

Ekstremitte iskemi reperfüzyonuna bağlı akciğer hasarında metilprednizolonun etkileri

The effects of methylprednisolone on the lung injury resulted from extremity ischemia reperfusion

Ali Yeginsu,¹ Makbule Ergin,¹ Hüseyin Özyurt,² Çiğdem Elmas,³ Ali Akbaş,²
Güleser Çağlar Göktaş,³ İlker Etikan⁴

Gaziosmanpaşa Üniversitesi Tıp Fakültesi, ¹Göğüs Cerrahisi Anabilim Dalı,

²Biyokimya Anabilim Dalı, ⁴Biyostatistik Anabilim Dalı, Tokat

³Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Ankara

Amaç: Bu çalışmada ekstremitte iskemi reperfüzyonu sonrasında gelişen akciğer hasarının önlenmesinde metilprednizolonun etkileri araştırıldı.

Çalışma planı: Çalışmada 30 adet Wistar albino cinsi sıçan kullanıldı. Sıçanlar her bir grupta altı sıçan olacak şekilde rastgele beş gruba ayrıldı. Sıçanlarda sol alt ekstremitte iskemisi yaratıldı. Reperfüzyon öncesi tek doz 15, 50 ve 150 mg/kg metilprednizolon verildi. Deneklerin serum ve akciğer örnekleri alınarak akciğer hasarı ve sistemik inflamasyon parametreleri çalışıldı. Bulgular istatistiksel olarak değerlendirildi.

Bulgular: Tüm inflamasyon parametreleri (lökosit, nötrofil yüzdesi, laktat dehidrojenaz, malondialdehit, süperoksit dismutaz, glutasyon peroksidaz, interlökin-8 ve tümör nekroz faktör alfa) kontrol grubuyla karşılaştırıldığında iskemi-reperfüzyon grubunda anlamlı olarak yüksek bulundu ($p<0.05$). Tedavi gruplarında verilen dozla ilişkili olarak inflamasyon parametre düzeylerinde düşüşler görüldü. İnflamasyon parametreleri, 150 mg/kg metilprednizolon verilen grupta, 15 mg/kg metilprednizolon verilen gruba kıyasla anlamlı olarak daha düşüktü ($p<0.05$). İskemi-reperfüzyon grubu ile karşılaştırıldığında böbrek ve karaciğer fonksiyon parametrelerindeki farklılık tedavi gruplarının hiçbirinde anlamlı bulunmadı ($p>0.05$).

Sonuç: Tek doz metilprednizolon, sıçanlarda ekstremitte iskemi reperfüzyonuna bağlı akciğer hasarının önlenmesinde etkili bir ajandır. Dozun artması ile doku hasarını önleyici etki daha da belirginleşmektedir. Bununla birlikte, çok yüksek dozlarda bile böbrek ve karaciğer fonksiyonları etkilenmemektedir.

Anahtar sözcükler: Ekstremitte; iskemi-reperfüzyon; akciğer; metilprednizolon; sıçan; steroid.

Background: The purpose of this study was to investigate the effects of methylprednisolone on lung injury developing after extremity ischemia reperfusion.

Methods: Thirty Wistar albino rats were used in the study. Rats were randomly divided into five groups, with six rats in each group. A left lower extremity ischemia was established in the rats. Before reperfusion, 15, 50, and 150 mg/kg single doses of methylprednisolone were given to the rats. Serum and lung samples were taken, and lung damage and systemic inflammation parameters were studied. The findings were statistically evaluated.

Results: In ischemia-reperfusion group, all inflammatory parameters (leukocyte, percentage of neutrophil, lactate dehydrogenase, malondialdehyde, superoxide dismutase, glutathione peroxidase, interleukin-8, and tumor necrosis factor alpha) were significantly higher when compared to control group ($p<0.05$). In treatment groups, the levels of inflammatory parameters decreased in relation to dose. In 150 mg/kg methylprednisolone group, inflammatory parameters were significantly lower than those in 15 mg/kg methylprednisolone group ($p<0.05$). There were no significant differences in kidney and liver function parameters in the treatment groups when compared to ischemia-reperfusion group ($p>0.05$).

Conclusion: Single dose methylprednisolone is an effective agent to prevent the lung injury resulted from extremity ischemia reperfusion in rats. This preventive effect becomes manifested by increasing the dose. However, kidney and liver functions are not influenced even when much higher doses are used.

Key words: Extremity; ischemia-reperfusion; lung; methylprednisolone; rat; steroid.

Geliş tarihi: 25 Mayıs 2009 Kabul tarihi: 21 Ağustos 2009

Yazışma adresi: Dr. Ali Yeginsu, Gaziosmanpaşa Üniversitesi Tıp Fakültesi Göğüs Cerrahisi Anabilim Dalı, 60100 Tokat.
Tel: 0356 - 213 31 79 e-posta: yeginsu@hotmail.com

Dokularda iskemi-reperfüzyon (İR) hasarı klinik olarak transplantasyon cerrahisi, turnike uygulaması, serbest doku transferleri, akut kompartman sendromu ve ampute ekstremitenin replantasyonu gibi durumlarda ortaya çıkabilir.^[1] Hasarın şiddeti iskeminin süresine, dokunun ısısına ve dokuya özgün faktörlere bağlı olarak değişir.^[2] İskemi sırasında iskemik dokuda toksik oksijen radikalleri üretilir. Reperfüzyondan sonra serbest oksijen radikalleri ve süperoksit radikalleri endotel hasarına ve vasküler geçirgenliğin artmasına neden olur. Ayrıca aktive olan adezyon molekülleri ve sitokinler de sistemik inflamatuvar yanıtı başlatırlar. Lökositlerin ve sitokinlerin aktivasyonu süresince akciğerler ana hedef organlardan biridir.^[3]

Glukokortikoidler bilinen en kuvvetli antiinflamatuar ajanlardır. Steroidlerin iskemi-reperfüzyon hasarını azaltıcı etkileri olduğunu bildiren yayınlar vardır.^[4-9] Ancak, akciğer üzerine olan etkilerin araştırıldığı, metilprednizolon (MP) ile yapılmış kapsamlı bir çalışma bulunmamaktadır. Çalışmamızda ekstremitte İR'si sonrasında gelişen akciğer hasarının önlenmesinde MP'nin etkinliğinin araştırılması amaçlandı. Çalışmada aşağıdaki sorulara yanıt arandı;

1- Metilprednizolon ekstremitte İR hasarının sistemik ve akciğer üzerine olan etkilerini önleyebilmekte midir?

2- Eğer önleyebiliyorsa bunu hangi dozda daha iyi yapmaktadır?

GEREÇ VE YÖNTEMLER

Denekler

Çalışmada 30 adet 280-320 gr ağırlığında Wistar albino cinsi, erkek sıçan kullanıldı. Çalışma Gaziosmanpaşa Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu tarafından onaylandı ve Üniversitemizin Bilimsel Araştırma Fonu tarafından desteklendi (Proje no: 2007/30). Sıçanlar Üniversitemizin Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Laboratuvarı'ndan sağlandı. Sıçanların

bakımı "Laboratuvar hayvanları kullanım ve bakım kılavuzu"na uygun olarak yapıldı.

Cerrahi yöntem

Sıçanlar 120 mg/kg ketamin ve 5 mg/kg ksilazin ile uyutulduktan sonra trakeostomi ile entübe edilerek ventilatöre bağlandı. Üç mililitre tidal volum ve 70/dk solunum sayısı ile oda havasıyla ventilasyona devam edildi. İşlem sırasında hayvan uyandıkça anestezi dozlar tekrarlandı. Penil venden 50 IU heparin verildi. Sol bacak kasık bölgesinden turnike ile bağlanarak bir saat iskemi sonrasında turnike açıldı ve iki saat reperfüzyon uygulandı. İki mililitre sistemik kan örneği alındıktan sonra hayvan kanatılarak ötanazi uygulandı, laparo-sternotomi yapılarak akciğerler blok olarak çıkarıldı. Serum örnekleri -80 °C'de buzdolabında saklandı. Sol akciğer ayrılarak -80 °C'de buzdolabında, sağ akciğer ise %10 formalin içerisinde muhafaza edildi.

Gruplar;

1) Kontrol grubu (n=6): Sıçanlara toplam üç saat anestezi uygulandıktan sonra ötanazi uygulandı.

2) İskemi-reperfüzyon grubu (n=6): Sıçanlara anestezi sonrasında bir saat iskemi ve iki saat reperfüzyon uygulandı ve İR sonrasında ötanazi uygulandı.

3) MP15 grubu (n=6): Sıçanlara bir saatlik iskeminin 30. dakikasında 15 mg/kg MP intravenöz (i.v) uygulandı. Daha sonra iki saatlik reperfüzyon sonrasında sıçanlara ötanazi uygulandı.

4) MP50 grubu (n=6): Sıçanlara bir saatlik iskeminin 30. dakikasında 50 mg/kg MP i.v uygulandı. Daha sonra iki saatlik reperfüzyon sonrasında sıçanlara ötanazi uygulandı.

5) MP150 grubu (n=6): Sıçanlara bir saatlik iskeminin 30. dakikasında 150 mg/kg MP i.v verildi. İki saatlik reperfüzyon sonrasında sıçanlara ötanazi uygulandı.

Tablo 1. Serum inflamasyon bulgularının istatistiksel değerlendirilmesi

Gruplar	Kontrol	İR	MP15	MP50	MP150	p
Lökosit	5.1±1.8	14.9±2.7	9.4±1.8	8.0±1.7	5.6±1.0	<0.001*
Nötrofil %	8.5±1.8	16.8±2.6	14.5±2.8	13.6±1.3	10.6±1.7	<0.001*
Laktik dehidrogenaz	449±96	857±83	740±154	668±174	467±172	<0.001*
SGOT	42.8±7.9	69.8±8.2	61.1±12.1	58.1±11.9	60.6±15.1	0.007*
SGPT	81±15	131±43	102±13	117±28	107±26	0.071
Kreatinin	0.30±0.05	0.34±0.08	0.35±0.10	0.32±0.06	0.32±0.02	0.934
Malondialdehit ^Δ	0.96±0.1	2.03±0.2	1.58±0.1	1.38±0.1	1.29±0.1	<0.001*
Süperoksit dismutaz ^{&}	49.9±10	87.7±5.4	71.1±7.2	70.8±4.5	59.4±3.9	<0.001*
Glutasyon peroksidaz ^{&}	7.03±0.3	16.5±1.4	14.3±1.3	13.9±1.9	10.6±1.2	<0.001*
İnterlökin-8 ^f	106±14	316±56	155±25	119±17	126±6	0.001*
Tümör nekrozis faktör alfa ^f	101±19	161±23	153±15	138±16	105±11	<0.001*

*: İstatistiksel olarak anlamlı; İR: İskemi-reperfüzyon; MP: Metilprednizolon; SGOT: Serum glutamik oksaloasetik transaminaz; SGPT: Serum glutamik pürivik transaminaz; Δ: nmol/gr yaş doku; &:U/gr protein; f: pg/mL.

Tablo 2. Tablo 1'e ait ikili karşılaştırmaların p değerleri

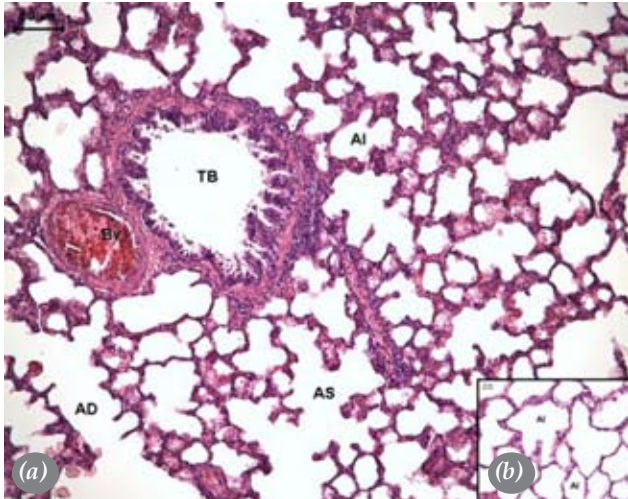
Gruplar	Kontrol / IR	Kontrol / MP15	Kontrol / MP50	Kontrol / MP150	İR / MP15	İR / MP50	İR / MP150	MP15 / MP50	MP15 / MP150	MP50 / MP150
Lökosit	0.001*	0.006*	0.103	0.985	<0.001*	<0.001*	<0.001*	0.735	0.022*	0.263
Nötrofil %	0.001*	0.001*	0.003*	0.438	0.366	0.118	<0.001*	0.962	0.039*	0.152
LDH	<0.001*	0.012*	0.096	0.999	0.612	0.174	0.001*	0.903	0.021*	0.135
SGOT	0.003*	0.069	0.169	0.081	0.684	0.411	0.638	0.991	1.000	0.995
SGPT	0.015*	0.041*	0.041*	0.093	0.240	0.818	0.394	0.485	0.818	0.485
Kreatinin	0.485	0.589	0.699	0.394	0.818	0.937	0.937	0.818	1.000	0.937
MDA	<0.001*	<0.001*	0.001*	0.008*	<0.001*	<0.001*	<0.001*	0.213	0.029*	0.863
SOD	<0.001*	<0.001*	<0.001*	<0.114	0.002*	0.001*	<0.001*	0.998	0.041*	0.079
GPX	<0.001*	<0.001*	0.001*	0.052	0.405	0.201	0.001*	0.997	0.042*	0.087
İL-8	0.002*	0.002*	0.180	0.026*	0.002*	0.002*	0.002*	0.004*	0.002*	0.394
TNF- α	<0.001*	<0.001*	0.011*	0.993	0.936	0.466	0.099	0.677	0.129	0.777

*: İstatistiksel olarak anlamlı; İR: İskemi-reperfüzyon; MP: Metilprednizolon; LDH: Laktik dehidrogenaz; SGOT: Serum glutamik oksaloasetik transaminaz; SGPT: Serum glutamik pürivik transaminaz; MDA: Malondialdehit; SOD: Süperoksit dismutaz; GPX: Glutatyon peroksidaz; İL-8: İnterlökin-8; TNF- α : Tümör nekrozis faktör alfa.

Ölçülen parametreler

a) Sistemik parametreler: İskemi-reperfüzyon ve yüksek doz steroidin sistemik etkilerini tespit etmek için serum akut inflamasyon parametreleri (lökosit, nötrofil yüzdesi, LDH), böbrek ve karaciğer fonksiyon testleri [kreatinin, serum glutamik oksaloasetik transaminaz (SGOT), serum glutamik pürivik transaminaz (SGPT)] değerleri ölçüldü.

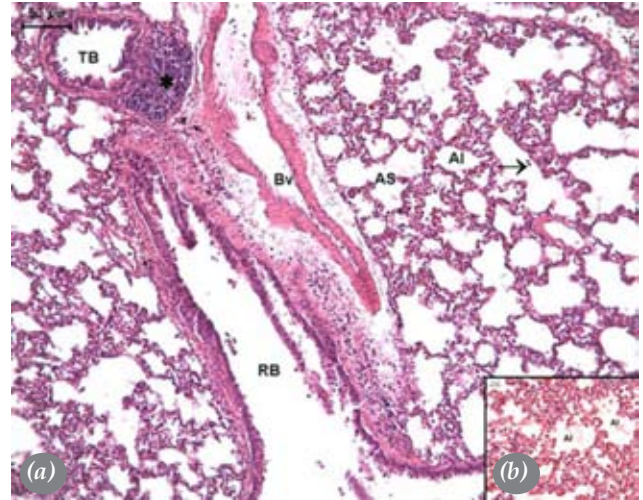
b) Antioksidan enzim aktiviteleri ve lipid peroksidasyonu: Serum ve dokuda süperoksit dismutaz (SOD), Glutatyon peroksidaz (GPX) ve Malondialdehit (MDA) düzeyleri spektrofotometrik yöntemle ölçüldü.^[10-12]



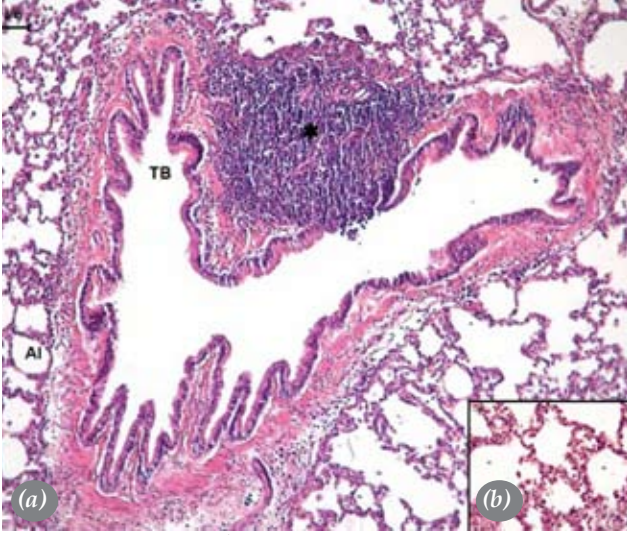
Şekil 1. Kontrol grubu. Tüm akciğer dokusu bileşenleri, normal yapılarında izlendi. Doku genelinde lenfosit infiltrasyonu yoktu. Terminal bronşiyoller, respiratuvar bronşiyoller, duktus alveolaris ve sakkus alveolarisler normal yapılarında görüldü. Alveoler hücreler normal görünümde ve alveoler lümende hücre debrisisi yoktu. Damar duvar yapısı normal görünümde izlenmekle birlikte damarlarda ödem izlenmedi. **a:** (H-E x 100), **b:** (H-E x 400). TB: Terminal bronşiyol; AD: Duktus alveolaris; AS: Sakkus alveolaris; Al: Alveol; Bv: Duvar yapısı.

c) Sitokin düzeyleri: Sitokinlerden interlökin-8 (İL-8) ve TNF- α (tümör nekrozis faktör alfa) düzeyleri ELİSA (Enzyme-linked immunosorbent assay) yöntemi ile ölçüldü.

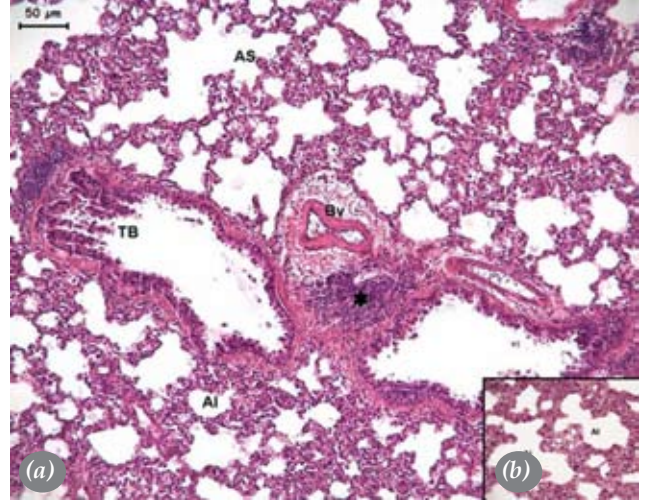
d) Morfometrik ölçümler: Doku örnekleri %10 formalin solüsyonunda bekletildi ve parafin bloklar hazırlandı. Bloklardan 4 μ m seri kesitler alındı (Leica SM 2000, Germany) ve hematoksilen-eozin



Şekil 2. İskemi-reperfüzyon grubu. Akciğer doku örneklerinde, yoğun lenfosit infiltrasyonu (*) ve infiltrasyonun bronkus ağacını izlediği görüldü. Terminal bronşiyoller çevresindeki düz kas yapısında belirgin bir kalınlaşma ve komşu alanlarda kümelenmiş lenfosit toplulukları belirgindi. Terminal bronşiyol lümeninde makrofajlar (ok) ve hücre debrisisi izlendi. Respiratuvar bronşiyollerin duvar yapısında bozulma ve dejenerasyon belirgindi. Epiteldeki kopmalara respiratuvar bronşiyol lümenindeki az miktardaki hücre debrisinin eşlik ettiği görüldü. Alveol lümeninde belirgin bir bozulma vardı. Damar duvarında düz kas artışıyla birlikte ödem varlığı da dikkati çekti. **a:** (H-E x 100), **b:** (H-E x 400). TB: Terminal bronşiyol; Bv: Duvar yapısı; AS: Sakkus alveolaris; Al: Alveol; RB: Respiratuvar bronşiyol.



Şekil 3. MP15 grubu. İskemi-reperfüzyon grubu arasında belirgin bir fark yoktu. İskemi-reperfüzyon grubundaki yoğun lenfosit infiltrasyonuna (*) ek olarak en belirgin dejeneratif bulgu damar duvarı ve bronkus ağacını çevreleyen düz kaslardaki artışı. Terminal bronşiyol ve alveollerin lümeni parçalanmış hücre debrisini içeriyordu. Damarlardaki ödem ise iskemi-reperfüzyon grubuna eşdeğer olarak belirgindi. **a:** (H-E x 100), **b:** (H-E x 400). TB: Terminal bronşiyol; Al: Alveol.



Şekil 4. MP50 grubu. İskemi-reperfüzyon ve M15 grubuna oranla belirgin bir rejenerasyon dikkati çekti. Lenfosit infiltrasyonunda (*) bu iki gruba göre belirgin bir azalma vardı. Terminal bronşiyollerin normal histolojik görünümüne yakın olduğu görüldü. Bronşiyol ve alveol lümenindeki hücresel debrisinin azaldığı ve lümeninin daha temiz olduğu ilgiyi çekti. Damar duvarı düz kas yapıları normal histolojik yapıda izlenirken damar duvarındaki ödem belirgindi. **a:** (H-E x 100), **b:** (H-E x 400). TB: Terminal bronşiyol; AS: Sakkus alveolaris; Al: Alveol; Bv: Duvar yapısı.

(H-E) ile boyandı. Kesitler ışık mikroskopu (Leica DM 4000 B and Leica DFC 280 Plus camera; Weetlar, Germany) ile deneklere ne uygulandığını bilmeyen histologlarca incelendi.

Alveoler dejenerasyon (infiltrasyon, terminal bronş duvar yapısı, terminal bronş debris, respiratuvar bronş duvar yapısı, respiratuvar duvar debris, alveoler yapı ve vasküler duvarda ödem) derecelemesi, 0=değişiklik yok; 1=fokal hafif değişiklikler; 2=multifokal hafif değişiklik; 3=multifokal bariz değişiklik; 4=diffüz hafif değişiklik; 5=diffüz bariz değişiklik, olarak belirlendi. Lenfosit ve alveoler makrofaj sayımı x400 büyütme altında rastgele seçilen 10 kesitte 10 farklı alan seçilerek yapıldı. Çekilen fotoğrafların analizi Leica QWin V3 Plus Image (Leica QWin V3; Leica Microsystems, Cambridge, England) programı ile yapıldı.

e) Bronkoalveoler lavaj (BAL) albümin düzeyi: İmmüno-turbidimetrik yöntem kullanılarak Roche/Hitachi (Roche Diagnostics GmbH D-68298 Mannheim, Germany) modüler P otoanalizöründe ölçüldü. Ölçüm değerleri gr/dl olarak kaydedildi.

İstatistik

Elde edilen veriler Windows için SPSS 10.0 versiyon (SPSS Inc., Chicago, Illionis, USA) istatistik paket programı kullanılarak Gaziosmanpaşa Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyoistatistik Anabilim Dalı tarafından değerlendirildi. Değerler ortalama \pm standart sapma (SS) olarak alındı. Gruplar arası karşılaştırmalarda, tek yönlü

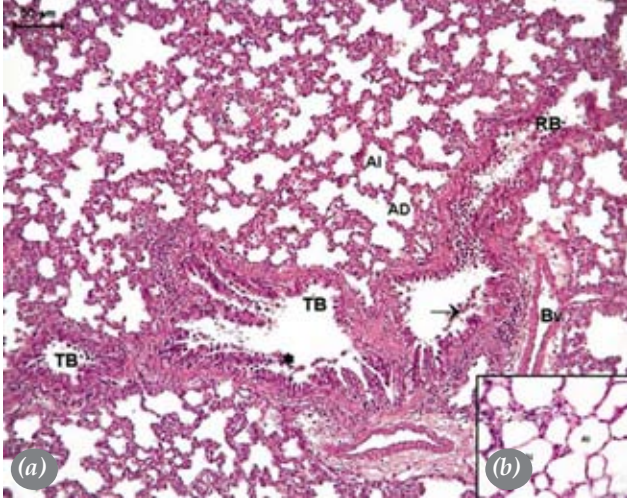
ANOVA ve Kruskal Wallis varyans analizi testleri kullanıldı. Post-hoc ikili karşılaştırmalar Tukey ve Mann Whitney U-testleri ile yapıldı. P<0.05 değerleri anlamlı kabul edildi.

BULGULAR

Sistemik bulgular

Serum lökosit, nötrofil yüzdesi, LDH düzeyleri İR grubunda kontrol grubuna kıyasla anlamlı olarak yüksekti. Bu değerler tedavi gruplarında dozla ilişkili olarak azalmakla birlikte, lökosit, nötrofil yüzdesi ve LDH, İR grubuna kıyasla sadece MP150 grubunda anlamlı olarak düşüktü. MP150 grubunda bu parametreler MP15 grubuna kıyasla anlamlı olarak düşüktü.

İskemi-reperfüzyon grubunda serum MDA ve SOD düzeyleri, kontrol ve tedavi gruplarına kıyasla daha yüksekti. Glutasyon peroksidaz düzeyi ise sadece kontrol ve MP150 gruplarına kıyasla anlamlı olarak yüksekti. Tedavi grupları arasında MP150 grubunda MDA, SOD ve GPX düzeyleri MP15 grubuna kıyasla anlamlı olarak düşüktü. Ancak MDA düzeyleri tedavi gruplarında uygulanan dozla doğru orantılı olarak anlamlı şekilde düşüktü. İskemi-reperfüzyon grubunda serum İL-8 düzeyi kontrol ve tedavi gruplarına kıyasla anlamlı olarak yüksekti. MP150 grubunda İL-8 düzeyi MP15 ve MP50 gruplarından daha düşüktü. Serum TNF- α değeri İR grubunda kontrol grubundan daha yüksekti. Tedavi grupları ile İR grubu arasında istatistiksel farklılık yoktu.



Şekil 5. MP150 grubu. Histolojik bulgular kontrol grubuna eşdeğer olarak değerlendirilmeye birlikte terminal bronşiyol lümeninde minimal hücre debris izlendi. Lenfosit infiltrasyonun belirgin olarak gerilediği görüldü. Bronş ağacı duvarında yer yer lenfositler izleniyordu. Damar duvarındaki ödem belirgin olarak azalmakla beraber adventisyadaki yağ hücrelerinde artış görüldü. En az dejeneratif bulgu bu grupta görüldü. **a:** (H-E x 100), **b:** (H-E x 400). Al: Alveol; AD: Duktus alveolaris; TB: Terminal bronşiyol; Bv: Duvar yapısı. *: Lenfosit infiltrasyon; (ok): Alveoler makrofaj.

İskemi-reperfüzyon grubunda karaciğer fonksiyon parametre (serum SGOT, SGPT) düzeyleri kontrol grubuna kıyasla anlamlı olarak yüksekti. Ancak, İR ve tedavi grupları arasında farklılık yoktu. Böbrek fonksiyon parametresi (kreatinin) hiçbir grupta anlamlı olarak değişmedi. Serum inflamatuvar parametrelerinin istatistiksel değerlendirmesi Tablo 1 ve 2'de gösterilmiştir.

Lokal (akciğer dokusu) bulgular

İskemi-reperfüzyon grubunda alveoler dejenerasyon, kontrol ve tedavi gruplarından anlamlı olarak daha fazla idi. MP150 grubunda dejenerasyon MP15 grubuna kıyasla daha düşük idi.

Alveoler makrofaj ve lenfosit sayısı İR grubunda diğer gruplara kıyasla anlamlı olarak yüksek bulundu.

MP150 grubunda alveoler makrofaj ve lenfosit sayısı MP15 ve MP50 gruplarına kıyasla daha düşük olarak saptandı (Şekil 1-5).

İskemi-reperfüzyon grubunda MDA, SOD ve GPX düzeyleri kontrol grubuna kıyasla daha yüksek idi. Malondialdehit ve GPX düzeyleri tüm tedavi gruplarında İR grubuna kıyasla anlamlı olarak düşük bulundu. Süperoksit dismutaz düzeyi ise sadece MP150 grubunda anlamlı olarak düşük bulundu. MP150 grubunda SOD düzeyleri sadece MP15 grubuna kıyasla, GPX düzeyi ise MP15 ve MP50 gruplarının her ikisine kıyasla anlamlı olarak düşük idi. Malondialdehit düzeylerinde tedavi grupları arasında anlamlı bir farklılık bulunmadı.

İnterlökin-8 ve TNF- α düzeyleri İR grubunda kontrol ve tedavi gruplarına kıyasla anlamlı olarak yüksek idi. MP150 grubunda İL-8 ve TNF- α düzeyleri MP15 ve MP50 grubuna kıyasla anlamlı olarak düşük bulundu.

Bronkoalveoler lavaj albümin düzeyleri İR grubunda kontrol ve tedavi gruplarına kıyasla daha yüksek idi. MP150 grubunda BAL albümin düzeyleri MP15 ve MP50 gruplarına kıyasla anlamlı olarak düşük bulundu. Akciğer dokusu inflamatuvar parametrelerinin istatistiksel değerlendirmesi Tablo 3 ve 4'de gösterilmiştir.

TARTIŞMA

Çalışmamız ekstremitelere İR'ye bağlı gelişen akciğer hasarının önlenmesinde MP'nin etkili bir ajan olduğunu göstermiştir. Reperfüzyon öncesi uygulanan tek doz MP, İR'ye bağlı inflamatuvar reaksiyonu ve oksidatif stresi azaltmaktadır. Metilprednizolonun bu etkisi doza bağlı olarak artmakta ve özellikle 150 mg/kg dozda uygulanan grupta anlamlı olarak daha belirgin şekilde ortaya çıkmaktadır.

Glukokortikoidlerin birçok organda İR'ye bağlı hasarı azalttığı bildirilmiştir.^[5-8] Bourbon ve ark.^[9] MP tedavisinin sistemik inflamatuvar yanıtı da azalttığını göstermişlerdir. Bazı yazarlar bu etkinin yüksek dozlarda ortaya çıktığını,^[5,7] bazıları da^[6,9] düşük doz ile de bu etkinin

Tablo 3. Akciğer dokusu inflamasyon bulgularının istatistiksel değerlendirmesi

Gruplar	Kontrol	İR	MP15	MP50	MP150	p
Dejenerasyon	–	4.6±0.5	2.3±0.5	1.5±0.5	1.1±0.4	<0.001*
Lenfosit	1.3±1.2	21.8±2.2	15.6±3.1	14.0±3.1	7.0±0.4	<0.001*
Makrofaj	16.0±3.3	149±15	115±9.8	113±15.8	71.8±4.5	<0.001*
Malondialdehit ^Δ	1.34±0.2	5.46±0.6	3.31±0.7	3.10±0.9	1.97±0.4	<0.001*
Süperoksit dismutaz ^{&}	41.5±8.5	81.7±10.6	77.3±7.0	64.6±5.9	52.0±4.0	<0.001*
Glutasyon peroksidaz ^{&}	2.83±0.2	24.4±9.0	15.4±3.2	13.7±1.9	10.2±1.1	<0.001*
İnterlökin-8 [¶]	117±22	298±69	196±22	184±21	141±18	<0.001*
Tümör nekrozis faktör alfa [¶]	118±20	177±25	156±6	142±13	115±9	<0.001*
Bronkoalveoler lavaj albümin	105±8.7	196±30	149±16	144±18	117±11	<0.001*

*: İstatistiksel olarak anlamlı; İR: İskemi-reperfüzyon; MP: Metilprednizolon; Δ: nmol/gr yaş doku; &: U/gr protein; ¶: pg/mL.

Tablo 4. Tablo 3'e ait ikili karşılaştırmaların p değerleri

Gruplar	Kontrol / IR	Kontrol / MP15	Kontrol / MP50	Kontrol / MP150	İR / MP15	İR / MP50	İR / MP150	MP15 / MP50	MP15 / MP150	MP50 / MP150
Dejenerasyon	0.002*	0.002*	0.002*	0.002*	0.002*	0.002*	0.002*	0.065	0.009*	0.394
Lenfosit	<0.001*	<0.001*	0.001*	<0.003*	0.001*	<0.001*	<0.001*	0.739	<0.001*	<0.001*
Makrofaj	0.002*	0.002*	0.002*	0.002*	0.009*	0.015*	0.002*	0.937	0.002*	0.002*
MDA	<0.001*	0.007*	0.043*	0.237	0.004*	0.008*	<0.001*	1.000	0.379	0.751
SOD	<0.001*	<0.001*	0.004*	0.026*	0.986	0.072	0.015*	0.062	0.006*	0.624
GPX	0.002*	0.002*	0.002*	0.002*	0.026*	0.004*	0.002*	0.180	0.009*	0.004*
İL-8	0.007*	0.002*	0.002*	0.026*	0.026*	0.026*	0.002*	0.589	0.002*	0.009*
TNF- α	0.004*	0.004*	0.065	0.937	0.240	0.015*	0.002*	0.093	0.002*	0.004*
BAL albümin	0.002*	0.002*	0.002*	0.065	0.015*	0.009*	0.002*	0.589	0.002*	0.009*

*: İstatistiksel olarak anlamlı; İR: İskemi-reperfüzyon; MP: Metilprednisolon; MDA: Malondialdehit; SOD: Süperoksit dismutaz; GPX: Glutatyon peroksidaz; İL-8: İnterlökin-8; TNF- α : Tümör nekrozis faktör alfa; BAL: Bronkoalveoler lavaj.

elde edilebileceğini bildirmişlerdir. Bizim çalışmamızda reperfüzyon öncesi verilen tek doz 15 mg/kg MP'nin sistemik ve lokal antiinflamatuvar etkisinin ortaya çıktığı, bu etkinin doz arttıkça daha da arttığı tespit edildi.

Ekstremitte İR sonrasında lokal inflamatuvar etkinin yanı sıra sistemik etkilerinde ortaya çıktığı ve en fazla etkilenen organların başında da akciğerlerin bulunduğu bilinmektedir.^[3,13-15] Bugüne kadar ekstremitte İR'nin akciğer üzerindeki yıkıcı etkilerini azaltmak için birçok farmakolojik ajan denenmiş ve belirli ölçüde başarılı sonuçlar bildirilmiştir.^[1,13,16,17] Bu konuda steroidlerle yapılan kapsamlı deneysel ya da klinik bir çalışmaya literatürde rastlamadık. Yapılmış olan klinik çalışmaların hepsinde sistemik parametreler değerlendirilmiş, ancak spesifik olarak akciğer dokusu değerlendirilmemişti. Bizim çalışmamız bu açıdan yapılmış olan ilk ve en kapsamlı çalışma olarak değerlendirilebilir.

Kortikosteroidler antiinflamatuvar etkilerini, hücre içi reseptörleri aracılığı ile prostaglandin sentezini etkileyerek ve nükleer faktör Kappa B'yi (NF- κ B) aktive ederek yaparlar.^[7,8] Glukokortikoidler inflamasyon bölgesinde plazma eksudasyonunu ve lökosit birikimini dramatik olarak inhibe ederler. Uygulama dozu, uygulama yolu, hedef hücre gibi birçok faktör bu etkinin derecesini etkiler. Glukokortikoidler makrofaj farklılaşmasını antagonize eder, nötrofillerin endotel hücrelerine yapışmasını engeller, dolaşımdaki eozinofil ve bazofil sayısını ve alerjik reaksiyonda eozinofil ve mast hücre birikimini azaltırlar. Endotelial hücrelerin fonksiyonlarını düzenleyerek vasküler geçirgenliği belirgin bir şekilde azaltırlar. Proliferasyonun ve büyüme faktörünün indüklediği DNA, protein ve kollajen sentezini baskılar. Fosfolipaz A2 aktivitesini azaltarak prostaglandin sentezini inhibe eder. Glukokortikoidler, ayrıca T ve B lenfosit aktivitesini inhibe ederek immün sistemi baskılar.^[18-20] Glukokortikoidlerin dolaylı yollardan hidrolitik enzimlerin salınımını, lipid peroksidasyonunu, oksijen radikallerinin üretimini azalttığı bildirilmiştir.^[21]

Çalışmamızda MP verilen gruplarda tüm inflamasyon ve oksidatif stres parametrelerinde belirgin bir azalma gözlemlendi ve bu azalmanın verilen doz ile paralellik gösterdiği görüldü. Tek doz olarak verilen 150 mg/kg MP'nin antiinflamatuvar etkisi daha düşük dozlara kıyasla daha belirgin olarak ortaya çıktı. Klinik kullanımda bu derece yüksek dozlar kullanılmamaktadır. Yüksek doz steroid kullanımı metabolik asidoz ve hiperglisemi gibi metabolik düzensizliklere neden olabilmektedir.^[5,7] Ancak bu etkilerin uzun süreli kullanımında ortaya çıktığı bildirilmiştir. Bir defada verilen çok yüksek dozdaki steroidün yan etkileri ile ilgili bir bilgiye ulaşamadık. Ancak, bizim çalışmamızda çok yüksek dozlarda bile diğer organ (böbrek ve karaciğer) fonksiyonlarını fazla etkilemediğini gördük. Diğer bazı metabolik ölçümler çalışmamızda yapılmadı.

Fizyolojik ölçümlerin yapılmaması ve muhtemel yan etkilerin iyi araştırılmaması çalışmamızın eksiklikleri olarak kabul edilebilir. Bu çalışmanın sonuçlarına dayanarak çok yüksek dozda ve bir defada verilen MP'nin belirgin bir yan etki göstermeden klinik tabloyu düzleteceğini iddia etmek fazlaca spekülasyon olacaktır. Bu soruya yanıt bulmak için daha kapsamlı çalışmalara ihtiyaç vardır.

Sonuç olarak, reperfüzyon öncesi uygulanan tek doz MP sıçanda ekstremitte İR'ye bağlı akciğer hasarını azaltmaktadır. Bu etki dozla ilişkili olarak artmaktadır. Sıçanlarda tek doz uygulanan 150 mg/kg MP diğer dozlara oranla, böbrek ve karaciğer fonksiyonlarında anlamlı bir değişikliğe yol açmadan, daha fazla parametrede anlamlı iyileşme sağlamaktadır.

KAYNAKLAR

- Herbert KJ, Hickey MJ, Lepore DA, Knight KR, Morrison WA, Stewart AG. Effects of the endothelin receptor antagonist Bosentan on ischaemia/reperfusion injury in rat skeletal muscle. *Eur J Pharmacol* 2001;424:59-67.
- Petrsek PF, Walker PM. A clinically relevant small-animal model of skeletal muscle ischemia-reperfusion injury.

- J Invest Surg 1994;7:27-38.
3. Olguner C, Koca U, Kar A, Karci A, Iflekel H, Canyilmaz M, et al. Ischemic preconditioning attenuates the lipid peroxidation and remote lung injury in the rat model of unilateral lower limb ischemia reperfusion. *Acta Anaesthesiol Scand* 2006;50:150-5.
 4. Volk T, Schmutzler M, Engelhardt L, Pantke U, Laule M, Stangl K, et al. Effects of different steroid treatment on reperfusion-associated production of reactive oxygen species and arrhythmias during coronary surgery. *Acta Anaesthesiol Scand* 2003;47:667-74.
 5. Slivka AP, Murphy EJ. High-dose methylprednisolone treatment in experimental focal cerebral ischemia. *Exp Neurol* 2001;167:166-72.
 6. Turner S, Derham C, Orsi NM, Bosomworth M, Bellamy MC, Howell SJ. Randomized clinical trial of the effects of methylprednisolone on renal function after major vascular surgery. *Br J Surg* 2008;95:50-6.
 7. Enc Y, Karaca P, Ayoglu U, Camur G, Kurc E, Cicek S. The acute cardioprotective effect of glucocorticoid in myocardial ischemia-reperfusion injury occurring during cardiopulmonary bypass. *Heart Vessels* 2006;21:152-6.
 8. Chimalakonda AP, Mehvar R. Effects of methylprednisolone and its liver-targeted dextran prodrug on ischemia-reperfusion injury in a rat liver transplantation model. *Pharm Res* 2007;24:2231-8.
 9. Bourbon A, Vionnet M, Leprince P, Vaissier E, Copeland J, McDonagh P, et al. The effect of methylprednisolone treatment on the cardiopulmonary bypass-induced systemic inflammatory response. *Eur J Cardiothorac Surg* 2004;26:932-8.
 10. Sun Y, Oberley LW, Li Y. A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clin Chem* 1988;34:497-500.
 11. Paglia DE, Valentine WN. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med* 1967;70:158-69.
 12. Esterbauer H, Cheeseman KH. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. In: Packer L, Glazer AN, editors. *Methods in enzymology*. New York: Academic Press; 1990. p. 407-21.
 13. Koksel O, Yildirim C, Cinel L, Tamer L, Ozdulger A, Bastürk M, et al. Inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase attenuates lung tissue damage after hind limb ischemia-reperfusion in rats. *Pharmacol Res* 2005;51:453-62.
 14. Duru S, Koca U, Oztekin S, Olguner C, Kar A, Coker C, et al. Antithrombin III pretreatment reduces neutrophil recruitment into the lung and skeletal muscle tissues in the rat model of bilateral lower limb ischemia and reperfusion: a pilot study. *Acta Anaesthesiol Scand* 2005;49:1142-8.
 15. 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 J Surg* 2002;26:115-21.
 16. Sirmali M, Uz E, Sirmali R, Kilbaş A, Yilmaz HR, Altuntaş I, et al. Protective effects of erdosteine and vitamins C and E combination on ischemia-reperfusion-induced lung oxidative stress and plasma copper and zinc levels in a rat hind limb model. *Biol Trace Elem Res* 2007;118:43-52.
 17. Okutan H, Savas C, Delibas N. The antioxidant effect of melatonin in lung injury after aortic occlusion-reperfusion. *Interact Cardiovasc Thorac Surg* 2004;3:519-22.
 18. Boumpas DT, Chrousos GP, Wilder RL, Cupps TR, Balow JE. Glucocorticoid therapy for immune-mediated diseases: basic and clinical correlates. *Ann Intern Med* 1993;119:1198-208.
 19. Anderson DK, Saunders RD, Demediuk P, Dugan LL, Braughler JM, Hall ED, et al. Lipid hydrolysis and peroxidation in injured spinal cord: partial protection with methylprednisolone or vitamin E and selenium. *Cent Nerv Syst Trauma* 1985;2:257-67.
 20. Anderson DK, Dugan LL, Means ED, Horrocks LA. Methylprednisolone and membrane properties of primary cultures of mouse spinal cord. *Brain Res* 1994 21;637:119-25.
 21. Kochanek PM, Hallenbeck JM. Polymorphonuclear leukocytes and monocytes/macrophages in the pathogenesis of cerebral ischemia and stroke. *Stroke* 1992;23:1367-79.