

## Eritropoietinin sıçan aortik iskemi-reperfüzyonunda akciğer hasarı üzerine etkisi

*The effect of erythropoietin on lung injury in rat aortic ischemia-reperfusion*

Şahin Kapan,<sup>1</sup> İlker Kiriş,<sup>1</sup> Aynur Kılbaş,<sup>1</sup> İrfan Altuntaş,<sup>1</sup> Nermin Karahan,<sup>2</sup> Hüseyin Okutan

Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi, Kalp ve Damar Cerrahisi Anabilim Dalı, <sup>1</sup>Biyokimya Anabilim Dalı, <sup>2</sup>Patoloji Anabilim Dalı, Isparta

**Amaç:** Bu çalışmada sıçan infrarenal abdominal aortunda (İAA) oklüzyon-reperfüzyon sonrası akciğerlerde oluşan iskemi-reperfüzyon (İR) hasarına eritropoietinin etkisi araştırıldı.

**Çalışma planı:** Yirmi dört adet Wistar albino cinsi sıçan rastgele ve eşit sayıda üç gruba ayrıldı. Kontrol grubunda laparotomi ve İAA diseksiyonu yapıldı, İR uygulanmadı. Aortik İR grubunda, İAA'ya travmatik olmayan mikrovasküler klemp konularak 30 dakika iskemi, klemp kaldırılarak 60 dakika reperfüzyon uygulandı. Aortik İR+eritropoietin grubunda da 30 dakika iskemi, 60 dakika reperfüzyon uygulandı ve ayrıca klemp kaldırılmadan 5 dakika önce 1000 Ü/kg eritropoietin subkutan yolla verildi. Anestezi altında yaşamları sonlandırılan sıçanların akciğerleri çıkarıldı ve akciğer dokularında malondialdehid (MDA) düzeyi ve süperoksit dismutaz (SOD), katalaz ve glutatyon peroksidaz aktivite düzeyleri ölçüldü ve histopatolojik inceleme yapıldı.

**Bulgular:** Aortik İR grubunda MDA, SOD ve katalaz değerleri kontrol grubundaki değerlerden anlamlı derecede yüksek bulundu ( $p<0.05$ ). Aortik İR+eritropoietin grubundaki katalaz değeri aortik İR grubundan anlamlı derecede düşüktü ( $p<0.05$ ). Histopatolojik incelemede, aortik İR grubuna ait alveolar konjesyon, inflamatuvar infiltrasyon, intraalveolar hemoraji, intraalveolar makrofaj ve akciğer hasarı skorları, kontrol grubundan anlamlı derecede yüksek bulundu ( $p<0.05$ ). Aortik İR+eritropoietin grubunda ise bu değerlerin hepsi aortik İR grubundan düşük bulundu; inflamatuvar infiltrasyon, intraalveolar makrofaj ve akciğer hasarı skorlarındaki düşüklük anlamlıydı ( $p<0.05$ ).

**Sonuç:** Eritropoietin, sıçanlarda abdominal aort İR sonrası oluşan akciğer hasarını azaltıcı etki göstermektedir.

**Anahtar sözcükler:** Aort, abdominal/cerrahi; katalaz; eritropoietin/terapötik kullanım; glutatyon peroksidaz; lipid peroksidasyonu; akciğer; malondialdehid; sıçan; reperfüzyon hasarı/önleme ve kontrol; süperoksit dismutaz.

**Background:** We investigated the effect of erythropoietin on ischemia-reperfusion (IR) injury in lungs occurring after occlusion-reperfusion of rat infrarenal abdominal aorta (IAA).

**Methods:** Twenty-four Wistar albino rats were randomized to three groups equal in number. Control rats underwent laparotomy and IAA dissection without IR. Two groups underwent aortic IR designed as 30 min of ischemia by clamping of the IAA with an atraumatic microvascular clamp, followed by 60 min of reperfusion after removal of the aortic clamp. In one aortic IR group, 1000 U/kg erythropoietin was administered subcutaneously 5 min before declamping of the IAA. The rats were decapitated under deep anesthesia and the lungs were removed. Tissue levels of malondialdehyde (MDA) and activity levels of superoxide dismutase (SOD), catalase, and glutathione peroxidase were measured and lung specimens were examined histopathologically.

**Results:** Rats treated with aortic IR alone had significantly higher tissue MDA levels and activity levels of SOD and catalase compared to the control group ( $p<0.05$ ). Erythropoietin-administered rats exhibited significantly lower catalase activity than the aortic IR group ( $p<0.05$ ). In histopathological examination, rats treated with aortic IR alone had significantly higher scores for alveolar congestion, inflammatory infiltration, intraalveolar hemorrhage, intraalveolar macrophages, and overall lung injury compared to the control rats ( $p<0.05$ ). Erythropoietin-administered rats had lower scores in all these parameters compared to the aortic IR group, with scores of inflammatory infiltration, intraalveolar macrophages, and overall lung injury being significantly lower ( $p<0.05$ ).

**Conclusion:** Erythropoietin attenuates the severity of lung injury occurring after abdominal aortic IR in rats.

**Key words:** Aorta, abdominal/surgery; catalase; erythropoietin/therapeutic use; glutathione peroxidase; lipid peroxidation; lung; malondialdehyde; rats; reperfusion injury/prevention & control; superoxide dismutase.

Geliş tarihi: 6 Nisan 2007 Kabul tarihi: 3 Mayıs 2007

Yazışma adresi: Dr. Şahin Kapan, Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi, Kalp ve Damar Cerrahisi Anabilim Dalı, 32000 Isparta.  
Tel: 0246 - 232 95 02 e-posta: kirisilker@yahoo.com

Abdominal aortun klemlenmesi klemp distalinde iskemi oluştururken, aortik kros-klempin kaldırılması sonrası alt ekstremitelere dolaşımın ani olarak yeniden sağlanması reperfüzyon hasarını başlatır ve bu fenomen iskemi-reperfüzyon (İR) hasarı olarak tanımlanır.<sup>[1]</sup> İskemik dokuların reperfüzyonu toksik reaktif oksijen türevlerinin oluşumuna yol açar.<sup>[2]</sup> Reaktif oksijen türevleri hücre membranlarına lipid peroksidasyonu yoluyla doğrudan zarar verir. Reaktif oksijen türevleri ayrıca İR sonrası lökosit aktivasyonu, kemotaksis, lökosit-endotel yapışmasını artırır.<sup>[3]</sup> Abdominal aortun geçici oklüzyonu ve alt ekstremitelerde İR sonrası akciğer hasarı gelişir.<sup>[4-6]</sup> Bu hasarda polimorfonükleer (PMN) lökositlerin esas role sahip olduğu gösterilmiştir.<sup>[6]</sup>

Eritropoietin, 30.4 kDa moleküler ağırlığında bir glikoproteindir.<sup>[7]</sup> Başlıca üretim yeri erişkinlerde böbrek iken fetüste karaciğerdir. Eritropoietin üretimi için en güçlü uyaran anemidir.<sup>[8]</sup> Kanama ve eritrosit üretiminin azaldığı durumlarda, hipokside salınımı artar.<sup>[8]</sup> Eritropoietin, antiapoptotik, antioksidan, anjiyojenik ve nöroprotektif etkileri aracılığıyla iskemiye karşı koruyucu etki gösterir.<sup>[9]</sup>

Eritropoietinin abdominal aort cerrahisinde aortik İR'ye bağlı akciğer hasarı üzerine etkileri yeterince araştırılmamıştır. Bu deneysel çalışmada, eritropoietinin sıçan infrarenal abdominal aort (İAA) İR'si sonrası oluşan akciğer hasarına etkisi araştırıldı. Bu amaçla sıçan akciğer doku örneklerinde malondialdehid (MDA) seviyeleri ve süperoksit dismutaz (SOD), katalaz ve glutatyon peroksidaz (Gprx) aktiviteleri ölçüldü ve histopatolojik inceleme yapıldı.

## GEREÇ VE YÖNTEM

### Deney hayvanları

Süleyman Demirel Üniversitesi deney hayvan laboratuvarından elde edilen, her iki cinsten, ağırlıkları 200-250 gr arasında olan 24 adet Wistar albino cinsi sıçan çalışmaya alındı. Sıçanlar tel kafeslerde 12 saat gece, 12 saat gündüz koşullarında, ortam sıcaklığı 24-26 °C ve nem oranı %50-60 olacak şekilde tutuldu. Deneyden 12 saat önce, su hariç beslenmeleri durduruldu. Sıçanların bakımı, Amerika Birleşik Devletleri'nde Tıbbi Araştırmalar Ulusal Derneği tarafından biçimlendirilen 'Deney Hayvanlarının Bakım Prensipleri'ne ve Laboratuvar Hayvanı Kaynakları Enstitüsü tarafından hazırlanıp Ulusal Sağlık Enstitüsü tarafından yayımlanan 'Laboratuvar Hayvanlarının Bakım ve Kullanımı için Kılavuz'una (Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, NIH basım no. 85-23, 1985 revize edildi) uygun olarak yapıldı. Çalışma protokolü ve deneysel yöntem Süleyman Demirel Üniversitesi Etik Kurulu tarafından onaylandı (08.11.2005 tarih ve 11/32 sayılı Etik Kurul kararı).

### Deneysel çalışma yöntemi

Sıçanlar, eşit sayıda (n=8) ve rastgele olarak üç deney grubuna ayrıldı. Kontrol grubunda, laparotomi ve İAA diseksiyonu yapıldı ancak İAA oklüzyonu yapılmadı. Abdominal aort İR grubunda, İAA klemlenerek 30 dakika iskemi ve klemp kaldırılarak 60 dakika reperfüzyon uygulandı. Abdominal aort İR+eritropoietin grubunda, İAA klemlenerek 30 dakika iskemi, klemp kaldırılarak 60 dakika reperfüzyon uygulandı ve klemp kaldırılmadan 5 dakika önce 1000 Ü/kg eritropoietin subkutan yolla verildi.

### Aortik iskemi-reperfüzyon tekniği

Tüm sıçanlara intramusküler enjeksiyonla 100 mgr/kg dozda ketamin hidroklorid (Ketalar flakon®, Pfizer, İstanbul, Türkiye) verilerek anestezi sağlandı ve bir ısıtma lambası altında sırtüstü pozisyon verildi. Cilt aseptik olarak hazırlandı ve orta hattan laparotomi yapıldı. Sıvı dengesini korumak amacıyla, 10 ml ılık serum fizyolojik peritoneal boşluğa verildi. Bağırsaklar ıslak gaz ile sola çekilerek abdominal aorta ulaşıldı. İnfrarenal abdominal aorta travmatik olmayan bir mikrovasküler klemp (Vascu-Stat II, Midi Straight 1001-532; Scanlan International, St. Paul, MN, ABD) konuldu. Isı ve sıvı kaybını en aza indirmek için batın insizyonu kapalı tutuldu. Otuz dakikalık oklüzyon sonrasında batın tekrar açılarak İAA'daki mikrovasküler klemp kaldırıldı ve 60 dakika reperfüzyon uygulandı. İskemi oluşturulması, klemlenme işlemi sırasında distal aortta pulsasyonun kaybolmasıyla, reperfüzyon ise klempin kaldırılması sonrasında distal aortta pulsasyonun geri gelmesiyle değerlendirildi. Kontrol grubundaki sıçanlara laparotomi ve eşit sürede İAA diseksiyonu uygulandı; ancak İR uygulanmadı. Reperfüzyon sonrası tüm sıçanlar anestezi altında başları kesilerek öldürüldü ve akciğerleri toraks boşluğundan çıkartıldı. Akciğerlerin bir kısmı biyokimyasal incelemeler yapılmaya kadar -80 °C'de, diğer kısmı ise histopatolojik inceleme yapılmaya kadar %10'luk formaldehid solüsyonu içinde saklandı.

### Biyokimyasal işlemler

Biyokimyasal analizler için, dondurulmuş sıçan akciğerleri serum fizyolojik ile yıkandı, ağırlıkları ölçüldü. Daha sonra %10'luk homojenat elde etmek için, %0.05 sodyum azid içeren 100 mmol/l soğuk fosfat tamponu (pH:7.4) içinde homojenize edildi (Ultra-Turrax T25, Janke and Kunkel GmbH & Co., KG Staufen, Almanya). Bu homojenatlara 30 dakika süreyle ultrason dalgası uygulandı (Sonoplus UW 2070, Bandelin Electronic, Berlin, Almanya) ve ardından süpernatant ele etmek için santrifüj edildi (5000 g'de 10 dk). Süpernatantlar biyokimyasal incelemeler için kullanılmaya kadar -80 °C'de saklandı. Süpernatantın protein içeriği Lowry yöntemi ile saptandı.<sup>[10]</sup>

### Malondialdehid ölçümü

Reperfüzyon süreci sonunda artan serbest radikal yapımının bir göstergesi olan ve lipid peroksidasyonunun son ürünü olan MDA düzeyleri, Draper ve Hadley'in çift ısıtma yöntemi ile belirlendi.<sup>[11]</sup> Bu yöntemde, MDA ile thiobarbitürik asit reaksiyonunun meydana getirdiği renk oluşumu spektrofotometrik ölçümle değerlendirilir. Bu amaçla, 100 gr/l'lik trikloroasetik asit solusyonundan 2.5 ml, her santrifuj tüpünde 0.5 ml seruma (süpernatant) eklenerek 15 dakika süreyle kaynayan su banyosuna tabi tutuldu. Musluk suyu altında soğutulan tüpler 1000 g hızda 10 dakika santrifuj edildikten sonra elde edilen materyalin 2 ml'si, 6.7 g/l'lik thiobarbitürik solusyonunun 1 ml'sine eklenerek 15 dakika kaynayan su banyosunda tutuldu. Bu solüsyon musluk suyunda soğutulduktan sonra absorbansı 532 nm'lik spektrofotometre ile (Shimadzu UV-1601, Shimadzu, Kyoto, Japonya) ölçüldü. Malondialdehid düzeyi, MDA-thiobarbitürik asit kompleksinin emilim katsayısı (emilim katsayısı  $\epsilon$ :  $1.56 \times 10^5 \text{ cm}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$ ) ile hesaplandı ve sonuç proteinin miligramındaki nanomol olarak ifade edildi.

### Süperoksit dismutaz aktivitesi ölçümü

Süperoksit dismutaz aktivitesi, Spitz ve Oberley<sup>[12]</sup> ve Woolliams ve ark.na<sup>[13]</sup> ait yöntemler kullanılarak ölçüldü. Süperoksit dismutaz aktivitesinin tayini, 2-(4-iodofenol)-3-(4-nitrofenol)-5-feniltetrazoliumklorid ile reaksiyona girerek kırmızı bir formazan boya oluşturan süperoksit radikallerini üreten ksantin oksidaz reaksiyonu temel alınarak yapıldı. Süperoksit dismutaz aktivitesi bu reaksiyonunun inhibisyon derecesi olarak belirlendi. Sonuçlar ünite/miligram (Ü/mgr) protein olarak ifade edildi.

### Katalaz aktivitesi ölçümü

Katalaz aktivitesi Aebi<sup>[14]</sup> yöntemine göre ölçüldü. Bu yöntem, hidrojen peroksitin ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) 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 faktörünü,  $b$  süpernatant protein içeriğini göstermektedir. Sonuçlar  $k/\text{gr}$  protein olarak ifade edildi.

### Glutasyon peroksidaz aktivitesi ölçümü

Glutasyon peroksidaz aktivitesi spektrofotometrik yöntemle ölçüldü.<sup>[15]</sup> Glutasyon peroksidaz,  $\text{H}_2\text{O}_2$  varlığında redükte glutasyonun okside glutatona yükseltgenme-

sini katalize eder.  $\text{H}_2\text{O}_2$ 'nin bulunduğu ortamda Gprx'in oluşturduğu okside glutasyon, glutasyon redüktaz ve nikotinamid adenin nükleotid fosfat yardımı ile glutatona indirgenir. Glutasyon peroksidaz aktivitesi, nikotinamid adenin nükleotid fosfatın nikotinamid adenin dinükleotide yükseltgenmesi sırasındaki absorbans azalmasının 340 nm'de okunmasıyla hesaplandı ve ünite/gram (Ü/gr) doku proteini şeklinde belirtildi.

### Histopatolojik inceleme

Sıçanların akciğer biyopsileri ayrı ayrı formalin solüsyonunda tespit edilerek, rutin takip işlemleri sonrası parafine gömülerek bloklandı. Beş mikrometrelik kesitler yapılarak hematoksilin-eozin boyasıyla boyandı ve ışık mikroskopu ile incelendi. Tüm örnekler deney gruplarından habersiz olan aynı patoloj tarafından değerlendirildi. Her örnekte en az iki farklı kesit incelendi. Akciğer hasarı, kesitlerde saptanan alveolar konjesyon, inflamatuvar infiltrasyon, intraalveolar hemoraji ve intraalveolar makrofaja göre aşağıdaki skalaya uygun olarak semikantatif olarak skorlandı.<sup>[16-18]</sup> (-) Değişiklik yok; (1+) Fokal, hafif değişiklikler; (2+) Multifokal belirgin değişiklikler; (3+) Yaygın belirgin değişiklikler.

### İstatistiksel analiz

İstatistiksel analizler SPSS 13.0 bilgisayar programı (SPSS Inc., Chicago, IL; ABD) kullanılarak yapıldı. Veriler ortalama±standart sapma olarak sunuldu. Biyokimyasal verilerin istatistiksel olarak değerlendirilmesi sırasında gruplar arasındaki farkların incelenmesinde tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve ardından Tukey *honestly significant difference* testi kullanıldı. Histopatolojik bulguların istatistiksel değerlendirilmesi sırasında gruplar arasındaki anlamlı farkların belirlenmesinde Kruskal-Wallis testi, iki grup arasındaki farkın belirlenmesinde de Mann-Whitney U-testi kullanıldı. P değerinin 0.05'ten küçük olması istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

## BULGULAR

### Biyokimyasal bulgular

Tüm gruplara ait sıçan akciğer örneklerindeki MDA düzeyleri ve SOD, katalaz ve Gprx aktiviteleri Tablo 1'de gösterildi. Aortik İR grubunda MDA, SOD ve katalaz değerleri kontrol grubundaki değerlere göre anlamlı

**Tablo 1. Gruplara ait biyokimyasal değerlendirme sonuçları**

Gruplar	Malondialdehid (nmol/mgr protein)	Süperoksit dismutaz (Ü/mgr protein)	Katalaz (k/mgr protein)	Glutasyon peroksidaz (Ü/gr protein)
Kontrol (1)	5.29±1.59	3.06±0.46	0.07±0.03	0.44±0.02
Aortik İR (2)	9.27±2.61*	3.72±0.47*	0.12±0.03*	0.51±0.08
Aortik İR+eritropoietin (3)	8.14±1.06	3.44±0.44	0.07±0.01**	0.51±0.03

İR: İskemi-reperfüzyon; \*1-2 ve \*\*2-3:  $p < 0.05$ .

**Tablo 2. Gruplara ait histopatolojik değerlendirme sonuçları**

	Kontrol (1) (n=8)						Aortik İR (2) (n=8)						Aortik İR+ eritropoietin (3) (n=8)						K-W	M-W
	İAS	-	1+	2+	3+	OS	İAS	-	1+	2+	3+	OS	İAS	-	1+	2+	3+	OS		
Alveolar konjesyon	16	16	0	0	0	-	14	0	7	5	2	2+	13	4	4	5	0	1+	*	1-2 1-3
İnflamatuvar infiltrasyon	16	15	1	0	0	-	16	1	7	7	2	2+	16	3	10	3	0	1+	*	1-2, 2-3 1-3
İntraalveolar hemoraji	16	16	0	0	0	-	14	8	5	1	0	1+	13	8	5	0	0	-	*	1-2 1-3
İntralveolar makrofaj	16	8	7	1	0	1+	12	0	1	9	2	2+	14	3	3	8	0	1+	*	1-2, 2-3 1-3
Akciğer toplam hasar skoru						1+						7+						3+	*	1-2, 2-3 1-3

İR: İskemi-reperfüzyon; İAS: İncelenen akciğer sayısı; OS: Ortalama skor; K-W: Kruskal-Wallis; M-W: Mann-Whitney, p<0.05.

(-) Değişiklik yok; (1+) Fokal, hafif değişiklikler; (2+) Multifokal belirgin değişiklikler; (3+) Yaygın belirgin değişiklikler.

derecede yüksek bulundu (p<0.05); Gprx değeri ise kontrol grubundan daha yüksekti, ancak aradaki fark anlamlı değildi (p>0.05).

Aortik İR+eritropoietin grubundaki katalaz değeri aortik İR grubundaki değere göre anlamlı derecede düşüktü (p<0.05). Bu grupta MDA ve SOD aortik İR grubundan daha düşük bulunmasına karşın fark anlamlı değildi; Gprx aktivitesi ise benzer bulundu (p>0.05).

### Histopatolojik bulgular

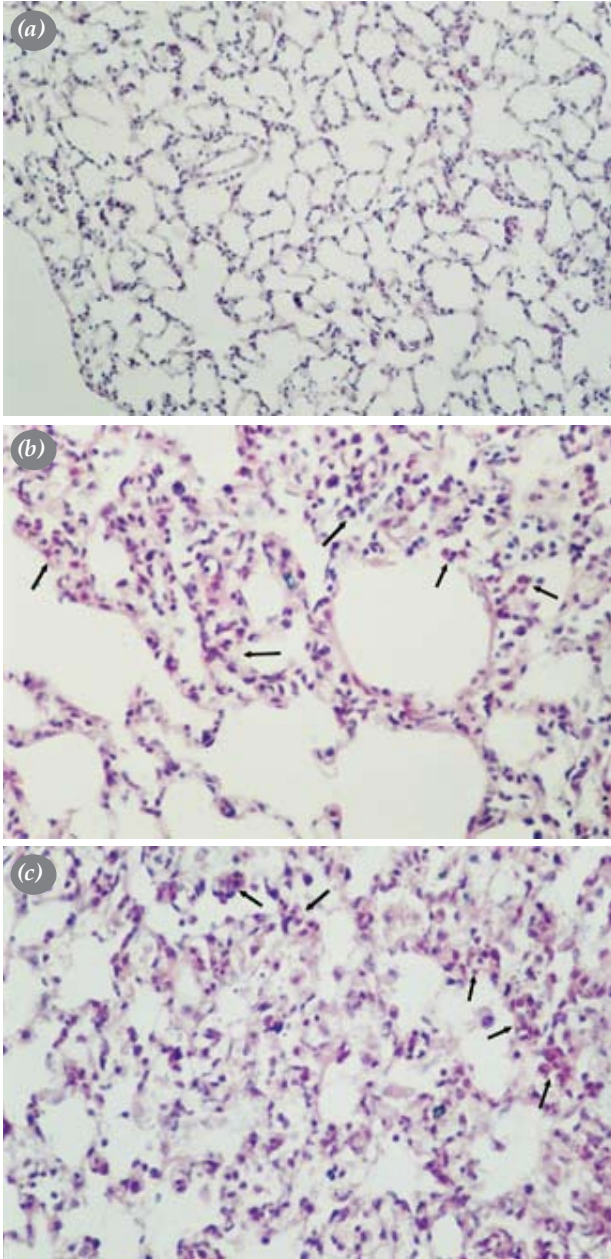
Gruplara ait histopatolojik inceleme sonuçları Tablo 2'de gösterildi. Kontrol grubunda, alveolar konjesyon, inflamatuvar infiltrasyon ve intraalveolar hemoraji yönünden histopatolojik değişiklik görülmezken (ort. skor -), intraalveolar makrofaj yönünden fokal, hafif değişiklikler (ort. skor 1+) görüldü (Şekil 1a). Aortik İR grubunda, alveolar konjesyon, inflamatuvar infiltrasyon ve intraalveolar makrofaj yönünden multifokal belirgin değişiklikler (ort. skor 2+) ve intraalveolar hemoraji yönünden fokal hafif değişiklikler (ort. skor 1+) görüldü (Şekil 1b). Aortik İR+eritropoietin grubunda, intraalveolar hemoraji de ortalama skor (-) iken, alveolar konjesyon, inflamatuvar infiltrasyon ve intraalveolar makrofaj bulgularında ise ortalama skor 1+ idi (Şekil 1c).

Aortik İR grubuna ait alveolar konjesyon, inflamatuvar infiltrasyon, intraalveolar hemoraji, intraalveolar makrofaj ve akciğer hasar skoru değerleri, kontrol grubundaki değerlere göre anlamlı derecede yüksek bulundu (p<0.05). Aortik İR+eritropoietin grubundaki inflamatuvar infiltrasyon, intraalveolar makrofaj ve akciğer hasar skoru değerleri aortik İR grubundaki değerlere göre anlamlı derecede düşüktü (p<0.05); alveolar konjesyon ve intraalveolar hemoraji değerleri ise daha düşük olmasına rağmen aradaki fark anlamlı değildi (p>0.05).

### TARTIŞMA

Çalışmamızda, eritropoietinin sıçanlarda İAA oklüzyonu ile oluşturulan deneysel aortik İR modelinde akciğer hasarına etkisi araştırıldı. Bu çalışmanın sonuçları eritropoietinin sıçanlarda abdominal aortik İR'ye bağlı akciğer hasarını azalttığını göstermektedir.

İskemi-reperfüzyon hasarı sırasında oluşan serbest radikaller, yüksek reaktiviteleri nedeniyle hücre membranlarındaki lipidlere saldırarak lipid peroksidasyonunu başlatırlar. Malondialdehid lipid peroksidasyonunun son ürünüdür ve deneysel İR modellerinde lipid peroksidasyon miktarının bir göstergesi olarak kullanılmaktadır.<sup>[19,20]</sup> Çalışmamızda, aortik İR grubunda, kontrol grubuna göre MDA düzeyinde anlamlı artış saptanırken, aortik İR+eritropoietin grubunda ise MDA düzeyinde anlamlı azalma saptanmadı. Deneysel olarak, alt ekstremitte İR<sup>[21]</sup> ve aortik oklüzyon-reperfüzyon<sup>[22]</sup> sonrasında akciğer MDA doku düzeylerinin arttığı bildirilmiştir. Patel ve ark.<sup>[23]</sup> ile Ateş ve ark.<sup>[9]</sup> eritropoietinin sıçanlarda böbrek İR hasarına etkisini araştırmışlar ve eritropoietin uygulanan grupta lipid peroksidasyonunda anlamlı azalma saptamışlardır. Bununla birlikte, Özakyol ve ark.<sup>[24]</sup> sıçanlarda karaciğer İR hasarına L-nitro-arginin-metil-ester'in etkisini araştırmışlar, L-nitro-arginin-metil-ester verilen grupta İR hasarının histopatolojik olarak anlamlı derecede azaldığını; ancak, karaciğer MDA doku düzeylerinin anlamlı derecede azalmadığını bildirmişlerdir. Bu sonucu, verilen ilacın oluşan İR hasarını lipid peroksidasyonundan bağımsız olarak azaltabileceği yorumu ile açıklamışlardır. Çalışmamızda da, Özakyol ve ark.<sup>[24]</sup> çalışmasına benzer şekilde eritropoietin verilen grupta histopatolojik incelemede İR hasarı azalmasına karşın, MDA düzeyinde anlamlı azalma saptanmadı. Biz de eritropoietinin İR hasarını lipid peroksidasyonundan bağımsız olarak azaltabile-



**Şekil 1.** (a) Kontrol grubunda normal akciğer dokusu (H-E x 100). (b) Aortik iskemi-reperfüzyon (İR) grubunda inflamatuvar infiltrasyon, skor (3+) (H-E x 200). (c) Aortik İR +eritropoietin grubunda inflamatuvar infiltrasyon (H-E x 200).

çeği düşüncesindeyiz. Öte yandan, eritropoietin verilen grupta MDA düzeyinde anlamlı azalma olmaması, uygulanan eritropoietin dozunun yetersizliğine bağlı olabilir. Daha yüksek eritropoietin dozları ile yapılacak yeni çalışmalar bu konuda aydınlatıcı olabilir.

Aortik İR hasarı oluşumunda serbest oksijen radikalleri önemli bir yer tutar.<sup>[2,21,22]</sup> İskemik dokuların reperfüzyonu toksik reaktif oksijen türevlerinin oluşumuna yol açar. Bunlar süperoksit anyonlar, hidroksil

radikalleri, hipoklorik asit, hidrojen peroksit ve nitrik oksitten derive peroksinitrittir.<sup>[3]</sup> Oksijen kökenli serbest radikaller aracılığıyla oluşan hasarda başlangıçta ksantin oksidaz kökenli süperoksit anyonları üretilir.<sup>[25]</sup> Serbest radikal temizleyicileri, reaktif oksijen parçaları ile reaksiyona girerek bunları zararsız maddeler haline dönüştüren ajanlardır. Bu ajanlar SOD, katalaz ve Gprx olarak sıralanabilir.

Süperoksit dismutaz, süperoksitin hidrojen perokside dönüşümünü katalizleyen bir enzimdir. Çalışmamızda aortik İR grubunda SOD aktivitesinde anlamlı yükselme saptandı; ancak, aortik İR +eritropoietin grubunda SOD aktivitesinde anlamlı azalma saptanmadı. İlhan ve ark.<sup>[26]</sup> tavşanlarda kafeik asit fenil esterinin spinal kord İR hasarına olan etkilerini araştırdıkları bir çalışmada serbest radikal hasarının göstergesi olarak SOD aktivitesini ölçmüşler, ancak deney gruplarına ait SOD aktivitesi değerleri arasında anlamlı fark bulmamışlardır. Ege ve ark.<sup>[27]</sup> ise, erdosteinin tavşan spinal kord İR hasarına etkisini araştırmışlar ve, sonuçlarımızla benzer şekilde, SOD aktivitesinde İR grubunda kontrol grubuna göre anlamlı artış saptamışlardır. Çalışmamızda aortik İR +eritropoietin grubunda SOD düzeyinde belirgin azalma olması, ancak bunun kontrol seviyesine inmemesi oksidatif stresin eritropoietin uygulanan grupta azaldığını, ancak tamamen ortadan kalkmadığını düşündürmektedir.

Katalaz enzimi, SOD tarafından oluşturulan hidrojen peroksiti peroksizomlarda su ve oksijene çevirir. Katalaz vücutta doğal olarak oluşan bir metalloprotein ve *in vivo* olarak SOD ile kombine bir şekilde etki eder. Çalışmamızda katalaz aktivitelerinde aortik İR grubunda kontrol grubuna göre anlamlı derecede artış, aortik İR +eritropoietin grubunda da aortik İR grubuna göre anlamlı derecede azalma saptandı. Kiriş ve ark.<sup>[28]</sup> infrarenal aortik İR modelinde gadolinyum klorürün renal hasara etkisini araştırmışlar ve aortik İR grubunda kontrol grubuna göre katalaz aktivitesinin anlamlı olarak arttığını bildirmişlerdir. Erten ve ark.<sup>[29]</sup> da melatoninin deneysel spinal kord İR hasarına etkisini araştırmışlar ve İR grubunda katalaz aktivitelerinde anlamlı artış saptamışlardır. Mezzetti ve ark.<sup>[30]</sup> kardiyopulmoner bypass sırasında miyokardiyal İR sonrası kanda katalaz ve diğer antioksidan enzim aktivitelerinde anlamlı artış bulmuşlardır. Çalışmamızın aortik İR ve aortik İR +eritropoietin gruplarındaki katalaz aktivite değerlerinin istatistiksel sonuçları bu çalışmalarla uyumludur. Çalışmamızda aortik İR grubunda katalaz aktivite artışı, yükselmiş SOD aktivitesi ile oluşan hidrojen peroksitin katalaz enzimi ile elimine edildiğini düşündürmektedir. Eritropoietin uygulanan grupta azalan SOD aktivitesi, oksidatif stresin azaldığını, ancak tam ortadan kalkmadığını; bununla birlikte, bu grupta oluşan hidrojen peroksitin indirgenmesi için

katalaz aktivitesinde artışa yol açmadığı görülmüştür. Katalaz aktivitesinin eritropoietin grubunda kontrol grubu değerlerine inmesinin bu durumdan kaynaklandığını düşünüyoruz.

Glutasyon peroksidaz hidrojen peroksit varlığında redükte glutasyonun okside glutatyona yükseltgenmesini katalize eder. Ayrıca, SOD tarafından oluşturulan hidrojen peroksiti mitokondri ve sitoplazmada su ve oksijene indirger. Çalışmamızda Gprx aktivitelerinde gruplar arasında anlamlı fark saptanmadı. İlhan ve ark.<sup>[31]</sup> nebi-volölün tavşanlarda spinal kord İR hasarına etkisini araştırmışlar ve İR grubunda spinal kord dokusunda Gprx'in anlamlı derecede yükseldiğini bulmuşlardır. Aceto ve ark.<sup>[32]</sup> kardiyopulmoner bypass uygulanan hastalarda aortik klempleme ve klemp kaldırılması sonrası kanda Gprx aktivitelerinde artış olduğunu saptamışlardır. Bu çalışmada, aortik İR grubunda Gprx aktivite artışı olması SOD aktivitesi ile oluşan hidrojen peroksitin Gprx enzimi ile de elimine edildiğini gösterebilir. Eritropoietin uygulanan grupta Gprx aktivite değerlerinin kontrol grubundaki değerlerden daha yüksek, hatta aortik İR grubundaki kadar yüksek değerlerde kalmasının hidrojen peroksit eliminasyonunun bu grupta Gprx tarafından devam ettirilmesi ile ilgi olabileceğini düşündürmektedir.

Polimorfonükleer (PMN) lökositler alt ekstremitte İR sonrasında akciğer hasarında esas role sahiptirler ve PMN lökositlerin azaltılması bu hasardan koruyucu bir etki oluşturur.<sup>[6]</sup> Çalıkoğlu ve ark.<sup>[33]</sup> alt ekstremitte İR'nin akciğerdeki nitrozatif etkilerini ve kafeik asit fenilesterin koruyucu rolünü araştırmışlar, peribronşiyal ve perivasküler lökosit infiltrasyonunun İR grubunda anlamlı artış, ilaç grubunda ise anlamlı azalma gösterdiğini saptamışlardır. Köksel ve ark.<sup>[34]</sup> İR'ye bağlı akciğer hasarına  $\alpha$ -lipoik asidin etkisini araştırmışlar ve İR grubunda kontrol grubuna göre anlamlı PMN lökosit artışı, tedavi edilen grupta da PMN lökosit sayısında anlamlı azalma saptamışlardır. İskemi-reperfüzyon grubunda belirgin derecede artan intraalveolar makrofaj sayısının,  $\alpha$ -lipoik asitle tedavi edilen grupta azalmış bulunması sonuçlarımızla uyum göstermektedir. Wu ve ark.<sup>[35]</sup> eritropoietinin sıçanlarda İR'ye bağlı akciğer hasarını azalttığını bildirmişlerdir. Anılan çalışmada akciğer histopatolojik hasar skoru değerlendirilmiş ve, sonuçlarımızla benzer şekilde, eritropoietin ile tedavi edilen grupta İR grubuna göre akciğer alveolar ödem ve nötrofil infiltrasyonunda anlamlı azalma saptanmıştır. Berkan ve ark.<sup>[36]</sup> alt ekstremitte İR hasarına bağlı akciğerlerde oluşan patolojik değişiklikler ve bunları önlemede askorbik asidin koruyucu etkisini araştırmışlardır. Aortik + askorbik asit grubunda, aortik İR grubuna göre PMN lökosit sayısı, interstisyel ödem ve konjesyonun daha az olduğu saptanmıştır. Bu çalışmalara genel olarak bakıldığında, İR sonrası akciğer hasarı göstergesi

olarak kullanılan histopatolojik değişiklik parametreleri çalışmamızdaki parametrelere benzemektedir ve sonuçlarımız yukarıda sunulan çalışmaların sonuçları ile uyumludur. Akciğerde oluşan İR hasarında, proinflamatuvar sitokinlerle aktive olmuş nötrofillerin akciğer dokusuna infiltrasyonu önemli bir yer tutar.<sup>[35]</sup> Çalışmamızda eritropoietinin akciğer İR hasarını azalttığı ve bu etkiyi alveolar makrofajları ve inflamatuvar infiltrasyonu azaltarak sağladığı görülmektedir.

Sonuç olarak, çalışmamızda eritropoietinin, deneysel infrarenal aortik İR modelinde oluşan akciğer hasarını azalttığı histopatolojik olarak gösterilmiştir. Malondialdehid düzeylerinde anlamlı azalma olmaması, hasarın lipid peroksidasyonundan bağımsız olabileceğini ve eritropoietinin lipid peroksidasyonunu değiştirmeden İR hasarını azalttığını düşündürmektedir. Yine de, eritropoietinin bu konudaki etki mekanizmasının ayrıntılı olarak tanımlanması için yeni deneysel çalışmalara ihtiyaç vardır. Bu deneysel çalışmaların sonucunda, eritropoietinin İAA'daki cerrahi girişimlerde gelişen akciğer hasarına etkisinin klinik olarak da araştırılabileceği düşüncesindeyiz.

#### KAYNAKLAR

1. Pararajasingam R, Weight SC, Bell PR, Nicholson ML, Sayers RD. Prevention of renal impairment following aortic cross-clamping by manipulation of the endogenous renal nitric oxide response. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2000;19:396-9.
2. Collard CD, Gelman S. Pathophysiology, clinical manifestations, and prevention of ischemia-reperfusion injury. *Anesthesiology* 2001;94:1133-8.
3. Toyokuni S. Reactive oxygen species-induced molecular damage and its application in pathology. *Pathol Int* 1999;49:91-102.
4. Baltalarlı A, Özcan V, Bir F, Aybek H, Saçar M, Önem G, et al. Ascorbic acid (vitamin C) and iloprost attenuate the lung injury caused by ischemia/reperfusion of the lower extremities of rats. *Ann Vasc Surg* 2006;20:49-55.
5. Welbourn R, Goldman G, O'Riordain M, Lindsay TF, Paterson IS, Kobzik L, et al. Role for tumor necrosis factor as mediator of lung injury following lower torso ischemia. *J Appl Physiol* 1991;70:2645-9.
6. Klausner JM, Anner H, Paterson IS, Kobzik L, Valeri CR, Shepro D, et al. Lower torso ischemia-induced lung injury is leukocyte dependent. *Ann Surg* 1988;208:761-7.
7. Bahlmann FH, de Groot K, Haller H, Fliser D. Erythropoietin: is it more than correcting anaemia? *Nephrol Dial Transplant* 2004;19:20-2.
8. Bakkaloğlu S, Tümer N, Ekim M, Yalçınkaya F. Kronik böbrek yetmezliğinde anemi ve eritropoietin kullanımı. *Türk Nefroloji Diyaliz ve Transplantasyon Dergisi* 1998;2:54-8.
9. Ateş E, Yalçın AU, Yılmaz S, Köken T, Tokyol C. Protective effect of erythropoietin on renal ischemia and reperfusion injury. *ANZ J Surg* 2005;75:1100-5.
10. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951;193:265-75.
11. Draper HH, Hadley M. Malondialdehyde determination as

- index of lipid peroxidation. *Methods Enzymol* 1990;186:421-31.
12. Spitz DR, Oberley LW. An assay for superoxide dismutase activity in mammalian tissue homogenates. *Anal Biochem* 1989; 179:8-18.
  13. Woolliams JA, Wiener G, Anderson PH, McMurray CH. Variation in the activities of glutathione peroxidase and superoxide dismutase and in the concentration of copper in the blood in various breed crosses of sheep. *Res Vet Sci* 1983;34:253-6.
  14. Aebi H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol* 1984;105:121-6.
  15. Gültekin F, Delibaş N, Yaşar S, Kılınç I. In vivo changes in antioxidant systems and protective role of melatonin and a combination of vitamin C and vitamin E on oxidative damage in erythrocytes induced by chlorpyrifos-ethyl in rats. *Arch Toxicol* 2001;75:88-96.
  16. Tassiopoulos AK, Carlin RE, Gao Y, Pedoto A, Finck CM, Landas SK, 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.
  17. Duthie GG, Arthur JR, James WP. Effects of smoking and vitamin E on blood antioxidant status. *Am J Clin Nutr* 1991; 53(4 Suppl):1061S-3S.
  18. Shields CJ, Winter DC, Manning BJ, Wang JH, Kirwan WO, Redmond HP. Hypertonic saline infusion for pulmonary injury due to ischemia-reperfusion. *Arch Surg* 2003;138:9-14.
  19. Saçar M, Özcan V, Aybek H, Önem G, Demir S, Gökşin İ, et al. Vitamin C and iloprost attenuate skeletal muscle injury caused by ischemia-reperfusion of the lower extremities. *Türk Göğüs Kalp Damar Cer Derg* 2005;13:374-8.
  20. Taçyıldız İ, Aldemir M, Girgin S, Büyükbayram H, Baç B. Karaciğer iskemi/reperfüzyon hasarının önlenmesinde topikal hipotermi, metilprednizolon ve BN 52021 uygulamasının etkinliği. *Ulusal Cerrahi Dergisi* 2002;18:70-6.
  21. Köksal C, Bozkurt AK, Ustündağ N, Konukoğlu D, Musellim B, Şirin G, et al. Attenuation of acute lung injury following lower limb ischemia/reperfusion: the pharmacological approach. *J Cardiovasc Surg* 2006;47:445-9.
  22. Okutan H, Savaş C, Özgüner İF, Yönden Z, Eren VC, Delibaş N. Lung injury after aortic occlusion-reperfusion in rats: the role of gadolinium chloride. *Tohoku J Exp Med* 2004;203:267-73.
  23. Patel NS, Sharples EJ, Cuzzocrea S, Chatterjee PK, Britti D, Yaqoob MM, et al. Pretreatment with EPO reduces the injury and dysfunction caused by ischemia/reperfusion in the mouse kidney in vivo. *Kidney Int* 2004;66:983-9.
  24. Özakyol AH, Tunçel N, Sarıçam T, Uzuner K, Ak D, Güreer F. Effect of nitric oxide inhibition on rat liver ischemia reperfusion injury. *Pathophysiology* 2000;7:183-8.
  25. Granger DN. Role of xanthine oxidase and granulocytes in ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol* 1988;255:H1269-75.
  26. İlhan A, Koltuksuz U, Özen S, Uz E, Ciralik H, Akyol O. The effects of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) on spinal cord ischemia/reperfusion injury in rabbits. *Eur J Cardiothorac Surg* 1999;16:458-63.
  27. Ege E, İlhan A, Gürel A, Akyol O, Özen S. Erdosteine ameliorates neurological outcome and oxidative stress due to ischemia/reperfusion injury in rabbit spinal cord. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2004;28:379-86.
  28. Kiriş İ, Okutan H, Savaş Ç, Yönden Z, Delibaş N. Deneysel aortik iskemi-reperfüzyon modelinde renal hasara gadolinium klorürün etkisi. *Damar Cerrahi Dergisi* 2005;14:13-8.
  29. Erten SF, Koçak A, Özdemir İ, Aydemir S, Çolak A, Reeder BS. Protective effect of melatonin on experimental spinal cord ischemia. *Spinal Cord* 2003;41:533-8.
  30. Mezzetti A, Lapenna D, Pierdomenico SD, Di Giammarco G, Bosco G, Di Ilio C, et al. Myocardial antioxidant defenses during cardiopulmonary bypass. *J Card Surg* 1993;8:167-71.
  31. İlhan A, Yılmaz HR, Armutçu F, Gürel A, Akyol O. The protective effect of nebivolol on ischemia/reperfusion injury in rabbit spinal cord. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2004;28:1153-60.
  32. Aceto A, Mezzetti A, Di Ilio C, Calafiore AM, De Cesare D, Bosco G, et al. Effect of ischaemia-reperfusion on glutathione peroxidase, glutathione reductase and glutathione transferase activities in human heart protected by hypothermic cardioplegia. *Free Radic Res Commun* 1990;8:85-91.
  33. Çalikoğlu M, Ünlü A, Sucu N, Aktaş S, Tamer L, Çalikoğlu İ. Periferik iskemi reperfüzyonun akciğerdeki nitrozatif etkileri ve "caffeic acid phenethyl ester" in koruyucu rolü. *Tüberküloz ve Toraks Dergisi* 2004;52:218-33.
  34. Köksel O, Çekirdekçi A, Kükner A, İlhan N. The effect of alpha-lipoic acid on ischemia-reperfusion induced lung injury. *Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi* 2001;2:459-65.
  35. Wu H, Ren B, Zhu J, Dong G, Xu B, Wang C, et al. Pretreatment with recombinant human erythropoietin attenuates ischemia-reperfusion-induced lung injury in rats. *Eur J Cardiothorac Surg* 2006;29:902-7.
  36. Berkan Ö, Katrancioğlu N, Günay İ, Yıldız E. Alt ekstremité iskemi reperfüzyona bağlı gelişen akciğer hasarında askorbik asidin etkisi. *Türk Göğüs Kalp Damar Cer Derg* 2001;9:238-41.