

AŞAMALI YIKAMA YÖNTEMİ İLE RENAL KORUMA: YIKAMA PARAMETRELERİ VE ELEKTRON MİKROSKOPİK BULGULAR

RENAL PRESERVATION BY GRADUALLY FLUSHOUT: PERFUSION PARAMETERS AND FINDINGS ON ELECTRON MICROSCOPY

Mehmedođlu, A.*, Önder, A., U.***, Seçkin, I.***, Sarıyar, M.***

Özet

Çalışmamızın amacını tavşan modelinde ultrastrüktürel inceleme ve yıkama parametrelerini kullanarak aşamalı yıkamanın renal allograftın mikrosirkülasyonu üzerine etkilerini araştırmak oluşturmaktadır. Tavşan modeli kullanarak yapılan aşamalı yıkamanın ilk bölümünde hafif hipotermi uygulanmıştır. Nefrektomiye takiben klasik (1. grup) ve aşamalı yıkama (2. grup) yapılan böbreklerde ortalama yıkama akımı (median perfusate flow-MPF), ortalama böbrek içi direnç (median intrarenal resistance-MIRR), son dönem böbrek içi direnç (terminal intrarenal resistance-TIRR) parametleri ölçüldü, 96 saatlik basit soğuk koruma sırasında belirli saatlerde korteks ve medulladan parçalar alınarak elektron-mikroskopik (EM) incelemeler yapıldı.

2. grupta MPPF parametresi yüksek, MIRR ve TIRR parametreleri 1. gruba oranla düşük bulunmuştur ki, bu da aşamalı perfüzyonun daha iyi mikrosirkülasyon için zemin hazırladığını göstermektedir. 1. grupta arteriollerde ve kapillerlerde eritrosit (red blood cell-eritrosit) agregasyonu, ≥ 24 saat yıkama sonrası aglütinasyon ve endoteliuma adhezyon görüldü. 2. grupta arteriollerde eritrosit agregasyonu yoktu, kapillerlerde de çok az sayıda eritrositlere rastlandı.

Deneylerde elde ettiğimiz bulgular aşamalı hipotermik yıkamanın renal allograftta hipotermimin oluşturduğu vasküler spazmın neden olduğu hasarların önlenmesinde etkili olabileceğini düşündürmektedir.

Summary

The purpose of this study was to investigate the effect of gradual perfusion on the microcirculation of the renal allograft using perfusion parameters and ultrastructural observation. The first stage of the gradual perfusion using rabbit model was initiated with mild hypothermia. Median perfusate flow (MPF), median intrarenal resistance (MIRR) and terminal intrare-

* Azerbaycan Tıp Üniversitesi Üroloji Anabilim Dalı,

** İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Üroloji Ana Bilim Dalı

*** İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Cerrahi Bilimler Ana Bilim Dalı

nal resistance (TIRR) parameters were measured in the 1st and 2nd group in which classic perfusion and gradual perfusion was performed, respectively following nephrectomy. Samples were obtained from the cortex and medulla for electron microscopic examination during 96 hr of SCS.

The MPF parameter was higher and the MIRR and TIRR parameters were lower in the 2nd group (gradual perfusion group) when compared with the 1st group. This implies that gradual perfusion prepares a better situation for microcirculation.

Aggregation of the erythrocytes in the capillaries and arterioles, following ≥ 24 hr of preservation erythrocyte agglutination and adhesion to the endothelium were observed in the 1st group. There was no erythrocyte aggregation in the arterioles, and a few erythrocytes in the capillaries in the 2nd group.

In conclusion our results imply that gradual hypothermic perfusion may prevent the damages on the renal allografts due to hypothermia induced vascular spasm.

Anahtar Kelimeler: Renal koruma, yıkama parametreleri, eritrosit agregasyonu, aşamalı yıkama.

Key words: Renal preservation, perfusion parameters, erythrocyte aggregation, gradual perfusion.

Giriş

Kadaverik renal transplantasyonda organın kan şekilli elemanlardan arındırılması için yıkanması (perfüzyon), soğuk ortamda korunması (prezervasyon) ve dolaşımın yeniden sağlanması (reperfüzyonu) sırasında ortaya çıkan iskemik hasarlar erken postoperatif dönemde non-fonksiyone böbrek ve akut tübüler nekroz (ATN) gibi komplikasyonlara neden olmaktadır(1). Non fonksiyone böbrek allograft kaybına yol açmakta, ATN ise organın 1 yıllık ve 5 yıllık sürvi süresini etkilemektedir (2).

Allograftın reperfüzyon sırasında fonksiyonel durumu, renal dokuda mikrosirkülasyonun korunması ile sıkı şekilde bağlantılıdır(3). Doku mikrosirkülasyonunu etkileyen en önemli faktörler arasında çeşitli nedenlere bağlı vazokonstriksiyon ve eritrosit agregasyonu yer almaktadır(4). Arteriol ve kapillerlerde oluşan vazospazm ve eritrosit agregasyonu böbrek içi direnci artırarak reperfüzyon döneminde yeterli kan akımının engellenmesine

neden olur ve bu da iskemik hasarların ilerlemesine yol açar(5).

Yıkama sırasında hipoterminin yaptığı vazokonstriksiyonu önlemek amacıyla aşamalı hipotermi uygulanması ile ilgili deneysel çalışmalarımızı sunmuştuk(6). Bu çalışmamızın amacını yöntemin allograftın perfüzyon parametreleri ve ultrastrüktürü üzerine etkisini araştırmak oluşturmaktadır.

Materyal ve Metod

Deneilerde ağırlığı 2.25-2.5 kg olan Yeni Zelanda tavşanları kullanıldı. 1. grubu (n=12) oluşturan deneklere İV pentobarbital 20 mg/kg+ketamin 25 mg/kg bolus+1 mg/kg/dak infüzyon anestezisi altında laparotomi, böbrek damarları disseksiyonu ve bilateral nefrektomi yapıldı. Böbrekler içerisinde eriyen buzlar bulunan serum fizyolojik solüsyonuna alındı ve 4°C Euro-Collins (EC) solüsyonu ile 20 dak 100 cm H₂O basınçta yıkama uygulandı. Ameliyat sırasında İV 50 ml/kg serum fizyolojik infüzyonu yapıldı ve nefrektomiden 3 dak önce 250 Ü/kg heparin verildi. Yıkama öncesi

böbreğin ağırlığı, yıkama solüsyon miktarı ölçüldü ve yıkama basıncı ve süresi sabit tutularak yıkama sıvısı ortalama akım hızı (Median Perfusate Flow-MPF, ml/dak/100 g doku) ve ortalama böbrek içi direnç (Median Intrarenal Resistance-MIRR) hesaplandı.

$$MPF = \frac{\text{Yıkama Sıvı Miktarı (cc)}}{\text{Yıkama Süresi (dak.)}} \times \frac{100}{\text{Böbrek Ağırlığı (g)}}$$

$$MIRR = \frac{100 \text{ cm H}_2\text{O}}{MPF}$$

Perfüzyon sonunda Protocol Propaq 106 manometresi ile renal arterde basınç ölçüldü ve yıkama son dönem böbrek içi direnci (Terminal Intrarenal Resistance-TIRR) olarak değerlendirildi. TIRR parametresi diğer parametrelerle kıyaslanması amacıyla cm H₂O ile ifade edildi. Böbrekler 4°C ısıda korumaya alındı.

2. grupta (n=12) operasyon 1. grupta olduğu gibi yapıldı, nefrektomi sonrası böbrekler oda ısısında serum fizyolojik solüsyonuna konarak 10 dak 22°C, daha onra ise eriyen buzlar içerisine alınarak 10 dak 4°C EC solüsyonu ile yıkandı.

48 ve 96 saat basit soğuk koruma sonrası tekrar 20 dakikalık yıkama uygulanarak MPF ve MIRR değerleri hesaplandı ve TIRR ölçüldü. Yıkamayı takiben 12, 24, 48, 72 ve 96 saat hipotermik prezervasyon sonrası korteks ve medulladan doku örnekleri alındı. Belirtilen saatlerde böbreğin değişik bölgelerinden herhangi bir travma oluşturulmadan alınan örnekler elektron mikroskopik olarak incelendi. Reperfüzyon yapılan gruplarda (her biri için n=6) hipotermi süresince EM inceleme için örnekleme yapılmadı.

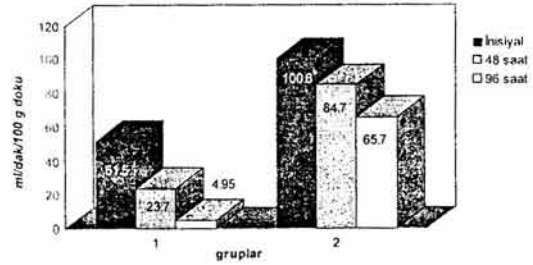
Yıkama parametreleri çift yönlü Student t testi ile değerlendirildi ve P<0.05 istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

Bulgular

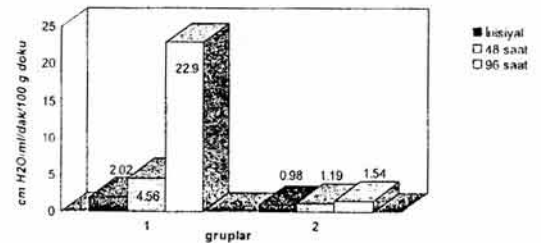
Yıkamayı takiben MPF değerleri 2. grupta 1. gruba göre daha yüksek, MIRR ve TIRR de-

ğerleri düşük olarak bulundu ve istatistiksel olarak anlamlıydı (P<0.01). 48 saat koruma sonrası 1. grupta MPF sonuçlarında belirgin azalma kaydedilirken MIRR ve TIRR parametrelerinde artış saptandı (P<0,01). 96 saat basit soğuk koruma sonrasında yine 1. grupta MPF değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı düşüş, MIRR ve TIRR parametrelerinde artış saptandı (P<0.01) (Grafik: 1, 2, 3).

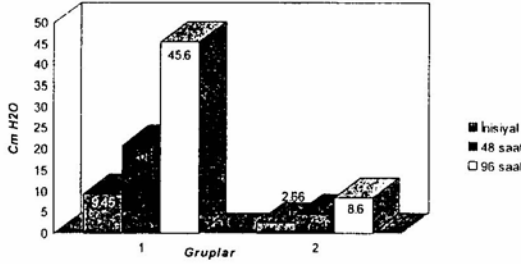
Aşamalı yıkama yapılan 2. grupta ise inisyal ve 48 saatlik koruma süresince yıkama parametrelerindeki değişiklik istatistiksel olarak anlamlı değildi (P>0.05).96 saat korunma sonrası MPF'de düşüş, MIRR ve TIRR parametrelerinde artış gözlemlendi (P<0.01) (Grafik: 1, 2, 3).



Grafik 1: Gruplarda median perfusate flow değerleri



Grafik 2: Gruplarda median intrarenal resistance değerleri



Grafik 3: Gruplarda median intrarenal resistance değerleri

TIRR elektron mikroskopik incelemede elde edilen bulgularla büyük oranda uyumluluk gösterdi. EM incelemelerde allografta iskemik reperfüzyon hasarlara neden olan patomorfolojik değişikliklerin olduğu sürelerde TIRR değerini yaklaşık 40 cm H₂O ve üzerinde olarak saptadık.

Yıkamayı takiben ve 12 saat koruma sonrası yapılan EM incelemelerde 1. grupta arteriollerde, glomerüller ve peritübüler kapillerlerde sık olarak eritrosit agregasyonuna rastlandı. Ancak endoteliumda patomorfolojik değişiklikler görülmedi, eritrositlerin aglütinasyonu ve endoteliuma adhezyonu olmadığı tesbit edildi (Resim: 1). Tubülüs hücrelerinin ultrastrüktürü normaldi, hücre membranı, mitokondrium ve mikrovilluslarda herhangi bir değişiklik saptanmadı.

24 saat basit soğuk koruma sonrasında ise kapillerlerde eritrosit agregasyonu varlığının yanı sıra proksimal tubülüs hücrelerinde hafif derecede hidropik dejenerasyon, mitokondriumlarda hafif hipertrofi ve krista harabiyeti kaydedildi. Endoteliumda dejenerasyon saptanmadı, fakat seyrek olarak eritrositler ile endotelium arasında adhezif bağlantılar oluşmaya başladığı görüldü.

Korumanın 48 ve 72. saatlerinde yapılan incelemelerde glomerüller ve peritübüler kapillerlerde eritrositlerin aglütinasyonu ve endote-

liuma adhezyonu görüldü (Resim: 2). Özellikle eritrositlerle tıkanmış glomerüler kapillerlerin endoteliumun dış hudutları gerilmiş görünümde idi. Endoteliumun bazal membranının elektron dansitesinde azalma, bitişme bölgelerinde endotel netliğinde bozulma tesbit edildi. Mitokondriumlarda aşırı hipertrofi ve krista kaybı, podositlerde ve proksimal tubülüs epitel hücrelerinde vakulolizasyon, lokal olarak nüvede invaginasyon (72 saat), mikrovilluslarda azalma ve şişme bulguları saptandı.

96 saat sonra yapılan EM incelemelerde glomerüller ve peritübüler kapillerlerde ileri derecede eritrosit agglütinasyonu ve eritrosit ile endotelium arasında adhezyon görüldü. Endoteliumda daha fazla dejeneratif değişikliklere rastlandı ve özellikle adhezyon bölgelerinde endotelium bütünlüğü bozulmuştu, glomerüler kapillerlerde endotelium sitoplazmasının pencereci bölgesinde dejenerasyon göze çarptı (Resim 3). Proksimal tubülüs epitelinde mikrovilluslar silinmiş, mitokondriumlarda krista kaybı ve dejenerasyon, nüvede invaginasyon ve piknoza giden değişiklikler, bir çok bölgelerde organellerde dağılma şeklinde bulgulara rastlandı. Tubülüs lümenlerinin yer yer sitoplazmik debris ve şişmiş mikrovilluslarla tıkanmış durumda olduğu gözlemlendi.

2. grupta yıkamayı takiben, 12 ve 24 saatlik koruma sonrası yapılan EM incelemelerde arteriollerde eritrosit agregasyonuna rastlanmazken, kapillerlerin eritrositlerden daha iyi arınmış durumda olduğu saptandı. Endotelium ve tubülüs epitel hücrelerinin ultrastrüktürü normaldi.

48 ve 72 saatlik koruma sonrası ise tubülüs epitelinde hafif hidropik dejenerasyon görüldü, mitokondrium kristaları ve mikrovilluslar 1. gruba kıyasla 2. grupta daha iyi korunmuştu. Kapiler ve arteriol endoteliumunda dejeneratif değişiklikler gözlenmedi (Resim 4).

96 saat basit soğuk koruma sonrası orta derecede hidropik dejenerasyonun yanı sıra proksimal tubülüs epitelinde mitokondrium krista harabiyeti, mikrovilluslarda azalma görüldü. Endoteliumda dejenerasyonu 1. gruba kıyasla daha hafif idi.

Tartışma

Reperfüzyon döneminde allograftın fonksiyon gösterme ve yaşam yeteneği (viability) organın damar sisteminin fonksiyonel ve morfolojik durumu ve mikrosirkülasyonun koruma derecesi ile bağlantılıdır(7). Bu bilgiler göz önüne alınarak pulsatil yıkama ile yapılan kadaverik böbrek nakillerinde allograftın post-tranplantasyon dönemindeki fonksiyonel durumunun prognozunu saptamak amacıyla MPF ve MIRR perfüzyon parametreleri esas alınmaktadır(5).

Kozaki ve ark. 50 mm Hg basınçla aralıksız hipotermik yıkama ile MPF'nin 04 ml/dak/g üstünde olmasını ve yıkama sırasında vasküler direncin azalmasını böbreğin yaşam kabiliyeti açısından olumlu bulgular olarak değerlendirmektedirler(8).

Çalışmamızda basit soğuk koruma ile koruma sırasında gruplar arasında MPF ve MIRR parametrelerini kıyasladık ve EM bulguları ile karşılaştırdık. İlk etapta hafif hipotermik olarak yapılan aşamalı yıkama, klasik uygulama ile karşılaştırıldığında aşamalı yıkama grubunda MPF değerinde istatistiksel anlamlı artış, MIRR'da düşüş sağlandığı görüldü ($P<0.01$). Gruplar arasındaki bu fark 48 ve 96 saat koruma sonrası yapılan reperfüzyonlarda daha da belirgin idi. Yıkama parametreleri ile EM bulguları arasında da uyumluluk gözlemlendi.

Yıkama sonunda böbrekte intravasküler basıncın Protocol Propaq 106 veya su manometresi ile ölçülmesi çok pratiktir, böbreğin ağırlığının ölçülmesini ve hesaplamalar gerektirmez. TIRR olarak adlandırdığımız bu parametre (Terminal Intrarenal Resistance-Yıkama

Sonu Böbrek İçi Direnç) MPF ve MIRR parametreleri ve EM incelemede elde edilen bulgularla büyük oranda uyumluluk gösterdi. EM incelemelerde eritrosit agregasyonu, eritrositlerin aglütinasyonu ve endoteliuma adhezyonu, tubülüslerde dejenerasyon bulgularını TIRR parametresi ile kıyaslayarak TIRR'ın yaklaşık 40 cm H₂O ve üzerinde olması durumunda böbreğin potansiyel fonksiyonu açısından riskli olacağı görüşüne vardık. TIRR parametresi basit soğuk korumanın herhangi bir safhasında kısa süreli perfüzyon yapılarak ölçülebilir. Geç dönemde tekrar yapılan perfüzyonun allograft üzerinde zararlı etkisi olmadığı Jos ve ark. tarafından bildirilmiştir(9).

Koruma sonrası reperfüzyon yapılan allograftın belirli alanlarında veya tüm dokuda kan dolaşımının yetersiz olması "no-reflow" fenomeni olarak adlandırılmaktadır(3). Bu fenomenin nedenleri arasında vazokonstriksiyon ve eritrosit agregasyonu ilk sıraları almaktadır(5). Özellikle iskemik hasara uğramış organlarda ATP tükenmesi ile kalsiyumun hücre membranına bağlanması sonucu eritrositler rigid duruma gelmektedirler ki, bu da kapillerlerin elastikiyetini kaybetmiş eritrositlerle tıkanmasına neden olmaktadır(10).

Çalışmamızda 1. grupta yıkamayı takiben yapılan EM incelemelerde arterioller ve kapillerlerde belirgin eritrosit agregasyonuna rastlandı. Aynı grupta ≥ 24 saat koruma sonrası eritrositler arasında aglütinasyon ve eritrositlerin endoteliuma adhezyonunu saptadık. Kanımızca 24 saati aşan basit soğuk koruma ile prezervasyona tabi tutulmuş organlarda bu bulgular ATN ve non fonksiyone böbrek komplikasyonu insidansının yüksek olmasının önemli nedenlerinden biridir. ≥ 48 saat basit soğuk koruma sonrası eritrositlerin endoteliuma adhezyonu bölgelerinde endoteliumda belirgin dejenerasyon izlenmekte, bu değişiklikler daha sonraki dönemlerde endotel bütünlüğünün bozulmasına kadar ilerlemektedir.

Soğuk iskemi döneminde lökositlerin ve özellikle nötrofillerin endotelial hücelere adhezyonunun reperfüzyon hasarlarına yol açtığı gösterilmiştir(11). Çalışmamızda kapiler lümeninde seyrek olarak lökositlere (daha çok lenfositler) ve trombositlere rastlandı. Bu kan elemanlarının da adhezyon gösterme insidansı ve süresi eritrositlerden farklı değildi.

Tubuler epitelde görülen hücre ödeminin de reperfüzyon dönemindeki iskemik hasarlar da rolü olduğu Harvig ve ark. tarafından bildirilmiştir. Özellikle vasa recta bölgesinde dış medullada olan hücre ödemi vasküler obstrüksiyona ve sonuçta "no-reflow" fenomenine neden olmaktadır(12). Çalışmamızda ≥ 48 saat koruma uygulanan böbreklerde (özellikle 96 saat hipotermi sonrası) hem proksimal tubülüs hücrelerinde, hem de dış medullada orta ve yer yer ileri derecede hidropik vakuolizasyon saptandı. Fakat olguların büyük çoğunluğunda hidropik dejenerasyon kapiler lümenini tıkayıcı nitelikte değildi.

İlk yıkama sırasında aşamalı perfüzyon uygulanarak hipotermik korumaya alınan böbreklerde MPF parametride istatistiksel anlamlı artış, MIRR ve TIRR parametrelerinde düşüş görüldü ($P < 0.01$). EM incelemelerde bu grupta arteriol ve kapilerlerde eritrosit agregasyonunun önemli ölçüde önlendiği saptandı. Damar lümeninin kan elemanlarından daha iyi arınması kanımızca hafif hipotermi dolayısı ile vasküler spazmın profilaksisine bağlıdır. 2. grupta hipotermi sırasında tubülüs epitel hücreleri daha iyi korunmuştu ki, bu da EC solüsyonunun kapilerlere daha iyi ulaşması ile izah edilebilir. 72 ve 96 saat koruma sonrası 2. grupta damar endoteliumunda dejenerasyon 1. gruba oranla daha hafif idi. Bu durum kapiler lümenindeki eritrositlerin endoteliuma baskı yaparak dejeneratif değişiklikleri artırdığını göstermektedir.

Sonuç

Yıkama parametrelerinde ve EM incelemelerde görülen değişiklikler aşamalı hipotermik yıkama yönteminin allograftın inisiyal perfüzyon kalitesini iyileştirdiğini ve koruma sırasındaki iskemik hasarları azalttığını düşündürmektedir. Kanımızca aşamalı uygulanan hipotermik yıkama soğğun etkisinden dolayı oluşan vazokonstriksiyonu perfüzyonun ilk aşamasında önleyerek, organın kapilerlerinde eritrosit agregasyonunu azaltmakta ve buna bağlı olarak da reperfüzyon sırasında daha iyi mikrosirkülasyon için olanak sağlamaktadır.

Kaynaklar

1. Barber, W.H., Hudson, S.L., Derierhoi, M.H., et al: Pulsatile perfusion preservation: Early posttransplant dialysis requirement predicts rapid graft loss. *Transplant Proc* 1990; 22(2): 446-7.
2. Troppmann, C., Gillingham, J.K., Benedetto, E., et al.: Delayed graft function, acute rejection, and outcome after adaver renal transplantation. *Transplantation*, 59(7): 962-8, 1995.
3. Anaise, D., Ramsammy, L., Lane, B., Waltzer, W.C. and Rapoport, F.T.: The pathophysiology of the No-Reflow phenomenon in cold-stored kidneys. *Transplantation Proc*, 1: 1348-52, 1987.
4. Mason, J., Welsch, J., Torhorst, J.: The contribution of vascular obstruction to the functional defect that follows renal ischaemia. *Kidney Int.*, 31: 65-71, 1987.
5. Booster, M.N., Wijnen, R.M.H., Yin, M., et al.: Enhanced resistance to the effect of normothermic ischaemia in kidneys using pulsatile machine perfusion. *Transplant Proc*, 25(6): 3006-11, 1993.
6. Memmedođlu, A., Yiğitbaşı, R., Kalafat, H., Özbay, G., Şenyüz, O.F., Sarıyar, M.: Renal transplantasyonda hipotermik perfüzyonun allograft üzerine etkisi. *Klinik ve Deneysel Cerrahi Dergisi*, 4: 65-69, 1996.
7. Mason, J., Welsch, J., Torhorst, J.: The contribution of vascular obstruction to the functional defect that follows renal ischaemia. *Kidney Int.*, 31: 65-71, 1987.
8. Kozaki, K., Sakurai, E., Tamaki, I., Et al.: Usefulness of continuous hypothermic perfusion preservation for cadaveric renal grafts in poor condition. *Transplant Proc*. 27(1): 757-8, 1995.
9. Jos, V.J., Connolly, J.K., Deardon, D., Pearson, C.R., Parrott, R.N., Johnson, R.W.G.: Evidence that late perfusion does not influence delayed allograft function. *Transplantation*, 58(3): 389-90, 1994.
10. Weed, R.I., La Celle, P.L. and Merrill, E.W.: Metabolic dependence of red cell deformability. *J. Clin. Invest*, 48: 795-809, 1969.
11. Monden, K., Arii, S., Ishiguro, S. et al.: Involvement of ICAM-1 expression on sinusoidal endothelial cell and neutrophil adherence in the reperfusion injury of cold preserved livers. *Transplant Proc*, 27(1): 759-61, 1995.
12. Harvig, B., Engberg, A., Ericsson, J.L.: Effects of cold ischaemia on the preserved and transplanted rat kidney. Structural changes of the proximal tubule. *Virchows Arch.*, B 34: 153-71, 1980.