

Dekspantenolün Böbreği İskemi-Reperfüzyon Hasarından Koruyucu Etkisi Var mıdır?

Does Dexpanthenol Protect the Kidney from Ischemia-Reperfusion Injury?

ÖZ

AMAÇ: İskemik kalan bir dokuda tekrar reperfüzyon sağlandığında serbest oksijen radikalleri açığa çıkmakta ve iskemiden daha yaygın bir doku hasarı oluşmaktadır. Birçok kimyasal ajanın bu hasarı önlediği bilinmektedir. Çalışmamızda, dekspantenolün (Dxp) böbreği iskemi-reperfüzyon hasarından koruyup korumadığını araştırmayı amaçladık.

GEREÇ ve YÖNTEMLER: Çalışmada 24 erişkin sıçan kullanıldı ve 8'erli 3 grup oluşturuldu. Tüm gruplarda orta hat laparotomi ile sağ nefrektomi yapıldı. Buna ek olarak Grup 1'de (Sham grubu) sol böbrekte iskemi oluşturulmadan 6 saat sonra sol nefrektomi yapıldı. Grup 2'de (Serum fizyolojik grubu) sol böbrek 1 saat iskemik bırakıldı. 1 saatin sonunda 6 saat süre ile reperfüzyon uygulandı. İskemiden 30 dakika önce ve reperfüzyondan hemen önce periton içine serum fizyolojik uygulandı. Grup 3'te (Dekspantenol grubu) sol böbrek 1 saat iskemik bırakıldı ve 6 saat reperfüzyon uygulandı. İskemiden 30 dakika önce ve reperfüzyondan hemen önce 500 mg/kg Dxp periton içine verildi. 6 saatin sonunda sol nefrektomi yapıldı. Alınan her bir böbreğin bir kısmı histopatolojik olarak konjesyon, inflamasyon ve nekroz, bir kısmı da doku nitrik asit, Glutatyon redüktaz, katalaz ve MDA düzeyleri yönünden incelendi.

BULGULAR: Histopatolojik ve biyokimyasal değerlendirmede gruplar arasında anlamlı bir fark saptanmadı ($p>0,05$).

SONUÇ: Dxp, pantotenik asidin biyolojik olarak aktif formudur ve antioksidan etkiye sahiptir. Literatürde çeşitli dokularda antioksidan etkisi ile dokuları koruyucu etkisi gösterilmiş olmasına rağmen bizim çalışmamızda böbreğin iskemi-reperfüzyon hasarında Dxp'ün koruyucu etkisi olduğu gösterilememiştir.

ANAHTAR SÖZCÜKLER: Dekspantenol, İskemi, Reperfüzyon hasarı

ABSTRACT

OBJECTIVES: Tissue injury occurs following reperfusion after creation of ischemia. Plenty of chemical agents have been shown to protect from such an injury. We planned to evaluate the protective effect of dexpanthenol (dpx) in ischemia-reperfusion injury.

MATERIAL and METHODS: 24 adult rats were used and divided into 3 groups. A right nephrectomy was performed through a median laparotomy incision in all groups. Additionally, in group 1 (sham group), left nephrectomy was made 6 hours later without creation of ischemia. In group 2 (Saline group), the left kidney was left ischemic for 1 hour and reperfusion was established for 6 hours. Saline was administered intraperitoneally thirty minutes before creation of ischemia and just before reperfusion. In group 3 (Dexpanthenol group), the left kidney was left ischemic for 1 hour and reperfusion was established for 6 hours. Dxp (500 mg/kg) was administered intraperitoneally thirty minutes before creation of ischemia and just before reperfusion. A left nephrectomy was performed at the end of the 6 hours of reperfusion. Nephrectomy specimens were histopathologically analysed for congestion, inflammation and necrosis. Tissue NO, glutathione reductase, catalase and MDA levels were measured.

RESULTS: There was no significant differences between the groups histopathologically or biochemically.

CONCLUSION: Dexpanthenol is the biologically active form of pantothenic acid and has an antioxidant effect. Our study was not in correlation with the literature regarding a protective effect of dpx on various organs via its antioxidant effect.

KEY WORDS: Dexpanthenol, Ischemia, Reperfusion injury

Sezen ÖZKISACIK¹

Mesut YAZICI¹

Harun GÜRSOY¹

Mukadder SERTER²

Nil ÇULHACI³

1 Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Çocuk Cerrahisi Anabilim Dalı, Aydın, Türkiye

2 Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, Aydın, Türkiye

3 Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Patoloji Anabilim Dalı, Aydın, Türkiye

Geliş Tarihi : 24.11.2010

Kabul Tarihi: 31.12.2010

Yazışma Adresi:

Sezen ÖZKISACIK

Adnan Menderes Üniversitesi Tıp

Fakültesi, Çocuk Cerrahisi Anabilim Dalı, Aydın, Türkiye

Tel : 0 256 444 12 56

Faks : 0 256 214 64 95

E-posta : sozkisacik@adu.edu.tr

GİRİŞ

Böbrekte iskemi-reperfüzyon (I/R) hasarı şok, travma ve böbrek nakli gibi durumları takiben gelişebilmektedir. Bu iskemi-reperfüzyon hasarı akut böbrek yetmezliği, doku reddi ve uzun dönemde organ işlevlerinde gecikmenin en önemli nedenlerinden biridir (1-3).

Dekspantenol (Dxp) (vitamin B5) pantotenik asidin (PA) (vitamin B5) biyolojik olarak aktif formudur. Dxp memeli canlılarda aktif formundan yararlanmak için oral ya da parenteral yollarla verilebilir (4,5). Dekspantenol sıçan ya da memeli canlılarda oral ya da parenteral yolla verildiğinde dokuda PA'e dönüştürülür. PA, redükte glutatyon (GSH), Koenzim A (CoA) ve hücredeki ATP sentezinde artışa neden olur (6-8). Bu GSH ve glutatyon bağımlı peroksidazlar iskemi reperfüzyon hasarında görülen oksidatif stres ve lipid peroksidasyonuna karşı en önemli koruyucu sistemdir (9-11). PA'in kalpte ve karaciğerdeki iskemi-reperfüzyon hasarından koruyucu etkisi de daha önceki çalışmalarda bildirilmiştir (7-9,11).

Bu çalışmadaki amacımız, antioksidan etkisi olan dekspantenol (Dxp)'ün böbreği iskemi-reperfüzyon (I/R) hasarından koruyucu etkisinin olup olmadığını deneysel olarak göstermekti.

GEREÇ ve YÖNTEMLER

Deneysel çalışma, Yerel Etik Kurul onayı aldıktan sonra Adnan Menderes Üniversitesi Deneysel Çalışma laboratuvarında yapıldı. Çalışmada ağırlıkları 200-300gr arasında değişen toplam 24 erişkin sıçan kullanıldı. Sıçanlar uygun ısı ve ışığın olduğu koşullarda standart kemirgen diyeti ve su ile beslendiler. Sıçanların anestezisi 50mg/kg ketamin (periton içi) ve 3mg/kg alfazın (periton içi) ile yapıldı. Renal arter trombozunu engellemek için 100 U/kg heparin (periton içi) uygulamasından sonra orta hat kesi ile sıçanların karnına girildi. Sağ nefrektomi yapıldıktan sonra iskemi-reperfüzyon oluşturmak üzere sol renal arter bulundu ve 3 grup oluşturuldu:

Grup I (Sham grubu)(n=8): Tüm hayvanlara sağ nefrektomi yapıldıktan 6 saat sonra sol nefrektomi yapıldı.

Grup II (n=8): Sağ nefrektomi sonrası sol renal artere 60 dakika travmatik olmayan damar klemp konuldu. Daha sonra

klemp açılarak sol böbrek 6 saat süreyle reperfüzyona bırakıldı. İskemiden 30 dakika ve reperfüzyondan hemen önce olmak üzere toplam 2 kez serum fizyolojik periton içine verildi.

Grup III (n=8): Sağ nefrektomi takiben sol renal artere 60 dakikalık süre ile travmatik olmayan damar klemp kondu ve sonrasında 6 saat reperfüzyon uygulandı. İskemiden 30 dakika ve reperfüzyondan hemen önce olmak üzere toplam 2 kez 500 mg/kg Dxp periton içine verildi.

6 saatlik reperfüzyonu takiben sıçanların tamamı yüksek doz anestetik ajan ile sakrifiye edildi. Alınan her bir böbreğin bir kısmı biyokimyasal değişkenler olan doku glutatyon (GSH), nitrik oksit (NO), glutatyon redüktaz (GR), Malondialdehid (MDA) ve katalaz (CAT) düzeylerine bakılmak üzere biyokimya laboratuvarına, kalan kısımları da histopatolojik değerlendirme için patoloji laboratuvarına gönderildi.

Histopatolojik Değerlendirme

Alınan dokular %10 formol içerisine kondu ve parafin bloklar hazırlandı. Daha sonra bu bloklardan 4 µm kalınlıkta kesitler hazırlandı. Kesitler önce parafinden arındırıldı, daha sonrada hidrate edildi ve hematoksilin-eozin (HE) ile boyandı. Tüm kesitler mikroskop altında inflamasyon, konjesyon ve nekroz açısından değerlendirildi. Kesitler tek bir patolog tarafından, kör olarak değerlendirildi. Histopatolojik değerlendirme daha önce Güz ve ark.nın (12) yapmış olduğu skorlamaya göre 0: Normal, 1: Hafif, 2: Orta ve 3: Şiddetli şeklinde yapıldı.

İstatistiksel analiz: NO, GR, CAT, MDA ve GSH düzeylerini karşılaştırmada One-way analiz of variance (ANOVA) ve post-hoc testler kullanıldı. Gruplar arası histolojik değerlendirme için Kruskal-Wallis testi kullanıldı. P değerinin 0,05'in altında olması anlamlı olarak kabul edildi.

BULGULAR

Tüm biyokimyasal ortalama değerler Tablo I'de gösterilmiştir.

Doku GSH düzeyi: Doku GSH düzeyi sham (I), serum fizyolojik (II) ve Dxp (III) gruplarında sırasıyla 58,8±13,0 mg/g doku, 69,6±25,9 mg/g doku ve 54,3±27,4 mg/g doku idi. Gruplar arasında anlamlı bir fark yoktu (p>0,05).

Doku MDA düzeyi: Doku MDA düzeyleri grup I, II ve III'te sırasıyla 21,7±6,2 nmol/mg protein, 20,7±8,7 nmol/mg protein

Tablo I: Biyokimyasal ortalama doku değerleri.

Grup	Doku GSH	Doku MDA	Doku NO	Doku GR	Doku Katalaz
Sh	58,8 ± 13,0	21,7 ± 6,2	18,4 ± 2,9	3,4 ± 1,2	22,7 ± 8,3
SF	69,6 ± 25,9	20,7 ± 8,7	23,5 ± 5,9	6,2 ± 1,1	31,2 ± 10,5
Dxp	54,3 ± 27,4	19,9 ± 4,2	31,5 ± 23,6	6,4 ± 0,9	18,1 ± 7,6

*p<0,05 **Sh:** Sham grubu **SF:** Serum Fizyolojik grubu; **Dxp;** Dekspantenol grubu

Tablo II: Histopatolojik değerlendirmenin gruplara göre dağılımı.

Grup	Nekroz (ortalama±SD)	İnflamasyon (ortalama±SD)	Konjesyon (ortalama±SD)
Sh	0	0	1,5±0,2
SF	0	0,4±0,2	1,8±0,4
Dxp	0	0,1±0,1	1,4±0,2

*p<0.05 SD: Standard deviasyon; Sh: Sham grubu SF: Serum Fizyolojik grubu; Dxp; Dekspantenol grubu

ve 19,9±4,2 nmol/mg protein idi ve gruplar arasında istatistiksel olarak fark yoktu (p>0,05).

Doku NO düzeyi: Doku NO düzeyi sham, serum fizyolojik ve Dxp gruplarında sırasıyla 18,4±2,9 nmol/g doku, 23,5±5,9 nmol/g doku ve 31,5±23,6 nmol/g doku idi ve gruplar arasında anlamlı bir fark yoktu (p>0,05).

Doku GR düzeyi: Ortalama doku GR düzeyi sham, serum fizyolojik ve Dxp gruplarında sırasıyla 3,4±1,2 mmol/mg, 6,2±1,1 mmol/mg ve 6,4±0,9 mmol/mg idi ve gruplar arası bir fark saptanmadı (p>0,05).

Doku Katalaz (CAT) düzeyi: Doku katalaz düzeyi sham, serum fizyolojik ve Dxp gruplarında sırasıyla 22,7±8,3 mg, 31,2±10,5 mg ve 18,1±7,6 mg idi ve gruplar arası bir fark yoktu (p>0,05).

Histolojik değerlendirme: Sonuçlar 0(Normal), 1 (hafif), 2 (orta), ve 3 (şiddetli) olarak değerlendirildiğinde gruplar arası istatistiksel bir fark saptanmadı (p>0,05). Histolojik skorlamanın ortalama değerleri Tablo II'de görülmektedir.

TARTIŞMA

Dokularda sürekli olarak bir miktar serbest oksijen radikalleri üretilmektedir. Ancak bunlar az miktarda olduklarından dokudaki SOD, CAT ve GSH-Px gibi enzimatik antioksidan sistemlerle yok edilebilmektedirler (13). Bu dokulara olan kan akımı herhangi bir nedenden dolayı kesildiğinde çok miktarda serbest oksijen radikalleri açığa çıkmaktadır (14). Aynı dokuda kan akımı tekrar sağlandığında ise aşırı miktarlarda serbest oksijen radikalleri açığa çıkmakta ve çok daha fazla doku hasarı oluşmaktadır. Sistemik enflamatuvar yanıtta da neden olan bu durum reperfüzyon hasarı olarak bilinmektedir (15-17). Dokulardaki iskemi-reperfüzyon hasarının derecesi serbest oksijen radikalleri ile antioksidan sistem arasındaki dengeye bağlıdır (13). Çalışmamızda oksidatif yanıt olarak gruplar arasında bir fark yoktu (p>0,05).

Özellikle böbrek nakli yapılan hastalarda nakil sırasında renal arter klemlendiğinde böbreğe olan kan akımı tamamen kesilmekte ve iskemi oluşmaktadır. Bu durumda açığa çıkan serbest oksijen radikalleri böbrekte enflamatuvar yanıtta ve iskemik doku hasarına neden olmaktadır. Nakil tamamlanıp

böbreğe olan kan akımı tekrar sağlandığında ise reperfüzyon hasarına neden olan çok miktarlarda vazoaktif mediatörler salınmaktadır (18). Böbrek nakli yapılan hastalarda en büyük sıkıntı olan akut renal yetmezliğin ve gecikmiş greft işlevinin en önemli nedeni bahsetmiş olduğumuz reperfüzyon hasarıdır (15,14).

Dxp, pantotenik asidin biyolojik olarak aktif formudur ve antioksidan etkiye sahiptir. Dxp çok kolay elde edilebilen, oldukça ucuz bir madde olmasına rağmen bununla ilgili iskemi-reperfüzyon hasarından koruyucu etkisine yönelik çok fazla bir çalışma yoktur. Daha önceki bir çalışmamızda ratlarda testis torsiyonu modelinde dxp'ün testisi reperfüzyon hasarından kısa ve uzun dönemde koruduğunu göstermiştik (19;20). Bu çalışmamızda da testis dokusu gibi iskemi-reperfüzyon hasarına oldukça hassas bir dokuda koruyucu etkisinin olduğu gösterilmiş olan bu kolay bulunabilen ve uygulanabilen maddenin renal iskemi-reperfüzyon hasarından koruyabileceğini düşündük.

MDA lipid peroksidasyonunun son ürünüdür ve iskemi sonrası dokularda artmış olan serbest oksijen radikallerinin saptanabilmesinde yaygın olarak kullanılan bir değişken (15,21). Çalışmamızda, ortalama doku MDA düzeylerini birbirine çok yakın saptadık ve istatistiksel olarak gruplar arasında anlamlı bir fark yoktu (p>0,05). Dxp grubundaki ortalama doku MDA düzeyini sham grubundaki ortalama değere çok yakın bulduk. Aynı şekilde ortalama doku GSH düzeyi de Dxp grubunda sham grubuyla paraleldi. Bu bulgularla dxp kullanılan grupta ortalama doku MDA ve GSH düzeylerinin düşük olma eğiliminde olduğunu gözlemledik. Bu düşük olma eğiliminin de dxp'ün dokudaki iskemi-reperfüzyon hasarını azaltıyor olmasından kaynaklanabileceğini düşündük.

Dokulardaki antioksidan mekanizmalardan biri olan GR aktivitesi değerlendirildiğinde, istatistiksel bir anlamlılık olmasa da dxp grubunda en yüksek düzeyde olduğunu gördük. Bu yüksek oran, bize böbrekteki antioksidan mekanizmaların dxp grubunda artış eğiliminde olduğunu düşündürdü. Bu artış eğilimi istatistiksel olarak anlamlı olmasa da, dxp'ün böbreği antioksidan mekanizmalarla koruyucu etkisinin olabileceğini düşündürdü.

Histopatolojik değerlendirme yapıldığında gruplar arasında bir fark saptanmamış olması ve biyokimyasal değerlerin de bizim

sonuçlarımızı istatistiksel olarak desteklememiş olmasından dolayı dxp'ün böbrek dokusunu iskemi-reperfüzyon hasarından koruyucu etkisinin olmadığını düşündük.

Tüm verilerimizin ışığında Dxp grubunda istatistiksel bir anlamlılık olmasa da biyokimyasal parametrelerden, dokudaki antioksidan mekanizmaların koruyucu yönde bir eğilimi olduğunu, ancak istatistiksel değerlendirmenin bizim çalışmamızı desteklememesi nedeniyle dxp'ün renal iskemi-reperfüzyon hasarında koruyucu bir etkisinin olmadığını söyleyebiliriz.

Kısaltmalar:

CAT: Katalaz

CoA: Koenzim A

Dxp: Dekspanteenol

GR: Glutasyon redüktaz

GSH: Redükte glutasyon

I/R: İskemi-reperfüzyon

MDA: Malondialdehid

NO: Nitrik oksit

PA: Pantotenik asit

SOD: Süperoksit dismutaz

KAYNAKLAR

1. Baron P, Gomez-Marin O, Casas C, Heil J, Will N, Condie R, Burke B, Najarian JS, Sutherland DE: Renal preservation after warm ischemia using oxygen free radical scavengers to prevent reperfusion injury. *J Surg Res* 1991; 51: 60-65
2. Furuichi K, Gao JL, Murphy PM: Chemokine receptor CX3CR1 regulates renal interstitial fibrosis after ischemia-reperfusion injury. *Am J Pathol* 2006; 169: 372-387
3. Sadis C, Teske G, Stokman: Nicotine protects kidney from renal ischemia/reperfusion injury through the cholinergic anti-inflammatory pathway. *PLoS ONE* 2007; 2: 469
4. Loftus EV Jr, Tremaine WJ, Nelson RA, Shoemaker JD, Sandborn WJ, Phillips SF, Hasan Y: Dexpanthenol enemas in ulcerative colitis a pilot study. *Mayo Clin Proc* 1997; 72: 616-620
5. Abiko Y, Tomikawa M, Shimizu M: Enzymatic conversion of pantothenylalcohol to pantothenic acid (Kyoto). *J Vitaminol* 1969; 15: 59-69
6. Slyshenkov VS, Omelyanchik SN, Moiseenok AG, Trebukhina RV, Wojtczak L: Pantothenol protects rats against some deleterious effects of gamma radiation. *Free Radic Biol Med* 1998; 24: 894-899
7. Slyshenkov VS, Piwocka K, Sikora E, Wojtczak L: Pantothenic acid protects jurkat cells against ultraviolet light-induced apoptosis. *Free Radic Biol Med* 2001; 30: 1303-1310
8. Slyshenkov VS, Dymkowska D, Wojtczak L: Pantothenic acid and pantothenol increase biosynthesis of glutathione by boosting cell energetics. *FEBS Lett* 2004; 569: 169-172
9. Slyshenkov VS, Rakowska M, Moiseenok AG, Wojtczak L: Pantothenic acid and its derivatives protect Ehrlich ascites tumor cells against lipid peroxidation. *Free Radic Biol Med* 1995; 19: 767-772
10. Jessop CE, Bulleid NJ: Glutathione directly reduces an oxidoreductase in the endoplasmic reticulum of mammalian cells. *J Biol Chem* 2004; 279: 55341-55347
11. Wojtczak L, Slyshenkov VS: Protection by pantothenic acid against apoptosis and cell damage by oxygen free radicals-the role of glutathione. *Biofactors* 2003; 17: 61-73
12. Guz G, Demirogullari B, Ulusu NN, Dogu C, Demirtola A, Kavutcu M, Omeroglu S, Stefek M, Karasu C: Stobadine protects rat kidney against ischaemia/reperfusion injury. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2007; 34: 210-216
13. Aguilar A, Alvarez-Vijande R, Capdevila S, Alcobero J, Alcaraz A: Antioxidant Patterns (Superoxide Dismutase, Glutathione Reductase, and Glutathione Peroxidase) in Kidneys From Non-Heart-Beating-Donors. *Transplantation Proceedings* 2007; 39: 249-252
14. Jefayri MK, Grace PA, Mathie RT: Attenuation of reperfusion injury by renal ischaemic preconditioning: the role of nitric oxide. *BJU Int* 2000; 85: 1007-1013
15. Akgur FM, Kilinc K, Aktug T: Reperfusion injury after detorsion of unilateral testicular torsion. *Urol Res* 1993; 21: 395-399
16. Liu X, Chen H, Zhan B, Xing B, Zhou J, Zhu H, Chen Z: Attenuation of reperfusion injury by renal ischemic preconditioning: The role of NO. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 359: 628-634
17. Ozmen S, Ayhan S, Demir Y, Siemionow M, Atabay K: Impact of gradual blood flow increase on ischaemia-reperfusion injury in the rat cremaster microcirculation model. *J Plast Reconstr Aesthet Surg* 2008; 61: 939-948
18. Filho DW, Torres MA, Bordin AL, Crezcynski-Pasa TB, Boveris A: Spermatic cord torsion, reactive oxygen and nitrogen species and ischemia-reperfusion injury. *Mol Aspects Med* 2004; 25: 199-210
19. Etensel B, Ozkisacik S, Ozkara E, Serbest YA, Oztan O, Yazici M, Gursoy H: The protective effect of dexpanthenol on testicular atrophy at 60th day following experimental testicular torsion. *Pediatr Surg Int* 2007; 23: 271-275
20. Etensel B, Ozkisacik S, Ozkara E, Karul A, Oztan O, Yazici M, Gursoy H: Dexpanthenol attenuates lipid peroxidation and testicular damage at experimental ischemia and reperfusion injury. *Pediatr Surg Int* 2007; 23: 177-181
21. Abasiyanik A, Dagdonderen L: Beneficial effects of melatonin compared with allopurinol in experimental testicular torsion. *J Pediatr Surg* 2004; 39: 1238-1241