

İskemik Önkoşullanmanın ve K-ATP Kanal Açıcı Ajan Pinacidil'in İntestinal İskemi-Reperfüzyon Hasarına Etkisi

Effects of Ischemic Precondition and K-ATP Channel Opener Pinacidil on Intestinal Ischemia-Reperfusion Injury

Dr. Oğuzhan USTAOĞLU,^a
Dr. Adnan HASANOĞLU,^b
Dr. Saadet AKTURAN,^c
Dr. Osman GÜLER,^b
Dr. Hüseyin ÜSTÜN,^d
Dr. Hatice SÜRER^e

^aGemel Cerrahi Kliniği,
82. Yıl Devlet Hastanesi, Rize

^{b1} Genel Cerrahi Kliniği,

^dTıbbi Patoloji Kliniği,

^eBiyokimya Kliniği,

Ankara Eğitim ve Araştırma Hastanesi,

^cGemel Cerrahi Kliniği,

Haymana Devlet Hastanesi, Ankara

Yazışma Adresi/Correspondence:

Dr. Saadet AKTURAN

Haymana Devlet Hastanesi,

Genel Cerrahi Kliniği, Ankara,

TÜRKİYE/TURKEY

akturansaadet@yahoo.com

ÖZET Deneysel intestinal iske-mi-reperfüzyon (I/R) modelinde, iskemik önkoşullanmanın (İÖ) ve K-ATP kanallarını spesifik olarak açarak önkoşullanmaya benzer antiiskemik etki gösteren pinacidil'in (Pin.) iskemik hasar üzerine etkilerini incelemek ve karşılaştırmaktır. Her biri 6 Wistar Albino rat (200- 250 gram) içeren 5 grup oluşturuldu. Kontrol (I. grup) grubuna sadece laparotomi yapıldı. I/R (II. grup) grubuna süperior mezenterik arterin aort çıkışına 40 dakika vasküler klempaj ile iske-mi yapıldı, ardından klemp açılarak 90 dakika reperfüzyon sağlandı. Pin.+I/R (III. grup) grubuna II. gruba ek olarak I/R periyodundan 5 dakika önce 0.1 mg/kg pinacidil intravenöz (IV) puşe olarak yapıldı. İÖ+IR (IV. grup) grubuna II. gruba ek olarak I/R periyodundan önce 10 dakika iske-mi, 10 dakika reperfüzyon yapıldı. İÖ+Pin.+I/R (V. grup) grubuna IV. gruba ek olarak İÖ'nün reperfüzyon safhasının 5. dakikasında pinacidil uygulandı. Yeniden laparotomi yapılarak kanda ve terminal ileum dokusunda malondialdehit (MDA) düzeyine bakıldı. Kanda ve mezenterik lenf nodu (MLN)'da mikrobiyolojik çalışma yapıldı. Terminal ileum dokusu histopatolojik olarak incelendi. I/R grubunda MLN'e bakteriyel translokasyon (BT)'un ve doku MDA düzeyinin diğer gruplardan yüksek olması istatistiksel olarak anlamlı bulundu. İÖ+IR grubunda MLN'e BT, doku ve serum MDA düzeyleri I/R grubundan anlamlı olarak daha düşüktü. Pin.+I/R grubunda MLN'e BT ve doku MDA düzeyi I/R grubundan anlamlı olarak daha düşük bulundu. İÖ+Pin.+I/R grubunda MLN'e BT'nin, doku MDA düzeyinin ve terminal ileum histopatolojik skorlamasının I/R grubundan anlamlı olarak daha düşük olduğu görüldü. İÖ+I/R, Pin.+I/R ve İÖ+Pin. I/R grupları arasında yukarıdaki parametrelerde anlamlı farklılık saptanmadı. Pin. ve İÖ, intestinal I/R sonucu gelişen lipit peroksidasyonunu, ileum morfolojisindeki bozulmayı ve BT'yi azaltmaktadır. Pin. ve İÖ'nün birlikte kullanılmasının, yalnız Pin. ya da yalnız İÖ ile sağlanan korumaya belirgin bir üstünlüğü yoktur.

Anahtar Kelimeler: İskemi-reperfüzyon, pinacidil, iskemik önkoşullanma

ABSTRACT To investigate and to compare the effect of ischemic precondition and K-ATP channel activating agent pinacidil, showing anti-ischemic effects which are similar to ischemic pre-conditioning, on ischemic injury in experimental intestinal ischemia reperfusion model. Five groups were made up each including 6 Wistar Albino rat (200- 250 gr). Only laparotomy performed on the control group (group I). In I/R (group II), ischemia was induced with vascular clompage for 40 minutes to proximal superior mesentric artery, and then reperfusion was induced for 90 minutes with declampage. Five minutes before I/R period, 0.1 mg/kg pinacidil was given intravenously to Pin.+I/R (group III), in addition to group II. In İÖ+IR group (group IV), before I/R period, 10 minutes ischemia and then 10 minutes reperfusion was performed, in addition to group II. At the fifth minute of the reperfusion stage. Pin. were given to İÖ+Pin.+I/R group (group V), in addition to group IV. The level of malondi aldehit (MDA) was measured in blood and terminal ileum tissue by performing relaparatomy. Furthermore, microbiological study was carried out in blood and mesentric lymph node. Histopathologically terminal ileum in the groups was investigated. Bacterial translocation (BT) to MLN and the level of tissue MDA in the I/R group were significantly higher than the other groups. In the İÖ+IR group, BT to MLN, levels of tissue and plasma MDA were significantly lower than I/R group. In the Pin.+I/R group, BT to MLN, level of tissue MDA were significantly lower than I/R group. In the İÖ+Pin.+I/R group, BT to MLN, level of tissue MDA, and histopathologically ileal ischemia score were significantly lower than I/R group. There was no significant difference in the parameters among İÖ+I/R, Pin.+I/R and İÖ+Pin. I/R groups. Pin. and İÖ decreased lipid peroxidation, deterioration in ileum morphology, and BT, resulting from intestinal I/R. Given Pin. and IO together has no superiority on giving them each alone.

Key Words: Ischemia-reperfusion, pinacidil, ischemic precondition

İskemi reperfüzyon (I/R) hasarı, bağırsak mukoza bariyerindeki hasarlanmanın temelinde yatan ve sistemik inflamatuvar yanıt sendromu, sepsis, multiorgan yetmezliği gibi klinik tabloların nedeni olabilen bir fenomendir. İskemi sırasında toksik ürünlerin ve anaerobik metabolizmanın son ürünlerinin birikimi, reperfüzyon sırasında serbest oksijen radikallerinin oluşması ve inflamatuvar mediatörlerin ortaya çıkması, I/R hasarının ana mekanizmasıdır.¹ İskemi ve takiben gelişen reperfüzyon sonucunda ksantin oksidaz aracılığı ile oluşturulan serbest radikaller lipid peroksidasyonu ve hücre membran hasarına yol açarak mukoza hasarına neden olurlar.²

İskemik önkoşullanma (İÖ), kısa süreli tekrarlayan iskemi ve reperfüzyon dönemlerinin sonraki daha uzun süreli iskemi reperfüzyon hasarına karşı koruyucu, indüklenebilen güçlü bir endojen mekanizmadır.³ İÖ'de lokal olarak salınan agonistler (adenozin, asetil kolin, bradikinin, katekolaminler, anjiyotensin2) G proteinine bağlı reseptörleri aktive eder ve İÖ'nün sinyalizasyon yolu başlar. Reseptör aktivasyonu ile protein tirozin kinaz, protein kinaz C ve mitojen aktive protein kinaz stimule olur.^{4,5} İÖ'de her ne kadar değişik mekanizmalar sorumlu tutulsa da K-ATP kanal aktivasyonunun gerekliliği gösterilmiştir.⁶ İntrasellüler Ca^{+2} yüklenmesi iskemi reperfüzyona bağlı hücre disfonksiyonu ve ölümün esas nedeni sayılmaktadır.^{7,8} Hücre içi ATP konsantrasyonu azaldığında K-ATP kanalları açılarak potasyum çıkışına izin vermekte bu ise aksiyon potansiyelinin süresini kısaltarak Ca^{+2} girişini azaltmaktadır. Aksiyon potansiyeli süresinin kısalması Ca^{+2} girişinin azalması enerji korunmasını sağlar ve iskemi sonucu oluşan ozmotik şişmeyi azaltır.³

K-ATP kanallarını spesifik olarak açan pinacidil ve benzeri ajanlar iskemik önkoşullanmaya benzer anti iskemik etki gösterirler. Myocardial iskemi reperfüzyon hasarı üzerine yapılan çalışmalarda bu ajanların kalbi koruyucu etkileri gösterilmiştir.^{9,10}

Bu çalışmada amaç, intestinal iskemi reperfüzyon modelinde iskemik önkoşullanmanın ve iskemik ön koşullanmaya benzer etki göstermesi

beklenen K-ATP kanal açıcı ajan pinacidil'in iskemik hasara karşı koruyucu etkisini göstermek ve karşılaştırmaktır.

GEREÇ VE YÖNTEMLER

Bu çalışma, Sağlık Bakanlığı Ankara Eğitim ve Araştırma Hastanesi deney hayvanları laboratuvarında etik kurul onayı alındıktan sonra gerçekleştirilmiştir. Çalışmada ağırlıkları 200- 250 gr arasında değişen, 30 adet Wistar-Albino rat kullanıldı. Ratların deney öncesi gıda ve su alımları serbest bırakıldı.

Ratlar randomize olarak her biri 6 rattan oluşan 5 gruba ayrıldı.

I. Grup (Kontrol Grubu): Sadece laparotomi yapıldı. Herhangi bir iskemi oluşturulmadı.

II. Grup (İskemi-Reperfüzyon (I/R) Grubu): Süperior mezenterik arterde 40 dakika iskemi ardından 90 dakika reperfüzyon yapıldı.

III. Grup (Pinacidil + İskemi-Reperfüzyon (Pin. + I/R) Grubu): 0.1 mg/kg pinacidil İV puşe uygulandı, 5 dakika sonra süperior mezenterik arterde 40 dakika iskemi ardından 90 dakika reperfüzyon yapıldı.

IV. Grup (İskemik Önkoşullanma + İskemi-Reperfüzyon (İÖ + I/R) Grubu): Süperior mezenterik arterde sırası ile 10 dakika iskemi, 10 dakika reperfüzyon, 40 dakika iskemi, 90 dakika reperfüzyon yapıldı.

V. Grup (İskemik Önkoşullanma + Pinacidil + İskemi-Reperfüzyon (İÖ + Pin. + I/R) Grubu): Süperior mezenterik arterde 10 dakika iskemi ardından 10 dakika reperfüzyon yapıldı. Reperfüzyonun 5. dakikasında 0.1 mg/kg pinacidil İV puşe uygulandı. Ardından sırası ile 40 dakika iskemi, 90 dakika reperfüzyon yapıldı.

OPERASYON

Tüm deneklere karın cildi tıraşını takiben intramüsküler olarak 50 mg/kg ketamin ile 7 mg/kg rompun anestezisi uygulandı. Steril şartlarda laparotomi yapıldı.

İskemi-reperfüzyon yapılan gruplarda, önce süperior mezenterik arterin aort çıkışına atravma-

tik mikrovasküler klemp ile 40 dakika oklüzyon uygulandı. Bunu takiben klemp açılarak 90 dakika reperfüzyon sağlandı.

İskemik önkoşullanma yapılan gruplarda, superior mezenterik arterin aort çıkışına aynı işlem 10 dakika oklüzyonu takiben 10 dakika reperfüzyon şeklinde uygulandı.

Pinacidil (C₁₃ H₁₉ N₅) (SİGMA) kullanılan gruplarda, I/R periyodundan 5 dakika önce ratın kuyruk veni kullanılarak 0,1 mg/kg pinacidil puşe olarak yapıldı.¹¹ Pinacidili **eriyik** hale getirmek amacıyla steril şartlarda dimethyl sulfoxide (DMSO) (28 mg/ml **çözünürlükte**) solüsyonu kullanıldı. Pinacidil verilmeyen gruplara eşit miktarda DMSO kuyruk veninden puşe olarak verildi. Tüm deneklerin eşit sürede anestezi almasına özen gösterildi (150 dakika).

Sürenin tamamlanmasının ardından tüm deneklere steril şartlarda torakotomi ve laparotomi yapıldı. Malondialdehid (MDA) ölçümü ve mikrobiyolojik kültür çalışması yapılabilmesi için vena kava inferiordan kan örneği alındı. Mikrobiyolojik kültür çalışabilmesi için terminal ileuma en yakın mezenterik lenf nodu doku örneği alındı. Doku MDA düzeyini değerlendirmek için ileum örnekleri alındı. Serum fizyolojik ile yıkanıp alüminyum folyoya sarılarak çalışma gününe kadar -70°C'deki derin dondurucuda saklandı. Histopatolojik incelemeler için de distal ileumdan örnekler alındı.

HİSTOPATOLOJİ

Doku örnekleri %10'luk formaldehit içinde tespit edildi. Kesitler hazırlandıktan sonra hemotoksilen-eozin ile boyandı. Değerlendirme, örneklerin hangi gruba ait olduğunu bilmeyen bir patoloji uzmanı tarafından, daha önceden Chiu ve ark. tarafından tanımlanan, mukozal hasar, inflamasyon ve hiperemi-hemoraji derecelerini gösteren bir skorlama sistemi kullanılarak yapıldı.¹²

MİKROBİYOLOJİK İNCELEME

Mezenter Lenf Nodu

Mezenter lenf nodu örnekleri 2 milimetrelük Brain Heart Infusion agar içine konuldu. Ağırlıkları öl-

çülüp homojenize edildi. Örnekler thioglycolatlı buyyona alındı ve tartıldı. %5 koyun kanlı agar ve EBM agara ekim yapılarak 24 saat 37°C'de inkübe edildi. İnkübasyon sonunda üreme varsa bakteriler konvansiyonel yöntemlerle tanımlandı. Üreme yoksa thioglycolatlı zenginleştirme besi yerinde tekrar ekim yapıldı. Bakteri türleri standart mikrobiyolojik teknikler kullanılarak tanımlandı.

Kan

Deney hayvanlarından alınan 3 ml kan örnekleri Bactec 9240 aerob ve anaerob kan kültür vasatlarına ekildi. Yedi gün inkübe edildi. Yedinci günün sonunda cihaz tarafından negatif olarak saptanan kan kültürleri acridin orange boyası ile boyandı. Yedi gün içinde üreme olanlar %5 koyun kanlı agar ve EMB besiyerlerine ekildi. 24 saat 37°C'de inkübe edildi. Anaerob vasatta üreme varsa anaerob ekimler 48 saat sonra değerlendirildi. İnkübasyon sonucunda plak besiyerlerinde üreme varsa bakteriler konvansiyonel yöntemlerle tanımlandı.

BIYOKİMYASAL İNCELEME

Serum MDA ölçümü

Hunter ve ark. tarafından geliştirilen yöntem kullanıldı.¹³ Bu yöntemde temel prensip, lipit peroksidasyonu sonucu oluşan ürünlerin tiyobarbitürik asit (TBA) ile reaksiyona girerek pembe renkli bir kompleks oluşturmasıdır. Bu pembe renkli ürünün absorbansı 530 nm'de ölçüldü. Sonuçlar nmol/L olarak hesaplandı.

Bağırsak Mukozası MDA Ölçümü

Uchiyama metodu kullanılarak değerlendirildi.¹⁴ Laboratuvarında hassas terazi ile bağırsak mukozası dokuları ayrı ayrı tartılarak ağırlıkları kaydedildi ve %10'luk homojenat elde etmek üzere soğuk %1.15'lik KCl ilave edildi. Dokular homojenizatör ile homojenize edildikten sonra bu homojenattan 0.5 ml çekilerek üzerine 3 ml %1'lik fosforik asit ve 1 ml %0.6'lık TBA ilave edildi. Karışım 45 dakika su banyosunda kaynatılıp soğutulduktan sonra üzerine 4 ml n-butanol ilave edildi. 3500 devirde 10 dakika santrifüj edilerek butanol gazı ayrıldı. Ayrılan butanol gazlarının n-butanol körüne karşı 535

ve 520 nm'lerde spektrofotometrik olarak absorpsanları ölçülüp, absorpsanlar arasındaki fark MDA değeri olarak hesaplandı.

Hazırlanan homojenatlardan Lowry metodu ile protein analizi yapıldı.¹⁵ Spektrofotometrik olarak 750 nm'de absorpsan ölçümleri yapıldı. Sonuç olarak MDA değerleri nmol/mg protein olarak hesaplandı.

İSTATİSTİKSEL ANALİZ

Mikrobiyolojik verilerin istatistiksel analizinde Pearson χ^2 testi kullanıldı. Histopatolojik ve biyokimyasal verilerde elde edilen değişkenlere ilişkin ortalama ve standart sapmalar verilmiştir. Değişkenler açısından gruplar arasındaki farklılık Kruskal-Wallis testi ile incelendi. Farklılık önemli bulunduğu ikişerli karşılaştırmalar Bonferroni düzeltilmesi kullanılarak Mann-Whitney U testi kullanılarak gerçekleştirildi. Analizler SPSS for Windows 11.5 ile yapıldı. $p < 0.05$ anlamlı kabul edildi.

BULGULAR

MİKROBİYOLOJİ SONUÇLARI

Kontrol grubunda MLN'de ve kanda üreme olmadı. II. grupta beş adet denekte üreme saptandı. III. grupta iki adet denekte, IV. ve V. gruplarda birer adet denekte üreme saptandı (Tablo 1). Kan kültüründe sadece IV. grupta iki adet denekte üreme oldu. Kan kültüründeki üreme istatistiksel analiz için uygun bulunmadı. MLN'e olan bakteriyel translokasyon II. grupta diğer gruplara göre istatistiksel olarak anlamlı yüksek bulundu ($p = 0.023$). Diğer gruplar arasında fark bulunmadı.

TABLO 1: MLN doku örneklerinde bakteriyel translokasyon.

	I. Grup	II. Grup	III. Grup	IV. Grup	V. Grup
I. Denek	-	E.Coli	-	-	-
II. Denek	-	E.Coli	-	-	-
III. Denek	-	E.Coli	-	-	-
IV. Denek	-	E.Coli	E.Coli	-	-
V. Denek	-	E.Coli	E.Coli	-	E.Coli
		Enterokok			
VI. Denek	-	-	-	E.Coli	-

SERUM MDA AKTİVİTESİ

Serum MDA düzeyi, I/R grubunda (II. grup) en yüksek düzeyde olup; IÖ uygulanması ile IV. grupta serum MDA düzeylerinde anlamlı bir düşme saptanmıştır ($p < 0.05$). III. grupta ve V. grupta serum MDA düzeylerinde II. gruba göre istatistiksel açıdan anlamlı olmamakla birlikte bir düşme saptanmıştır. Serum MDA düzeyi, kontrol grubunda (I. grup) en düşük olup; II. grup ve V. grup serum MDA düzeylerinde istatistiksel açıdan anlamlı yükseklik saptanmıştır ($p < 0.05$). Diğer grup karşılaştırmalarında anlamlı farklılık saptanmamıştır (Tablo 2).

DOKU MDA AKTİVİTESİ

Terminal ileum doku MDA düzeyi, II. grupta diğer bütün gruplardan istatistiksel açıdan anlamlı olarak yüksek saptandı ($p < 0.05$). Doku MDA düzeylerinde I. grup, III. grup, IV. grup ve V. gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmadı (Tablo 3).

TERMİNAL İLEUMUN HİSTOPATOLOJİSİ

Terminal ileum dokularının histopatolojisi, Chui ve ark.nın yaptığı histopatolojik skorlama kullanılarak değerlendirildi (Tablo 4).

Mukoza harabiyeti

I/R grubunun (II. grup) mukoza hasarı skoru I., II., IV. ve V. grupların mukoza hasarı skorlarından yüksek bulundu ($p < 0.05$). V. grubun mukoza hasarı skoru kontrol grubundan yüksek saptandı ($p < 0.05$). Diğer gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı (Tablo 5).

İltihap

I/R grubunda (II. grup) inflamasyon skoru II. grup ve V. grup'dan yüksek saptandı ($p < 0.05$). Diğer gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı (Tablo 6).

Hiperemi/Hemoraji

I/R grubunun (II. grup) hiperemi/hemoraji skoru kontrol grubundan yüksek saptandı ($p < 0.05$). Diğer gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı (Tablo 7).

TABLO 2: Kan MDA düzeyinin gruplara göre dağılımı.

	Ortalama değer	Standart hata
I. grup (Kontrol)	15.9	0.8
II. grup (I/R)	20.6	2.4
III. grup (Pin. + I/R)	17.7	3.7
IV. grup (IÖ + I/R)	16.9	3
V. grup (IÖ+ Pin.+ I/R)	20.3	1.4

*p< 0.05 II. grup ile I. grup, II. grup ile IV. grup, +p= 0.002 I. grup ile V. grup.

Kontrol grubunda normal terminal ileum dokusu izlendi (Resim 1). Histopatolojik derecelendirmede toplam skor ele alındığında (mukoza harabiyeti, iltihap, hiperemi/hemoraji) I/R grubunda (II. grup) en yüksek değerler bulundu (Resim 2). Toplam histopatolojik skor I/R grubunda (II. grup), kontrol grubu ve IÖ + Pin.+IR uygulanan V. gruba göre istatistiksel açıdan anlamlı yüksek bulundu (p< 0.05). İskemi reperfüzyon öncesi yalnız Pin. uygulanması ya da yalnız IÖ uygulanması istatistiksel açıdan anlamlı olmamakla beraber toplam histopatolojik skoru düşürdü. 3., 4. ve 5. gruplar arasında toplam histopatolojik skor açısından anlamlı farklılık saptanmadı (Tablo 8) (Resim 3, 4, 5).

TARTIŞMA-SONUÇ

Son yıllarda I/R hasarı, miyokart infarktüsü, septik şok ve multiorgan yetmezliğindeki mortalite ve morbiditenin önemli bir kaynağı olarak gösterilmektedir. İskemi sırasında toksik ürünlerin ve anaerobik metabolizmanın son ürünlerinin birikimi, reperfüzyon sırasında serbest oksijen radikallerinin oluşması ve iltihap mediatörlerinin ortaya çıkması, I/R hasarının ana mekanizmasını oluşturur.¹ İskemi ve takiben gelişen reperfüzyon sonucunda ksantin oksidaz aracılığı ile oluşturulan serbest radikaller lipid peroksidasyonu ve hücre membran hasarına yol açarak mukoza hasarına yol açarlar.² İntestinal epitel hücreleri yüksek düzeyde ksantin dehidrogenaz ve ksantin oksidaz içermektedir.¹⁶ Bu nedenle bağırsak mukozası I/R ile oluşan doku hasarına en duyarlı dokulardan biridir.

Önceleri kısa süreli iskemi ataklarının adenin nükleotitlerinin tüketimini artırdığı ve tekrarlayan iskemi ataklarının kümülatif etki gösterip dokuda

TABLO 3: Doku MDA düzeylerinin gruplara göre dağılımı.

	Ortalama değer	Standart hata
I. grup (Kontrol)	0.97	0.3
II. grup (I/R)	3.06	0.9
III. grup (Pin. + I/R)	1.09	0.3
IV. grup (IÖ + I/R)	1.29	0.7
V. grup (IÖ+ Pin.+ I/R)	0.78	0.2

*p<0.05 II. grup ile I. grup, II. grup ile III. grup, II. grup ile IV. grup, II. grup ile V. grup.

TABLO 4: Chui ve ark.nın histopatolojik skorlaması.

Mukoza harabiyeti	0	Normal mukoza
	1	Villusların tepesinde subepitelyal boşluk
	2	Epitelin orta derecede ayrılması
	3	Epitelin şiddetli ayrılması
	4	Villuslarda silinme, lamina proprianın açığa çıkması
	5	Ülserasyon ile birlikte lamina proprianın parçalanması
İltihabın şiddeti	0	Yok
	1	Lamina propriada, lokal iltihap
	2	Lamina propriada, diffüz iltihap
	3	Local subepitelyal iltihabi hücre birikimi
	4	Diffüz subepitelyal iltihabi hücre birikimi
	5	Masif iltihabi hücre birikimi
Hiperemi / Hemoraji	0	Yok
	1	Lamina propriada dilate kapillerler
	2	Lamina propriada lokal hemoraji
	3	Lamina propriada diffüz hemoraji
	4	Subendotelial hemoraji
	5	Masif hemoraji

TABLO 5: Doku örneklerinde mukoza harabiyet skorunun karşılaştırılması.

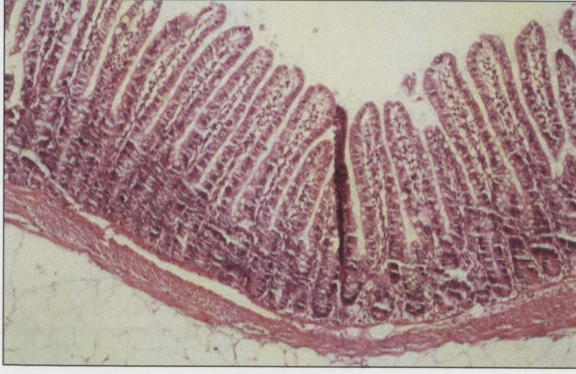
	Ortalama değer	Standart hata
I. grup (Kontrol)	0	0
II. grup (I/R)	2.33	0.8
III. grup (Pin. + I/R)	0.83	0.9
IV. grup (IÖ + I/R)	0.75	0.9
V. grup (IÖ+ Pin.+ I/R)	1.16	1.1

*p<0.05 II. grup ile I. grup, II. grup ile III. grup, II. grup ile IV. grup, II. grup ile V. grup
+p=0.015 I. grup ile V. grup

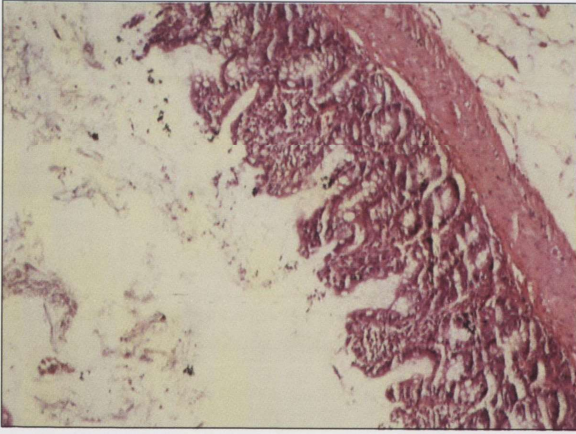
metabolik ve fonksiyonel bozukluklar oluşturarak ölümcül hasara neden olduğu düşünülmekte idi. Ancak ilk kez 1986'da bir deneysel çalışmada risk

TABLO 6: Doku örneklerinde iltihabi skorun karşılaştırılması.		
	Ortalama değer	Standart hata
I. grup (Kontrol)	1	0
II. grup (I/R)	2	0.6
III. grup (Pin. + I/R)	1.25	0.6
IV. grup (IÖ + I/R)	1.25	0.5
V. grup (IÖ+ Pin.+ I/R)	0.91	0.2

*p<0.05 II. grup ile I. grup, II. grup ile V. grup.



RESİM 1: Kontrol grubu: Normal terminal ileum dokusu (HE, x100).



RESİM 2: II. Gruba ait dokuda villuslarda yer yer silinme, diffüz subepitelyal iltihabi hücre birikimi, subepitelyal hemoraji (HE, x100).

altındaki miyokarda IÖ uygulanarak takip edilen daha uzun süreli IR da infarkt büyüklüğünde %75 azalma olduğu gösterilmiştir.¹⁷ İnsan üzerinde ilk kez koroner by-pass operasyonu geçiren bir hastanın geçici bir iskemi sonrası kalp ventrikül kasi biopsisinde ATP seviyelerinin daha iyi korunduğu

TABLO 7: Doku örneklerinde hiperemi/hemoraji skorunun karşılaştırılması.		
	Ortalama değer	Standart hata
I. grup (Kontrol)	0	0
II. grup (I/R)	1.66	1
III. grup (Pin. + I/R)	1	1.2
IV. grup (IÖ + I/R)	0.87	0.8
V. grup (IÖ+ Pin.+ I/R)	0.58	0.4

*p=0.002 I. grup ile II. grup.

gösterilerek IÖ tariflenmiştir.¹⁸ İskemik önkoşullanma, kısa süreli tekrarlayan iskemi ve reperfüzyon dönemleridir ve sonraki daha uzun süreli iskemi reperfüzyon hasarına karşı koruyucu, indüklenebilen güçlü bir endojen mekanizmadır. İskemik önkoşullanmada hücre içi ATP konsantrasyonu azaldığında K-ATP kanalları açılarak potasyum çıkışına izin vermekte bu ise aksiyon potansiyelinin süresini kısaltarak Ca²⁺ girişini azaltmaktadır. Hücre içine Ca²⁺ girişinin azalması, enerji korunmasını sağlamakta ve iskemi sonucu oluşan ozmotik şişmeyi azaltmaktadır.³

Önkoşullanma işlemi ile ilgili literatür uygulamaları farklılık gösterse de genelde uygulanan 10'ar dakikalık iskemi reperfüzyon siklusudur.¹⁹ Biz de çalışmamızda IV. ve V. gruplara 10 dakika iskemi takiben 10 dakika reperfüzyon şeklinde IÖ uyguladık.

K-ATP kanallarını spesifik olarak açan kromakalim, bimakalim, nicrandil ve pinacidil ve benzeri ajanlar önkoşullanmaya benzer anti iskemik etki gösterirler. Bu ajanlarla miyokardiyal iskemi reperfüzyon hasarı üzerine yapılan çalışmalarda kalp koruyucu etkileri gösterilmiş-

TABLO 8: Doku örneklerinde toplam histopatolojik skorun karşılaştırılması.		
	Ortalama değer	Standart hata
I. grup (Kontrol)	1	0
II. grup (I/R)	6	2
III. grup (Pin. + I/R)	3.33	2.5
IV. grup (IÖ + I/R)	2.87	1.9
V. grup (IÖ+ Pin.+ I/R)	2.66	1.2

*p<0.05 II grup ile I. grup, II. grup ile V. grup, I. grup ile V. grup.



RESİM 3: III. grupta terminal ileum mukozasında minimal hasar görülüyor (HE, x100).



RESİM 4: IV. grupta terminal ileum mukozasında minimal hasar görülüyor (HE, x100).

tir.^{9,10} Pinacidil'in etkisini değerlendiren bir çalışmada bu ajanın sarkoplazmik K-ATP kanalı gösterilen hücrelerde Ca^{+2} yüklenmesini önleyip hücreyi hasardan koruduğu görülmüştür.²⁰ Biz çalışmamızda III. gruba 0.1 mg/kg pinacidil İV olarak I/R hasarından 5 dakika önce deneklere uyguladık. V. grupta pinacidil ve önkoşullanmayı I/R hasarından önce kullanarak bu benzer anti-iskemik faktörleri bir arada denedik.

Bağırsak mukoza bariyerinin bozulması ile bakteriyel translokasyon (BT) oluştuğu bilinmektedir.^{21,22} Çalışmamızda I/R hasarını gösteren bir parametre olarak BT'yi kullandık ve bunu MLN ve kan örneklerinde bakteri kolonilerinin üremesi ile değerlendirdik. I/R grubunda MLN'e BT saptandı. İÖ, Pin, ve İÖ+Pin. uygulanması ile benzer ve anlamlı şekilde BT'nin önlendiği tespit edildi. Aksöyek S. ve ark.nın yaptıkları deneysel çalışmada da mikrobiyolojik ve histopatolojik olarak İÖ'nün intestinal I/R'da meydana gelen bakteriyel translokasyonu engellediği gösterilmiştir.²³ Literatürde bağırsakta Pin. ile yapılmış önkoşullanma çalışmasına rastlamadık.

Çalışmamızda I/R ile terminal ileumda meydana gelen toplam histopatolojik değişiklikler İÖ ve Pin. uygulanması ile azalma göstermiş, İÖ + Pin uygulanması ile de istatistiksel açıdan anlamlı azalma göstermiştir. Ayrıntılı olarak değerlendirildiğinde I/R grubunda mukoza harabiyeti skorunun



RESİM 5: V. Grupta ince bağırsak mukozasında subepitelyal boşluklar (HE, x100).

İÖ, Pin. ve İÖ + Pin. uygulanması ile anlamlı oranda düştüğü saptanmıştır. Bizim çalışmamızda iskemik önkoşullanmanın ve pinacidil'in özellikle mukoza korunmasında etkili olduğu sonucuna ulaşıldı. Yapılan bir çalışmada da iskemik önkoşullanmanın uzamış iskemiden sonra intestinal yapısal/ultrayapısal morfoloji üzerindeki etkileri değerlendirilmiş, morfolojik değişiklikler arasında belirgin villus kısalması veya kaybı, fokal nekroz ve lökosit infiltrasyonu ele alınmıştır. İntestinal iskemik önkoşullanmanın, uzamış iskemi reperfüzyondan sonra değişmez olarak varolan morfolojik hasarı azaltabildiği sonucuna varılmıştır.¹⁹

I/R hasarı sonucunda oluşan serbest radikaller hücre membranındaki kolesterol ve doymamış yağ asitleri ile reaksiyona girerek lipid peroksidasyonu başlatabilir.²⁴ Başka bir çalışmada I/R da doku hasarından lipid peroksidasyonu ve ileal epitelyal apoptozis sorumlu tutularak iskemik önkoşullanma ve I/R gruplarının sonuçları ele alınmış ve karşılaştırılarda I/R grubunda ileal MDA seviyeleri belirgin olarak artmış, önkoşullanma grubunda ise artışın önlenildiği tespit edilmiştir.²⁵ Çalışmamızın sonuçları da bunu destekler nitelikte olup doku ve kan MDA değerleri IÖ+I/R grubunda I/R grubuna göre anlamlı olarak düşük saptandı. Pin. ve Pin.+IÖ

uygulanması doku MDA düzeyini anlamlı şekilde düşürürken, kan MDA düzeylerinde anlamlı değişiklik olmadı.

Deneysel çalışmamızın sonucunda, pinacidil ve IÖ uygulanmasının dokuyu, intestinal I/R hasarında gelişen oksidatif stresten koruyabileceği, K-ATP kanal açıcı ajan pinacidil'in bağırsak iskemi reperfüzyon hasarına karşı korumada iskemik önkoşullanma kadar güçlü olduğu gösterildi. Bu koşullarda IÖ ve pinacidilin beraber uygulanmasının ayrı ayrı uygulanmasına karşı belirgin bir üstünlük sağlamadığı görüldü.

KAYNAKLAR

1. Xu DZ, Lu Q, Kubicka R, Deitch EA. The effect of hypoxia/reoxygenation on the cellular function of intestinal epithelial cells. *J Trauma: Injury, Infection and Critical Care* 1999; 46: 280-5.
2. Boros M, Kaszaki J, Nagy S. Histamine release during intestinal ischemia-reperfusion: role of iron ions and hydrogen peroxide. *Circ Shock* 1991; 35: 174-80.
3. Harun E, Dursun D, Ender S. İskemik önkoşullanma. *Anadolu Kardiyol Derg.* 2003; 3: 144-9.
4. Downey JM, Cohen MV. Arguments in favor of protein kinase C playing an important role in ischemic preconditioning. *Basic Res Cardiol* 1997; 92: 37-9.
5. Nishizuka Y. Intracellular signalling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein kinase C. *Science* 1992; 258: 607-14.
6. Mei DA, Elliott GT, Gross GJ. KATP channels mediate late preconditioning against infarction produced by monophosphoryl lipid A. *Am J Physiol* 1996; (6Pt2): H2723-9.
7. Chaudry IH. Cellular mechanisms in shock and ischemia and their correction. *Am J Physiol* 1983; 245: R117-34.
8. Steenbergen C, Fralix T, Murphy E. Role of increased cytosolic calcium concentration myocardial ischemic injury. *Basic Res Cardiol* 1993;88: 456-63.
9. Grover GJ, Mc Cullough JR, Henry DE, Conder ML, Sleph PG. Anti-ischemic effects of the potassium channel activators pinacidil and cromacalim and the reversal of these effects with the potassium channel blocker glyburide. *J Pharmacol Exp Ther* 1989; 251: 98-104.
10. Grover GJ, Dzwonczyk S, Parham C, Sleph PG. The protective effects of cromacalim and pinacidil on reperfusion function and infarct size in isolated perfused rat hearts and anesthetized dogs. *Cardiovasc Drugs Ther* 1990; 4: 465-74.
11. Das B, Sarkar C. Cardiomyocyte mitochondrial KATP channels participate in the antiarrhythmic and antiinfarct effects of KATP activators during ischemia and reperfusion in an intact anesthetized rabbit model. *Pol J Pharmacol* 2003; 55: 771-86.
12. Chiu CJ, McArdle AH, Brown R, Scott HJ, Gurd FN. Intestinal mucosal lesion in low-flow states. A morphological, hemodynamic, and metabolic reappraisal. *Arch Surg* 1970; 101: 478-83.
13. Hunter MI, Nlemadim BC, Davidson DL. Lipid peroxidation products and antioxidant protein in plasma and cerebrospinal from multiple sclerosis patients. *Neurochem Res* 1985;10: 1645-52.
14. Mihara M, Uchiyama M. Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. *Analytical Biochemistry* 1978; 86: 271-8.
15. Lowry O.H. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol Chem* 1951;193: 265-75.
16. Parks DA, Granger DN. Xanthine oxidase: biochemistry, distribution and physiology. *Acta Physiol Scand* 1986; 548: 87-99.
17. Zager RA, Baltes LA, Sharma HM, Jurkowitz MS. Responses of the ischemic acute renal failure kidney to additional ischemic events. *Kidney Int* 1984; 26: 689-700.
18. Yellon DM, Alkhalafi A, Pugsley Wb. Preconditioning the human myocardium. *Lancet* 1993; 342: 276-77.
19. Sileri P, Sica G, Gentileschi P et al. Ischemic preconditioning protects intestine from prolonged ischemia. *Transplantation Proceedings* 2004; 36: 283-5.
20. Tanno M, Miura T, Tsuchida A et al. Contribution of both the sarcolemmal KATP and mitochondrial KATP channels to infarct size limitation by KATP channel openers: differences from preconditioning in the role of preconditioning. *Arch Pharmacol* 2001; 364: 226-32.
21. Carrico JC, Meakins JL, Marshall JC, Fry D, Maier RV. Multiple organ failure syndrome. *Arc Surg* 1986; 121: 196-208.
22. Miner TJ, Tavaf-Motamen H, Stojadinovic A, Shea-Donohue T. Ischemia-reperfusion protects the rat small intestine against subsequent injury. *J Surg Res* 1999; 82: 1-10.
23. Aksöyek S, Cinel I, Avlan D et al. Intestinal ischemic preconditioning protects the intestine and reduces bacterial translocation. *Shock* 2002; 18: 476-80.
24. Basaga HS. Biochemical aspects of free radicals. *Biochem Cell Biol* 1990; 68: 989-98.
25. Cinel I, Avlan D, Cinel L et al. Ischemic preconditioning reduces intestinal epithelial apoptosis in rats. *Shock* 2003;19: 588-92.