir. Ancak beklenenin aksine akciğer hasarında artma saptanmıştır. Bu durum alt ekstremite kaslarının iskemi yanında, klemp proksimalinde kalan kısımların verdiği nöro-humoral cevaba bağlı gelişmiş olabilir.

Papanastasiou ve arkadaşları, alt ekstremite İPC'i ile kandaki nitrik oksit ürünlerinin arttığını ve bunun iskemi-reperfüzyona bağlı gelişen iskelet kası hasarının azaltılmasında etkili olduğunu bildirmektedir. Buna göre kandaki nitrik oksit metabolitlerinin artmasını sağlayan bir yöntem olan İPC ile akciğerlerdeki hasarın da azaltılabileceği düşünülebilir. Ancak yüksek dozdaki nitrik oksitin, akciğerler için koruyucu olmadığı da ileri sürülmektedir [15].

Javadpour ve arkadaşları sıçanlarda termal stres yaratarak preconditioning (PC) oluşturmuş ve iskemi reperfüzyona bağlı ortaya çıkan akciğer hasarında azalma saptamıştır [11]. Bu çalışmada vücut ısısı 41 derece civarına çıkarılmış, dolayısıyla bütün dokular aynı oranda termal PC'e maruz kalmıştır. Bizim çalışmamızda ise akciğerlere PC uygulanmamış; aksine iskemi-reperfüzyon hasarının pulmoner etkilerinin ortaya konması için kullanılmıştır.

İskemik PC'in uygulandığı dokuda iskemiye direnci artırdığı bilinmektedir. Ancak akciğerlerde lökosit infiltrasyonu ve ödeme yol açabilir.

1. Stallone RJ, Lim RC Jr, Blaisdell FW: Pathogenesis of the pulmonary changes following ischemia of the lower extremities. *Ann Thorac Surg* 1969;7:539-49.
2. Welbourn R, Goldman G, O'Riordan M, et al: Role for tumor necrosis factor as a mediator of lung injury following lower torso ischemia. *J Appl Physiol* 1991;70:2645-9.
3. Klausner JM, Anner H, Paterson IS, et al: Lower torso ischemia-induced lung injury is leukocyte dependent. *Ann Surg* 1988;208:761-7.
4. Murry CE, Jennings RB, Reimer KA: Preconditioning with ischemia: A delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation* 1986;74:1124-36.
5. Mounsey RA, Pang CY, Boyd JB, et al: Augmentation of skeletal muscle survival in the latissimus dorsi porcine model using acute ischemic preconditioning. *J Otolaryngol* 1992;5:315-20.
6. Jerome SN, Akimitsu T, Gute DC, et al: Ischemic preconditioning attenuates capillary no-reflow induced by prolonged ischemia and reperfusion. *Am J Physiol* 1995;268:2063-7.
7. Tassiopoulos AK, Carlin RE, Gao Y, et al: Role of nitric oxide and tumor necrosis factor on lung injury caused by ischemia/reperfusion of the lower extremities. *J Vasc Surg* 1997;26:647-56.
8. Toosy N, McMorris EL, Grace PA, et al: Ischaemic preconditioning protects the rat kidney from reperfusion injury. *BJU Int* 1999;84:489-94.
9. Yoshizumi T, Yanaga K, Soejima Y, et al: Amelioration of liver injury by ischaemic preconditioning. *Br J Surg* 1998;85:1636-40.
10. Gaspari RI, Jannis NC, Flameng WJ, et al: Ischemic preconditioning enhances donor lung preservation in the rabbit. *Eur J Cardiothorac Surg* 1999;16:639-46.
11. Javadpour M, Kelly CJ, Chen G, et al: Thermotolerance induces heat shock protein 72 expression and protects against ischaemia-reperfusion induced lung injury. *Br J Surg* 1998;83:943-6.
12. Welbourn CR, Goldman G, Paterson IS, et al: Neutrophil elastase and oxygen radicals; synergism in lung injury after hindlimb ischemia. *Am J Physiol* 1991;260:1852-6.
13. Simpson R, Alon R, Kobzik L, et al: Neutrophil and non neutrophil mediated injury in intestinal ischemia reperfusion. *Ann Surg* 1993;218:444-54.
14. Papanastasiou S, Estdale SE, Homer-Vanniasinkam S, et al: Protective effect of preconditioning and adenosine pretreatment in experimental skeletal muscle reperfusion injury. *B J Surg* 1999;86:916-22.
15. Murakami S, Bacha EA, Mazmanian GM, et al: Effects of various timings and concentrations of inhaled nitric oxide in lung ischemia-reperfusion. *Am J Respir Crit Care Med* 1997;156:454-8.

## Kaynaklar