

Experimental study / Deneysel çalışma

THE PROTECTIVE EFFECT OF MILRINONE ON ISCHEMIA / REPERFUSION INJURY ON SUPERIOR MESENTERIC ARTERY LIGATED RATS

Superior mezenterik arter oklüzyonu oluşturulmuş ratlarda milrinon'un iskemi/reperfüzyon hasarına koruyucu etkisi

Bartu Badak¹, Özgür Türk², Tarık Çağa³, Dilek Burukoğlu⁴

Banaz Devlet Hastanesi, Genel Cerrahi Kliniği¹, Sivrihisar Devlet Hastanesi, Genel Cerrahi Kliniği², Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Genel Cerrahi ABD³, Histoloji ve Embriyoloji ABD⁴
Yazışma adresi: Dr. Bartu Badak, drbartu@gmail.com

Cer San D (J Surg Arts), 2014;7(1):1-6. <http://dx.doi.org/10.14717/jsurgarts.2014.152>

ABSTRACT

In this study the aim was to determine the protective effect of milrinone on rats that have mesenteric ischemia. In study 40 Sprague-Dawley rats of either sex, weighing between 200 and 250 gr are used. The animals are randomly assigned to the four groups. In group 1 (control group); SMA isolated but not ligated, in group 2 (sham); SMA isolated and ligated from the distal of separating aort. In group 3 (İ/R + dopamin); SMA isolated and ligated from the distal of separating aort for 60 minutes. In group 4 (İ/R + milrinone); SMA isolated and ligated as group 3. In group 3 Dopamin 1,5 mcg/kg i.p. injected after 120 minutes. In group 4 milrinone (Primacor) 0,05 mg/kg i.p. injected after 120 minutes. To determine the intestinal damage depending ischemia and reperfusion the samples are taken from intestin and caecum. As the result normal histopathological mucosal structures are seen in control group. In our study, cell injury was decreased in rats that used milrinone according to the sham group, but cell injury was increased according to the dopamin group. Many agents must be performed in several doses and times in ischemia-reperfusion injury that has no gold standart therapy.

Key words: Mesenteric ischemia, milrinone, reperfusion ischemia, ischemic injury.

ÖZET

Bu çalışmada amaç; mezenter iskemi oluşturulmuş ratlarda milrinon'un iskemi/reperfüzyon (İ/R) hasarına koruyucu etkisini araştırmaktır. Çalışmada cinsiyet farkı gözetilmeksizin 200-250 gram ağırlığındaki 40 adet Sprague-Dawley türü fareler kullanıldı. Deney hayvanları dört gruba ayrıldı. Grup 1'de (Kontrol grubu) SMA izole edilerek ortaya konuldu ancak bağlanmadı. Grup 2'de (İntestinal İ/R grubu-Sham) SMA izole edilerek aort'dan çıktığı yerin hemen distalinden bağlandı, Grup 3'te (İntestinal İ/R + Dopamin grubu) ise, SMA nazikçe izole edildi ve aort'dan çıktığı yerin hemen distalinden 60 dakika boyunca atravmatik mikrovasküler pensler kullanılarak klempe edildi. Grup 4'te (İ/R + Milrinon) ise SMA izole edildikten sonra yine grup 3'le aynı şekil ve sürede olmak üzere klempe edildi. Grup 3 ratlarda reperfüzyonun başlatılmasından 120 dakika sonra Dopamin 1,5 mcg/kg i.p. olarak enjekte edildi, grup 4 farelere ise 120 dakikalık reperfüzyon sonrası 0,05 mg/kg Milrinon (Primacor) i.p. olarak uygulandı. İ/R'a bağlı intestinal hasarı araştırmak üzere ince barsak ve çekumdan doku örnekleri elde edildi. Sonuç olarak kontrol grubuna ait deney hayvanlarının barsaklarında normal morfolojiye sahip barsak mukoza yapısı gözlemlendi. Çalışmamızda milrinon kullanılan deneklerde hücrel hasar sham-iskemi grubuna göre azalmış bulunmakla beraber, iskemi-dopamin grubuna göre artmış olarak bulunmuştur. Altın standart tedavinin bulunmadığı İ/R hasarında birçok ajan değişen süre ve dozlarda araştırılmaya devam edilmelidir.

Anahtar kelimeler: Mezenter iskemisi, milrinon, reperfüzyon, iskemi, iskemik hasar.

GİRİŞ

Akut mezenterik iskemi (AMİ) göreceli olarak nadir görülen, ancak sıklıkla geç tanı konulması nedeniyle yüksek mortaliteye (%60-80) sahip olan bir abdominal, vasküler acil durumdur (1-3). AMİ'nin etyolojisi dört ayrı alt kategori içerir; superior mezenterik arter (SMA) embolisi (%45-50), SMA trombozu (%25), superior mezenterik ven (SMV) trombozu (%5-10) ve non-oklusif mezenterik iskemi (NOMİ) (%20) (4). Etiyolojisindeki farklılıklara rağmen, AMİ'nin ortak ve potansiyel olarak fatal olan tek sonucu intestinal gangren ve nekrozdur (5). Tanısal görüntüleme yöntemleri, cerrahi teknikler ve perioperatif yoğun bakım desteğindeki gelişmelere rağmen, AMİ'nin yüksek mortalite oranları son 70 yılda önemli bir değişiklik göstermemiştir (6). Bunun nedeni, barsak nekrozu gelişmeden önce AMİ tanısının koyulabilmesindeki güçlüklerin süremesidir (5). Cerrahi eksplorasyon veya ölümden önce AMİ hastalarının sadece 1/3'ünde tanının konulabildiği bildirilmiştir (6). AMİ tanısındaki gecikmelerin hastalarda süreyi şansını azalttığı, yaşayan hastalarda ise morbiditeyi artırdığı bilinmektedir (4). Buna karşın hekim açısından AMİ'yi erken tanıyabilmek oldukça zordur. Klinik tablo genellikle nonspesifik olmakta, ilk başvurudaki karın ağrısıyla orantısız derecede normal batın muayene bulguları nedeniyle muayeneyi yapan hekimde tehlikeli bir güvenlik hissi oluşabilmektedir (4, 6). Akut mezenterik iskeminin erken tanısında güncel radyolojik tetkik yöntemlerinin kısıtlı bir rolü vardır. Düz karın grafileri nonspesifiktir ve genellikle diğer akut batın yapan nedenleri ayırt etmekte kullanılır. Bilgisayarlı tomografi (BT) barsak duvarında kalınlaşma, asit ya da mezenterik arter kökünde tıkanmayı gösterebilir ancak bunlar çoğunlukla nonspesifik ve intestinal iskeminin geç dönemlerinde görülen bulgulardır (3). Proksimal SMA'nın komplet tıkanmış durumlarda Doppler ultrasonografi tanıda yararlı olmakla beraber, yapana bağlı olması ve barsak gazlarının görünüyü kısıtlaması nedeniyle suboptimal bir yöntemdir (4). AMİ tanısında selektif mezenterik anjiyografi altın standart olarak değerlendirilmekle birlikte, her hastanede bulunmaması, girişimsel radyolog gerektirmesi, göreceli olarak invaziv ve uzun süren bir teknik olması ve nefrotoksik ajan kullanımı nedeniyle yaygın olarak kullanılmamaktadır (3,6). Bu çalışmamızın amacı akut mezenterik iskemi oluşturulmuş ratlarda İ/R hasarına milrinon'un etkisini araştırmak ve en iyi bilinen pozitif inotropik ajanlardan biri olan dopamin ile arasındaki farkı ortaya koymaktır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Deney Hayvanları: Ağırlıkları 200-250 gr arasında değişen 40 adet Wistar-Albino rat çalışmaya alındı. Tüm ratlar kafeslerde 12 saat gece 12 saat gündüz olmak üzere 20-26 °C sıcaklık olacak şekilde tutularak standart rat yemi ve musluk suyuyla beslendi.

Deneyel Çalışma: Çalışmamızda bir gecelik açlığı takiben (sadece su içmelerine izin verilerek), 50 mg/kg i.m ketamine ve 10 mg/kg xylazine kullanılarak farelere anestezi verildi. Ameliyat sonunda farelerin dehidrate olmalarının önlenmesi amacıyla subkutan yoldan 10 ml ringer laktat solusyonu verildi. Karın bölgesi traş edildikten sonra %10 povidon iyodür solusyonuyla iki kez silindi ve asepti kurallarına uyularak steril aletlerle ameliyata başlandı. Orta hat laparatomisiyle batına girildi ve superior mezenterik arter (SMA) ortaya konuldu.

Deney Grupları: Fareler rastgele seçilerek her biri on hayvandan oluşan dört grup oluşturuldu.

Grup 1'de (kontrol grubu) SMA izole edilerek ortaya konuldu ancak bağlanmadı.

Grup 2'de (intestinal İ/R grubu-sham) SMA izole edilerek aort'dan çıktığı yerin hemen distalinden bağlandı,

Grup 3'de (intestinal İ/R + Dopamin grubu) ise, SMA nazıkçe izole edildi ve aort'dan çıktığı yerin hemen distalinden 60 dakika boyunca travmatik mikrovasküler pensler kullanılarak klempe edildi.

Grup 4'de (İ/R + Milrinon) ise SMA izole edildikten sonra yine aynı şekilde Grup 3'le aynı şekil ve sürede olmak üzere klempe edildi.

Bu işlem sonucunda ince barsaklar, çekum ve sağ kolonda soluklukla ve nabız yokluğuyla doğrulanmış iskemi elde edildi. İskemi takip eden 60 dakika sonrasında, vasküler pens çıkarıldı ve reperfüzyon periyodu başlatıldı. Grup 3 ratlarda reperfüzyonun başlatılmasından 120 dakika sonra Dopamin 1,5 mcg/kg intraperitoneal olarak enjekte edildi, grup 4 farelere ise 120 dakikalık reperfüzyon sonrası 0,05 mg/kg Milrinon intraperitoneal olarak uygulandı. Daha sonra, batın insizyonları 3/0 poliglaktin dikişlerle iki kat üzerinden kapatıldı. Postoperatif dönemde hayvanlar standart fare yiyeceği ve suyla beslenmeye devam edildi. Reperfüzyondan 24 saat sonra tüm hayvanlara anestezi verilerek ötenazi uygulandı. İskemi/reperfüzyona bağlı intestinal hasarı araştırmak üzere ince barsak ve çekumdan doku örnekleri elde edildi.

Histopatolojik inceleme: Grup 1(kontrol), grup 2 (sham), grup 3 (İ/R + Dopamin) ve grup 4 (İ/R + Milrinon) gruplarını oluşturan tüm ratlardan ince barsak ve çekum örnekleri alındı. Alınan ince barsak ve çekum örneklerinin %10'luk formalin fiksatifinde 48 saat süre ile fiksasyonları sağlandı. Doku parçaları daha sonra sırasıyla kademeli olarak %70'lik, %80'lik, %90'lık ve %96'lık alkol serilerinde 45'er dakika bekletilerek dehidratasyonları sağlandı. Dehidratasyonlarının ardından örnekler şeffaflandırılmak üzere 2 kez 20'şer dakika ksilolde bekletildi. İnce barsak ve çekum örnekleri şeffaflanmalarının ardından etüv içinde 65 °C'de eritilmiş parafinlere alınarak 60 dakika süreyle üç ayrı parafinde bekletildi. Parafinize edilen dokular ayrı ayrı parafin içeren kasetlere gömülerek bloklandı ve kesit alınmaya hazır duruma getirildi. Parafin bloklardan

kesitlerin alınmasında kullanılacak mikrotom bıçağı buzdolabında soğutulularak, mikrotom aracılığı ile her bir örnekten 5'er mikrometre kalınlığında doku kesitleri alındı. Kesitlerin 45 °C'de su banyosunda açılmaları sağlanarak temiz lamalar üzerine alınmasından sonra etüv içinde 1 saat süre ile bekletilmeleri sağlandı. Preparatlar 1'er saat süre ile iki ayrı ksilolde tutulup deparafinizasyonları sağlandıktan sonra boyama aşamasına geçildi. Kesitlerin boyanmasında Hematoksilen-Eosin ikili boyası kullanıldı. Deparafinizasyonu yapılmış olan dokuların kesitleri 5'er dakika süreyle %96, %90, %80, %70'lik alkollerde ve distile suda bekletildi. Kesitler hematoksilen ile 2 dakika ve eosin ile 10 dakika boyandı. Çeşme suyu ile fazla boyası alınan kesitler hızla alkol serilerinden geçirilip dehidratasyonları sağlandı. Dokular iki ayrı ksilolde 30'ar dakika tutularak şeffaflaştırıldı ve şeffaflanan dokular daha sonra entellan ile kapatılarak ışık mikroskopik düzeyde değerlendirmeleri yapıldı.

BULGULAR

Histolojik bulgular: Tüm deney gruplarını oluşturan sıçanların ince barsak ve çekumları üzerinde yapılan ışık mikroskopik olarak yapılan incelemelerde aşağıda verilen bulgular gözlenmiştir.

A grubu: Kontrol grubuna ait deney hayvanlarının ince barsakları üzerinde ışık mikroskopik olarak yapılan incelemelerde normal morfolojiye sahip barsak mukoza yapısı gözlemlendi. Kontrol grubuna ait deney hayvanlarının çekumları üzerinde ışık mikroskopik olarak yapılan değerlendirmelerde sıçan çekumları normal morfolojiye sahip olarak görüldü (Resim 1).

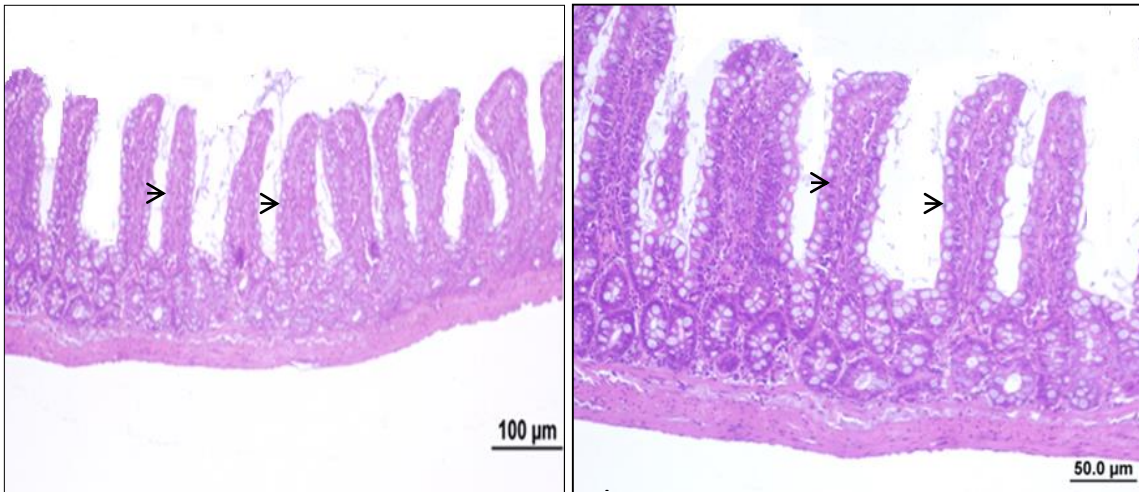
B grubu: Sham - iskemi grubuna ait deney hayvanlarının ince barsakları üzerinde yapılan ışık mikroskopik incelemelerde kontrol grubuyla karşı-

laştırıldığında barsak mukozasında yoğun villus hasarı, lamina propria hemoraji ve hücresel inflamasyon ile epitel hücrelerinde nekroz dikkat çekti. Sham + iskemi grubuna ait sıçan çekum mukozasında kontrol grubuyla karşılaştırıldığında yoğun hasar ve hemoraji, lamina propria damar konjesyonu görüldü (Resim 2).

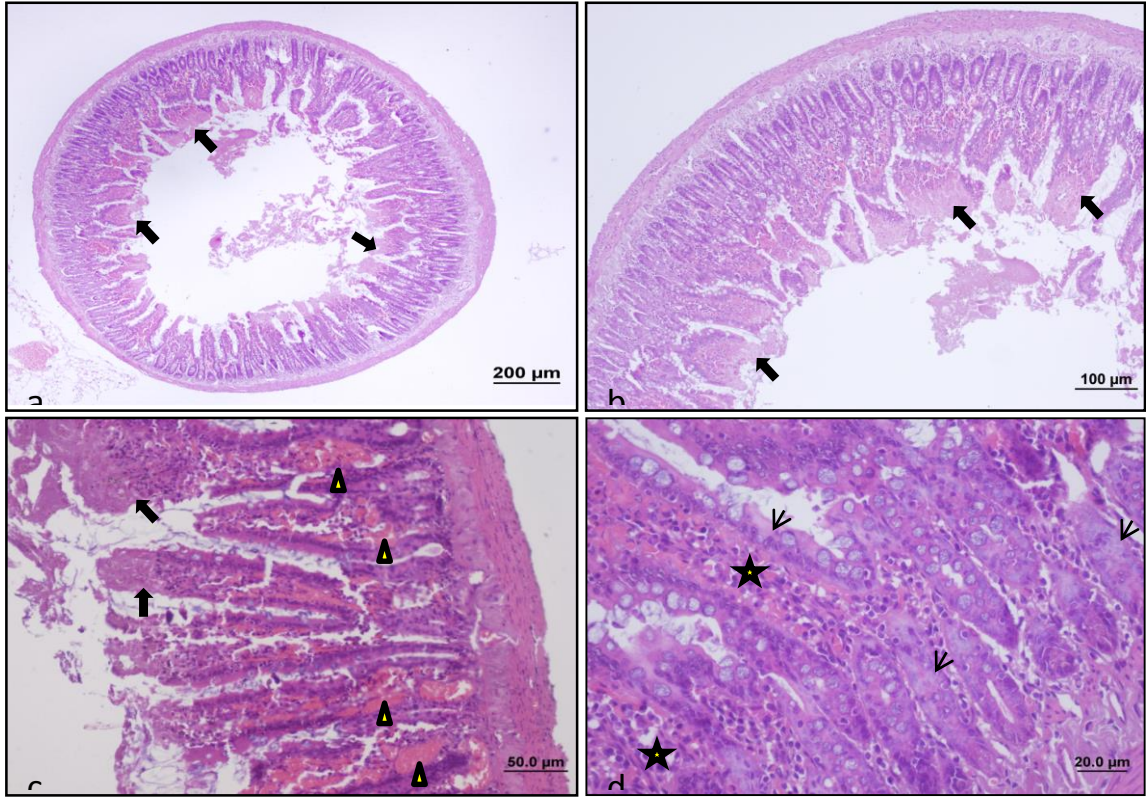
C grubu: İskemi + ilaç (dopamin) grubuna ait deney hayvanlarının ince barsakları üzerinde yapılan ışık mikroskopik incelemelerde sham-iskemi grubuyla karşılaştırıldığında azalmış mukoza hasarı, lamina propria ise hücresel inflamasyon görüldü. İskemi + ilaç (dopamin) grubuna ait sıçanların çekumları üzerinde yapılan ışık mikroskopik incelemelerde azalmış mukoza hasarı ve lamina propria da ise kısmi hücresel inflamasyon görüldü (Resim 3).

D grubu (az hasarlı olan): İskemi + ilaç (milrinon) grubuna ait deney hayvanlarının ince barsakları üzerinde yapılan ışık mikroskopik incelemelerde sham-iskemi grubuyla karşılaştırıldığında azalmış mukoza hasarı, lamina propria ise kısmi hücresel inflamasyon görüldü. İskemi+ilaç (milrinon) grubuna ait sıçanların çekumları üzerinde yapılan ışık mikroskopik incelemelerde azalmış mukoza hasarı, lamina propria ise kısmi hücresel inflamasyon görülmektedir (Resim 4).

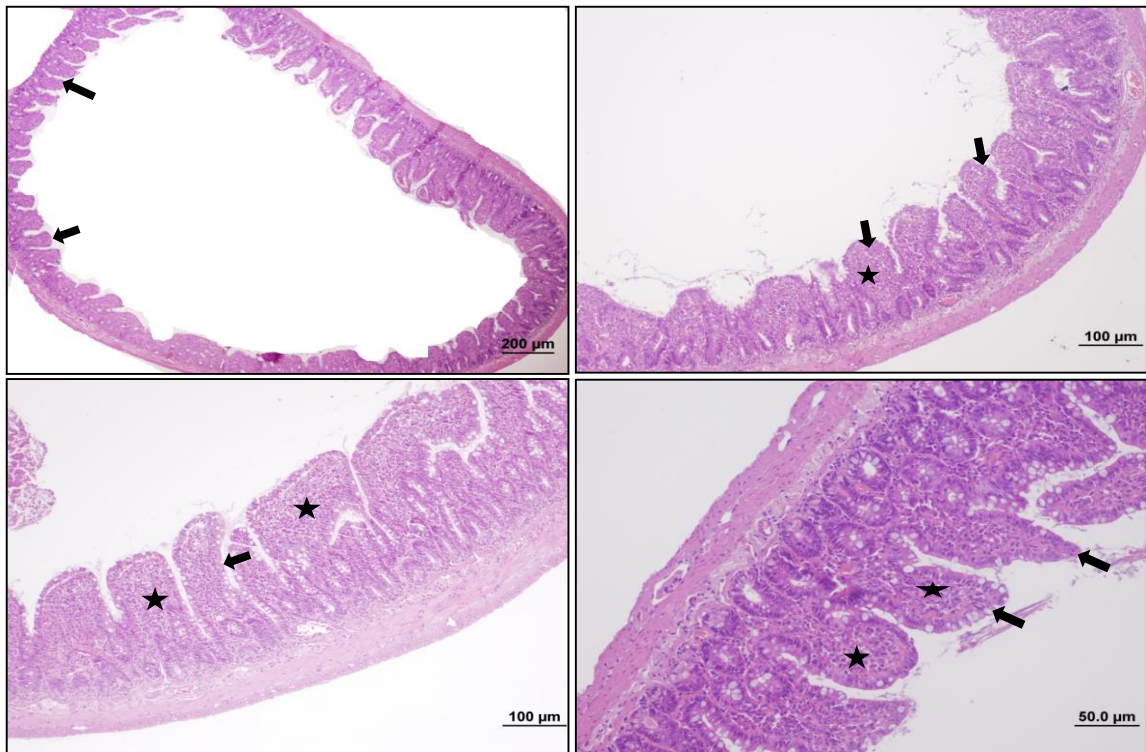
D grubu (yoğun hasarlı): İskemi + ilaç (milrinon) grubuna ait deney hayvanlarının ince barsakları üzerinde yapılan ışık mikroskopik incelemelerde barsak mukozasında yoğun villus hasarı, villuslarda ayrılarak kopmalar, lamina propria hemoraji ve hücresel inflamasyon görüldü. İskemi + ilaç (milrinon) grubuna ait sıçanların çekumları üzerinde yapılan ışık mikroskopik incelemelerde çekum mukozasında yoğun hasar ve lamina propria da hücresel inflamasyon görüldü (Resim 5).



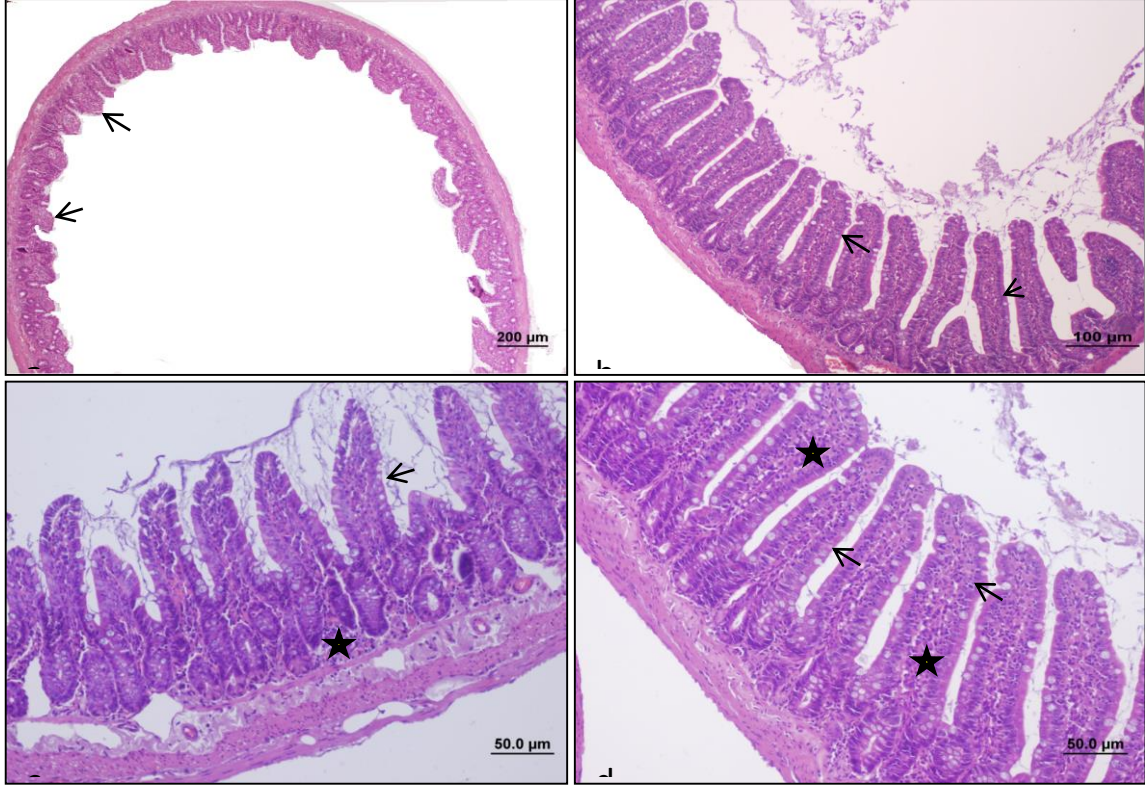
Resim 1: A grubu. Kontrol grubuna ait normal morfolojiye sahip sıçan ince barsak mukozası (ok) görülmektedir (a,b) (HE, X10,20).



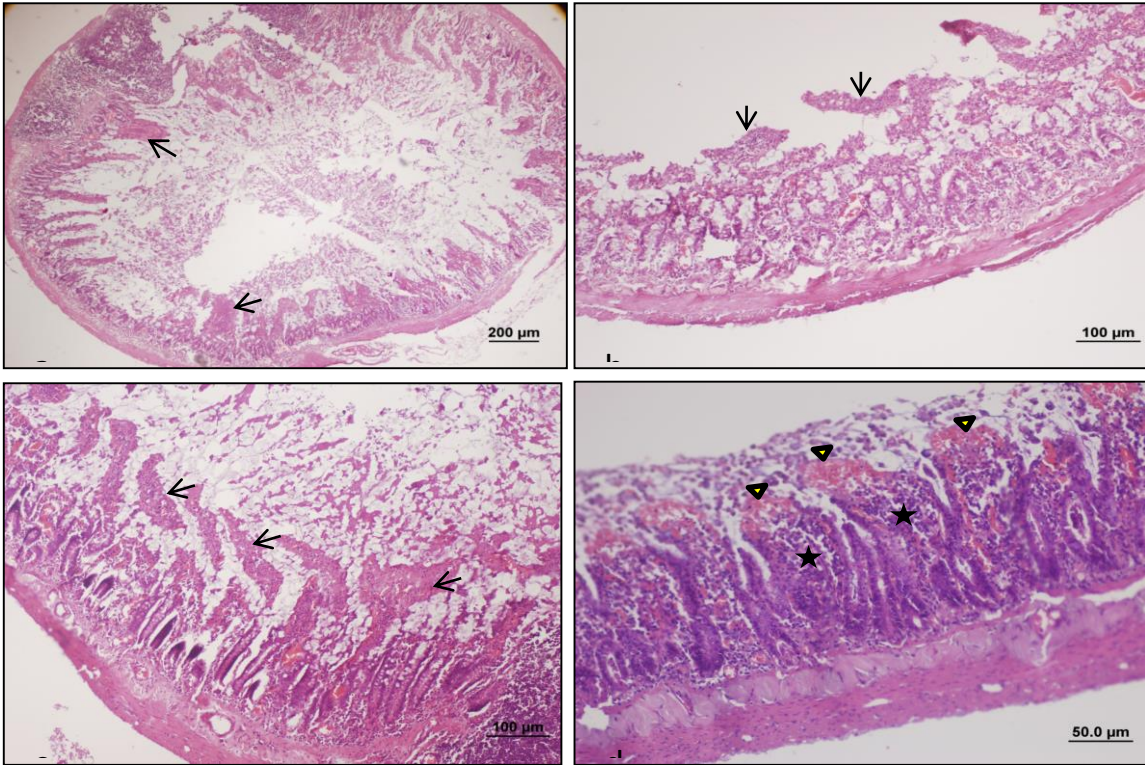
Resim 2: B grubu. Sham + iske mi grubuna ait sıçan ince barsak mukozasında farklı büyütmelerde yoğun villus hasarı (ok) (a,b,c), lamina propriada hemoraji (ok başı) (c) ve hücre sel inflamasyon (*) epitel hücrelerinde nekroz (ince ok) (d) görülmektedir (HE, X4,10,20,40).



Resim 3: C grubu. İske mi + ilaç (dopamin) grubuna ait sıçanların ince barsaklarında azalmış mukoza hasarı (ok), lamina propriada ise hücre sel inflamasyon (*) görülmektedir (a,b,c,d) (HE, X4,10,20).



Resim 4: D grubu (az hasarlı olan). İskemi + ilaç (milrinom) grubuna ait sıçanların ince barsaklarında azalmış mukoza hasarı (ok) lamina propriada ise kısmi hücresel inflamasyon (*) görülmektedir (a,b,c,d) (HE, X4,10,20).



Resim 5: D grubu (Yoğun hasarlı) İskemi + ilaç (milrinom) grubuna ait sıçan ince barsak mukozasında yoğun villus hasarı, villuslarda ayrılmalar (ok) (a,b,c), lamina propriada hemoraji (ok başı) (c,d) ve hücresel inflamasyon (*) (d) görülmektedir (HE, X4,10,20).

TARTIŞMA

Akut mezenterik iskemi tanı konulduğunda sonucun genel olarak ölümcül olduğu bir hastalık olmaya devam etmektedir. Mortalite oranının hala bu denli yüksek olmasının nedenlerinin başında barsaklarda doku ölümü oluşmadan önce tanının konulmasındaki güçlük ve gecikme gelir. Yaşam oranını belirleyen en önemli faktör, barsaklarda nekroz ve peritonit gelişmeden önce tanının konmasıdır. 24 saat içinde tanı konan hastalarda yaşam olasılığı %60 iken, 24 saatten sonra tanı konanlarda bu oran %30'a düşmektedir. Hücre ölümü ve organ yetmezliği ile birlikte olan iskemi genellikle dokunun oksijen ve diğer metabolitlere olan ihtiyacının dolaşım tarafından sağlanamaması ve oluşan artık ürünlerin yine dolaşım tarafından uzaklaştırılmaması sonucu oluşur. Sonuçta akut hücresel şişme, interstisyel ödem ve hücresel disfonksiyon meydana gelir. Tekrar dokunun kanlanması sağlanamazsa sonunda hücresel ölüm gerçekleşir. Kan akımının yeniden sağlanması yani reperfüzyon, iskemik dokunun iyileşebilmesi için ön koşuldur. Ancak iskemik dokunun reperfüzyonu bir taraftan iskemi sırasında kaybolan bazı fonksiyonların geri gelmesini sağlarken bir taraftan da hücre kaybı devam ederek daha ileri hasarlara neden olmaktadır. Bu durum I/R hasarı olarak adlandırılan önemli bir klinik olaydır (7, 8). İnce barsak I/R hasarında etkinliklerini araştırmak amacıyla pentoksifilin, kafeik asit, melatonin, verapamil, nitrogliserin, allopürinol, trimetazidin, dopamin, dobutamin gibi ajanlar kullanılmış ve oksidatif strese karşı etkili oldukları gösterilmiştir. Ayrıca Dopaminin 0,2-5 µg/kg/dk dozlarında, splanknik alanda postsinaptik vasküler dopamin reseptörleri aracılığıyla vazodilatasyona neden olarak bölgenin perfüzyonunu artırdığı gösterilmiştir. Pentoksifilin'in I/R hasarını önlemedeki rolünün araştırıldığı bir çalışmada bir saat iskemi, iki saat reperfüzyon uygulanmıştır(9). Çinkonun intestinal I/R sonrası oluşan hasarı önlemedeki etkinliğinin araştırıldığı bir çalışmada 60 dakika iskemiye takiben 90 dakika reperfüzyon uygulanmıştır. Biz de çalışmamızda, öncül deneylerde intestinal I/R hasarı oluşumunun histopatolojik olarak tespit edilmesi üzerine 60 dakika iskemi ve 120 dakika reperfüzyon uyguladık. Reperfüzyon sonrası oluşan hücre hasarına yanıtı araştırmak amacıyla bilinen vazodilatör etkinliği ile yeni nesil inotrop ilaçlar arasında gösterilen milrinon'u kullandık.

Sonuç olarak; çalışmamızda kontrol grubuna ait deney hayvanlarının ince barsak ve çekumları üzerinde yapılan incelemelerde normal morfolojiye sahip barsak mukoza yapısı görülmüştür. Sham iskemi grubuna ait hayvanların ince barsak ve çekum mukozalarında ise yoğun villus hasarı, lamina propriada hemoraji, konjesyon ve hücresel inflamasyon ile epitel hücrelerinde nekroz görülmüştür. İskemiye yönelik dopamin uygulanan grupta ise sham-iskemi grubuna oranla deney hayvanlarının ince barsak ve çekumlarında azalmış mukoza hasarı ve

lamina propriada azalmış hücresel inflamasyon gözlenmiştir. Çalışmamızın asıl hedefi olan iskemiye yönelik milrinon uygulanan deney hayvanlarında ise ince barsak ve çekumda epitel hasarı ve hücresel hasarı sham grubuna göre azalma göstermekle beraber iskemi + dopamin grubuna göre artmış olarak bulunmuştur. Çalışmamızda ince barsak ve çekum spesmenlerindeki etkilenme için; epitelyum hasarı, hücresel hasar ve nekroz, ödem, hemoraji ve inflamasyon baz alınarak, bu kriterler hasarsız, ve az-orta-çok hasar olarak derecelendirilmiştir. Superior mezenterik arter tıkanması ise son yıllarda özellikle kardiyak rahatsızlıkların artışına bağlı olarak ve teşhiste kullanılan silahların artması ile birlikte gün yüzüne çıkmakta olan bir antitedir. Cerrahiye gerek kalmadan yakalanabilecek olgularda veya dahası cerrahiye alternatif olabilecek I/R periyodunu artı yöne çevirmek için birçok deney üzerinde çalışılmakta ve birçok ajan kullanılmaktadır. Altın standart bir medikal tedavinin bulunmadığı bu periyotta milrinon da yeni kuşak bir inotrop olarak bu ilacın değişik doz, süre ve deneklerle yapılacak çalışmalarla heparin, dopamin gibi bilinen etkinliği olan ilaçlara alternatif, etkili bir tedavi süreci yakalanması mümkün olabilecektir.

KAYNAKLAR

1. Menon NJ, Amin AM, Mohammed A, Hamilton G. Acute mesenteric ischaemia. Acta Chir Belg 2005;105(4):344-54.
2. Ujiki M, Kibbe MR Mesenteric ischemia. Perspect Vasc Surg Endovasc Ther 2005;17(4):309-18.
3. Yasuhara H. Acute mesenteric ischemia: the challenge of gastroenterology. Surg Today 2005; 35(3):185-95.
4. Martinez JP, Hogan GJ. Mesenteric ischemia. Emerg Med Clin North Am 2004;22(4): 909-28.
5. Oldenburg WA, Lau LL, Rodenberg TJ, Edmonds HJ, Burger CD. Acute mesenteric ischemia: a clinical review. Arch Intern Med 2004; 164(10):1054-62.
6. Herbert GS, Steele SR. Acute and chronic mesenteric ischemia. Surg Clin North Am 2007; 87(5):1115-34.
7. Grace PA. Ischaemia-reperfusion injury. Br J Surg 1994;81(5):637-47.
8. Zimmerman BJ, Granger DN. Reperfusion injury. Surg Clin North Am 1992;72(1):65-83.
9. Boyd AJ, Sherman IA, Saibil FG, Mamelak M. The protective effect of gamma-hydroxybutyrate in regional intestinal ischemia in the hamster. Gastroenterology 1990;99(3):860-2.