

SIÇANLARDA, HEMORAJİK ŞOK VE REPERFÜZYON SONRASI  
GÖRÜLEN ORGAN HASARINDA SİKLOSPORİN A'NIN ROLÜROLE OF CYCLOSPORINE A ON ORGAN INJURY SEEN AFTER HEMORRHAGIC  
SHOCK AND REPERFUSION IN RATSDr. M Süphan ERTÜRK\* Dr. Ertuğrul GAZİOĞLU\* Dr. Dildar KONUKOĞLU\*\* Dr. Şennur İLVAN\*\*\* Dr. Ali ŞAHİN\*  
Dr. Osman ŞENEL\*\*\*\* Dr. Serap ARIKAN\*\* Dr. Oğuz ÇETİNKALE\*\*\*\*\* Dr. Serdar YÜCEYAR \*

**ÖZET:** İskemiye maruz kalan organlarda, reperfüzyon sonrası görülen hasarın (I-R hasarı) ortaya çıkmasında nötrofiller önemli rol oynamaktadır. Nötrofil aracılığıyla gelişen I-R hasarını önlemek amacıyla, deneysel koşullarda, çeşitli maddelerin yanısıra siklosporin A (CsA) ve FK506 gibi immünosupresif ajanlar da kullanılmıştır. Ancak immünosupresiflerin nötrofiller üzerindeki etki mekanizmaları henüz tam olarak anlaşılamamıştır. Hipovolemik şok oluşturulan sıçanlarda, nötrofil aracılığıyla oluşan I-R hasarına CsA'nın etkilerini araştırmayı amaçladık. Çalışmamızda, her biri 10 dişi Wistar albino sıçan içeren 4 grup oluşturuldu. G1: Kontrol, G2: Şok, G3: Şok+Reperfüzyon, G4: CsA. Şok oluşturmak için, deneklerden femoral ven yoluyla yaklaşık 2,5 ml kan alındı. Reperfüzyon gruplarında, alınan kan 20 dk sonra aynı yoldan reperfüze edildi. G4'te, reperfüzyondan 5 dk önce IV 20 mg/kg CsA verildi. Postop 24.cü saatte sakrifiye edilen deneklerde plazmada malonildialdehit (MDA); karaciğer, akciğer, ince barsak ve böbreklerde ise MDA ve miyeloperoksidaz (MPO) ölçümü ve nötrofil sayımı yapıldı. I-R sonrası plazma ve tüm dokularda artan MDA değerleri, CsA verildikten sonra normale inmiştir. Bu bulgular, I-R hasarında serbest oksijen radikallerinin (SOR) rolünü göstermektedir. Ancak, MPO değerleri CsA verilmesi ile sadece ince barsakta normale inmiştir. CsA'nın nötrofil infiltrasyonunu azaltıcı etkileri de yine ince barsak ve böbrekte görülmüştür. Sonuç olarak, CsA tedavisinin I-R hasarını azaltıcı yönde etkiye sahip olduğu saptanmıştır. Ancak bu etkinin, en azından karaciğer ve akciğerde, nötrofil infiltrasyonunu azaltmak yoluyla olmadığını düşünmekteyiz. CsA'nın dozu artırıldığı taktirde, bu etki belki tüm dokularda yaygınlaşabilir. CsA'nın I-R hasarındaki etki mekanizmasının tam olarak anlaşılabilmesi için yeni araştırmalara ihtiyaç vardır.

**SUMMARY:** Neutrophils are an important factor in the organ injury associated with ischemia and reperfusion (I-R). In experimental conditions, besides many chemicals, immunosuppressive agents like cyclosporine A (CsA) and FK506 were also used to prevent I-R injury. But effect of immunosuppressives on neutrophils still remains unclear. We designed an experimental study to investigate the role of CsA in organ injury after hemorrhagic shock and reperfusion in rats. Forty Wistar albino rats were divided into 4 groups. G1: Control, G2: Shock, G3: Shock + Reperfusion, G4: CsA. Shock was induced by withdrawing of 2,5 ml blood via femoral vein. The shed blood was then reinfused after 20 min in reperfusion groups. In G4, CsA (20 mg/kg) was given by a single IV injection just before (5 min) the perfusion. Rats were sacrificed 24 hours after operation. Plasma malondialdehyde (MDA) levels of all groups and, MDA and myeloperoxidase (MPO) levels of liver, lung, small bowel and kidney were measured. In addition, neutrophil counts were obtained from all organs. After I-R, MDA levels of plasma and all organs increased and then returned to normal by CsA administration. This observations revealed the role of free oxygene radicals in I-R injury. But CsA-induced MPO decrease was obtained in only small bowel. In addition, reduction in neutrophil infiltration by CsA was seen in small bowel and kidney. We concluded that, CsA has a beneficial effect on I-R-induced organ injury. But, at least in liver and lung, these results couldnt attributed to reduced neutrophil infiltration. However, increase of CsA dose may cause widespread reduction in neutrophil counts. gFurther investigations are necessary to clarify the exact role of CsA on I-R injury.

\* İÜ Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Genel Cerrahi ABD  
\*\* İÜ Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Biokimya ABD  
\*\*\* İÜ Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Patolojik Anatomi ABD  
\*\*\*\* İÜ Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Plastik ve Rekonstrüktif Cerrahi ABD

Yazışma Adresi: Dr. M. Süphan ERTÜRK  
Emniyet Evleri Mah. Cem Sultan Sok. Doğu Apt. 13/4 80650  
4. Levent - İSTANBUL

Son yıllarda, iskemiye maruz kalan dokuların reperfüzyonu sırasında ortaya çıkan patolojik değişiklikler (iskemi-reperfüzyon hasarı), yoğun araştırmalara konu olmaktadır. İskemi reperfüzyon (İ-R) hasarının oluşumunda serbest oksijen radikalleri (SOR), nötrofiller ve endotel hücreleri suçlanan faktörler arasındadır (1,2,3). SOR, reperfüzyon sırasında açığa çıkan ve hücre

hasarından sorumlu olan çok aktif bileşiklerdir. Son zamanlara dek, nötrofillerin iskemik dokuların iyileşmesi sürecine yardımcı olduğuna inanılırdı (4). Ancak nötrofillerin, İ-R hasarının patogeneziindeki rolleri çeşitli araştırmacılar tarafından ortaya konmuştur (2,4,5,6,7). Şok ve iskeminin, lökositlerin yokluğunda daha iyi tolere edildiği bildirilmiştir (4). Nötrofiller etkilerini, sentezledikleri SOR ve proteolitik enzimler aracılığıyla gösterirler. SOR'nin en önemli kaynaklarından biri nötrofillerdir (8).

İ-R hasarının oluşumunda nötrofillerin endotel hücrelerine yapışması (adhezyon) kritik öneme sahiptir. Böylece dış ortama kapalı bir mikro çevre oluşarak, SOR'nin inaktivasyonu engellenir. Endotel hasarı ve bunu takip eden bir dizi olay hücre ölümüne dek ilerler (4,9). Adhezyonu engellemek amacıyla, nötrofiller ve endotel hücreleri üzerindeki reseptörlere karşı üretilen antikorların verilmesinin İ-R hasarını azalttığı gösterilmiştir (6,10,11).

Siklosporin A (CsA) ve FK506 gibi immünsupresif ajanlar, İ-R koşullarında değişik organlarda nötrofil infiltrasyonunu ve doku hasarını azaltmaktadırlar (1,12,13,14). Ancak etki mekanizmaları tam olarak aydınlatılamamıştır. Ayrıca, literatürde şok modeli üzerinde CsA'nın İ-R hasarına etkileri ile ilgili çalışmalara rastlayamadık. Bu nedenle, hipovolemik şoka bağlı iskemi ve reperfüzyon üzerine CsA'nın etkilerini araştırmayı amaçladık

## MATERYAL - METOT

Çalışmamız, İÜ Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Genel Cerrahi Anabilim Dalı Deneysel Çalışma Laboratuvarı'nda gerçekleştirildi. Çalışmada, ağırlıkları 210-250 (ort. 225) gr arasında değişen 40 adet dişi Wistar albino sıçan kullanıldı. Denekler laboratuvar koşullarında, su ve yemlerine serbestçe ulaşabildikleri metal kafeslerde korundular. Denekler, herbiri 10 sıçan içeren 4 gruba ayrıldı. Grup-1: kontrol (K); Grup-2: şok (Ş); Grup-3: şok+reperfüzyon (R); Grup-4: siklosporin A (CsA) tedavi grubu.

1- Teknik: İntraperitoneal 40 mg/kg pentobarbital ile genel anestezi sağlandıktan sonra, elektrikli traş makinası ile sağ inguinal bölge traş edildi. Grup 1'de, steril koşullarda inguinal kesi ile sağ femoral vane ulaşıldıktan sonra prepare edilerek bırakıldı. Grup 2'de, sağ femoral ven No: 24 Branül ile kanüle edildikten sonra hipovolemik şok oluşturmak üzere ortalama 2,5 cc (vücut ağırlığının %20'si) kan alındı. Grup 3'te yine aynı şekilde 20 dk süreyle hipovolemik şok oluşturulduktan sonra, alınan sitratlı kan oda ısısında saklandı ve süre dolduğunda femoral vendeki kanül aracılığıyla reperfüze edildi. Grup 4'te ise, 20 dk süreyle hipovolemik şok oluşturulan deneklere reperfüzyondan 5 dk önce IV yolla 20 mg/kg siklosporin A (CsA) verildi.

Denekler, şok sonrası 24.cü saatte eter anestezisi ile

uyutulduktan sonra median sternotomi ve laparotomi yapıldı. İntrakardiyak ponksiyon ile tüm kan aspire edildi. Alınan kan santrifüje edilerek, serumu malonil dialdehit (MDA) ölçümü için ayrıldı. Daha sonra akciğer, karaciğer, her iki böbrek ve 3 cm uzunluğunda terminal ileum çıkartıldı. Çıkartılan tüm dokular üç bölüme ayrılarak bir bölümü histopatolojik inceleme için % 10'luk formole kondu. Diğer iki parça ise, MDA ve miyeloperoksidaz (MPO) ölçümü için derin dondurucuda saklandı.

2- MPO ölçümü: Derin dondurucuda -80°C'de saklanan dokular, eritilerek tartıldı ve 1 gramı 10 volüm KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (20 mmol) içinde 7.4 pH'da homojenize edildi. Homogenat 20 dk süreyle 20000 g'de ve 4°C'de santrifüje edildi. Pelet 50 mM potasyum fosfat tamponlu (pH 6.0) 10 volüm buzlu suda homojenize edilerek, MPO aktivitesi (U/gr yaş doku) standart spektrofotometrik teknikte saptandı (15,16).

3- MDA ölçümü: Homojenatlar, 1 gr yaş dokuya 9 ml potasyum fosfat tamponu eklenerek hazırlandı. Tiobarbitürik asit ile reaksiyona dayanan kalorimetrik yöntem kullanılarak MDA ölçümü (plazmada: nmol/ml; dokuda: nmol/100 mg protein) yapıldı (17,18).

4- Histopatolojik inceleme: % 10'luk formalinde fikse edilmiş, parafine gömülü dokulardan hazırlanan 5 m'luk kesitler hematoksilin-eozin ile boyandı. Işık mikroskopunda, rastgele seçilen 10 büyük büyütme (x400) alanındaki nötrofil sayısı belirlenerek aritmetik ortalaması alındı.

5- İstatistiksel değerlendirme: Çalışmamızda gruplar arasındaki karşılaştırmalar unpaired two-tailed Student's t testi kullanılarak yapıldı ve p < 0.05 değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

## BULGULAR

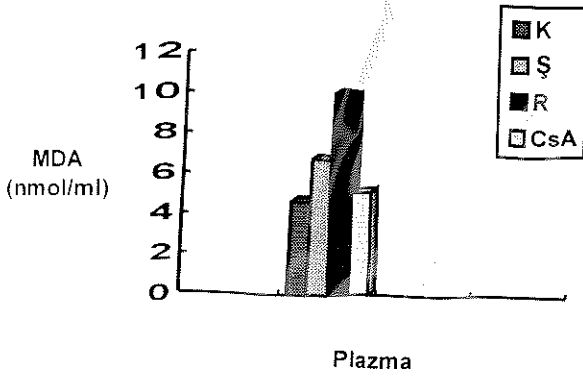
Hipovolemik şoka bağlı olarak, belirtilen çalışma süresince denek kaybımız olmadı. Deneklere ait plazma MDA ölçümleri Tablo 1 ve Grafik 1'de görülmektedir. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, şok (p < 0.02) ve reperfüzyon (p < 0.01) gruplarında SOR sentezini indirekt olarak yansıtan MDA değerlerinde anlamlı artış dikkati çekmektedir. CsA verilen grupta ise MDA değerlerinde şok ve reperfüzyona göre düşüş göze çarpmaktadır ve kontrol grubu ile aralarında istatistiksel fark yoktur. Şok, reperfüzyon ve CsA grupları arasında anlamlı düzeyde farklılık saptanmıştır (p < 0.05)

Tablo 1: Plazma MDA Ölçümleri (nmol/ml)

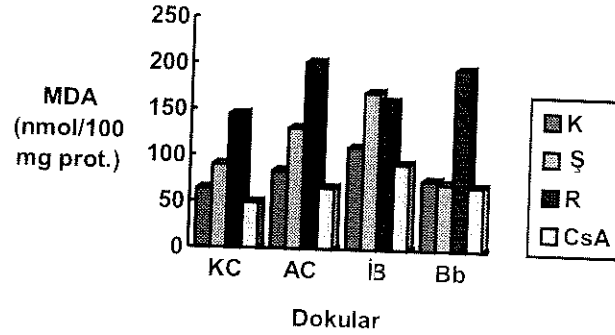
GRUPLAR	n	Ortalama ± SD	p *	p **	p ***
Kontrol	10	4.59 ± 0.50	-		
Şok	10	6.73 ± 1.23	<0.02	-	
Reperfüzyon	10	10.06 ± 1.77	<0.01	<0.01	-
CsA	10	5.14 ± 0.39	NS	<0.01	<0.0001

K. kontrol, Ş: şok, R: reperfüzyon, CsA: siklosporin A; NS: Not significant; p\*: K ile, p\*\*: Ş ile, p\*\*\*: R ile diğer gruplar arasındaki farklılık.

Grafik I: Plazma MDA ölçümleri (nmol/ml)



Grafik II: Dokularda MDA ölçümleri (nmol/100 mg protein)



Tablo 2 ve Grafik 2, dokulardaki MDA değerlerini toplu olarak vermektedir. Karaciğer dokusunda, kontrol grubu ile diğer gruplar arasında anlamlı farklılıklar saptanmıştır. MDA değerleri şokta artmakta ve reperfüzyon sırasında en yüksek seviyesine ulaşmaktadır ( $p < 0.05$ ,  $p < 0.005$ ). CsA verildiğinde ise MDA, kontrol grubuna ait değerlerin bile altına düşmektedir ve aralarındaki fark anlamlı bulunmuştur ( $p < 0.02$ ). Benzer şekilde, akciğer dokusunda da MDA değerleri kontrole göre şok ve reperfüzyon grubunda giderek artmaktadır ( $p < 0.002$  ve  $p < 0.0001$ ). CsA verilen grupta ise, MDA seviyesi düşmektedir ve kontrol grubu ile aralarında anlamlı fark saptanmamıştır. İnce barsakta, kontrol grubu ile Ş ve R arasında anlamlı fark vardır ( $p < 0.002$  ve  $p < 0.01$ ). CsA grubunda ise, MDA kontrol grubunun da altına inmiştir.

Ayrıca, şok ve reperfüzyon arasındaki fark da anlamsızdır. Böbrek dokusunda, şoktaki deneklerde MDA'da anlamlı artış görülmemiştir. Ancak reperfüzyon grubunda kontrole göre önemli artış gözlenmiştir ( $p < 0.0001$ ). CsA verildiğinde ise değerlerin normale indiği görülmektedir. Tüm veriler birlikte değerlendirildiğinde, dokularda MDA ölçümlerinin Ş ve R koşullarında arttığı ve CsA verilmesi ile tüm gruplarda normal düzeye indirilebileceği söylenebilir.

Çalışılan tüm dokularda MPO değerleri şok ve reperfüzyon ile artmış ve CsA tedavisi ile düşüş gözlenmiştir. Bu değişiklikler Tablo 3 ve Grafik 3'te görülmektedir. Karaciğerde, kontrol grubu ile diğer gruplar arasında anlamlı farklılık vardır. Nötrofil infiltrasyonunu gösteren MPO değerleri şok ve reperfüzyon gruplarında giderek artmakta ( $p < 0.02$ ,

Tablo II: Dokularda MDA ölçümleri (nmol/100 mg protein)

GRUPLAR	n	Ortalama $\pm$ SD	p*	p**	p***
<b>Karaciğer</b>					
Kontrol	10	63.07 $\pm$ 9.85	-	-	-
Şok	10	89.58 $\pm$ 19.37	<0.05	-	-
Reperfüzyon	10	144.42 $\pm$ 20.43	<0.005	<0.002	-
CsA	10	48.96 $\pm$ 4.95	<0.002	<0.001	-
<b>Akciğer</b>					
Kontrol	10	83.35 $\pm$ 12.38	-	-	-
Şok	10	130.25 $\pm$ 16.24	<0.002	-	-
Reperfüzyon	10	201.46 $\pm$ 18.69	<0.0001	<0.0001	-
CsA	10	65.57 $\pm$ 15.32	NS	<0.0001	<0.0001
<b>İnce barsak</b>					
Kontrol	10	109.73 $\pm$ 8.40	-	-	-
Şok	10	169.48 $\pm$ 23.34	<0.002	-	-
Reperfüzyon	10	160.48 $\pm$ 25.01	<0.01	NS	-
CsA	10	92.17 $\pm$ 21.49	NS	<0.0001	<0.0005
<b>Böbrek</b>					
Kontrol	10	74.94 $\pm$ 10.32	-	-	-
Şok	10	71.35 $\pm$ 15.12	NS	-	-
Reperfüzyon	10	195.67 $\pm$ 14.43	<0.0001	<0.0001	-
CsA	10	68.67 $\pm$ 7.57	NS	<0.0001	-

K: kontrol, Ş: şok, R: reperfüzyon, CsA: siklosporin A; NS: Not significant; p\*: K ile, p\*\*: Ş ile, p\*\*\*: R ile diğer gruplar arasındaki farklılık.

Tablo III: Dokularda MPO ölçümleri (U/gr yaş doku)

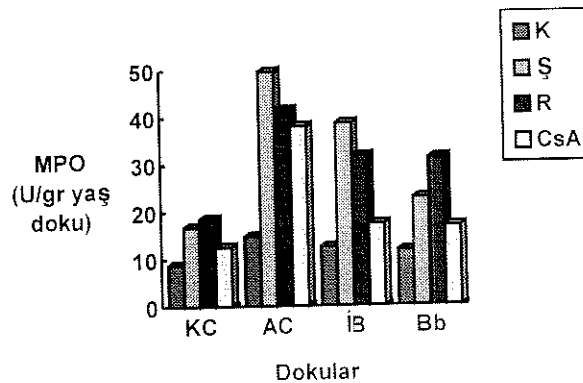
GRUPLAR	n	Ortalama ± SD	p*	p**	p***
<b>Karaciğer</b>					
Kontrol	10	8.72±1.68	-	-	-
Şok	10	16.70±4.74	<0.02	-	-
Reperfüzyon	10	18.42±3.41	<0.001	NS	-
CsA	10	12.43±2.60	<0.04	NS	<0.005
<b>Akciğer</b>					
Kontrol	10	14.68±3.07	-	-	-
Şok	10	49.58±20.20	<0.02	-	-
Reperfüzyon	10	41.40±5.24	<0.0001	NS	-
CsA	10	37.98±11.30	<0.005	NS	NS
<b>İnce barsak</b>					
Kontrol	10	12.43±1.06	-	-	-
Şok	10	38.54±16.42	<0.02	-	-
Reperfüzyon	10	31.60±9.39	<0.005	NS	-
CsA	10	17.21±4.27	NS	<0.01	<0.005
<b>Böbrek</b>					
Kontrol	10	11.60±2.55	-	-	-
Şok	10	22.71±4.12	<0.005	-	-
Reperfüzyon	10	31.10±9.33	<0.005	NS	-
CsA	10	16.72±2.92	<0.02	<0.02	<0.005

K: kontrol, Ş: şok, R: reperfüzyon, CsA: siklosporin A; NS: Not significant;  
p\*: K ile, p\*\*: Ş ile, p\*\*\*: R ile diğer gruplar arasındaki farklılık

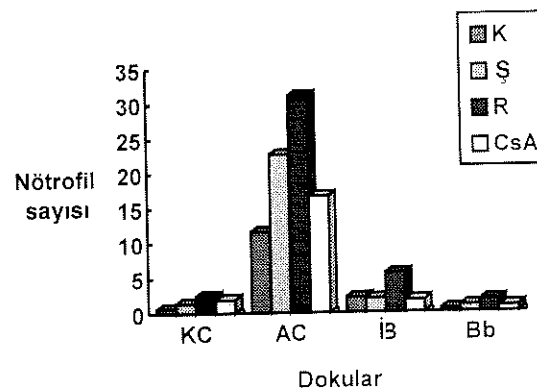
p<0.001), CsA verilmesi ile reperfüzyona göre anlamlı düşüş elde edilebilmesine rağmen (p>0.005) yine de kontrole göre yüksekliğini korumaktadır (p<0.04). Akciğerde ise MPO artışı en belirgin olarak şok grubunda gözlenmiştir. Kontrol grubu ile tüm gruplar arasında anlamlı fark vardır (p<0.02, p<0.0001 ve p<0.005) ve CsA verildiğinde MPO değeri azalmış ancak kontrol düzeyine inmemiştir. İnce barsakta da, şok ve reperfüzyon gruplarında anlamlı artış gözlenmiştir (p<0.02 ve p<0.005). Burada CsA verilmesi ile MPO değerleri kontrol grubunun düzeyine düşmüştür. Böbrekte, Ş ve R gruplarında kontrole göre anlamlı artış saptanmış (p<0.005) ve CsA verildiğinde MPO düşmeye başlamıştır. Fakat kontrol ile CsA arasındaki fark kapanmamıştır (p<0.02). Genel olarak tüm dokularda MPO düzeyi, şok ve reperfüzyon döneminde artmıştır. Ancak, şok ile reperfüzyon arasında anlamlı fark yoktur. CsA verildiğinde, akciğer dışında tüm dokularda MPO miktarında reperfüzyona göre anlamlı düşüş kaydedilmiş, sadece ince barsakta kontrol düzeyine indirilebilmiştir.

Nötrofillerin dokulardaki infiltrasyonu Tablo 4 ve Grafik 4'te verilmiştir. Şok ve reperfüzyonda karaciğer dokusunda nötrofil infiltrasyonunun giderek arttığı, CsA tedavisi ile normale inmediği görülmektedir (p<0.005, p<0.005, p<0.02). Akciğer dokusunda da nötrofil infiltrasyonu şok ve reperfüzyonda belirgin olarak artmakta CsA verilmesi ile normal sınırlara inmemektedir (p<0.01, p<0.001, p<0.001). İnce barsakta ise kontrol ve şok grupları arasında anlamlı fark yoktur. Ancak reperfüzyonda infiltrasyon anlamlı derecede artmakta (p<0.001) ve CsA ile normalin de

Grafik III: Dokularda MPO ölçümleri (U/gr yaş doku)



Grafik IV: Dokularda nötrofil sayıları



Tablo IV: Dokularda nötrofil sayımları

GRUPLAR	n	Ortalama ± SD	p*	p**	p***
<b>Karaciğer</b>					
Kontrol	10	0.65±0.7	-	-	-
Şok	10	1.41±1.48	<0.005	-	-
Reperfüzyon	10	2.44±1.66	<0.005	<0.01	-
CsA	10	1.88±2.64	<0.02	NS	NS
<b>Akciğer</b>					
Kontrol	10	11.60±2.55	-	-	-
Şok	10	22.71±4.12	<0.01	-	-
Reperfüzyon	10	31.10±9.33	<0.001	<0.001	-
CsA	10	16.72±2.92	<0.001	NS	<0.001
<b>İnce barsak</b>					
Kontrol	10	2.15±1.29	-	-	-
Şok	10	1.98±1.77	NS	-	-
Reperfüzyon	10	5.54±1.48	<0.001	<0.001	-
CsA	10	1.7±1.39	NS	NS	<0.001
<b>Böbrek</b>					
Kontrol	10	0.5±0.67	-	-	-
Şok	10	1.0±1.05	<0.01	-	-
Reperfüzyon	10	1.7±1.32	<0.001	<0.01	-
CsA	10	0.85±1.18	NS	NS	<0.001

K. kontrol, Ş: şok, R: reperfüzyon, CsA: siklosporin A; NS: Not significant; p\*: K ile, p\*\*: Ş ile, p\*\*\*: R ile diğer gruplar arasındaki farklılık.

altına indiği görülmektedir. Böbrekte şok ve reperfüzyonda anlamlı derecede artış kaydedilmiş ( $p < 0.01$ ,  $p < 0.001$ ), CsA ile normal düzeye inmiştir. Dokularda Ş ve R koşullarında nötrofil infiltrasyonunda görülen anlamlı artışın, CsA ile sadece ince barsak ve böbrekte normale düştüğü görülmüştür.

## TARTIŞMA

Organizmada çeşitli etkenlere bağlı olarak şok tablosu geliştiğinde, dokulardaki yaygın iskemiye bağlı olarak hücrel fonksiyonlar önemli ölçüde aksar. Bir süre sonra kan akımı tekrar sağlansa bile, hücrelerin fonksiyonları tam olarak geri dönememekte (no-reflow fenomeni) ve ayrıca reperfüzyona bağlı olarak dokularda ikinci bir hasar (iskemi-reperfüzyon hasarı) oluşmaktadır (19,20).

İskemi-reperfüzyon (İ-R) hasarının oluşumunda serbest oksijen radikalleri (SOR), nötrofiller ve endotel hücreleri gibi çeşitli faktörler suçlanmaktadır (1,2,3). SOR, reperfüzyona bağlı hücre hasarından sorumlu olan başlıca bileşiklerdir (4,5). İskemi sonrası reperfüzyon ve reoksijenasyon başladığında, ksantin dehidrogenaz (XD) enzimi XO'a çevrilir ve bu enzim de, O<sub>2</sub> varlığında, iskemi süresince ATP'nin parçalanması ile oluşan hipoksantin ksantine dönüşümünü katalize eder. Bu sırada yan ürün olarak süperoksit radikali (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) açığa çıkar. Süperoksit radikali daha sonra katalaz enzimi ile hidrojen peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) ya da demir (Fe<sup>++</sup>) gibi geçiş elementlerinin katalizatörlüğünde, çok daha reaktif olan hidroksil radikali (OH<sup>-</sup>) dönüşür (20). SOR adı verilen bu maddeler (O<sub>2</sub><sup>-</sup>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, OH<sup>-</sup>), hücre zarlarında ve

mitokondrilerde toksik etki gösterirler ve gelişen reperfüzyon hasarından sorumludurlar. SOR, hücre duvarında bulunan lipit moleküllerini parçalar ve lipit peroksitleri açığa çıkar. Dokularda lipit peroksidasyonu reaksiyonunun son ürünü olan MDA'nın yükselmesi ise, artmış SOR düzeyinin indirekt göstergesidir (12,13). Çalışmamızda, hipovolemik şok oluşturduğumuz deneklerde iskemiye bağlı olarak, plazma ve incelenen tüm dokularda MDA düzeyinde artma saptadık. Reperfüzyon uygulandığında, genel olarak organizmada MDA düzeyindeki yükseliş artarak devam etmekte idi. Gözlemlerimiz, şok ve reperfüzyonun organizmada SOR düzeyini arttırdığını göstermektedir. İ-R ile SOR aktivitesi arasındaki ilişkinin araştırıldığı birçok çalışmada da (3,21,22) benzer sonuçlar bildirilmiştir.

Nötrofiller, İ-R hasarında etkili olduğu ifade edilen SOR'nin en önemli kaynaklarından biridir (8). Lökositler ve özellikle nötrofillerin, İ-R hasarının patogeneğinde önemli role sahip oldukları çeşitli araştırmacılar tarafından ortaya konmuştur (2,3,4,5,6,7). Nötrofiller zararlı etkilerini çeşitli yollarla gösterirler. Nötrofiller, iskemi ya da travmaya maruz kalan endotel hücrelerinden salınan çeşitli mediatörlerin etkisiyle aktive olduklarında, çok sayıda oksidatif ve non-oksidatif toksini sentezleyip salgırlar. Bu maddelerin etkisiyle, vazomotor değişiklikler, endotel hasarı, damar bütünlüğünün kaybı, damar tıkanıklığı ve sonuçta hücrenin ölümüne dek uzanan bir dizi olay gelişir (2,4). Günümüzde yaklaşık olarak 50 kadarı belirlenebilmiş olan bu maddeler, nötrofillerin hücre duvarlarında ya da hücre içi granüllerinde bulunmaktadır (3). Hücre duvarında yer alan NADPH oksidaz enzim

sistemi, nötrofillerin spesifik bir uyarın ile uyarılmaları halinde aktifleşerek, NADPH'dan oksijene doğru elektron sıçramasına yol açar. Böylece süperoksit radikali, hidrojen peroksit ve hidroksil radikali gibi toksik SOR bileşiklerinin oluşumunu başlatır. Yine nötrofillerden ekstrasellüler ortama myeloperoksidaz (MPO) enzimi salgılanır. Eğer ortamda H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> molekülü varsa, MPO katalizatörlüğünde klor iyonu ile birleşir ve bir dizi reaksiyon sonucu oksitleyici kloraminler (N-Cl) açığa çıkar. Nötrofiller bu oksidatif toksinlerinin yanısıra, hücre içi granüllerinde yer alan çok sayıda proteolitik enzimleri aracılığıyla da İ-R hasarında rol oynarlar. Ancak, oksidatif yolla oluşan hücre hasarı çok daha ön plandadır (3).

Nötrofiller bol miktarda MPO enzimi içerirler (3). Dokulardaki nötrofil varlığının biokimyasal göstergesi olan MPO'nun kantitatif ölçümü ve nötrofillerin direkt olarak ışık mikroskobu altında sayımı, nötrofillerle ilgili birçok çalışmada parametre olarak kullanılmıştır (1,12,13,23). Biz de, dokularda nötrofil infiltrasyonunu araştırmak amacıyla bu iki parametreyi kullandık. Çalışmamızda şok ve reperfüzyon koşullarında dokulardaki nötrofil infiltrasyonunun arttığı, gerek MPO gerekse nötrofil sayısındaki artış ile desteklenmektedir. Plazma ve dokulardaki MDA düzeylerinde de benzer bir profil elde edildiğinden, şokla birlikte iskemi ve reperfüzyona maruz kalan dokularda SOR aktivitesinde görülen artışta nötrofillerin de payı olduğu sonucuna vardık. Gözlemlerimiz ilgili literatürlerle (1,4,5,12,13,24,25) uyum içindedir.

Nötrofil aracılığı ile oluşan İ-R hasarında en önemli kademe, nötrofillerin endotel yüzeyine yapışması (adhezyon) dönemidir (3,7). Nötrofillerden salınarak dolaşıma verilen SOR ve proteolitik enzimler, normalde dolaşan anti-proteazlar ve oksijen radikali toplayıcıları (scavenger) tarafından kısa sürede inaktive edilirler. Ancak nötrofiller endotel hücrelerine sıkıca yapıştığına, aralarında dış ortama kapalı bir mikro çevre (micro environment) oluşur. Böylece nötrofillerin salgıladığı proteazlar ve toksik oksijen bileşikleri inaktivasyondan kurtularak mikro çevredeki endotel hücrelerine yüksek konsantrasyonda ve sinerjistik olarak etki gösterirler. Sonuçta endotel hasarı, hücreler arasında ayrılmalar, permeabilite artışı, ödem, nötrofillerin damar dışına göçü, mikrosirkülasyonda bozulma ve hücre ölümü gelişir (9).

Nötrofillerin hücre duvarları üzerinde, nötrofilin endotele yapışmasını sağlayan ve membran glikoprotein kompleksi (CD11/CD18) adı verilen reseptörler; endotel hücreleri üzerinde ise bunların karşılığı olan adhezyon kompleksleri [ICAM-1 (Intracellüler Adhesion Molecule-1), CD54] bulunur (2,6). Nötrofiller üzerinde yer alan bu reseptörlere karşı oluşturulan monoklonal antikorların (Mab 60.3), in vivo ve in vitro koşullarda nötrofillerin yapışma yeteneklerini inhibe ettiği gösterilmiştir (10,11). Bu antikorların, yanıklarda (26), iskemik cilt flepleri ve myokardda (27,28), İ-R sonrası barsaklar (8) ve diğer organlarda (7) nötrofil aracılığıyla ortaya çıkan zararları

azalttığı ve surviyi düzelttiği bildirilmiştir. Ayrıca ICAM-1'e karşı oluşturulmuş R 6.5 antikorlarının verilmesinin de, yanık hasarının azalmasında etkili olduğu gösterilmiştir (6). Shaheen ve ark (13) iskemik ciltte nötrofil yoğunluğunun ve SOR yapımının arttığını saptamış, nötrofillere karşı hazırlanan polivalan antikorlarla nötropeni oluşturdukları ratlarda, nötrofil aktivitesini yansıtan MPO düzeyindeki ani düşüşe dikkat çekmiştir.

Daha sonra siklosporin A (CsA) ve FK506 gibi immünoşüpresif maddelerin de İ-R koşullarında karaciğer (13), cilt flabı (12,30), barsak (1) ve beyinde (15) benzer şekilde nötrofil infiltrasyonunu azalttığı bildirilmiştir. Nötrofillere bağlı İ-R hasarının, monoklonal antikorlar, nötropenik ve immünoşüpresif ajanlar kullanılarak azaltılması fakat tam olarak ortadan kaldıramaması, patogeneze farklı mekanizmaların rol oynayabileceğini düşündürmüştür (12,13). İmmünoşüpresif ajanların, nötrofil ve endotel hücreleri aracılığıyla gelişen İ-R hasarını azaltıcı etkilerinin mekanizmaları henüz tam olarak anlaşılamamıştır. Organizmada endotelden ve çeşitli inflamatuvar hücrelerden salgılanan bir mediatör olan lökotrien-B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>), uyarılmış lenfositlerden lenfokinlerin serbestleşmesine yol açarak, nötrofil infiltrasyonu kuvvetle uyarır. Kubek ve ark (1) kedilerde kan akımını % 20'ye düşürdükleri izole ince barsak segmentinde nötrofil infiltrasyonu ve SOR sentezinin arttığını, CsA ve FK506 verilen deneklerde ise reperfüzyondan sonra nötrofil infiltrasyonu ve oksidan düzeyinde belirgin azalma olduğunu saptamışlardır. Ancak aynı deneklerde LTB<sub>4</sub> düzeyindeki azalma, sadece FK506 ile sağlanabilmiştir. Bu nedenle, FK506'nın LTB<sub>4</sub>'ün azalması yoluyla da etkili olabileceğini, ancak CsA'nın etkisinin bu mekanizmadan bağımsız olması gerektiğini ifade etmişlerdir. Suzuki ve ark (13), CsA ve FK506 kullanımının İ-R sonrası karaciğerde nötrofil infiltrasyonunu ve MPO aktivitesini azaltarak surviyi olumlu etkilediğini bildirmiştir. CsA'nın İ-R hasarını azaltıcı yöndeki etkisinin, mekanizması ne olursa olsun, nötrofiller aracılığıyla olabileceği Çetinkale (12,25) ve diğer araştırmacılar (13,31) tarafından da bildirilmiştir. Çünkü önceden CsA ve FK506 verildiğinde, bu mekanizmalar etkilenmektedir. Bir diğer araştırmada, beş günden fazla CsA kullanımının endotel hücreleri üzerindeki ICAM-1 moleküllerinde % 65 oranında azalmaya yol açtığı gösterilmiştir (32). Bu molekülün nötrofil adhezyonu ve infiltrasyonu üzerindeki önemi göz önüne alındığında (2), CsA'nın olası etki mekanizmalarından birisinin de ICAM-1 aracılığıyla olduğu söylenebilir (1). Öte yandan, CsA'nın in vivo nötropeniye yol açmadığını bildiren yayınlar da vardır. Şokta, reperfüzyondan sonra kapillerlerde gelişen granülosit kaynaklı obstrüksiyonun yol açtığı yetersiz perfüzyonun (no-reflow), nötropenik deneklerde düzeldiği gözlenmiştir (19). Fleckenstein ve ark (22), sıçanlarda hemorajik şok oluşturarak lipooksijenaz inhibitörlerinin (tirilazad mesilat) surviyi düzelttiğini göstermiştir. Bu etki siklo-oksijenaz inhibitörleri

(İbuprofen), demir şelatörleri (desferal) ve XO inhibitörleri (oksigürinol) ile elde edilememiştir. Mayer ve ark (33) da hemorajik şoktan sonra reperfüzyon uygulandığında katalaz ve SOD aktivitesinin arttığını göstermiştir. Ancak şok modeli üzerinde CsA'nın İ-R hasarına yönelik etkilerini araştıran çalışmalara literatürde şu ana kadar rastlamadık.

Biz de hipovolemik şok oluşturduğumuz deneklere, reperfüzyondan önce CsA vererek İ-R hasarına olan etkisini araştırdık. Tüm dokularda, İ-R nedeniyle yükselmiş MDA değerleri, CsA verildikten sonra kontrol düzeyine inmiştir. Bu gözlemler, CsA'nın reperfüzyondan önce verilmesi durumunda SOR aktivitesinin azaltılabileceğini göstermektedir. Ancak nötrofil infiltrasyonu üzerinde CsA'nın etkileri araştırıldığında, benzer sonuçlar alınamamıştır. İnce barsak dışında diğer dokularda, reperfüzyondan önce CsA verilmesi MPO değerlerini düşürmüştür ancak kontrol düzeyine indirememiştir. Nötrofil sayısı da sadece ince barsak ve böbrekte normale inmiştir. Bu durumda, CsA'nın ince barsakta ve kısmen de böbrekte İ-R sonrası nötrofil infiltrasyonunu kontrol edebildiği, akciğer ve karaciğerde ise bu yönde etkili olmadığı görülmüştür.

Sonuç olarak çalışmamızda, hipovolemik şoka maruz kalan iskemik dokularda reperfüzyondan önce CsA verilmesinin SOR aktivitesini azalttığı saptanmıştır. Bu gözlemler CsA'nın İ-R hasarındaki olumlu etkisini ortaya koymaktadır. Ancak bu etkinin, en azından karaciğer ve akciğerde nötrofil infiltrasyonunu azaltmak yoluyla olmadığı görülmektedir. Belki de daha yüksek dozlarda, CsA'nın nötrofil infiltrasyonunu azaltıcı etkisi tüm dokularda yaygın hale gelebilir. Ayrıca, önceden de belirtildiği gibi, CsA'nın İ-R üzerindeki etkisi farklı mekanizmalarla olabilmektedir. Konunun tam olarak aydınlatılması için ileri araştırmalara ihtiyaç vardır.

## KAYNAKLAR

- 1- Kubes P, Hunter J, Granger DN: Effects of Cyclosporin A and FK506 on ischemia/reperfusion-induced neutrophil infiltration in the cat. *Dig Dis Sci* 1991; 36:1469-72.
- 2- McMillen MA, Huribal M, Sumpio B: Common pathway of endothelial-leukocyte interaction in shock, lichenia, and reperfusion. *Am J Surg* 1993; 166: 557-62.
- 3- Weiss SJ: Tissue destruction by neutrophils. *N Eng J Med* 1989; 320: 365-76.
- 4- Vedder NB, Fouty BW, Winn RK, et al: Role of neutrophils in generalized reperfusion injury associated with resuscitation from shock. *Surgery* 1989; 106: 509-16.
- 5- Hernandez LA, Grisham MB, Twohig B, et al: Role of neutrophils in ischemia-reperfusion-induced microvascular injury. *Am Physiol Soc* 1987; H699-703.
- 6- Mileski W, Gates B, Sigman A, et al: Inhibition of leukocyte adherence in a rabbit model of major thermal injury. *J Burn Care Reh* 1993; 14: 610-16.
- 7- Mileski WJ, Winn RK, Vedder NB, et al: Inhibition of CD18-dependent neutrophil adherence reduces organ injury after hemorrhagic shock in primates. *Surgery* 1990; 108: 206-12.
- 8- Schoenberg MH, Poch B, Younes M, et al: Involvement of neutrophils in postischaemic damage to the small intestine. *Gut* 1991; 32: 905-12.
- 9- Price T, Bcatty PG, Corpuz SR: In vivo inhibition of neutrophil function in the rabbit using monoclonal antibody to CD18. *J Immunol* 1987; 139: 4174-77.
- 10- Harlan JM: Consequences of leukocyte-vessel wall interaction in inflammatory and immune reactions: seminar in thrombosis and hemostasis: vessel wall 1987; 13: 434-44.
- 11- Arfors K, Lundberg C, Lindbom L, et al: A monoclonal antibody to the membrane glycoprotein complex CD18 inhibits polymorphonuclear leukocyte accumulation and plasma leakage in vivo. *Blood* 1987; 69: 338-40.
- 12- Cetinkale O, Bilgic L, Ayan F, et al: Neutrophil-mediated injury in ischemic skin flaps: Amelioration of ischemic injury by Cyclosporine in the rat. *Ann Plas Surg* 1996; 37: 66-74.
- 13- Suzuki S, Toledo-Pereyra LH, Rodriguez FJ, et al: Neutrophil infiltration as an important factor in liver ischemia and reperfusion injury. Modulating effects of FK506 and cyclosporine. *Transplantation* 1993; 55: 1265-72.
- 14- Shiga Y, Onodera H, Matsuo Y, et al: Cyclosporin A protects against ischemia-reperfusion injury in the brain. *Brain Res* 1992; 595:145-148.
- 15- Bradley PP, Priebe DA, Christensen RD, et al: Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. *J Invest Dermatol* 1982; 78: 206-9.
- 16- Renlund DG, MacFarlane JL, Christensen RD, et al: A quantitative and sensitive method for measurement of myeloperoxidase. *Clin Res* 1980; 28: 75-85.
- 17- Buege J, Aust SD: Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol* 1978; 52: 302-10.
- 18- Lowry OH, Rosenbrough NJ, Far AL, et al: Protein measurement with the jolin reagent. *J Biol Chem* 1951; 193: 265-70.
- 19- Aranda-Barroso J, Schmid-Schönbein S, Zweifach BW, et al: Granulocytes and no-reflow phenomenon in irreversible hemorrhagic shock. *Circ Res* 1987; 62: 437-47.
- 20- McCord JM: Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. *N Engl J Med* 1985; 312:159-63.
- 21- Rees R, Smith D, Li TD, et al. The role of xanthine oxidase and xanthine dehydrogenase in skin ischemia. *J Surg Res* 1994; 56:162-67.
- 22- Fleckenstein AE, Smith SL, Linseman KL, et al: Comparison of the efficacy of mechanistically different antioxidants in the rat hemorrhagic shock model. *Circ Shock* 1991; 35:223-30.
- 23- Simpson R, Alon R, Kobzik L, et al. Neutrophil and neutrophil-mediated injury in intestinal ischemia-reperfusion. *Ann Surg* 1993; 218: 444-54.

- 24- Stengle J, Meyers R, et al: Neutrophil recruitment after remote scald injury: *Journal Burn Care Rehabil* 1996; 17: 14-8.
- 25- Cetinkale O, Demir M, Sayman H.B, Ayan F et al: Effects of allopurinol, ibuprofen and cyclosporin A on local microcirculatory disturbances due to burn injuries. *Burns* 1997; 23: 43-9.
- 26- Bucky LP, Vedder NB, Hong HZ, et al. Reduction of burn injury by inhibiting CD18-mediated leukocyte adherence in rabbits. *Plast Reconstr Surg* 1994; 93: 1473-80.
- 27- Romson JL, Hook BG, Kunkel SL, et al. Reduction of ischemic myocardial injury by neutrophil depletion in the dog. *Circulation* 1983; 67: 1016-23.
- 28- Vedder NB, Bucky LP, Richer NL, et al: Improved survival rates of random flaps in rabbits with a monoclonal antibody that blocks leukocyte adherence. *Plast Reconstr Surg* 1994; 93: 1035-40.
- 29- Shaheen KW, Punch JD, Rees RS, et al. Early role for neutrophils in skin flap failure. *Surg Forum* 1990; 41: 553-55.
- 30- Kucukcelebi A, Ozcan M. The beneficial effect of cyclosporin-A on the no-reflow phenomenon in rat skin island flaps. *Br J Plast Surg* 1992; 45: 512-14.
- 31- Kawano K, Kim YI, Kaketani K, Kobayashi M: The beneficial effect of cyclosporine on liver ischemia in rats. *Transplantation* 1989; 48: 759.
- 32- Ho VC, Griffiths CEM, Ellis CN, et al: Intralesional cyclosporine in the treatment of psoriasis. A clinical, immunologic, and pharmacokinetic study. *J Am Acad Dermatol* 1990; 22: 94-100.
- 33- Mayer DC, Strada SJ, Hanson A, et al: Effects of hemorrhagic shock and retransfusion on catalase and superoxide dismutase activities in rabbits. *Circ Shock* 1992; 36: 147-53.