

# Alt Ekstremitte İskemi Reperfüzyona Bağlı Gelişen Akciğer Hasarında Askorbik Asidin Etkisi

## EFFECT OF ASCORBIC ACID IN THE LUNG INJURY CAUSED BY ISCHEMIA REPERFUSION OF THE LOWER EXTREMITIES

Dr.Öcal Berkan, \*Dr. Esin Yıldız, Dr. Nurkay Katrancıoğlu, Dr. İlhan Günay

Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi, Kalp ve Damar Cerrahisi Kliniği, Sivas  
\* Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi, Patoloji Kliniği, Sivas

### Özet

**Amaç:** Bu çalışmada, alt ekstremitelerdeki geçici iskemi reperfüzyon (İ/R) hasarına bağlı akciğerlerde oluşan patolojik değişiklikler ve bunları önlemede askorbik asidin koruyucu etkisi araştırıldı.

**Materyal ve Metod:** Ratlar kontrol grubu (Grup 1), iskemi reperfüzyon grubu (Grup 2) ve askorbik asit verilen çalışma grubu (Grup 3) olmak üzere üç gruba ayrıldı. Grup 1'deki ratlarda batin açıldı ve abdominal aortları eksplore edildikten sonra hiçbir girişim yapılmadan tekrar kapatıldı (n = 5). Grup 2'de infrarenal aortaya klemp konuldu. 3 saatlik iskemi süresinin sonunda klemp kaldırıldı ve reperfüzyon için 1 saat beklendi (n = 8). Bu işlemin aynıısı askorbik asit verilen 3. grupta da uygulandı (n = 8). Bu gruptaki ratlara, işlemden önceki 5 gün boyunca İM olarak 50 mg/kg/gün sodyum askorbat (Redoksan) verildi. Tüm gruplardaki ratlar dördüncü saatte sakrifiye edilerek akciğerleri alındı ve histopatolojik olarak incelendi. Akciğerlerdeki patolojik değişikliklerin derecesini ifade edebilmek için, 0 ile +3 arasında değişen puanlama sistemi kullanılarak hasar skoru hesaplandı..

**Bulgular:** İkinci ve üçüncü grupta, kontrol grubuna göre daha fazla polimorfonükleer lökosit (PMNL) birikimi, ödem ve konjesyon saptandı. İkinci grubun hasar skor puanı 2.75 olarak bulundu. 3'ncü grubun hasar skor puanı 2.12 olarak hesaplandı. Bu iki grubun sonuçları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu ( $p < 0.05$ ).

**Sonuç:** Askorbik asit, alt ekstremitelerdeki geçici İ/R hasarına bağlı olarak akciğerlerde oluşan patolojik değişiklikleri önlemede yararlı olmaktadır.

**Anahtar kelimeler:** Askorbik asit, aortik oklüzyon, akciğer hasarı, alt ekstremitte

Türk Göğüs Kalp Damar Cer Derg 2001;9:238-241

### Summary

**Background:** In this study, injury in the lungs due to experimental lower extremity IR and preventive effect of ascorbic acid were investigated.

**Methods:** Rats were divided into three groups as follows: control group (Group 1), IR group without treatment (Group 2), IR with the administration of ascorbic acid (Group 3). Rats in the group 1 were undertaken laparotomy and closed after exploration of abdominal aorta (n = 5). In the second group, the infrarenal aorta of the rats were clamped a period of 3 hours. After ischemic period, aortic clamping were removed and waited for 1 hour of reperfusion period (n = 8). The rats in the third group were administered 50 mg/kg/day of sodium ascorbic acid commencing from 5 days before experimental procedure (n = 8). The animals were sacrificed and the histopathological specimens of the lungs were examined. The pathological changes in the lungs were ranged between 0+ and 3+ correlated to the level of increasing injury.

**Results:** Edema, congestion and the more prominent accumulation of polymorphonuclear leukocyte (PMNL) were determined in the specimens of group 2 and 3 as compared to the control group. The average score was 2.75 in the group 2. The average score was 2.12 in the third group and it was statistically significant as compared to the second group ( $p < 0.05$ ).

**Conclusions:** Pretreatment with ascorbic acid was beneficial in prevention of lung injury after IR of lower extremities.

**Keywords:** Ascorbic acid, lung injury, aortic occlusion, lower extremity

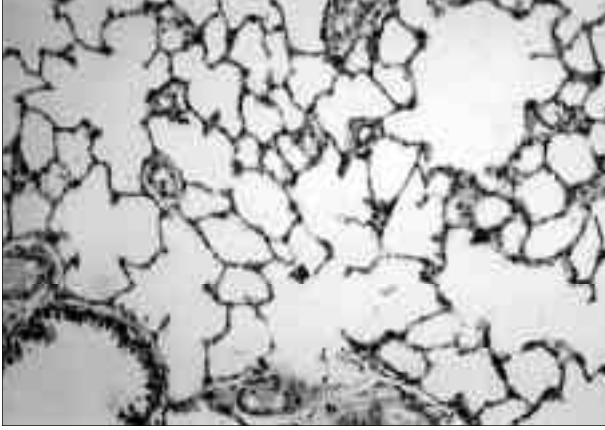
Turkish J Thorac Cardiovasc Surg 2001;9:238-241

### Giriş

Alt ekstremitelerde oluşan geçici İ/R hasarında, iskemiye maruz kalan bölge dışındaki uzak doku ve organlarda da hasar meydana geldiği bilinmektedir. Bu hedef organlar arasında akciğerler önemli bir yer tutmaktadır [1,2,3]. Akciğerlerde,

reperfüzyonun yaptığı etkinin ortaya çıkmasında nötrofillerin aktive olmaları önemli rol oynamaktadır [4-7]. Akciğer hasarının gelişmesinde yer alan en önemli etken, endotele yapışan nötrofillerin serbest oksijen radikallerini (SOR) ve proteolitik enzimleri ortaya çıkartmasıdır [2,5,8]. Askorbik asit (Vitamin C) indirgeyici etkisiyle serbest oksijen radikallerini

**Adres:** Dr. Öcal Berkan, Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi, Kalp ve Damar Cerrahisi Kliniği, 58140, Sivas  
**e-mail:** oberkan@cumhuriyet.edu.tr



**Resim 1. (0),** Normal akciğer dokusu, (Hematoksilen eosin, 150x).

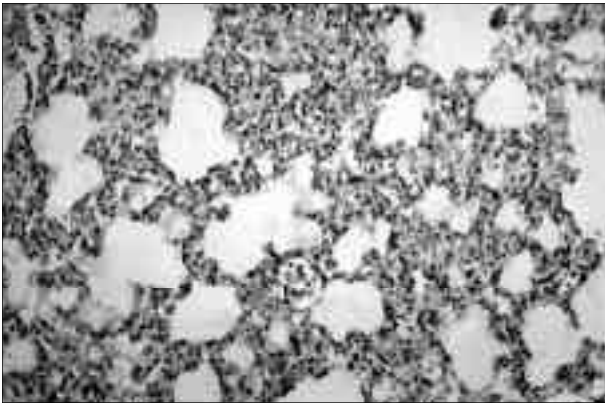
ortamdan kaldıran ve sebep oldukları hasarı önleyen güçlü bir antioksidandır [9,10,11].

Bu çalışmada, alt ekstremitelerde akut arteriyel oklüzyon sonucunda ortaya çıkan geçici iskemi ve reperfüzyon hasarının akciğer dokusu üzerinde yaptığı hasarı ve askorbik asidin bu hasarı önlemedeki etkisini histopatolojik olarak inceledik.

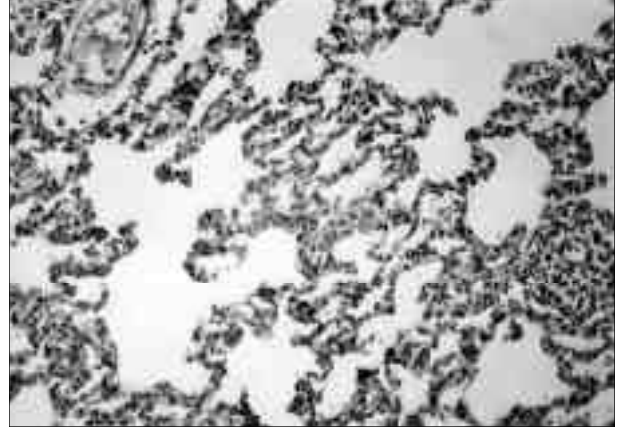
## Materyal ve Metod

Ağırlıkları 220 - 265 gr arasında olan aynı ortamda yaşamış ve aynı şekilde beslenmiş 21 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 eksplore edildikten sonra hiçbir girişim yapılmadan tekrar 4/0 atravmatik sütür ile kapatıldı (n = 5). I/R oluşturulan 2. grupta batin açıldıktan

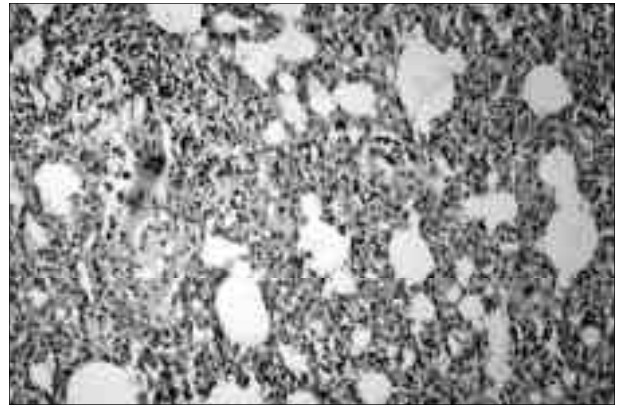


**Resim 3. (+2),** Multifokal orta derecede değişiklikler, (Hematoksilen eosin, 150x).



**Resim 2. (+1),** Fokal, göze çarpmayan hafif derecede değişiklikler, (Hematoksilen eosin, 150x).

sonra abdominal aorta eksplore edildi ve infrarenal aortaya klemp (vascu stadd mini-scalan) konularak batin kapatıldı (n = 8). 3 saatlik iskemi süresinin sonunda batin sütürleri alınarak aortadaki klemp kaldırıldı ve batin tekrar kapatılarak 1 saatlik reperfüzyon süresi beklendi. Askorbik asid verilen 3. grupta da bu işlemin aynısı yapıldı (n = 8). 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 akciğerleri çıkartıldı ve formalinde fikse edildi. Gözlemler, deneyin ve alınan örneklerin ayrıntılarını bilmeyen tarafsız bir patolog tarafından yapıldı. Her üç grupta bulunan ratlardan doku örnekleri alındı ve parafin bloklar hazırlandı. Bu parafin bloklardan kalınlığı 4µ olan seri kesitler yapılarak hemotoksilen eosin boyası ile boyandı. Büyütme alanı içerisinde bulunan akciğer dokusundaki PMNL, konjesyon, interstisyel ödem semikantitatif olarak değerlendirildi. Daha önce Tassiopoulos ve arkadaşlarının kullandıkları skorlama sistemi modifiye edilerek akciğerlerde oluşan hasarın miktarı tespit edildi [12]. Buna göre; 0, değişiklik yok (Resim 1); 1+, fokal, göze çarpmayan hafif derecede değişiklikler (Resim 2); 2+, multifokal orta derecedeki değişiklikler (Resim 3); 3+, multifokal ileri derecede ve yoğun değişiklikler olarak puanlama yapıldı (Resim 4).



**Resim 4.(+3),** Multifokal ileri derecedeki yoğun değişiklikler, (Hematoksilen eosin, 150x).

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

## Bulgular

Histopatolojik değerlendirmede kontrol grubunda normale yakın bir akciğer dokusu görüldü. İkinci ve üçüncü grupta, kontrol grubuna göre daha fazla PMNL birikimi, ödem ve konjesyon saptandı. Üçüncü grup, ikinci grup ile kıyaslandığında, 3.grupta PMNL sayısının daha az olduğu görüldü. Ayrıca, interstisyel ödem ve konjesyonda daha azdı.

Akciğerlerdeki patolojik değişikliklerin derecesini ifade edebilmek için kullanılan semikantitatif değerlendirmede, kontrol grubunun hasar skor puanı 0.8 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. Bu değerlere göre hesaplanan 2. grubun hasar skor puanı 2.75 olarak bulundu. Kontrol grubu ile 2. grup karşılaştırıldıklarında aralarında istatistiksel olarak anlamlı fark görüldü ( $p < 0.05$ ). Üçüncü grubun hasar skor puanı 2.12 olarak hesaplandı. Kontrol grubu ile 3. grup, hasar skor puanları yönünden karşılaştırıldıkları zaman aralarında istatistiksel olarak anlamlı fark vardı. Alt ekstremitelerde oluşan İ/R sonucunda akciğerlerinde hasar olduğu gözlemlenen ikinci ve üçüncü gruptaki ratlar kendi aralarında karşılaştırıldıklarında, askorbik asit verilen 3. grubun hasar skor puanı 2. gruba göre düşük bulundu. Bu iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu ( $p < 0.05$ ).

## Tartışma

Alt ekstremitelerde oluşan geçici iskemik reperfüzyon (İ/R) hasarı sonucunda akciğerlerde de patolojik değişikliklerin olduğu çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir [1,2,3]. Bu çalışmada, alt ekstremitelerde oluşan geçici İ/R sonrasında meydana gelen akciğerlerdeki hasar ve bu hasarı önlemede askorbik asidin koruyucu etkisi araştırıldı ve bu amaçla akciğerlerden alınan histopatolojik doku örnekleri incelendi.

Mekanizması henüz tam olarak anlaşılamayan İ/R hasarı sonrasında plazmada komplemanlar, sitokinler, arazidonik asit türevleri ve trombosit aktive edici faktör gibi proenflamatuar ajanlar artmaktadır [7,13]. Bunlarla birlikte ksantin oksidaz, süperoksit, hidroksil radikali ve hidrojen peroksit gibi serbest oksijen radikalleri de ortaya çıkmaktadır [2,14]. Sonuçta oluşan bu toksik SOR, yağ asit radikalleri ile etkileşerek lipid peroksidasyon reaksiyonunu oluşturular ve hücre hasarına yol açarlar.

Alt ekstremitelerde oluşan İ/R sonrasında akciğerlerde oluşan hasarın nedeni ve fizyopatolojik mekanizması henüz tam olarak ortaya konulamamıştır. Ancak bu olayın, oluşan akut İ/R hasarı sonrasında kompleks bir inflamatuvar döngünün başlaması ile ortaya çıktığı düşünülmektedir. Sitokinler, interlökinler, TNF, serbest oksijen radikalleri gibi etkenler de bu mekanizmanın oluşumunda rol oynamaktadırlar [1,7,14,15]. Bu enflamatuar yanıtı artıran değişimler sonucunda nötrofil aktivasyonu ve sekestrasyonu gelişmektedir [4,5,7].

Akciğerlerde reperfüzyonun etkisinin ortaya çıkmasında nötrofillerin aktive olmaları önemli rol oynamaktadır. Akciğer hasarının gelişmesinde yer alan en önemli etken, endotele yapışan nötrofillerin serbest oksijen radikallerini ve proteolitik enzimleri ortaya çıkartmasıdır [2,4,7,8]. Oluşan İ/R hasarı sonucunda artmış PMNL aktivitesi, kemoatraksiyonu ve infiltrasyonu PMNL degranülasyonuna neden olmaktadır. Degranülasyon sonrasında artan SOR ve proteazlar akciğer endotel hasarına ve buna bağlı olarak artmış pulmoner kapiller permeabiliteye sebep olmaktadır [2,5,6].

Çalışmamızda, İ/R uygulanan gruplar ile kontrol grubu arasında histopatolojik yönden önemli farklılıklar bulundu. İ/R uygulanan 2. grupta daha fazla ödem, konjesyon ve PMNL görüldü. Bu sonuçlar, alt ekstremitelerde oluşan İ/R hasarına bağlı olarak akciğerlerde olumsuz değişikliklerin ortaya çıktığını ileri süren çalışmalarla, paralellik göstermektedir. Tassiopoulos ve arkadaşlarının daha önce kullandıkları hasar skorlama puanına göre, 2. Grubun hasar skoru 2.75, 1.grubun hasar skoru ise 0.8 olarak hesaplandı [12]. Bu iki grup karşılaştırıldığı zaman aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark çıktı ( $p < 0.05$ ).

Günümüzde, İ/R sonrasında ortaya çıkan SOR'lerinin olumsuz etkileri ortadan kaldırmak için süperoksit dismutaz, allopürinol, katalaz, lipid peroksidaz, mannitol gibi çeşitli maddeler denenmiştir [16,17]. Anti oksidan maddelerin, pulmoner mikrovasküler permeabilite artışını ve nötrofil akümülyonunu önleyerek, İ/R sonrasında ortaya çıkan uzak doku ve organ hasarına karşı koruyucu etkiye sahip oldukları gösterilmiştir [8,9,10,18]. 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 [11,19,20]. 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 [9,10,19,,20]. Fiziksel stres plazma askorbik asit seviyesinde düşüşe 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 İ/R olayı gerçekleşmeden önce C vitamin seviyesini yükseltmek amacı ile işlemden önce 5 gün süreyle yüksek dozda askorbik asit verildi. Kontrol grubu ile karşılaştırıldıkları zaman İ/R sürecine maruz kalan 2. ve 3. grupta belirgin akciğer değişikliklerinin olduğu gözlemlendi. Ayrıca her iki grubun akciğer hasar skor puanları da kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulundu. Bununla birlikte ikinci grup, askorbik asit verilen 3. grup ile karşılaştırıldığında, PMNL, ödem ve konjesyonun bu grupta daha fazla arttığı ortaya çıktı. Akciğerlerdeki hasar skor puanı da aynı şekilde 2nci grupta daha yüksek bulundu. İki grup arasındaki tek değişken, üçüncü grupta kullanılan askorbik asittir. Farkın anlamlı olması, akciğerlerde oluşan hasarı azaltan faktörün askorbik asit olduğunu göstermektedir.

Sonuç olarak akciğerleri, alt ekstremitelerdeki geçici İ/R hasarına bağlı zararlardan korumak için askorbik asit verilmesinin yararlı olacağı ortaya çıkmaktadır.

## Kaynaklar

1. İşbir S, Akgün S, Ak K et al. Akut alt ekstremite iskemi/reperfüzyon hasarının akciğer serbest oksijen radikalleri üzerine olan etkisi. Türk Göğüs Kalp Damar Cer Derg 2000;8:2,629-31.
2. Nelson K, Herndon B, Reisz G. Pulmonary effects of ischemic limb reperfusion: evidence for a role for oxygen-derived radicals. Crit Care Med 1991;19(3):360-3.
3. Baltalarlı A, Çolakoğlu N, Önem G et al. İskemik preconditioning, sıçanlarda bilateral alt ekstremite iskemi/reperfüzyonuna bağlı gelişen akciğer hasarını artırır. Türk Göğüs Kalp Damar Cer Derg 2000;8:1,537-9.
4. Tassiopoulos AK Hakim TS; Finck CM et al. Neutrophil sequestration in the lung following acute aortic occlusion starts during ischaemia and can be attenuated by tumour necrosis factor and nitric oxide blockade. Eur J Vasc Endovasc Surg 1998 Jul;16(1):36-42.
5. Seekamp A, Mulligan MS, Till GO, Ward PA Requirements for neutrophil products and L-arginine in ischemia-reperfusion injury. Am J Pathol 1993;142(4):1217-26.
6. Anner H, Kaufman RP, Kobzik L, Valeri CR, Shepro D, Hechtman HB Pulmonary leukosequestration induced by hind limb ischemia. Ann Surg 1987;206(2):162-7.
7. Bless NM, Warner RL, Padgaonkar VA, et al. Roles for C-X-C chemokines and C5a in lung injury after hindlimb ischemia-reperfusion. Am J Physiol 1999;276(1):L57-63.
8. 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 1997;43(2):247-52.
9. Buettner GR: The pecking order of free radicals and antioxidants: Lipid peroxidation, alpha-tocopherol, and ascorbate. Arch Biochem Biophys 1993;300:535-43.
10. Beyer RE: The role of ascorbate in antioxidant protection of biomembranes: Interaction with vitamin E and coenzyme Q. J Bioenerg Biomembr 1994;26:349-58
11. Kearns SR, Kelly CJ, Barry M, Abdih H, Condrón C, Leahy A, Bouchier-Hayes D. Vitamin C reduces ischaemia-reperfusion-induced acute lung injury. Eur J Vasc Endovasc Surg 1999 Jun;17(6):533-6.
12. Tassiopoulos AP, Carling RE, Gao Y, Pedoto A, Finick 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.
13. Acer E, Mohan C, Geennaro M, Cupo S. Interleukin-1 and tromboxane release after skeletal muscle ischemia and reperfusion. Ann Vasc Surg.1992;6:69-73.
14. Greame MR. Ischemia/reperfusion inflammatory responses and acute lung injury. Thorax 1997; 52:841-2.
15. 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.
16. 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 1996;62:1664-66.
17. Ikezawa T, Nishikimi N, Oba Y, et al. Lipid peroxides in mechanism of ischemia/reperfusion injury i skeletal muscle experimental studies. Vasc Surg 1993;20:191-201.
18. Hirose J, Yamaga M, Takagi K. Reduced reperfusion injury in muscle. A comparison of the timing of EPC-K1 administration in rats. Acta Orthop Scand 1999;70(2):207-11.
19. 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 1997;272(1):H83-90.
20. Sağdıç K, Ener S, Gür E, et al. İskelet kası iskemi reperfüzyon hasarının azaltılmasında sodyum askorbat. Damar Cer Derg 1996;51-7.