

# Abdominal Aortaya Kros Klemp Konmasının Neden Olduğu İskemi/Reperfüzyon Hasarının Akciğerlere Etkisi

Hasan Ekim\*, Hasan Basri Erdoğan\*\*, Veysel Kutay\*, Halil Başel\*\*\*, Süleyman Özen\*\*\*\*, Abdüssemet Hazar\*\*\*, Hakan Akbayrak\*\*\*, Hanefi Özbek\*\*\*\*\*

## Özet:

**Amaç:** Aortanın geçici olarak kros klemlenmesini gerektiren cerrahi girişimlerden sonra alt ekstremitelerde iskemi/reperfüzyon (I/R) hasarı ve akciğerlerde hasar oluşabilir. I/R hasarında nötrofillerin aktivasyonunun önemli bir rol oynadığı bilinmektedir. Amacımız rat modelinde abdominal aortanın kros klemlenmesinin akciğer hasarında önemli bir rol oynadığını göstermek ve heparinin bu hasarı önlemede etkisi araştırmaktır.

**Metot:** Sprague-Dawley tipi 30 rat randomize olarak üç ayrı gruba ayrıldı. A grubundaki 10 ratta laparotomi yapılarak, abdominal aorta diseke edildi ve kros klemp konmadan batın kapatıldı. B grubundaki 10 ratta ise yine laparotomi yapılarak abdominal aorta diseke edildi ve kros klemp konarak batın kapatıldı. C grubundaki 10 ratta ise işlemden bir saat önce 500ü/kg diltiazem sodyum subkutan uygulandı ve aortaya kros klemp koymak için aynı işlemler yapıldı. Üç saat sonra B ve C gruplarında tekrar batın açılarak kros klemp kaldırıldı ve iki saat süreyle reperfüzyon sağlandı. Ratların hepsi çalışmanın bitiminde sakrifiye edildi. Histolojik inceleme ve biyokimyasal analizler için akciğerleri rezeke edildi.

**Bulgular:** Histopatolojik incelemede B grubundaki ratların akciğerlerinde nötrofil sayısı ve MDA seviyesi belirgin olarak artmıştı ve pulmoner hasar fazla idi. C grubunda B grubuna göre nötrofil sayılarında ve MDA seviyesinde azalma olmakla birlikte anlamlı farklar yoktu.

**Sonuç:** Abdominal aortaya belirli bir sürenin üstünde klemp uygulanması akciğerlerde nötrofil sekestrasyonuna neden olur ve pulmoner hasarı artırır. Heparinin hasarı azaltmada etkisi anlamlı değildir.

**Anahtar kelimeler:** İskemi/Reperfüzyon hasarı, rat

Alt ekstremitte iskemisi ve reperfüzyonu pulmoner hasara neden olur. Bu iskemi sonucu nötrofillerin aktivasyonu ve akciğerlerde sekestrasyonuna bağlıdır. Akut alt ekstremitte iskemi/reperfüzyon (I/R) hasarı özellikle aort cerrahisinde aortaya kros klemp konması sonucu oluşmaktadır. İskeminin etkisi iskemik kalan bölgede olmakla beraber akciğerler gibi uzak organlarda bile iskemik hasar oluşmaktadır (1,2). İskemik ekstremitte kan akımının yeniden sağlanması ekstremitteyi kurtarabilir; ancak, mortal seyredabilen multi-sistem organ yetmezliği gelişebilir. Myokard ve böbrekler gibi uzak organlarda bile hasar gözlenirse de akciğer dokusu en çok etkilenen organdır (3).

İnsanlarda aort replasmanından sonra aortik klempin açılması ve alt ekstremitelerin reperfüzyonu sonrası, kapiller wedge basınçtan bağımsız olarak pulmoner vazokonstriksiyon ve respiratuar disfonksiyon olduğu gösterilmiştir (4). Alt ekstremitte I/R, interstisyel ödem ile karakterize pulmoner hasar ve disfonksiyona neden olarak, bazı hastalarda uzayan ventilatör destek ve inotropik destek gereksinimine neden olabilir (5).

Bu çalışmamızda amacımız abdominal aortanın belli bir süre klemlenmesi sonucu oluşturulan geçici iskemi ve reperfüzyonu takiben akciğerlerde oluşan hasarı ve nötrofil birikimini tespit etmek ve heparinin bu hasarı önlemede etkisini incelemektir.

## Gereç ve Yöntem

Çalışmamızda fakültemiz hayvan laboratuvarında yetiştirilen 30 adet 200-250 gram ağırlığındaki Sprague-Dawley cinsi rat kullanılmıştır. Bu deneysel çalışma uluslararası kurallara da paralellik gösteren, fakültemizin etik kurulu yönergesine göre Neuro-Science araştırma birimi laboratuvarında yapılmıştır (26.04.2005 tarih ve 19 sayılı rapor). Ratlar prospektif randomize bir çalışma uygulanması

\*Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tıp Fakültesi Kalp Damar Cerrahisi Anabilim Dalı

\*\*Koşuyolu Kalp Eğitim ve Araştırma Hastanesi Kalp Damar Cerrahisi Kliniği

\*\*\*Van Yüksek İhtisas Hastanesi Kalp Damar Cerrahisi Kliniği

\*\*\*\*Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı

\*\*\*\*\*Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı

**Yazışma Adresi:** Dr. Hasan EKİM

Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tıp Fakültesi Kalp Damar Cerrahisi ABD, VAN

amacıyla üç ayrı gruba ayrıldı. Grup A'da bulunan 10 rat 40-50 mg/kg thiopental ile uyutularak steril şartlarda örtüldükten sonra laparotomi yapıldı. Abdominal aorta iliyak bifürkasyonun üzerinden diseke edildi. Başka bir işlem yapılmadan batın anatomik planda kapatıldı. B grubunda bulunan 10 ratta yine aynı işlemler yapılarak laparotomi yapıldı. Aorta iliyak bifürkasyonun üzerinden diseke edildikten sonra kros klemp kondu ve batın kapatıldı. C grubundaki 10 ratta ise işlemten bir saat önce 500ü/kg deltaparin sodyum subkutan uygulandı ve aortaya kros klemp koymak için aynı işlemler yapıldı. Üç saat sonra B ve C gruplarında tekrar batın açılarak kros klemp kaldırıldı ve iki saat süreyle reperfüzyon sağlandı. Ratların hepsi çalışmanın bitiminde sakrifiye edildi. Akciğerleri rezeke edilerek histolojik inceleme ve biyokimyasal analizler için örnekler alındı. Histolojik inceleme için akciğer dokusu %10 formalin ile tespit edildi. Seri kesitler yapılarak hematoksilin-eosin boyası ile boyandı. Mikroskopik incelemede 10 büyük büyütme sahasında nötrofil sayımı yapılarak her iki grup karşılaştırıldı. Çalışma bitiminde sakrifiye olan ratlar kırmızı çöp torbasına konarak hastanemizin çöplüğüne bırakıldı. İstatistiksel analizler için t-Testi kullanıldı.

Tablo 1: Her iki gruptaki ratlarda ortalama nötrofil sayıları ve MDA seviyeleri.

	A Grubu	B Grubu	C Grubu
Nötrofil sayısı (10 büyük büyütme sahasında)	10,2±1,1	38,1±1,2	36, ±1,8
Malon dialdehit (nanomol/gr doku)	61,7±0,7	117,6±0,3	115,1±0,6

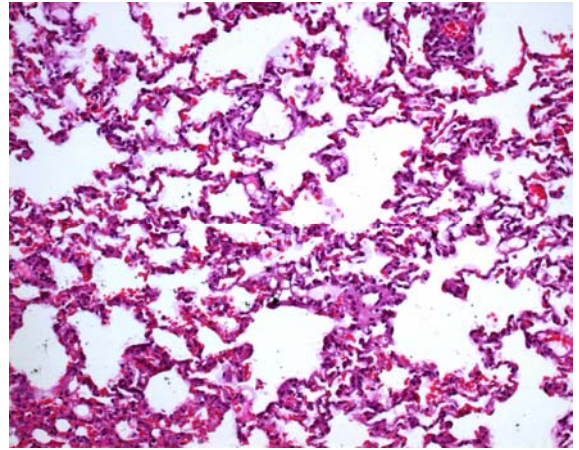
## Bulgular

Nötrofil sayısı, doku ödemi ve konjesyon A grubundaki ratlarda daha azdı (Resim 1). İskemi ve reperfüzyona maruz kalan ratların (Grup B) akciğerlerinde kontrol grubuna (Grup A) göre belirgin nötrofil birikimi saptandı (Resim 2). On büyük büyütme alanında B grubundaki ratlarda nötrofil sayısı (ortalama 38,1±1,2), A grubundaki ratlardan (ortalama 10,2±1,1) fazla idi. Aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı idi ( $p<0.001$ ). B grubundaki ratlarda yine A grubundaki ratlara göre malondialdehit seviyesi belirgin yükselmiş idi (Tablo 1). B grubunda ortalama malondialdehit seviyesi 117,6±0,3 nanomol/gr doku iken A grubunda 61,7±0,7 nanomol/gr doku idi ve fark istatistiksel olarak anlamlı idi ( $p<0.001$ ). Nötrofil sayıları ve MDA seviyesi bakımından B ve C grupları arasında anlamlı bir fark yoktu.

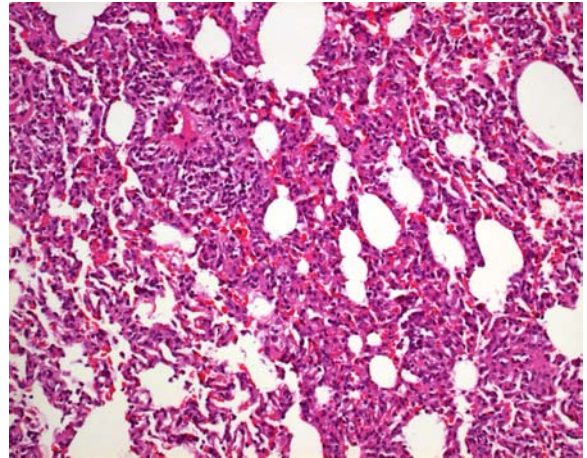
## Tartışma

İskemik dokuların reperfüzyonu sonrası pulmoner kapiller yatak bir filtre gibi görev yapar. Vasküler staz esnasında oluşan trombosit mikroagregatları reperfüzyondan sonra akciğerlerde tutulur. Ancak, akciğerlerde I/R hasarı oluşturmak için plazma kofaktörleri de dolaşımda bulunmalıdır (4).

Nötrofillerin akciğer endoteline yapışmasını (adezyon) takiben proteolitik enzimler ve serbest oksijen radikalleri açığa çıkar ve buna bağlı akciğer hasarı gelişir (6). I/R hasarı oluşan akciğerlerde hipoksemi, pulmoner hipertansiyon, kompliansta azalma ve non-hidrostatik akciğer ödemi oluşabilir. Bu subklinik bir tablodan akut respiratuar stres sendromuna (ARDS) kadar değişen bir klinik spektrum gösterebilir (1). Moleküler olarak akut alt ekstremite I/R hasarı sonrası vücutta lokal ve sistemik enflamatuar bir yanıt ortaya çıkmakta ve buna bağlı plazmada artmış pro-enflamatuar ajanlarla



Resim 1. İskemi ve reperfüzyon hasarı oluşturulmayan ratın akciğerinin histolojik incelemesi (Hematoxylin-eosin X 200).



Resim 2. İskemi ve reperfüzyon hasarı oluşturulan ratın akciğerinde histolojik incelemede interstisyel alan ve alveol içinde kanama ve yangı hücrelerinde belirgin artış görülmektedir (Hematoxylin-eosin X 200).

(sitokinler, araşidonic asit deriveleri, trombosit aktive edici faktör, kompleman gibi) birlikte, artmış serbest oksijen radikalleri ve nötrofil infiltrasyonu uzak organ hasarında rol oynamaktadır (1,3).

Artan polimorf nüveli lökosit aktivitesi, kemotraksiyonu ve infiltrasyonu, sonunda polimorf nüveli lökosit degranülasyonuna neden olur. Degranülasyon sonrası artan serbest oksijen radikalleri ve proteazlar akciğer endotel hasarına ve buna bağlı gelişen artmış pulmoner kapiller permeabiliteye neden olmaktadır (1). Akciğerde nötrofil aktivasyonu ve sekestrasyonu sonucunda pulmoner mikrosirkulasyon bozulmakta, protolitik enzimlerin ve serbest oksijen radikallerinin ortaya çıkmasıyla endotel permeabilitesinde artış ve interstisyel ödem ile karakterize doku hasarı oluşur (2).

İskemi reperfüzyon hasarının temelinde reperfüzyon esnasında dokunun oksijenizasyonu sonucu ortaya çıkan serbest oksijen radikalleri bulunmaktadır. Reperfüze olan dokuda serbest oksijen radikalleri oluşumuna bağlı nekrotik değişiklikler görülebilir. Reaktif oksijen radikalleri birçok kaynaktan salınabilir. En önemlisi ise aktive nötrofillerdir. Reperfüzyon sonrası akciğer hasarında en önemli olay, endotele yapışan nötrofillerin etkisiyle serbest oksijen radikalleri ve proteolitik enzimlerin ortaya çıkması ve bunlarında endotelde hasar yapmasıdır. Ayrıca plazmada bulunan proenflamatuar ajanlardan kompleman faktörleri, sitokinler (IL-6;IL-8;TNF), trombosit aktive edici faktör ve lökotrienler de endotel hücrelerinde hasara neden olur (3,7). Pulmoner vazokonstriksiyon, hipertansiyon ve artmış pulmoner vasküler geçirgenlik endotel hücre fonksiyonunun bozulmasının en sık görülen sonuçlarıdır (3,8).

I/R sonrası ortaya çıkan serbest oksijen radikallerinin zararlı etkilerini ortadan kaldırmak için superoksit dismutaz, allopurinol, katalaz, lipit peroksidaz, askorpiik asit ve mannitol gibi çeşitli maddeler kullanılmıştır. Bu antioksidan maddelerin, pulmoner mikrovasküler permeabilite artışını ve nötrofil akümülyasyonunu önleyerek, I/R sonrası oluşan uzak organ hasarına karşı koruyucu bir etkiye sahip oldukları bilinmektedir (2).

Ratlarda alt ekstremiteilerin akut iskemisi serum tümör nekrozis faktör (TNF) konsantrasyonunda ve takiben akciğerde nitrik oksit (NO) üretiminde artışına yol açar. TNF ve NO alt ekstremite I/R'nun neden olduğu akciğer hasarı oluşumunda anlamlı belirteçlerdir. Aktive makrofajlar ve monositler, patolojik koşullarda TNF'nin primer kaynağıdır. NO diğer serbest oksijen radikalleri (superoksid anyonu gibi) ile etkileşime girerek sitotoksitesini artıran peroksinitrit gibi molekülleri oluşturur (9).

Akut akciğer hasarı bir inflamasyon sendromu ve artmış permeabilite olarak tanımlanabilir. Akut akciğer hasarı ile akut respiratuar distress sendromu sistemik bir inflamatuvar yanıtın farklı derecelerdeki pulmoner bulgularıdır. Bu yanıt için tanımlanan risk faktörleri travma, sepsis ve cerrahi gibi çeşitli etkenleri kapsar. Tümünde birkaç inflamatuvar sitokinlerin transkripsiyonuna neden olur (7).

Akut akciğer hasarına doğru ilerleyen lokal ve sistemik inflamatuvar yanıtların son zamanlarda tanımlanan başka bir nedeni de I/R'dur. Aort cerrahisi alt ekstremite iskemisi ve reperfüzyonunun majör bir nedenidir. Akciğer hasarının oluşmasında en önemli etken, endotele yapışan nötrofillerin serbest oksijen radikallerini ve proteolitik enzimleri ortaya çıkarmasıdır. Ksantin oksidaz, superoksit, hidroksil radikali ve hidrojen peroksit gibi serbest oksijen radikalleri, yağ asit radikalleriyle reaksiyona girerek hücre hasarına neden olan lipit peroksidasyonuna neden olurlar (2,10).

I/R ile aortik cerrahi keza artmış interlökin-8 üretimi ve sistemik nötrofil aktivasyonu ile birliktedir. Bu prosesin sonunda nötrofiller damar duvarı boyunca hareket ettikçe yavaşlarlar. Endotel hücreleri değişik adezyon molekülleri veya selektin salgılar. Onlarda nötrofillere bağlanır. Adezyonu takiben, nötrofiller endotel bariyer arasından geç eder ve takiben onların hasar yapıcı granül kapsamları ve oksijen radikalleri akut akciğer endotel hasarına aracılık eder. Artmış pulmoner kapiller permeabilite surfaktanın inaktive olduğu alveollerde plazma transudasyonuna neden olur (7).

Bir düşük moleküler ağırlıklı heparin olan deltaparin sodyumun antikoagülan etkisinin olmadığı dozlarda bile antiinflamatuvar etkisi olduğunu daha önceki bir çalışmamızda göstermiştik (11). Heparin polimorf nükleer ve mononükleer lökosit fonksiyonlarını etkileyerek lökositlerin oluşturduğu reaktif oksijen türlerini azaltırlar, bunlar da nitrik oksitle bağlı olduğu için indirekt olarak nitrik oksit biyoyararlanımı artar ve vazodilasyon oluşur. Heparinin akut myokard infarktüsünde trombolizisten sonra reperfüzyon hasarının önlenmesindeki etkisinin bu mekanizmayla yakın ilişkisi vardır (12). Benzer olarak alt ekstremite iskemisi reperfüzyon hasarındaki etkisini araştırmak için yaptığımız bu çalışmamızda, abdominal aortaya belirli bir sürenin üstünde kros-klemp uygulanmasının akciğerlerde lipit peroksidasyonunun son ürünü olan MDA seviyesinin artmasına ve nötrofil sekestrasyonuna neden olarak pulmoner hasarı arttırdığı, Heparinin ise akciğer hasarını biraz azaltmakla birlikte anlamlı bir etkisi olmadığı sonucuna vardık. Denek sayılarımız sınırlı olduğu için bu konuda kesin sonuçlara varmak için daha geniş prospektif çalışmalara gereksinim vardır.

## Effect Of Ischemia/Reperfusion Injury To The Lungs Caused By Cross Clamping Of The Abdominal Aorta

### Abstract:

**Aim:** Lung injury may occur after the surgery involving the temporary aortic cross clamping with subsequent ischemia/reperfusion of the lower extremities. Activation of the neutrophils is known to play an important role in the ischemia/reperfusion injury. The aim of this study was to determine whether ischemia/reperfusion could have an important role on lung injury and to determine whether heparin could have a preventive effect on this injury in the rat model of abdominal aorta cross clamping.

**Methods:** Thirty Sprague-Dawley type rats were randomized into three groups. Rats in the group A (n:10) were undertaken laparotomy and closed after dissection of the abdominal aorta without cross clamping. Rats in the group B (n:10), were also undertaken laparotomy and abdominal aorta was dissected and clamped for 3 hours, then removed for reperfusion and abdomen was closed. In the group C rats (n:10), 500 u/kg deltaparin sodium was injected subcutaneously one hour before operation and subjected to the same surgical procedures as for group B rats. All rats were sacrificed and their lungs were removed for MDA analysis and histological examination.

**Results:** Rats in the group B have significantly higher neutrophil sequestration and lipid peroxidation product (MDA) in the lungs. The rats of group C exhibited lesser neutrophil sequestration and MDA levels than group B. But the difference were not statistically significant.

**Conclusion:** It is concluded that cross clamping of the abdominal aorta increases the neutrophil sequestration and augments the lung injury process. Heparin exhibited not significantly lesser neutrophil sequestration and MDA level.

**Key words:** Ischemia Reperfusion Injury, rat

### Kaynaklar

- İspir S, Akgün S, Ak K ve ark. Akut alt ekstremite iskemi/reperfüzyon hasarının akciğer serbest oksijen radikalleri üzerine olan etkisi. Türk Göğüs Kalp Damar Cer Derg.;8:629-631,2000.
- Berkan Ö, Yıldız E, Katrancıoğlu N ve ark. Alt ekstremite iskemi reperfüzyonuna bağlı gelişen akciğer hasarında askorbik asidin etkisi. Türk Göğüs Kalp Damar Cer Derg.;9:238-241,2001.
- Tekeli A, Akgün S, Civelek A ve ark. Alt ekstremite iskemi reperfüzyonu sonucunda gelişen akciğer hasarının önlenmesinde farklı bir ajan: FK 506 (takrolimus). Türk Göğüs Kalp Damar Cer Derg.;9:242-246,2001.
- Punch J, Rees R, Cashmer B, et al. Acute lung injury following reperfusion after ischemia in the hind limbs of rats. J Trauma.;31:760-765,1991.
- Şirin H, Sarıbülbül O, Cerrahoğlu M ve ark. Alt ekstremite iskemi reperfüzyonunun yol açtığı pulmoner hasarda aprotonin'in koruyucu etkinliği. Türk Göğüs Kalp Damar Cer Derg.;9:233-237,2001.
- 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.;8:537-539,2000.
- Graeme MR. Ischemia/reperfusion inflammatory responses and acute lung injury. Thorax;52:841-842,1997.
- Bengisun U, Koksoy C, Bengisun JS, et al. Ischemia and reperfusion injury: prevention of pulmonary hypertension and leukosequestration following lower limb ischemia. Prostaglandin Leukot Essent Fatty Acids;56:117-120,1997.
- Tassiopoulos A, 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.;26:647-656,1997.
- Nelson K, Herndan B, Reisz G. Pulmonary effects of ischemic limb reperfusion. Evidence for a role for oxygen-derived radicals. Crit Care Med;19:360-363,1991.
- Güler M, Ekim H, Kırallı K, Özen S. Ratlarda oluşturulan venöz tromboziste heparinin antiinflamatuvar etkisi. Fleboloji. 3:19-26, 2001.
- Dandona P, Qutob T, Hamouda W, et al. Heparin inhibits reactive oxygen species generation by polymorphonuclear and mononuclear leucocytes. Thromb Res 96:437-443, 1999.