

RENAL PREZERVASYONDA HİPOTERMİ SÜRESİNE BAĞLI ALLOGRAFTTA GÖRÜLEN ULTRASTRÜKTÜREL DEĞİŞİKLİKLER: İKİ AYRI SOLÜSYONUN KARŞILAŞTIRILMASI *

Akif MEHMEDOĞLU, İsmail SEÇKİN, Ali Ulvi ÖNDER, Muzaffer SARIYAR

Background and Design.- Euro-Collins (UC) and University of Wisconsin (UW) solutions are the most widely used solutions as the storage media of different organs prior to the transplantation. This experimental study was performed to investigate the renal ultrastructural changes caused by hypothermia during renal allograft preservation with UW and EC solutions at 12, 24 and 48 hours.

Result.- We observed minimal degeneration in the kidney structure following EC and UW perfusion at 12 hr preservation. The kidneys in UW group were better preserved when compared with EC group following more than 24 hr of preservation. Mitochondria of renal tubule cells podocytes and endothelial cells were also showed minimal degeneration and there were no erythrocyte aggregation and adhesion to capillary endothelium in UW group in EC group vacoolization and mitochondrial degeneration of these cells were prominent and erythrocyte aggregation and adhesion were seen. After \geq 48 hr of preservation erythrocyte aggregation and adhesion to capillary endothelium were seen in UW group. Degeneration of renal tubule cells, endothelium and podocytes were increased in both groups.

Conclusion.- We have observed the ultrastructural changes of kidneys following EC and UW perfusion of 12 hr, 24 hr, 48 hr for renal preservation. We have concluded that UW solution was seen to have better protective effect on kidney structure in same time period and erythrocytes aggregation and adhesion to endothelium appeared later periods of time (48 hr) when compared to EC solution.

Mehmedoğlu A, Seçkin İ, Önder A.U, Sarıyar M. Ultrastructural changes in renal allograft depending on cold ischaemic time at renal preservation: Comparison of two different solutions. Cerrahpaşa J Med 2003; 34: 75-80.

Renal transplantasyonda hipotermik prezervasyon ve reperfüzyon sırasında oluşan iskemik hasarların boyutu önemli ölçüde perfüzyonun kalitesine bağlıdır. Kadeverik renal transplantasyonda, iskemik reperfüzyon hasarlarının en önemli nedenleri arasında renal kapillerlerde görülen eritrosit agregasyonu gösterilmektedir.¹ Bu iskemik hasarlara bağlı oluşan komplikasyonların sıklığı hipotermi süresi ile bağlantılıdır.

Post-transplant renal disfonksiyon, özellikle non fonksiyonel böbreğin patogenezinde no-reflow fenomeni önemli yer almaktadır.² No-reflow fenomeni nedenleri arasında eritrosit agregasyonunun kapillerlerde oluşturduğu obstrüksiyon gösterilmektedir.¹ Obstrüksiyon, bu alanlarda iskemik hasarların ilerlemesine yol açmaktadır.^{3,4} Hipotermi süresinin uzaması ile de damar endoteliyal hücrelerinde dejeneratif değişikliklerin arttığı ve endotel hücre sürvisinin azaldığı saptanmıştır.^{5,6}

Euro-Collins (EC) ve Wisconsin Üniversitesi (UW) solüsyonları transplantasyon öncesinde farklı organların korunma solüsyonu olarak kullanılmaktadır.^{7,8,9}

Biz de bu çalışmamızda nefrektomi ile çıkarılan böbrekleri soğuk koruma altında bu solüsyonlarla perfüze ederek uygulamanın, nefrektominin 12, 24 ve 48 saat sonrasında böbrek ultrastrüktürünü ne şekilde etkilediklerini göstermeyi amaçladık.

YÖNTEM VE GEREÇLER

Deneylerde ağırlığı 2,25-2,5 kg olan 12 adet Yeni Zelanda tavşanları kullanıldı. Deneyler her biri 6 tavşandan oluşan 2 grup tavşanda yapıldı. Grup I'deki tavşanlara intravenöz (İV) ketamine anestezisi altında İV 50 ml/kg serum fizyolojik ve 250 Ü/kg heparin verilerek bilateral nefrektomi yapıldı. Böbrekler 4°C'de EC solüsyonu ile 20 dak. 100 cm H₂O basınçta perfüze edilerek aynı ısıda tutuldu. Perfüzyonu takiben 12, 24 ve 48 saat hipotermi süresinde

* *Anahtar Kelimeler:* Ultrastrüktür, renal prezervasyon, eritrosit agregasyonu, eritrosit adhezyonu; *Key words:* Ultrastructure, renal preservation, erythrocyte aggregation, erythrocyte adhesion; *Alındığı Tarih:* 4 Kasım 2002; Uzm. Dr. Akif Mehmedoğlu: Azerbaycan Tıp Üniversitesi Üroloji Anabilim Dalı; Prof. Dr. İsmail Seçkin: İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Histoloji Anabilim Dalı, İstanbul; Doç. Dr. Ali Ulvi Önder: İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Üroloji Anabilim Dalı, İstanbul; Prof. Dr. Muzaffer Sarıyar: İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Genel Cerrahi Anabilim Dalı, İstanbul; *Yazışma Adresi (Address):* Doç. Dr. Ali Ulvi Önder, İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Üroloji Anabilim Dalı, 34303, Cerrahpaşa, İstanbul.

renal korteksten parçalar alındı. Alınan parçalar Milloning phosphate tamponu ile hazırlanmış %4 glutaraldehit solüsyonu ile muamele edilerek ön fiksasyon ve aynı tampon ile hazırlanmış %1 Osmium tetroksit ile post fiksasyon uygulandı. Dehidrasyonu takiben parçalar araldit gömme ortamına alındı.

Grup II'ye de aynı işlemler UW solüsyonu ile perfüzyon uygulanarak yapıldı.

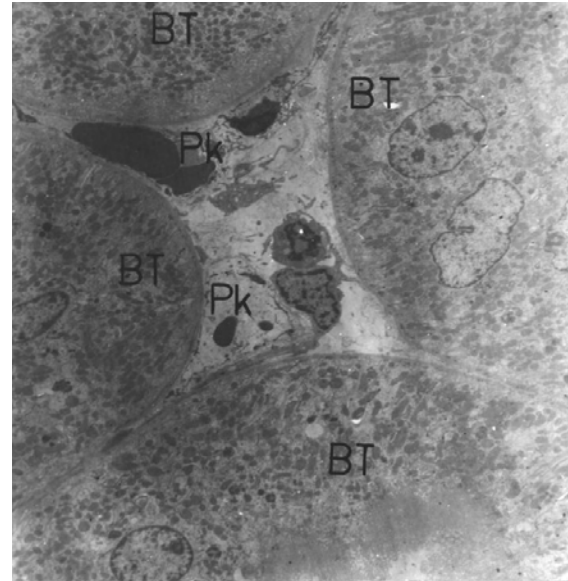
BULGULAR

EC ve UW perfüzyonu uygulanan grupların perfüzyon sonrası 12, 24 ve 48 saatlik kesitleri ultrastrüktürel yönden incelendi ve 12 saatlik preservasyonda gruplar arasında önemli bir farklılık gözlenmedi (Şekil 1, 2).

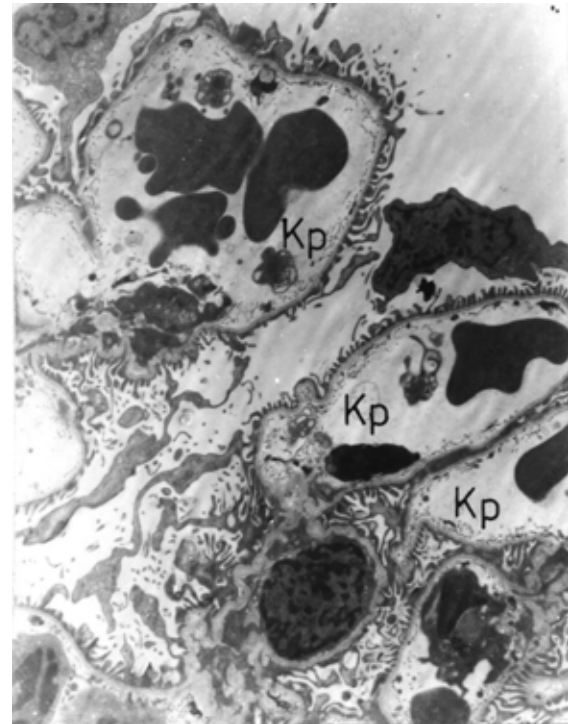
24 saat sonrasında özellikle EC grubunda daha belirgin dejenerasyonlar dikkat çekti. Bu grupta proksimal tübül hücrelerinin mitokondriumlarında hipertrofi ve krista dejenerasyonu sonucu oluşan vakuolizasyon görüldü (Şekil 3). Glomerüler podositlerde de vakuolizasyona rastlandı (Şekil 4). Peritübüler ve glomerüler kapiller lümeninde yer yer eritrosit agregasyonu ve eritrositlerin endotele adhezyonu gözlemlendi (Şekil 5). Aynı saatteki UW grubunda ise tübülüs hücrelerinde mitokondriumların daha iyi korunduğu ve bir harabiyete uğramadığı gözlemlendi. Tübülüs hücrelerinin lümenine doğru oluşturduğu stoplazmik çıkıntılara ve apikal bölgede hafif vakuolizasyona rastlandı (Şekil 6). Podositlerde vakuolizasyon görülmedi. Glomerüler kapillerlerin lümeninde yer yer endotel artıklarına rastlandı. Peritübüler ve glomerüler kapiller lümenlerinde eritrosit agregasyonu ve eritrosit adhezyonuna rastlanmadı (Şekil 7).

EC perfüzyonu ile prezervasyon uygulanan tavşanların nefrektomiden 48 saat sonra proksimal tübüllerinde daha fazla mitokondrial hipertrofi ve dejenerasyonların oluşturduğu daha fazla vakuolizasyonlar görüldü (Şekil 8). Peritübüler kapiller lümeninde görülen eritrositlerde agregasyon ve adhezyona rastlandı (Şekil 8). UW perfüze edilen grupta da renal tübül vakuolizasyonları 12 saatlik prezervasyona göre daha da artmıştı (Şekil 9). Glomerüler

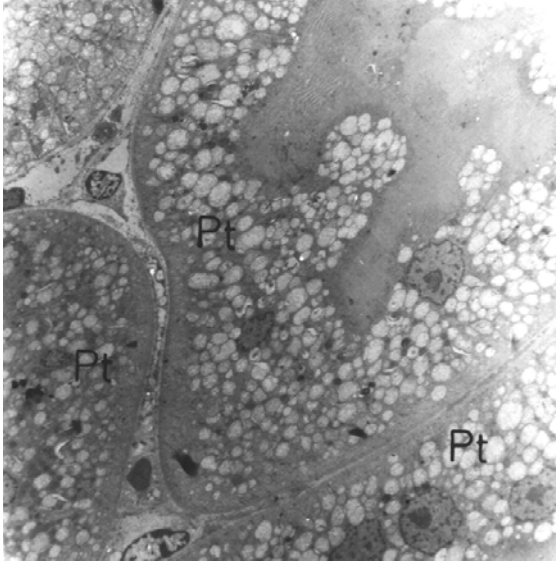
kapiller lümenlerinde daralma, daha fazla endotel artıkları ve podositlerde vakuolizasyon görüldü (Şekil 10). Kapillerlerde de eritrosit ve granulosit agregasyonu ve adhezyonuna rastlandı (Şekil 11).



Şekil 1. Böbrek tübülüsleri (BT) ve peritübüler kapillerler (Pk) (EC grup - 12. saat) x1600



Şekil 2. Glomerüler kapillerler (Kp) (EC grup - 12. saat) x3150



Şekil 3. Yaygın mitokondri dejenerasyonları gösteren proksimal tubüller (Pt) (EC grup - 24. Saat) x1250

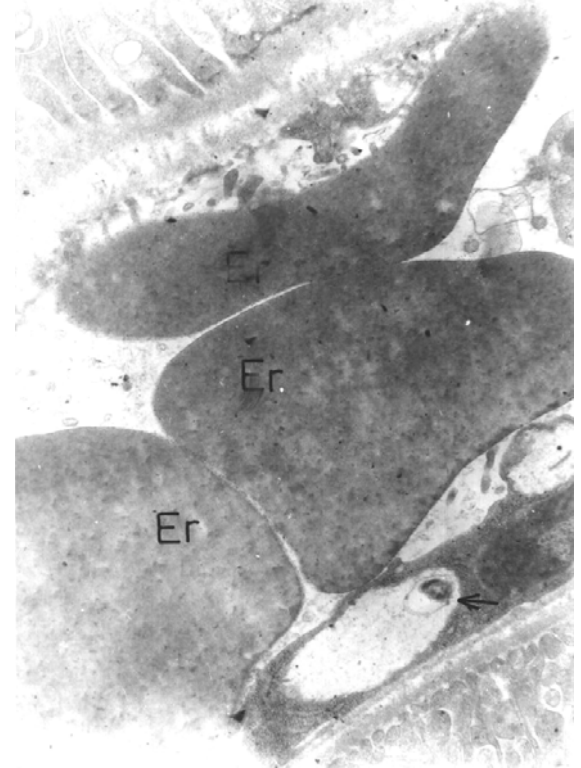


Şekil 4. Podositlerde (Pd) vakuolizasyon (ok) (EC grup-24. saat) x8000

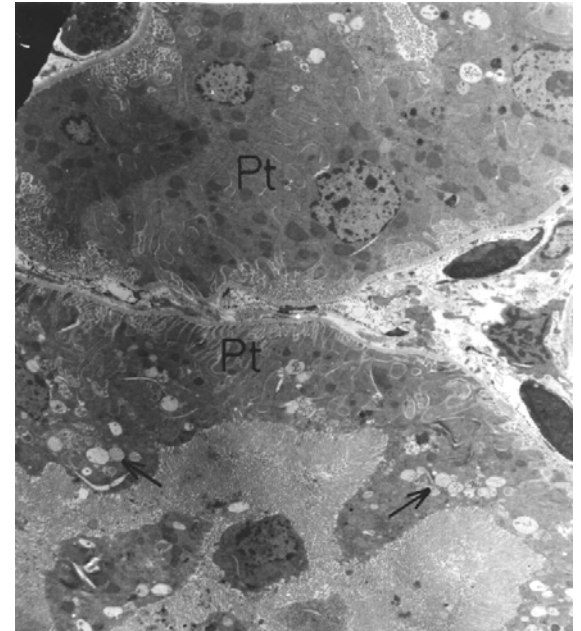
TARTIŞMA

Basit soğuk koruma kullanılan kadaverik renal transplantasyonda allograftın fonksiyonel durumu soğuk iskemi süresinin uzunluğuna bağlı ise de³ allografta uygulanan 2 farklı per-

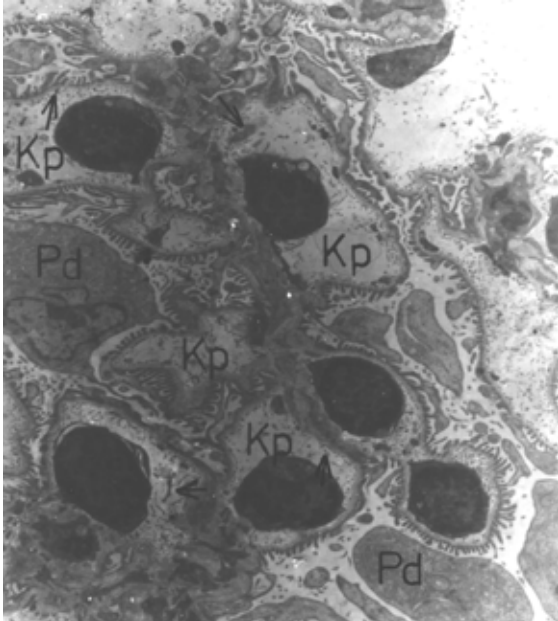
füzyon solüsyonunun bu konumda ne şekilde etkili olabileceği düşüncesi ile bu çalışmayı gerçekleştirdik.



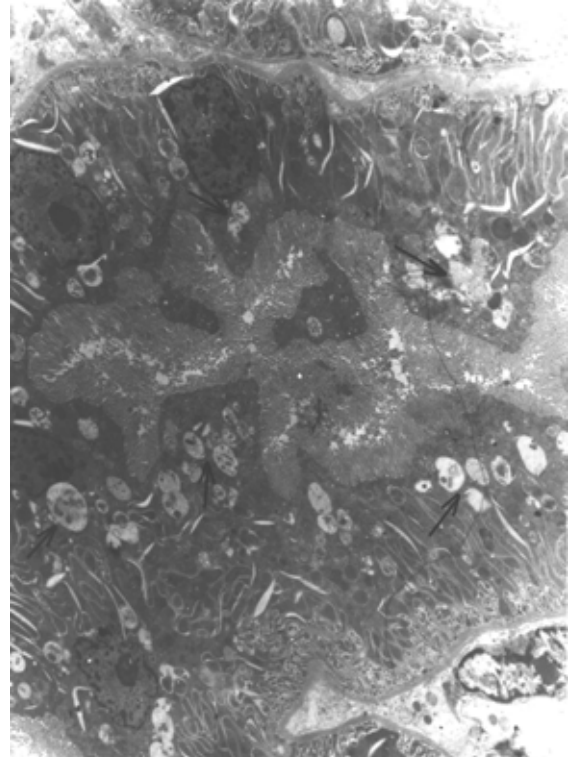
Şekil 5. Peritübüler kapillerde eritrosit (Er) agregasyonu ve endotele adhezyon. Endotelde vakuolizasyon (ok) (EC grup - 24. saat) x12500



Şekil 6. Proksimal tubülüs (Pt) hücrelerin apikal bölgesinde vakuolizasyon (ok) (UW grup - 24. saat) x1600



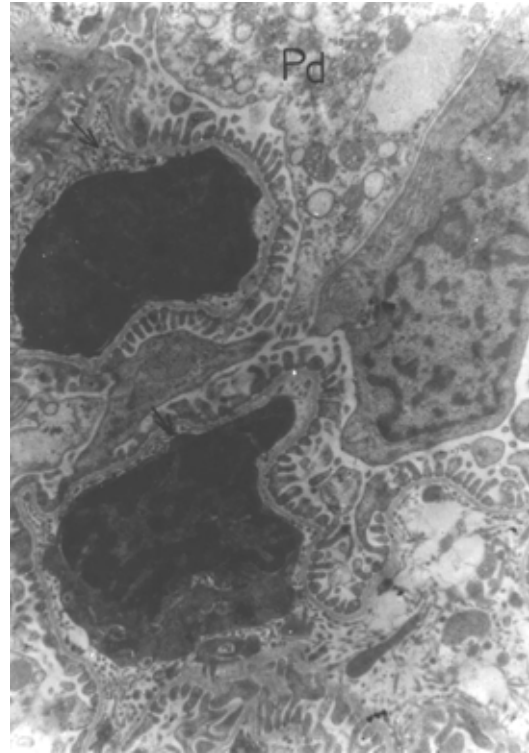
Şekil 7. Glomerül kapiller (Kp) lümenlerinde endotelial artıklar (ok) ve podositler (Pd) (UW grup -24. saat) x1600



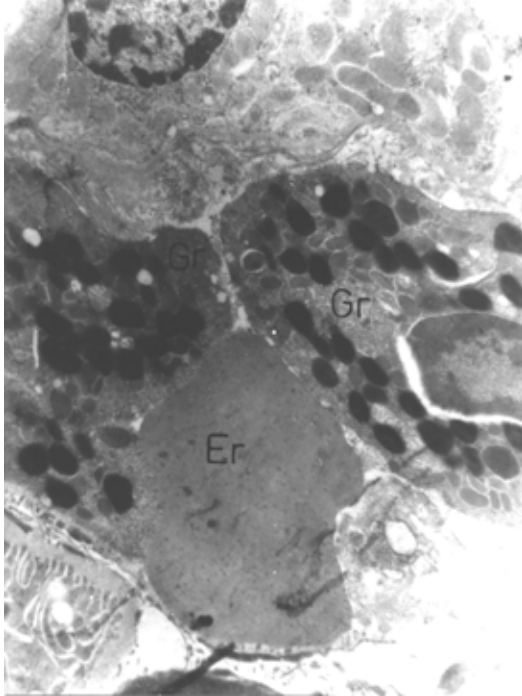
Şekil 9. Proksimal tübül apikal bölgelerinde vakuolizasyon (ok) (UW grup - 48. saat) x2000



Şekil 8. Proksimal tübül mitokondriumlarında dejenerasyon (ok) ve piknotik nüve (çift ok). Peritübüler kapillerde eritrosit (Er) agregasyonu ve adhezyonu (EC grup - 48. saat) x6300



Şekil 10. Glomerüler kapiller lümenlerinde daralma ve endotel artıkları (ok). Podositte (Pd) vakuolizasyon (UW grup - 48. saat) x6300



Şekil 11. Peritübüler kapillerde granülosit (Gr) ve eritrosit (Er) agregasyonu ve adhezyonu (UW grup - 48. saat) x8000

Transplantasyon sonrası renal disfonksiyon (özellikle non fonksiyonel böbrek) patogenezinde "no-reflow fenomeni" önemli yer almaktadır.² No-reflow fenomeni nedenleri arasında renal kapillerlerde görülen eritrosit trapping gösterilmektedir.¹ İskemi sırasında eritrositlerin daha rijid duruma geldiği saptanmıştır ki bunun da nedenini soğuk iskemide kalsiyum adenozin trifosfat (Ca ATP-ase) fermentinin hipotermik inhibisyonuna bağlı olarak ATP tükenmesi sonucu Ca'nın eritrosit membran proteinlerine bağlanması oluşturmaktadır.^{3,10}

Çalışmamızda hipotermik koruma altında EC ve UW solüsyonları ile perfüze edilen böbreklerden 12 saat sonrasında elde edilen ultrastrüktürel tetkiklerde pek fazla bir morfolojik farklılık gözlemedik. 24 saat ve sonrasında ise özellikle EC grubunda daha fazla görülen tubüler ve glomerüler seviyede ultrastrüktürel dejenerasyonlarla birlikte eritrosit aglutinasyonları ve endotel adhezyonlarına rastladık UW grubunda ise tubülüsler ve glomeruldaki gözlediğimiz ultrastrüktürel dejenerasyonlar daha az bir düzeydi. Özellikle mitokondrium

kristallarının 24 ve hatta 48 saatlik gruplar da dahil UW grubunda çok iyi korunduğunu saptadık.

Çalışmamızda çeşitli hipotermik prezervasyon sürelerinde elde ettiğimiz ultrastrüktürel değişiklik bulguları Euro-Collins solüsyonu ile yapılan diğer çalışmalarla büyük ölçüde uyum göstermektedir.^{11,12} Fakat ≥ 24 saat basit koruma ile prezervasyonu takiben yapılan elektron mikroskopik incelemelerde glomerüller ve peritübüler kapillerlerde eritrositlerle endotelium arasında adhezyon varlığına ulaşabildiğimiz literatür kaynaklarında rastlayamadık. Kanımızca bu bulgu eritrosit agregasyonunun reperfüzyonu sırasında dokunun belirli alanlarında mikrosirkülasyonu engelleme nedenini izah etmektedir.

Karaciğer prezervasyonu ile ilgili çalışmalarda da soğuk iskemide lökositlerin ve özellikle nötrofillerin endotelial hücrelere adhezyonunun reperfüzyon hasarlarına yol açtığı gösterilmiştir.¹³ Bizim incelemelerimizde EC grubunda da glomerüller ve peritübüler kapillerlerde eritrositler dışında kan elemanlarına seyrek olarak rastlandı. UW grubunda ise eritrosit ve granülositlerin agregasyonu ve adhezyonu görüldü.

Canlı vericilerden yapılan böbrek nakillerinde kısa süreli perfüzyon uygulaması dolayısıyla kapillerlerde daha çok eritrositler kalmasına rağmen, hipotermik prezervasyonun kısa süreli olmasına bağlı olarak akut tubüler nekroz ve non fonksiyonel böbrek gibi komplikasyonlar görülmektedir. Diğer taraftan 24 saati aşan basit soğuk koruma ile renal prezervasyonlarda bu komplikasyonların sıklığı hipotermi süresi ile orantılı derecede yüksektir. Gerçekten de bizim deney gruplarımızda gözlediğimiz ultrastrüktürel dejenerasyonlar da 24 saatten itibaren ortaya çıkmıştır. Ancak bu dejenerasyonlar arasında EC ve UW grupları arasında belirgin bir farklılık olduğu ve UW grubunun daha iyi korunduğu gözlenmiştir.

Yapılan çalışmalarda araştırmacılar da UW solüsyonunda 72 saat ve daha fazla korumanın bile EC solüsyonu ile karşılaştırıldığında renal mikrosirkülasyonu¹⁴ ve vasküler endotelial

hücreleri daha uzun süre koruduğunu¹⁵ göstermişlerdir.

Sonuç olarak basit soğuk koruma altındaki EC ve UW solüsyonları ile perfüze edilen böbreklerde hipotermi süresine bağlı olarak yapılan ultrastrüktürel tetkikler bize UW grubunun EC grubuna oranla daha iyi korunduğu ve bu grupta daha geç eritrosit agregasyon ve adhezyonuna neden olduğunu ve daha az ultrastrüktürel hasar oluştuğunu düşündürmektedir.

ÖZET

Kadeverik renal transplantasyonda, iskemik reperfüzyon hasarlarının en önemli nedenleri arasında renal kapillerlerde görülen eritrosit agregasyonu yer almaktadır. Bu iskemik hasarlara bağlı oluşan komplikasyonların sıklığı hipotermi süresi ile bağlantılıdır.

Euro-collins (EC) ve Wisconsin Üniversitesi solüsyonları organ transplantasyonları öncesinde farklı organların korunma solüsyonu olarak kullanılmaktadır. Bizde bu çalışmamızda nefrektomi sonrası elde edilen böbrekleri soğuk koruma altında bu solüsyonlarla perfüze ederek 12, 24, 48 saat sonrasında böbrek ultrastrüktürünü ne şekilde etkilediklerini göstermeyi amaçladık.

12. saatte her iki grupta pek önemli bir farklılık gözlenmedi. 24 saatlik grupta ise EC grubunda peritübüler glomerüler kapiller lümeninde yer yer eritrosit agregasyonu ve endotele adhezyonuna proksimal tubül ve padositlerde vakuolizasyona rastladık. UW grubunda ise bu grupta eritrosit agregasyon ve adhezyonu gözlenmezken böbrek strüktüründe fazlaca iskemik hasarlara rastlanmadı. Ancak 48. saatte UW grubunda eritrosit agregasyon ve adhezyonu ile daha ilerlemiş renal tubül dejenerasyonları görüldü.

Bulgularımız bize basit soğuk koruma altındaki EC ve UW solüsyonları ile korunmuş böbreklerde hipotermi süresine bağlı olarak yapılan ultrastrüktürel tetkikler bize UW grubunda strüktürel yapının EC grubuna oranla daha iyi korunduğunu ve bu grupta eritrosit agregasyonu ve adhezyonunun daha geç sürede oluştuğunu düşündürmektedir.

KAYNAKLAR

1. Booster MN, Wignen RMH, Yin M et al. Enhanced resistance to the effect of normothermic ischaemia in kidneys using pulsatile machine perfusion. *Transplant Proc* 1993; 25: 3006-3011.
2. Anaise D, Ramsammy L, Lane B, Waltzer WC, Rapoport FT. The pathophysiology of the no-reflow phenomenon in cold-stored kidneys. *Transplant Proc* 1987; 1: 1348-1352.
3. Weed RI, La Celle PL and Merrill EW. Metabolic dependence of red cell deformability. *J. Clin Invest* 1969; 48: 795-809.
4. Bonventre JV, Weinberg JM. Kidney preservation ex vivo for transplantation. *Ann Rev Med* 1992; 43: 523-553.
5. Mehmedoğlu A, Önder AU, Seçkin İ, Sarıyar M. Basit soğuk koruma ile renal prezervasyonda hipotermi süresine bağlı allograftta görülen ultrastrüktürel değişiklikler. *CerrahpaşaTıp Der* 1997; 28: 12-16.
6. Büsing M, Hopt UT, Schareck W, Ernst M, Morgenroth K. Ultrastructural changes of different preserved human kidney allografts before and after reperfusion. *Transplant Proc* 1990; 22: 448-449.
7. Kshetry VR, Kroshus TJ, Burdine J, Savik K, Bolman RM. Does donor organ ischaemia over four hour affect long-term survival after lung transplantation. *J Heart Lung Transplant* 1996; 15: 169-74.
8. UW G, Zhang F, Salley RK, Robinson MC, Chien S. A systematic study of hypothermic lung preservation solutions Euro-Collins solution. *Ann Thorac Surg* 1996; 62: 356-62.
9. Collins GM, Brovo-Sugerman M, Terasaki PI. Kidney preparation for transportation: initial perfusion and 30 hours cold ice storage. *Lancet* 1969; 22: 1219-1223.
10. Hochachka PW. Defense strategies against hypoxia and hypothermia. *Science* 1986; 231: 234-241.
11. Collins GM, Green RD, Halasz NA. Importance of anion content and osmolarity in flush solutions for 48 to 72 hr hypothermic kidney storage. *Cryobiology* 1979; 16: 217.
12. Büsing M, Hopt UT, Schareck W, Ernst M, Morgenroth K. Ultrastructural changes of different preserved human kidney allografts before and after reperfusion. *Transplant Proc* 1990; 22: 448-449.
13. Monden K, Anii S, Ishiguro S et al. Involvement of I CAM-I expression on sinusoidal endothelial cell and neutrophil adherence in the reperfusion injury of cold preserved livers. *Transplant Proc* 1995; 27: 759-761.
14. Ueda Y, Todo S, Imventarza O et al. Specific effect of University of Wisconsin solution on renal hemodynamics and microvasculature in canine kidney preservation. *Transplant Proc* 1990; 22 : 2216-2218.
15. Eberl T, Schmid T, Wödlinger R et al. Which organ preservation solution best protects vascular endothelium? *Transplant Proc* 1993; 25: 3019