

## DENEYSEL SICAK RENAL İSKEMİ VE REPERFÜZYONDA LİPİD PEROKSİDASYONU VE ALPHA-TOCOPHEROL TEDAVİSİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ\*

THE EVALUATION OF LIPID PEROXIDATION AND ALPHA-TOCOPHEROL TREATMENT IN EXPERIMENTAL WARM RENAL ISCHEMIA AND REPERFUSION

Dr. N. Yılmaz Selçuk\*, Dr. Birkan Yakan\*\*, Dr. Ayla San\*, Dr. Mahmut Başoğlu\*\*\*  
Dr. Zeki Tonbul\*, Dr. Ahmet Kızıltunç\*\*\*\*, Dr. Cemal Gündoğdu\*\*\*\*\*

Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Nefroloji Bilim Dalı\*, Histoloji\*\*, Genel Cerrahi\*\*\*, Biyokimya\*\*\*\*, Patoloji\*\*\*\*\*  
Anabilim Dalları, ERZURUM

### ÖZET

İskemi sonrası reperfüzyonla meydana gelen oksijen serbest radikalleri iskemik akut renal yetmezlik patogeneğinde ve renal transplantasyon sonrası allograft fonksiyonunun gecikmesinde önemli rol oynarlar. Bu çalışmada 50 Guinea Pig'de sıcak renal iskemisi ve reperfüzyon sırasında oluşan oksijen serbest radikalleriyle meydana gelen Lipid peroksidasyonu ve renal histolojik değişiklikler üzerinde alpha-tocopherol (E vitamini) tedavisinin etkilerini incelemeyi amaçladık.

50 Guinea Pig, 5 gruba bölündü. Grup 1 (n=10) sağlıklı kontrollerdi. Grup 2 (n=10)'ye 30 dk. süreyle sıcak renal iskemisi uygulandı. Grup 3 (n=10)'e sıcak renal iskemisi öncesi 3 gün süreyle intraperitoneal alpha-tocopherol (100 mg/gün) verildi. Grup 4 (n=10)'e 30 dk. sıcak renal iskemisi sonrası 60 dk. reperfüzyon yapıldı. Grup 5 (n=10)'e intraperitoneal alpha-tocopherol verildi ve sıcak renal iskemiyi takiben reperfüzyon uygulandı.

Grup 4'de lipid peroksidasyonu'nun bir göstergesi olan plazma malondialdehid düzeyleri (median değer: 9.52 nmollmL) sırasıyla Grup 1,2,3 ve 5'den daha yüksek bulundu (6.67, 6.59, 6.56, 6.57 nmollmL,  $p < 0.001$  tüm gruplar için).

Renal histolojik incelemede ise sıcak renal iskemiyi takiben proksimal ve distal tubuluslarda nekroz gözlemlendi. Reperfüzyonu takiben bu nekroz sahası genişledi ve glomerulus hasarı başladı. Alpha-tocopherolle tedavi, renal iskeminin histolojik değişikliklerini etkilemedi, fakat renal iskemisi sonrası reperfüzyon hasarını azattı.

Sonuç olarak, alpha-tocopherol'ün sıcak renal iskemiyi takiben reperfüzyonda lipid peroksidasyonu ve renal histolojik hasarı azalttığı gösterildi.

**Anahtar Kelimeler :** Sıcak renal iskemisi, reperfüzyon, Alpha - Tocopherol

### SUMMARY

We investigated effects of alpha-tocopherol on lipid peroxidation and histological observations induced by oxygen free radicals generated during warm renal ischemia and reperfusion in 50 Guinea Pigs.

Twenty-three Guinea Pigs were divided to five groups. Group 1 (n:10) was healthy controls. Group 2 (n:10) had warm renal ischemia for 30 minutes. Group 3 (n:10) was treated intraperitoneally by alpha-tocopherol (100 mg per day) for three days before warm renal ischemia. Group 4 (n:10) had reperfusion for 60 minutes after warm renal ischemia for 30 minutes. Group 5 (n:10) was treated intraperitoneally by alpha-tocopherol before warm renal ischemia and reperfusion.

In Group 4, level of plasma malondialdehyde (median value: 9.52 nmollmL), an indicator of lipid peroxidation, was higher than those of Group 1, 2, 3 and 5 (6.67, 6.59, 6.56, 6.57 nmollmL, respectively;  $p < 0.001$  for all groups).

Histological observations showed necrosis of proximal and distal convoluted tubules following warm renal ischemia. This necrosis area expanded, and glomerulus injury started following reperfusion. The treatment of alpha-tocopherol did not affect to histological changes of renal ischemia, but it reduced reperfusion injury after renal ischemia.

Finally, it was shown that alpha-tocopherol reduced both lipid peroxidation and histologic injury in reperfusion following warm renal ischemia.

**Key Words :** Warm renal ischemia, Reperfusion, Alpha-Tocopherol.

\* XII. Ulusal Böbrek Hastalıkları, Diyaliz ve Transplantasyon Kongresinde Sözlü Olarak Tebliğ Edilmiştir.

## GİRİŞ

Renal postiskemik reperfüzyonu takiben oluşan oksijen serbest radikallerinin akut renal yetmezlik patogenezinde (1) ve renal transplantasyondan sonra gecikmiş graft fonksiyonunda önemli rolleri vardır (2).

Renal iskemi adenosine triphosphate (ATP) yıkımında artış meydana getirir. Yıkım ürünleri olarak Adenosin Monofosfat (AMP), adenosin, inosin ve hipoksantin artar (3).

Renal reperfüzyonda hipoksantin, ksantin oksidaz tarafından ksantine çevrilir ve bu sırada moleküler oksijenin yıkım ürünü olarak superoksit radikali oluşur (4, 5).

Superoksit radikali ve onun yıkım ürünleri olan hidroksil radikali ile hidrojen peroksit mitokondrium, lizozom ve plazma membranları üzerinde lipid peroksidasyonu vasıtasıyla hücre hasar meydana getirir (6, 7). Hücre membranlarında lipid peroksidasyonu yoluyla meydana gelen hücre hasarı, membran permeabilite artışından hücre lizisine kadar değişebilir (8).

Alpha-tocopherol (E vitamini), superoksit dismutase, allopurinol önemli oksijen serbest radikal çöpcüleri ve antioksidanlardır (9).

Çalışmanın amacı Guinea Pig'lerde sıcak renal iskemi takiben reperfüzyon hasarında lipid peroksidasyonu ve alpha-tocopherol tedavisinin etkilerini deneysel olarak tesbit etmektedir.

## MATERYAL VE METOD

350-500 gm. ağırlığında 50 Albino Guinea Pig, ketamine hidroklorid ile intraperitoneal olarak anestezi edildi (Ketalar, 30 mg/kg). 50 Guinea pig her grupta 10'ar adet olmak üzere, 5 gruba bölündü. Grup 1 sağlıklı kontrollerdi. Grup 2'ye sadece sıcak renal iskemi uygulandı. Grup 3'e üç gün süreyle, 100 mg/gün intraperitoneal olarak alpha-tocopherol (-Euphenal amp, Roche) verildi ve daha sonra sıcak renal iskemi uygulandı. Grup 4'e sıcak renal iskemi takiben reperfüzyon işlemi yapıldı. Grup 5'e üç gün süreyle 100 mg/gün, intraperitoneal olarak alpha-tocopherol verildi ve sıcak renal iskemi takiben reperfüzyon uygulandı. Her grubun işlemleri ayrı zamanlarda yapıldı.

Sıcak renal iskemi ve reperfüzyon işlemi Jablonski ve arkadaşları (10)'nın rat modeline, Maesen ve arkadaşları (11)'nin Canine modeline ve Mc Dougal (12)'nin rapor ettiği klasik bilgilere uygun olarak yapıldı.

Sıcak renal iskemi için abdominal orta hat insizyo-

nu yapıldı ve sol böbreğin pedikülü ortaya çıkarıldı. Pediküle 30 dakika süreyle nontravmatik vasküler klemplere yerleştirildi. İskemik periyodun sonunda klempler açılarak kan akımının başlamasına izin verildi. Bu reperfüzyon işlemi 60 dk süreyle uygulandı.

İşlemleri takiben tüm tüm gruplarda sol böbrekler alındı ve % 10 tamponlanmış formaldehitte fiks edildi. Daha sonra heparin içeren bir şırıngaya (10 IU/mL kan) intrakardiyak kan örnekleri çekildi. Plazma santrifüjle ayrıldı ve analize kadar -20 °C'de deep-freeze'de saklandı. Hayvanlara tüm işlemlerden sonra sodyum thiopentalin aşın dozu intrakardiyak verilerek öldürüldü.

## Histoloji

Her grubun böbreklerinden alınan kesitler parafine gömüldü ve 3 µm'lik kalınlıkta kesildi. Daha sonra kesitler Hematoxylin Eosin ile boyanarak foto ışık mikroskopunda incelendi (Olympus Vanox photomicroscope).

## Lipid Peroxide Deneyi

Lipid peroksidasyon bir lipid peroksidasyon ürünü olan plazma Malondialdehid (MDA) seviyeleriyle değerlendirildi. Toplanan ve dopalanan (-20°C) plazma örnekleri Buege ve Aust tarafından tarif edilen (13) yöntemle thiobarbituric asit ile reaksiyona sokulduktan sonra MDA thiobarbituric asit ürünü tesbit edildi.

## İstatistiksel Analiz

Sonuçlar One-Sample ANOVA Varyans analizi, Median değer analizi ve Mann-Whitney - U testi ile yorumlandı.

## BULGULAR

Plazma MDA seviyeleri gruplar arasında farklı idi (F=24.5; p<0.001). Grupların plazma MDA seviyeleri Tablo 1'de gösterildi.

Dördüncü grubun MDA seviyeleri 2. grup (Z = -3.6; p>0.001) ile 1.3 ve 5. gruptaki MDA seviyelerinden daha yüksekti (Z = 3.78; p<0.001). 5. grubun MDA seviyeleri grup 1,2 ve 3'den farklı değildi (sırasıyla Z= -0.378, Z= -0.038, Z= 0; p>0.05). Böylece sıcak renal iskemi ve reperfüzyonu takiben meydana gelen lipid peroksidasyonunun alpha-tocopherol tedavi-

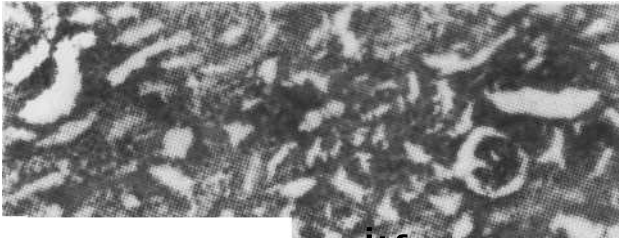
siyle önlendiği tespit edildi.

Tablo I. Plazma Malondialdehide seveleri  
(median değerler ve sınırları)

Gruplar	nmol/mL plazma	
Grup 1 (n=10)	6.67	(6.35 - 7.72)
Grup 2 (n=10)	6.59	(6.03 - 8.73)
Grup 3 (n=10)	6.56	(6.14 - 8.42)
Grup 4 (n=10)	9.52	(8.59 - 14.22)
Grup 5 (n=10)	6.57	(6.11-8.01)

Histolojik Değerlendirme Yapıldığında;

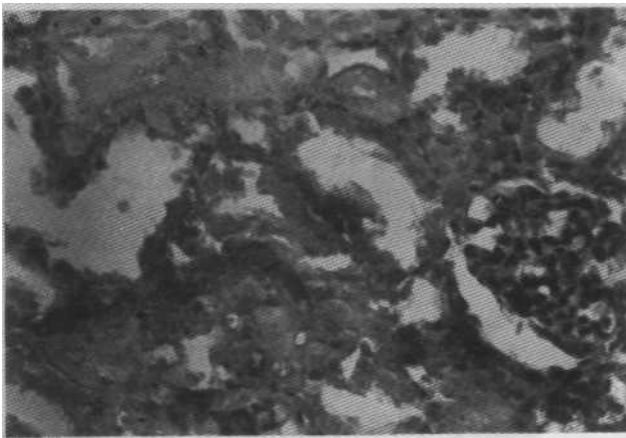
**Grup 1 normal glomeruler ve tubuler yapıya sahipti (Resim 1).**



Itf

Resim 1. Normal Glomeruler ve tubuler görünüm

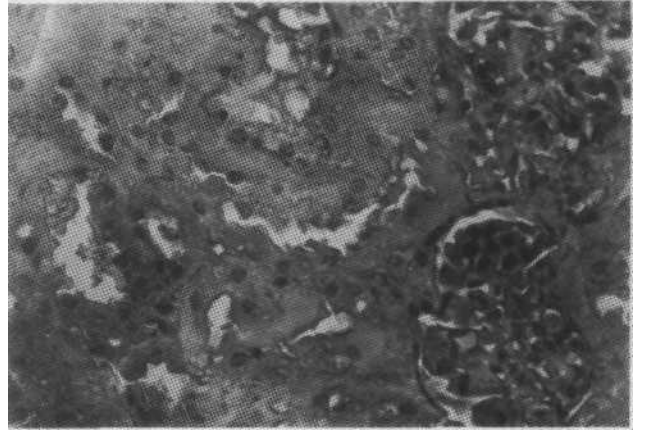
Grup 2'de sıcak renal iskemiyi takiben tubullerde belirgin iskemik nekroz ve tubulus lümenine dökülmüş nekroze hücreler gözlemlendi (Resim2).



Resim 2. 30 dk. sıcak renal iskemiyi takiben tubuluslarda belirgin iskemik nekroz ve tubulus lümenine dökülmüş nekroze hücreler

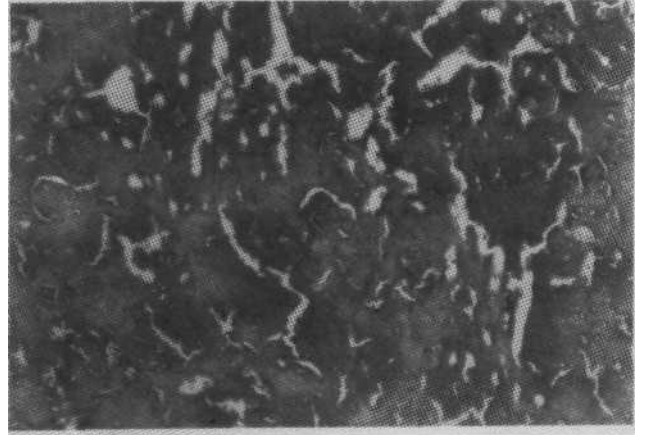
Grup 3'de alpha-tocopherol verilmesine rağmen 30 dk. sıcak renal iskemisi sonrası tubuluslardaki iske-

mik nekrozda değişiklik yoktu (Resim 3).



Resim 3. Alpha-tocopherol verilmesine rağmen 30 dk. sıcak renal iskemisi sonrası tubuluslarda devam eden iskemik nekroz

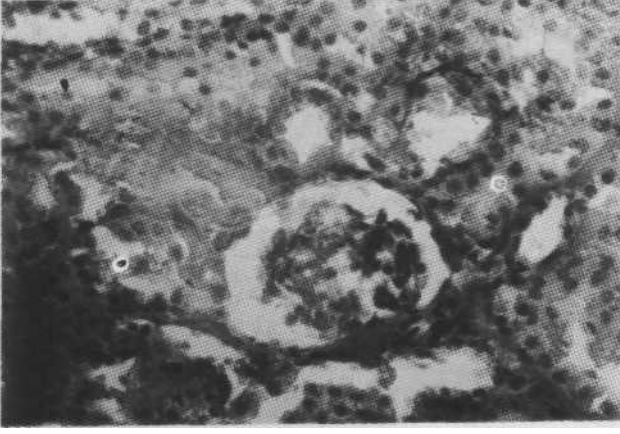
Grup 4'de 30 dk sıcak renal iskemiyi takiben 60 dk reperfüzyon sonrası yaygın tubuler ve glomeruler nekroz görüldü (Resim 4).



Resim 4. 30 dk. sıcak renal iskemiyi takiben 60 dk. reperfüzyon sonrası yaygın tubuler ve glomeruler nekroz

Grup 5'de alpha-tocopherol verilmesini takiben oluşturulan 30 dk sıcak renal iskemisi ve reperfüzyonda tubuluslar ve glomerulde kısmi nekroz görüldü (Resim 5)

Bu bulgularla alpha-tocopherol tedavisinin sıcak renal iskemisi sonrası reperfüzyon hasarını azalttığı saptandı.



Resim 5. alpha-tocopherol verilmesini takiben oluşturulan 30 dk. sıcak renal iskemi ve reperfüzyonda tubuluslar ve glomerulde kısmi nekroz

## TARTIŞMA

Galat ve arkadaşları (14) renal iskemik olay meydana getirmeden oksijen serbest radikallerine renal cevabı araştırmışlardır. Bu çalışmada hipoksantin ve ksantin oksidaz birlikte rat böbreğine infüze edildiği zaman glomeruler filtrasyon hızında % 70 azalma meydana gelmiştir. Halbuki ksantin oksidaz inaktive edildiği zaman veya superoksid dismutase yada katalazla böbrek önceden perfüze edildiği zaman glomeruler filtrasyon hızında bir değişiklik saptanmamıştır. Bu sonucu; oksijen serbest radikalleri lipid peroksidasyon yoluyla hücre membranlarını etkileyerek, glomeruller ve tubulo-interstisyel yapılarda hücrel hasar meydana getirerek sağlar (15).

Çalışmamızda lipid peroksid ürünü olan malondialdehidin plazma seviyeleri, renal iskemi uygulanan grupta normal seviyelerde iken, 30 dk. sıcak renal iskemi sonrası 60 dk.lık reperfüzyon uygulanan grupta yüksek bulunmuştur.

Maessen ve arkadaşları (11) Canin böbreklerinin post-transplant viabilitesi ve enerji metabolizması üzerinde sıcak renal iskemi olsun veya olmasın basit soğuk depolamanın etkisini inceledikleri çalışmalarında; 30.dk sıcak renal iskemi sonrası çıkarılan böbreğin 24 saat soğuk depolama sonrası adenin nükleotid seviyelerinin değişmediğini, böbrek yeniden implante edilip 60 dk.lık reperfüzyon uygulandığında adenin nükleotid seviyelerinin azaldığını tespit etmişlerdir. Soğuk depolamanın sonundaki doku neklotid seviyesinin implantasyondaki viabilite üzerinde herhangi bir rolünün olmadığı ve daha önceden mevcut olan renal iskemik hasarın implantasyonu takiben renal viabiliteyi bozduğu ve soğuk depolamanın nükleotid koruyucu etki-

sini azalttığı sonucuna varmışlardır.

Marubayaski ve arkadaşları (16) 30, 60 ve 120 dk'lık sıcak renal iskemi ve reperfüzyon işlemi sonrası renal ATP seviyesinde önemli derecede azalma tesbit etmişlerdir.

Demirbaş ve arkadaşları (17) Canin renal ototransplantasyon modelinde lipid peroksidasyonunun 24 saat soğuk depolama sonrası değişmediğini, transplantasyondan 1 ve 24 saat sonra arttığını bildirmişlerdir.

Paller (18) ile Doşluoğlu (19) ve arkadaşlarında rat böbreğinin 60 dk sıcak renal iskemi ve reperfüzyonu sonrası renal korteks homojenatlarında MDA seviyelerinin yükseldiğini tesbit etmişlerdir.

Son yıllarda da Rabl ve arkadaşları (20) insan böbrek transplantasyonunda iskemi-reperfüzyon hasarının lipid peroksidasyonu ile ilişkili olup olmadığını incelemek için yaptıkları çalışmada lipid peroksidasyonunu plazma malondialdehid seviyelerini ölçerek tesbit etmişler ve transplantasyon yapıldıktan sonra reperfüzyonun başlangıcından 1 saat sonra plazma Malondialdehit düzeylerinde artış olduğunu rapor etmişlerdir.

Çalışmamıza benzer olarak tüm bu çalışmalarda da renal iskemi sonrası reperfüzyonda lipid peroksidasyonun aktive olduğu saptanmıştır.

Jablonski ve arkadaşları (10) rat modelini kullandıkları çalışmada 30 dk sıcak renal iskemi sonrası proksimal tubulusda nekroz ve fonksiyonel değişiklikler tesbit etmişlerdir. Çalışmamızda da 30 dk sıcak renal iskemi sonrası tubuluslarda iskemik nekroz saptandı. Ancak 60 dk'lık reperfüzyondan sonra iskemik nekroz daha da yaygınlaştı. Çalışmamızın sonucuna benzer olarak Frega ve arkadaşları (21) iskemik böbreğin reperfüzyonuyla meydana gelen hasarın yalnızca iske miyle oluşan hasardan çok daha fazla olduğunu rapor etmişlerdir.

Allopurind, alpha-tocopherol, desferoksamin, superoksid dismutaze gibi serbest radikal çöpcüleri ve antioksidanların renal iskemi ve reperfüzyon öncesi veya reperfüzyondan hemen önce verilmesiyle renal hasarın aynı ölçüde azaldığı bildirilmiştir (22).

Alpha-tocopherol tüm hücre ve organel membranları içinde bir lipid faz antioksidanıdır. Oksijen serbest radikallerini daha az reaktif formlara çevirir ve böylece bu membranları lipid peroksidasyonuna karşı korur (23). Güçlü bir okside edici radikal olan hidroksil radikali en fazla harab edici serbest oksijen radikaldir (24). Alpha-tocopherol hidroksil radikal çöpcülerinden birisidir (25).

Çalışmamızda alpha-tocopherol'ün sıcak renal iskemisinin sonuçlarının etkilemediği, sıcak renal iske mi sonrası meydana gelen reperfüzyon hasarını lipid peroksidasyonunu, önleyerek azalttığı tesbit edildi. Benzer olarak Demirbaş ve arkadaşları (17) Canin renal ototransplantasyon modelinde Euro-Collins solüsyonu içine alpha-tocopherol ilave etkilerinde transplantasyon sonrası lipid peroksidasyonun azaldığını ve renal fonksiyonların iyileştiğini göstermişlerdir.

Rabl ve arkadaşları da (20) insan böbrek transplantasyonunda vitamin C, E, A ve B kompleksinden oluşan vitamin kompleksinin reperfüzyon başlamadan önce verildiğinde plazma malondialdehid seviyesinin artmadığını ve kreatinin klirensinin önemli oranda yükseldiğini saptamışlardır.

Çalışmamızda ki, alpha-tocopherol'ün sıcak renal iskemide etkili olmadığı sonucumuza benzer olarak Green ve arkadaşları da (26) tavşan böbreğinde Allopurinol'ün tek basma renal iskemide purin nükleotidlerin kaybını önlemediğini ancak reperfüzyonda meydana gelen lipid peroksidasyonu azalttığını tesbit etmişlerdir.

Yine bir başka çalışmada Allopurinol'ün I.V. 1 saat süreyle verilmesinden sonra 35 dk'lık sıcak renal iske miyi takiben reperfüzyonda ortaya çıkabilecek böbrek yetmezliğini önemli oranda azaldığı saptanmıştır (27).

Sonuç olarak; Guinea pig'lerde alpha-tocopherol tedavisinin 30.dk sıcak renal iskemiyi takiben reperfüzyonda lipid peroksidasyonu önlediği ve histolojik hasarı azalttığı, fakat iskemik renal değişiklikleri etkilemediği gösterildi. Böylece renal transplantasyon ve iskemik akut renal yetmezlikte böbreği koruyucu bir ilaç olarak alpa-tocopherol'ün verilebileceği söylenebilir.

#### KAYNAKLAR

1. Diamond JR, Bonventre JV, Karnovsky ML A role for oxygen free radicals in aminonucleoside nephrosis. *Kidney Int.* 1986; 29: 478-483.
2. Bosco PJ, Shweizer RT. Use of oxygen radical scavengers on autografted pig kidneys after warm ischemia and 48-hour perfusion preservation. *Arch Surg* 1988; 123: 601-604.
3. Miller WL, Thomas RA, Berne RM, et al. Adenosine production in the ischemic kidney. *Circ Res* 1978; 43: 390-397.
4. Waund WR, Rajagopalan KV. Purification and properties of the NAD<sup>+</sup> - dependent (type D) and Q2-dependent (type O) forms of rat liver xanthine dehydrogenase. *Arch Biochem Biophys* 1976; 172: 354-64.
5. Fridovich I. Quantitative aspects of the production of superoxide anino radical by milk xanthine oxidase *J Biol Chem* 1970; 245: 4053~057.
6. Fridovich I. The biology of oxygen radicals. *Science* 1978; 201: 875-880.
7. Kellogg EW, Fridovich I. Superoxide, hydrogen peroxide, and singlet oxygen in lipid peroxidation by a xanthine oxidase system. *J Biol Chem* 1975; 250: 8812-8817.
8. Kim K, Rhee SG, Stadman ER, Nonenzymatic cleavage of proteins by reactive oxygen species generated by dithiothreitol and iron. *J Biol Chem* 1985; 260: 394-397.
9. Paller MS. Free radical-mediated post ischemic injury in renal transplantation. *Ren Fail* 1992; 14 (3): 257-260. .
10. Jablonski P, Howden BO, Rae DA. An experimental model for assesment of renal recovery form warm ischemia. *Transplantation* 1983; 35: 198-204.
11. Maessen JG, Van Der Vusse GJ, Vork M, et al. The benefici effect of intermediate normothermic perfusion during cold storage of ischemically injured kidneys. *Transplantation* 1989; 47(3): 409-414.
12. McDougal WC. Renal perfusion/Reperfusion injuries. *J Urol.* 1988; 140: 1325-1330.
13. Buege JA, Aust SD. Microsomal lipid peroxidation. *Methods in Enzymology*, (Eds. Colowick SP and Kaplan NO), Vol. 52, Academic Press, New York, 1978, pp: 302-310.
14. Galat JA, Robinson AV, Rhodes RS. Oxygen Free Radical Mediated Renal Dysfucniton. *J Surg Res* 1989; 46: 520-525.
15. Freeman BA, Crapo JD. Biology of disease: free radicals and tissue injury. *J Lab Invest* 1982; 47: 412-426.
16. Marubayashi S, Dohi K, Sugino K, et al. The protective effect of administered  $\alpha$ -tocopherol against heptic damage caused by ischemia-reperfusion or endotoxemia. *Ann NY Acad Sci* 1989; 570: 208-218.
17. Demirbaş A, Bozoklu S, Özdemir A, et al. Effect of alpha-tocopherol on the prevention of reperfusion injury caused by free oxygen radicals in the canine kidney auto transplantation model, *Transplant Proc* 1993; 25(3): 2274.
18. Paller MS, Hoidal JR, Ferris TF. Oxygen free radicals in ischemic acute renal failure in the rat. *J Clin Invest* 1984; 74: 1156-1164.
19. Dolşuoğlu HH, Aktan AO, Yeğen C, et al. The cytoprotective effects of verapamil and iloprost (ZK 36374) on ischemia/reperfusion injury of kidneys. *Transpl Int* 1993; 6(3): 138-142.
20. Rabl H, Khoschorur G, Colombo T, et al. A multivitamin infusion perevents lipid peroxidation and improves transplantation performance. *Kidney Int* 1993; 43: 912-917.
21. Frega NS, DiBona DR, Guetler B. et al. Ischemic renal injury. *Kidney Int.* 1976; 10: 517-525.
22. Paller MS. Free radical-mediated post ischemic injury renal transplantation. *Ren Fail* 1992; 14(3): 257-260.
23. Witting LA. Vitamin E and lipid antioxidants in free-radical initiated reactions. *Free radicals in biology* (Ed. WA. Pryor), Academic Press, New York, 1980; 295-319.

24. Diguseppi J, Fridovich I. Ethylene from 2-keto -4-thiomethyl butyric acid: The Haber-Weiss reaction. *Arch Biochem Biophys* 1980; 205: 323-329.
25. Demopoulos HB, Flamm ES, Hietronigro DD, et al. The free radical pathology and the microcirculation in the major central nervous system disorders. *Acta PhysiolScand* 1980; Suppl 492: 91-119.
26. Green CJ, Healing G, Simpkin S, et al. Allopurinol inhibits lipid peroxidation in warm ischemic and reperfused rabbit kidneys. *Free Radic Res Commun.* 1989; 6(5): 329-337.
27. Marx A, Heberer M, Gale J, et al. Reduction of renal reperfusion damage following warm ischemia by allopurinol and superoxide dismutase. *Helv Chir Acta* 1989; 56(4): 539-542.