




İskemi/Reperfüzyon Hasarı Sonrası İloprost ile Tedavi Edilen Sıçanlarda Tuba Uterina Dokusunun Histopatolojik Değerlendirilmesi**Histopathological Evaluation of the Uterine Tube Tissue in Iloprost Treated Rats After Ischemia / Reperfusion Injury**

¹ Ebru ANNAÇ
² Talip KARAÇOR
³ Zümrüt DOĞAN

 orcid.org/0000-0001-9726-5846
 orcid.org/0000-0003-1349-1569
 orcid.org/0000-0001-7131-2317

¹ Adıyaman Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Adıyaman, Türkiye

² Adıyaman Üniversitesi Tıp Fakültesi, Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı, Adıyaman, Türkiye

³ Adıyaman Üniversitesi Tıp Fakültesi, Anatomi Anabilim Dalı, Adıyaman, Türkiye

ÖZ

Amaç: Sunulan çalışmada sıçanlarda oluşan I/R hasarı sonrasında tuba uterina dokusu üzerinde antioksidan özelliği olan iloprostun koruyucu etkisinin olup olmadığının değerlendirilmesi amaçlandı.

Gereç ve Yöntemler: Çalışmamızda; 32 dişi Sprague Dawley sıçan kullanıldı. Gruplar sham, torsiyon, detorsiyon ve detorsiyon + iloprost olarak belirlendi. Sham grubu hariç diğer ratlara torsiyon işlemi yapıldı. Torsiyon grubuna üç saat torsiyon, detorsiyon grubuna 3 saat torsiyon + 3 saat detorsiyon, I/R + iloprost grubuna 3 saat torsiyon + 3 saat detorsiyon ve detorsiyon başlangıcında 60 dk intravenöz iloprost infüzyonu yapıldı. Histopatolojik değerlendirme için alınan tuba uterina dokularının histolojik takibi yapıldı. Sonrasında 7 mikron kalınlıkta kesitler alındı ve Hematoksilin-Eozin (H-E) boyası ile boyandı. Alınan kesitler üzerinde ışık mikroskopik inceleme yapıldı.

Bulgular: Tuba uterinada yapılan incelemelerde kontrol grubunda herhangi bir histopatolojik bulguya rastlanmadı. Kontrol grubundan farklı olarak torsiyon grubunda vasküler tıkanıklık ve epitelde vakuolleşme meydana geldi. Detorsiyon grubunda epitelin bütünlüğünün bozulduğu gözlemlendi. İloprost uygulanan gruba ait görüntülerde hemorajik alanlar dışında herhangi bir histopatolojik duruma rastlanmadı. Bununla birlikte, bütün gruplarda bağ doku, muskuler alanlar ve seroza tabakaları normaldi.

Sonuç: Antioksidan ve vazodilatör etkisi nedeniyle tedavi amaçlı kullanılan iloprostun sıçan tuba uterina dokusu üzerinde I/R hasarı sonrasında korucu etkisinin olduğu gözlemlendi. Bu sonuçlar doğrultusunda organın tekrar fonksiyone edilmesi ile torsiyone olan tarafta ektopik gebelik riskinin azaltılabileceği düşünüldü.

Anahtar Kelimeler: İskemi/Reperfüzyon, İloprost, Histopatoloji, Sıçan

ABSTRACT

Aim: The aim of this study was to evaluate whether there is a protective effect of iloprost which has antioxidant properties on tuba uterine tissue after I/R injury in rats.

Materials and Method: In our study; 32 female Sprague Dawley rats were used. The groups were determined as sham, torsion, detorsion and detorsion + iloprost. Torsion was performed in all rats except sham group. Three hours of torsion in the torsion group, 3 hours of torsion in the detorsion group + 3 hours of torsion, 3 hours of torsion in the I/R + iloprost group, 3 hours of torsion and 60 minutes of intravenous iloprost infusion at the beginning of detorsion. Histological follow-up of the tuba uterine tissues were performed for histopathological evaluation. Then, 7 micron thick sections were taken and stained with Hematoxylin-Eosin (H-E) stain. Light microscopic examination was performed on the sections.

Results: No histopathological findings were found in the control group in the uterine examinations. Unlike the control group, vascular occlusion and vacuolization of the epithelium occurred in the torsion group. In the detorsion group, the integrity of the epithelium was observed. No histopathologic condition was found in the images of the iloprost group except for the hemorrhagic areas. However, connective tissue, muscular areas and serosa layers were normal in all groups.

Conclusion: It was observed that iloprost used for treatment because of antioxidant and vasodilator effect had protective effect on rat tuba uterine tissue after I/R injury. In line with these results, it was thought that the risk of ectopic pregnancy on the torsion side could be reduced by re-functionalizing the organ.

Keywords: Ischemia/Reperfusion, iloprost, Histopathology, Rat.

GİRİŞ

Over ve tuba uterinaları da içerebilen adneksiyal torsiyon (AT) özellikle reproduktif dönemde daha fazla görülür. Bu durum postmenopozal kadınlar ve çocuklarda ciddi sağlık sorunlarına yol açabilecek jinekolojik acillerden biridir (1). Non spesifik semptomlar söz konusu olduğu için AT tanısını belirleyebilmek zordur. Bu nedenle akut karın ağrısı şikayeti ile gelen her

kadında bu tanı akla gelmelidir (2). Torsiyon, organların kendi vasküler yolları çevresinde kan akımını bozacak şekilde rotasyonu olarak tanımlanmaktadır. Kan akımının bozulması, ilgili dokularda nekroza sebep olabilir, dolayısıyla rotasyona maruz kalma süresi önemlidir. Süre uzadıkça tedaviye cevap vermeyen doku hasarları olma riski artacaktır.

Sorumlu Yazar/ Corresponding Author:

Ebru ANNAÇ, PhD
Adıyaman Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji A.D., Adıyaman, Türkiye
E-mail: ebruellibol55@gmail.com

Başvuru tarihi: 17.07.2019

Kabul tarihi: : 04.12.2019

Uzun süreli iskemiler hariç birçok torsiyone uğramış olgu da organların fonksiyonlarını koruduğu belirtilmiştir. Bu gibi durumlarla karşılaşmamak için erken tanı konulması kaçınılmazdır. Tanının koyulmasıyla birlikte tedavi detorsiyon yapmaktır (3).

Detorsiyone edilmiş organlarda reperfüzyonuna bağlı olarak bazı lokal ve sistemik bazı etkiler ortaya çıkabilir. Organların bu şekilde tekrar kanlanması I/R (İskemi/Reperfüzyon) hasarına neden olabilir (4). Devam eden iskemide mitokondrielerde vakuolizasyon ve lizozomlarda şişme, hücre zarı bütünlüğünün bozulması ve hücre içindeki sıvıda bulunan kalsiyum oranında artış nedeniyle hücrelerde ve dokularda geri dönüşü olmayan hasarlar ortaya çıkmaktadır (5). Hücrenin iskeleti ile membranın yapısında bulunan fosfolipitlerin bozulmasına sebep olan proteaz ve fosfatazların aktive olması sonucunda serbest oksijen radikallerinin (SOR) oluşması oksidatif stresin ortaya çıkmasına neden olur (6). İskemi esnasında SOR düşük miktarda oluşurken; reperfüzyon sırasında dokudaki tekrar oksijenlenme çok daha büyük seviyelerde SOR oluşumuna ve lipid peroksidasyonuna neden olmakta ve bu da dokudaki hasarı arttırmaktadır (8). Oksidatif stresin ortaya çıkmasına neden olan SOR ve dokular üzerinde oluşturdukları hasarların önlenmesi için antioksidanlar kullanılabilir. Bu amaçla birçok farklı kimyasal antioksidan olarak I/R hasarını engellemek için kullanılmaktadır (8, 9, 10). Son zamanlarda antioksidan etkisinin olması ve dokudaki hasarları önleyici özelliğiyle bilinen iloprost I/R hasarında kullanılmaktadır (11,12). Bu deneysel çalışmada sıçanlarda yapılan tuba uterina torsiyonunda, dokuda gelişen I/R hasarı üzerine iloprostun olası koruyucu etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEMLER

Çalışmada 280 - 300 gr ağırlığında 32 adet genç erişkin Spraque Dawley cinsi dişi sıçanlar kullanıldı. Hayvanlar rastgele olarak 4 gruba ayrıldı. Çalışmanın etik onayı Adıyaman Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu (ADYÜ-HADYEK) tarafından verildi (onay no: 2019/033). Sıçanlar $22 \pm 20^\circ\text{C}$ oda ısıda ve 12'şer saat aydınlık - karanlık ışık döngüsüne sahip odalarda yem ve su ad-libitum olacak şekilde barındırıldı. Gruplar;

Grup 1 Sham (kontrol): Alt karın bölgesine yaklaşık 2 cm insizyon yapıldı ve tuba uterina 1 dakika boyunca gözlemlendi ve sonra karın duvarı sütürle kapatıldı. 3 saat sonra relaparotomi uygulaması ile tuba uterina dokuları cerrahi işlemle çıkarıldı.

Grup 2 İskemi (Torsiyon): Tuba uterina dokularını içeren adneks, kan akımı kesilecek şekilde saat yönünde 360 derece döndürüldü ve karın duvarına sabitlendi (13). 3 saat süren iskemisi sonrasında, relaparotomi uygulaması ile tuba uterina doku-

ları cerrahi işlemle çıkarıldı.

Grup 3 İskemi (Torsiyon) / Reperfüzyon (Detorsiyon): 3 saatlik iskemisi sonrasında 3 saat reperfüzyon uygulandı. Toplam 6 saatin sonunda tuba uterina dokuları relaparotomi ile cerrahi olarak çıkarıldı.

Grup 4 (İskemi - Torsiyon / Reperfüzyon - Detorsiyon + İloprost): Adnekslere 3 saatlik iskemisi uygulandı. Reperfüzyon işleminden 10 dk önce Juguler vene takılan kataterden (IV Cannula 24 gr (Yellow) 19 mm x 50 Braun Vasofix) 0,5 ng/kg/dk dozda iloprost (10 µg/kg, iv; Ilomedin @Schering, Berlin, Germany) infüzyonuna başlandı (11). İloprost infüzyonu reperfüzyonun ilk 1 saati boyunca devam etti. İloprost infüzyonu sonrasında 2 saat daha reperfüzyon süresi beklendi. Toplam 6 saat sonunda tuba uterina dokuları cerrahi olarak çıkarıldı.

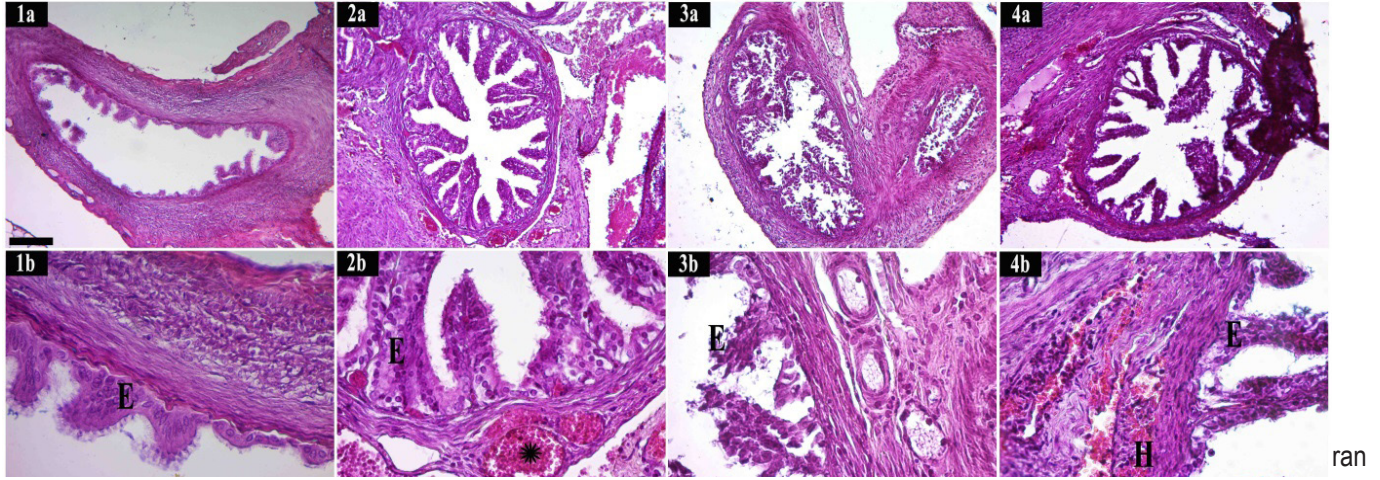
Sıçanlara anestezi için ketamin hidroklorür (50 mg / kg Ketalar; Eczacıbaşı, İstanbul, Türkiye) ve ksilazin hidroklorür (10 mg / kg Rompun; Bayer Türk İlaç Ltd. Şti.), veteriner hekim gözetiminde intramusküler olarak ile yapıldı. Anestezisi altında alınan tuba uterina dokuları histopatolojik incelemelerde kullanılmak için %10 luk formaldehit de fikse edildi. Fikse edilen dokular rutin histolojik doku takibi prosedürüne tabi tutuldu. Takibi tamamlanan dokular parafin blok haline getirildi. Bloklardan histopatolojik inceleme yapılabilmesi için 5 µm kalınlıkta kesitler alındı. Elde edilen kesitler boyama yöntemi ile boyandı. Boyanan kesitler Hematoksilen-Eozin (H-E) Carl Zeiss marka Axiocam ERc5 model dijital kamera ataçmanlı mikroskop ile incelenerek histopatolojik yönden değerlendirildi.

HİSTOPATOLOJİK BULGULAR

Tuba uterinada yapılan incelemelerde grup 1 e ait görüntülerde epitel tek sıralı prizmatik ve altında destek dokusu olan lamina propria normal görünümdeydi. Epitelde bulunan silyalı hücreler belirgindi. Tunica muskularis'in içte enlemesine dışta uzunlamasına yerleşik düz kas liflerinden oluştuğu görülmekteydi. Organ dıştan seroza ile sarılıydı. Epitel ve diğer yapılar normal görünümdeydi (Şekil 1a ve 1b). Kontrol grubundan farklı olarak Grup 2 ye ait görüntülerde aşırı vasküler tıkanıklık ve epitelde vakuolleşme gözlemlendi (Şekil 2a ve 2b). Grup 3 e ait incelemede epitelin bazı bölgelerde kübikleştiği epitelin bütünlüğünün bozulduğu dikkat çekti. Bağ dokuda ve diğer tabakalarda anormal bir görüntü yoktu (Şekil 3a ve 3b). Grup 4 e ait görüntülerde hemarajik alanların olduğu gözlemlendi (Şekil 4a ve 4b). Bütün gruplarda bağ doku, muskuler alanlar ve seroza tabakaları normaldi.

Şekil.1a, 2a, 3a, 4a.

Sırasıyla grup 1, grup 2, grup 3 ve grup 4 e ait tuba uterinaların genel ışık mikroskopi görüntüsü (x10, Hematoksilen-Eozin Boyama); 1b, 2b, 3b, 4b. Sırasıyla grup 1, grup 2, grup 3 ve grup 4 e ait ışık mikroskopi görüntüsü (x40, Hematoksilen- Eosin Boyama); E, Epitel; H, Hemaraji; *, Vasküler tıkanıklık.

**TARTIŞMA**

I/R hasarı vücutta özellikle böbrek, akciğer ve kalp gibi birçok organı etkileyen patolojik bir süreçtir. Klinikte, bu zarar verici sürecin tedavisi palyatif kalmaktadır (14, 15). Çalışmada kullanılan iloprost, arterlerde vazodilatasyon, trombosit antiagregasyonu ve antioksidatif etkileri olan prostacyclin PGI₂'nin sentetik bir analogudur (16); ayrıca, iloprost enfeksiyonlar gibi değişik patolojik durumlarda olduğu gibi iskemik hasarlarda da faydalıdır (17). Sunulan çalışmada sham grubu ile torsiyon ve detorsiyon grubu histopatolojik parametreler açısından ayrı ayrı karşılaştırıldı. Tuba uterina dokusundaki histopatolojik değerlendirme sonucunda grup 2 ve 3'te epitelyal hasarın kontrole göre fazla olduğu görüldü. Torsiyon işlemi sebebiyle Grup 2 de vasküler tıkanıklık ve epitel dejenerasyonu görüldü. Grup 3 teki epitelyal dejenerasyon grup 2 ye göre fazlaydı. Dolayısıyla detorsiyon sonrası dokudaki hasar artmıştı. Aynı şekilde, I/R yapılan çalışmalarda detorsiyon grubundaki doku torsiyon hasarının, grubundakilerden daha şiddetli olduğunu gösterilmiştir (18,19). Torsiyon sonrası yetersiz kan akışı ve oksijen eksikliği nedeniyle oluşan iske mi ATP üretiminin azalmasına, laktik asit üretiminin artmasına ve lipid peroksidaz birikimine neden olur (20-22). Reperfüzyon SOR oluşur ve nötrofiller aktive edilir. Bu olaylar, mitokondriyal ve hücre zarlarındaki lipidlerin peroksidasyonu nedeniyle iskemik dokulardaki hücre sel hasarın daha da artmasına neden olur (20-24). Bu çalışmada torsiyon ve detorsiyon grubundaki histopatolojik bulgularda görülen hasarın sebebi literatürle desteklenmektedir. Hücre içi sıklık 3', 5'-ade

reseptörlerine (IP-reseptörleri) bağlanması sonucunda artmaktadır. Böylece trombosit agregasyonu geri dönüşümlü olarak güçlü şekilde inhibe edilmektedir. Benzer şekilde bu etki damar kas hücrelerinde de hücre içi cAMP seviyesini artırır. Sonuçta damar direncinin azalmasına, vazorelaksasyona ve kan akışının artmasına neden olur (25). Sunulan çalışmada mikroskobik incelemede dokularda hemoraji tespit edilse de deneysel ortamda sıçan batınına hemoraji bulgularına rastlanmadı. Ayrıca iloprost inflamatuvar süreçleri inhibe etme etkisi vardır ve bu etkisini makrofajlar, monositler ve haberci T-lenfosit gibi hücreleri stabilize ederek göstermektedir (26). İloprost bu antiinflamatuvar etkisi ile, endotelin bütünlüğünü ve damar bütünlüğünü koruyucu etkiye sahiptir (27). Grup 4'te reperfüzyon döneminde tedavide iloprostun kullanılması inflamatuvar hücre infiltrasyonunu, interstisyel ödemi, hücre sel vakualizasyonu ve sonuç olarak doku hasarını azaltmıştır. Bunlara ilaveten bu grupta iloprostun vazodilatatif etkisiyle hemarajik alanlar tespit edildi.

SONUÇ

Sunulan çalışmadaki bulgular fazla kanlanan dişi üreme sistemine ait bir organ olan tuba uterinaların kısa süreli iskemiyeye fazla duyarlı olduğunu gösterdi. Tedavi amaçlı kullanılan iloprostun sıçan tuba uterina dokusu üzerinde I/R hasarı sonrasında koruyucu etkisinin olduğu histopatolojik değerlendirmeler sonucunda gözlemlendi. Ve bulgularımız literatürle desteklenir nitelikteydi. İloprost ile müdahale torsiyon sonrası tubaların tekrar fonksiyonuna dönmesine yardımcı olur. Böylece torsiyone olan Adnex tarafında ektopik gebelik riski azalmış olur.

KAYNAKLAR

1. Gündoğdu EC, Karacaoğlu MÜ, Odacılar E, Dayan H, Aksakal GE. Adneksiyel torsiyon olgularında klinik ve cerrahi yaklaşım. *Göztepe Tıp Dergisi*. 2014; 29(4):214-8. doi:10.5222/J.GOZTE-PETRH.2014
2. Chang YJ, Yan DC, Kong MS, Wu CT, Chao HC, Luo CC, et al. Adnexal torsion in children. *Pediatric emergency care*. (8): 534-7.
3. Houry D, Abbott JT. Ovarian torsion: a fifteen-year review. *Annals of emergency medicine*. 2001;38(2):156-9.
4. Taskin O, Birincioglu M, Aydin A, Buhur A, Burak F, Yilmaz I, et al. The effects of twisted ischaemic adnexa managed by detorsion on ovarian viability and histology: an ischaemia-reperfusion rodent model. *Human reproduction*. 1998;13(10):2823-7.
5. Kumar V, Cotran RS, Robbins SL. *Basic Pathology*. 7th ed. Elsevier Publishers, 2003; pages 6-11, 531-3.
6. Yaman TS, Agacayak E, Goruk NY, Icen MS, Turgut A, Alabalik U, et al. Protective effects of honokiol on ischemia/reperfusion injury of rat ovary: an experimental study. *Drug Design, Development and Therapy*. 2016;10:1077-83.
7. McMichael M, Moore RM. Ischemia-reperfusion injury pathophysiology, Part I. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care*. (4), 231-41.
8. Suleyman B, Albayrak A, Kurt N, Demirci E, Gundogdu C, Aksoy M. The effect of etoricoxib on kidney ischemia-reperfusion injury in rats: a biochemical and immunohistochemical assessment. *International Immunopharmacology*. 2014;23:179-85.
9. Ibrahim MA, Abdel-Gaber SA, Amin EF, Ibrahim SA, Mohammed RK, Abdelrahman AM. Molecular mechanisms contributing to the protective effect of levosimendan in liver ischemiareperfusion injury. *European journal of pharmacology*. 2014;741:64-73.
10. Sak ME, Soydinc HE, Sak S, Evsen MS, Alabalik U, Akdemir F, et al. The protective effect of curcumin on ischemia-reperfusion injury in rat ovary. *International Journal of Surgery*. (9), 967-70.
11. Erer D, Dursun AD, Oktar GL, Iriz E, Zor MH, Elmas C, et al. The effects of iloprost on lung injury induced by skeletal muscle ischemia-reperfusion. *Bratislavske lekarske listy*.(7): 405-10.
12. Tiryakioglu O, Erkoc K, Tunerir B, Uysal O, Altin HF, Gunes T, et al. The effect of iloprost and N-acetylcysteine on skeletal muscle injury in an acute aortic ischemia-reperfusion model: an experimental study. *BioMed research international*. 2015; doi: 10.1155/2015/453748.
13. Ergun Y, Koc A, Dolapcioglu K, Akaydin Y, Dogruer G, Kontas T, et al. The protective effect of erythropoietin and dimethylsulfoxide on ischemia-reperfusion injury in rat ovary. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*. 2010;152(2):186-90.
14. Yassin MM, Harkin DW, Barros D'Sa AA, Halliday MI, Rowlands BJ. Lower limb ischemia reperfusion injury triggers a systemic inflammatory response and multiple organ dysfunction. *World journal of surgery*.
15. Cevirme D, Adademir T, Başaran EK, Şavluk ÖF, Elibol A, Şentürk GE, et al. Comparison between iloprost and alprostadil for protection against ischemia/reperfusion injury in a rat model. *Turkish journal of medical sciences*.
16. Erre GL, Passiu G. Antioxidant effect of Iloprost: current knowledge and therapeutic implications for systemic sclerosis. *Reumatismo*.
17. Birukova AA, Wu T, Tian Y, Meliton A, Sarich N, Tian X et al. Iloprost improves endothelial barrier function in lipopolysaccharide-induced lung injury. *European Respiratory Journal*.
18. Kart C, Aran T, Guven S, Karahan SC, Yulug E. Acute increase in plasma D-dimer level in ovarian torsion: an experimental study. *Human Reproduction*.
19. Ozat M, Gungor T, Barun S, Demirogullari B, Sokmensuer LK, Gulbahar O, et al. The effects of iloprost, a prostacyclin analogue, in experimental ischaemia/ reperfusion injury in rat ovaries. *Experimental and Toxicologic Pathology*. 2009;61(5):519-27.
20. Kuroda S, Siesjo BK. Reperfusion damage following focal ischemia: pathophysiology and therapeutic windows. *Clinical Neuroscience (New York, NY)*.1997;4(4):199-212.
21. Land WG. The role of postischemic reperfusion injury and other nonantigen dependent inflammatory pathways in transplantation. *Transplantation*. 2005;79(5):505-14.
22. Baker GL, Corry RJ, Autor AP. Oxygen free radical induced damage in kidneys subjected to warm ischemia and reperfusion: protective effect of superoxide dismutase. *Annals of surgery*. 1985;202(5):628-41.
23. Sahin FK, Cosar E, Koken G, Toy HK, Buyukbas S. Protective effect of aprotinin on ischemia-reperfusion injury in rat ovary. *Journal of Obstetrics and Gynaecology Research*. 2008;34(5):794-800.
24. McCord JM. Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. *New England Journal of Medicine*. 1985;312(3):159-63.
25. Schermuly RT, Yilmaz H, Ghofrani HA, Woyda K, Pulamsetti S, Schulz A, et al. Inhaled iloprost reverses vascular remodeling in chronic experimental pulmonary hypertension. *American journal of respiratory and critical care medicine*.

26. Gombert-Maitland M, Olschewski H. Prostacyclin therapies for the treatment of pulmonary arterial hypertension. European respiratory journal.

27. Hsu HH, Rubin LJ. Iloprost inhalation solution for the treatment of pulmonary arterial hypertension. Expert opinion on pharmacotherapy.