

# Alt Ekstremitte İskemi Reperfüzyonu sonucunda Gelişen Akciğer Hasarının Önlenmesinde Farklı Bir Ajan: FK 506 (Takrolimus)

## PREVENTION OF LUNG INJURY BY FK 506 FOLLOWING HIND LIMB ISCHEMIA AND REPERFUSION MODEL IN RATS

Dr. Atike Tekeli, Dr. SerdarAkgün, Dr . Ali Civelek, Dr. Selim İşbir, Dr. Koray Ak, \*Dr. Gamze Demirtaş, \*Dr. Serap Şirvanci, \*Dr. Serap Arbak, \*\*Dr. İlhan Yaylım, Dr. AdnanÇobanoğlu

Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Kalp Damar Cerrahisi Ana Bilim Dalı, İstanbul  
\* Marmara Üniversitesi Histoloji Ana Bilim Dalı, İstanbul  
\*\* İstanbul Üniversitesi DETAM, İstanbul

### Özet

**Amaç:** İskemi ve reperfüzyonu takiben doku hasarının büyük bir bölümü reperfüzyon sırasında oluşur. Hayvan deneylerinde alt ekstremitte iske mi ve reperfüzyonunu takiben nötrofil infiltrasyonuna ve serbest oksijen radikallerine bağlı olarak akciğerde hasar oluştuğu gösterilmiştir. FK506'nın güçlü bir immunosupresif olmasının yanısıra nötrofil infiltrasyonunu modüle ettiği düşünülmektedir. Bu çalışmada sıçan alt ekstremitte iske mi reperfüzyonunu takiben oluşan akciğer hasarını önlemede FK506'nın rolü araştırılmıştır.

**Materyal ve Metod:** 22, sağlıklı, 300-350 gr ağırlığında, erkek, Sprague-Dawley sıçana üç gün boyunca farklı dozlarda FK506 ve normal saline solusyonu, intraperitoneal olarak enjekte edilmiştir. Dördüncü gün sıçanların bilateral alt ekstremitelerine 2 saat boyunca turnike metodu ile iske mi, 2 saat de reperfüzyon uygulanmıştır, sonrasında denekler sakrifiye edilerek akciğer dokuları çıkarılmış, biyokimyasal olarak lipid peroksidasyonun son ürünü olan malondealdehide (MDA) ve konjuge dienerler (CD) ile glutathione (GSH) düzeyine bakılmış histolojik olarak da preparatlar ışık mikroskobu altında incelenmiştir.

**Bulgular:** Profilaktik FK506 uygulanan hayvanlarda lipid peroksidasyon ürünü olan MDA düzeyinde istatistiksel olarak azalma saptanmıştır (MDA  $33.92 \pm 5.33$ ,  $p < 0,01$ ). Total GSH ve CD değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilememiştir. Histopatolojik olarak FK506 alan grupta kontrol grubuna göre nötrofil infiltrasyonu ve akciğer hasarı bulguları daha az olarak gözlenmiştir.

**Sonuç:** Akciğer dokusunda tesbit edilen düşük MDA seviyeleri FK506 tedavisinin iske mi ve reperfüzyon ile ortaya çıkan serbest oksijen radikallerinin oluşumunu azalttığını düşündürmektedir. Ancak FK506'nın glutathione sistemi üzerine belirgin bir etkisi saptanamamıştır.

**Anahtar kelimeler:** Alt ekstremitte, iske mi reperfüzyonu, akciğer hasarı, FK506

Türk Göğüs Kalp Damar Cer Derg 2001;9:242-246

### Summary

**Background:** The major part of tissue damage occurs upon reperfusion and is mediated by activated neutrophils that release oxygen free radicals. Following hind limb ischemia and reperfusion, injury in the lung due to neutrophil infiltration and oxygen free radicals has been demonstrated in animal models. In addition to being a potent immunosuppressant, FK506 modulates neutrophilic infiltration. To test this effect we looked at the role of FK506 in prevention of lung injury following hind limb ischemia and reperfusion model in rats.

**Methods:** Twenty-two male Sprague-Dawley rats were randomized to receive FK506 at doses of 0.3 mg/kg/day, 0.5 mg/kg/day, 1mg/kg/day or normal saline via intraperitoneal injections as pretreatment. On the fourth day the animals were subjected to 2 hours of ischemia to their hind limbs using ourniquet method. After 2 hours of ischemia, tourniquets were released and the extremities were reperfused for 2 hours. Lung tissue assays were performed for lipid peroxidation products malondealdehide (MDA) and conjugated diens (CD), and total glutathione (GSH). Lung tissues were also examined histopathologically under light microscopy.

**Results:** Animals that were pretreated with FK506 showed the least lipid peroxidation product (MDA  $33.92 \pm 5.33$ ,  $p < 0.01$ ). Total glutathione levels and conjugated diens levels showed no significant difference. Histopathologic examination showed less neutrophil infiltration and less lung tissue damage in the study groups.

**Conclusion:** Lower levels of malondealdehide (MDA) found in lung tissue suggest that pretreatment with FK506 reduces the production of oxygen free radicals that are accelerated by ischemia and reperfusion. There is no significant effect of FK 506 on glutathione system.

**Keywords:** Lower limb ischemia-reperfusion, lung injury, FK506

Turkish J Thorac Cardiovasc Surg 2001;9:242-246

**Sunulduğu Kongre:** 50. European Society of Cardiovascular Surgery Kongresi, 7-11 Haziran, Budapeşte, "Dos Santos" ödülü

**Adres:** Dr. Atike Tekeli, Marmara Üniversitesi Hastanesi Kalp Damar Cerrahisi Ana Bilim Dalı, Tophanelioğlu Cad. 13, Altunizade, 81090, İstanbul

## Giriş

Alt ekstremitte iske mi ve reperfüzyonu sık karşılaşılan ve klinik açıdan önemli bir olaydır. Reperfüzyonla birlikte serbest oksijen radikalleri ve inflamatuvar mediatörlerin etkisiyle hem lokal hem de sistemik hasar oluşumu başlamış olur (1-3). Kan akımının yeniden sağlanması ekstremitteyi kurtarmasına karşın, multisistem organ disfonksiyonu gelişebilir ve mortaliteye neden olabilir. Polimorfonükleer lökositler (PMN) iske mi reperfüzyon hasarında önemli rol oynamaktadırlar. Bu hasar miyokard dokusunda, böbreklerde ve akciğerlerde gözlenebilir (4). Akciğer dokusu alt ekstremitte iske mi reperfüzyon hasarının en çok etkilediği hedef organdır. Bunun etyolojisi tam olarak bilinmemekle birlikte, reperfüzyon sırasında bazı hü moral mediatörlerin bu hedef organ hasarında rol oynadığı düşünülmektedir (5,6). FK506 (Tacrolimus, Prograf Fujisawa CO.) "Streptomyces tsukubaensis" toprak mantarından üretilen immunosupresif bir ajandır. Karaciğer, barsak, böbrek ve miyokard iske mi ve reperfüzyon hasarında FK506'nın etkili olduğu gösterilmiştir [7-10]. FK506 nötrofil infiltrasyonunu modüle eder ve nötrofil agregasyonunu ve hücrelerin adherensini arttıran tumor nekrosis faktör üretimini inhibe eder [11]. Bu çalışma FK506'nın profilaktik tedavisinin bilateral alt ekstremitte iske mi reperfüzyonu sonrası oluşan akciğer hasarını korumadaki etkisini araştırmak amacıyla yapılmıştır.

## Materyal ve Metod

Deney sel çalışmamız Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Komitesi tarafından denetlenmiş ve uygun bulunmuştur. 22, 300 - 350gr, erkek, Sprague-Dawley sıçan dört gruba ayrılmış ve deneklere 3 gün boyunca 0.3 mg/kg/gün, 0.5 mg/kg/gün, 1.0 mg/kg/gün dozlarında FK506 ve normal saline solusyonu intraperitoneal olarak enjekte edilmiştir (Tablo 1). Dördüncü gün hayvanlara intraperitoneal olarak ketamine hydrochloride (Ketalar, Parke-Davis) 100 mg/kg enjekte edilerek uyutulmuş ve bilateral alt ekstremiteleri traşlanmıştır. Tüm hayvanların bilateral alt ekstremitelerine turnike metodu uygulanarak 2 saat boyunca iske mi uygulanmış, arteriyal akımın kaybolduğu doppler USG yoluyla doppler sinyallerinin alınamaması ile gösterilmiştir. 2 saat sonra turnikeler açılarak 2 saat boyunca reperfüzyon yapılmış, arteriyal akımın kontrolü yine doppler USG ile yapılmıştır. Dördüncü saatin sonunda hayvanlara yüksek doz thiopental (Pentothal Sodyum, Fako) enjekte edilerek sakrifikasyon yapılmış ve median sternotomi ile akciğer dokusu çıkarılarak histopatolojik ve biyokimyasal (MDA, CD, GSH düzeyleri) analiz yapılmıştır.

Tablo 1. Çalışma grupları, FK506 dozları.

Gruplar	FK506* dozu	n
Grup 1**	-	5
Grup 2	1.0 mg/kg/gün	6
Grup 3	0.3 mg/kg/gün	6
Grup 4	0.5 mg/kg/gün	5

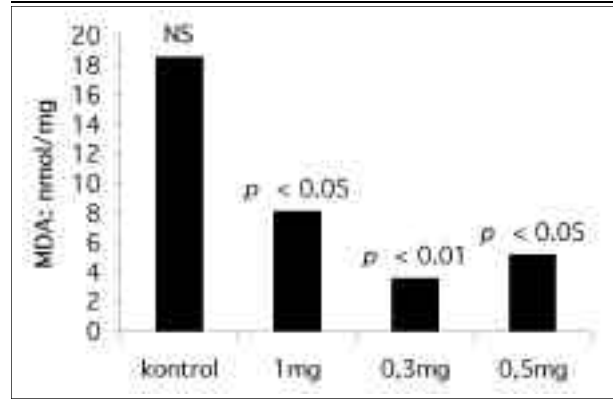
\* FK506 alt ekstremitte iske mi ve reperfüzyonu öncesi 3 gün boyunca intraperitoneal olarak enjekte edilmiştir.

\*\* Kontrol grubu, bu gruba sadece normal saline solusyonu enjekte edilmiş ve alt ekstremitte iske mi ve reperfüzyonu uygulanmıştır.

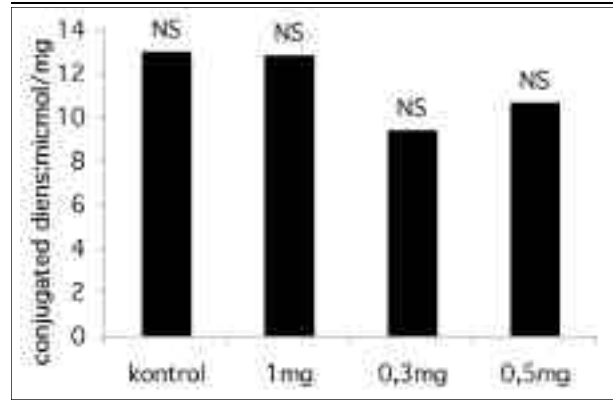
## Biyokimyasal Analiz:

Akciğer dokuları sıvı nitrojen de dondurulmuş ve ölçümler başlayana kadar -80°C' de saklanmıştır. 20 micron kalınlığındaki preparatlar hazırlanmış ve tüm gece boyunca vakumla kurutulmuştur (20°C'de). Dondurulup kurutulmuş preparatlar -20°C'de saklanmıştır.

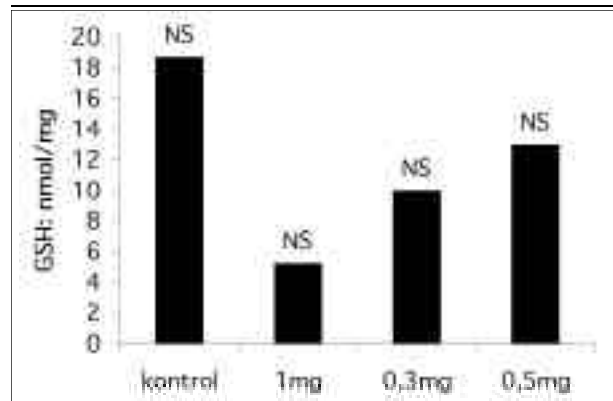
Tablo 2. Malondealdehyde (MDA) mean değerleri (nmol/mg). P değerleri kontrol ve çalışma grupları arasındaki farkı göstermektedir. NS, istatistiksel olarak anlamlı değil.



Tablo 3. Konjuge dien mean değerleri (\_mol/mg). NS, istatistiksel olarak anlamlı değil.



Tablo 4. Glutathione (GSH) mean değerleri (nmol/mg). NS, istatistiksel olarak anlamlı değil.



#### **Doku Malondealdehide Çalışması:**

Akciğer dokusunda lipid peroksidasyon çalışması, lipid peroksidasyonunu son ürünü olan MDA düzeyinin ölçülmesiyle yapılmaktadır. Homogenatlar 20mg dondurulup kurutulmuş dokuya % 0.001 butylated hydroxytoluene ve % 0.07 sodyum dodecyl sulfate içeren 1.5ml soğuk saline solusyonu oranında, Potter tipi cam homogenizer kullanılarak yapılmıştır. Butylated hydroxytoluene saline solusyonu her kullanımdan 10 dakika önce nitrojen gazına tabi tutulmuştur. Homojenat ethanol chloroform (3:2) ile yıkanır ve hemoglobin uzaklaştırılır. MDA thiobarbitürik asid ile kalorimetrik reaksiyonla çalışılır ve konsantrasyonu nmol/mg protein olarak ölçülür.

#### **Glutathione Çalışması:**

Dokudaki glutathione düzeyi nmol/mg olarak Ellman'a göre çalışılmıştır [18].

#### **Konjuge Dien Çalışması:**

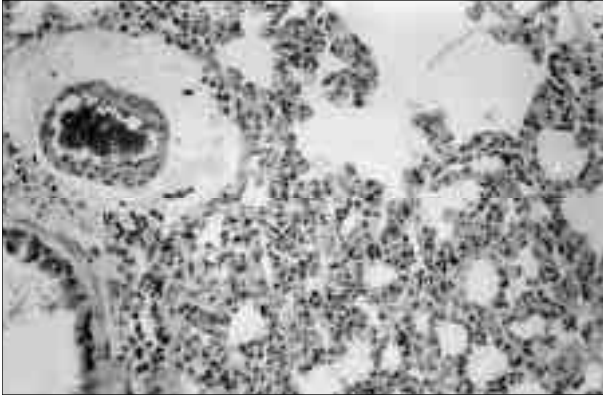
Konjuge dienlerin oluşumu spektrofotometre ile 250°C'de 234nm (A234)' deki absorbsanın artması ile belirlenir [19].

#### **Histopatolojik Çalışma:**

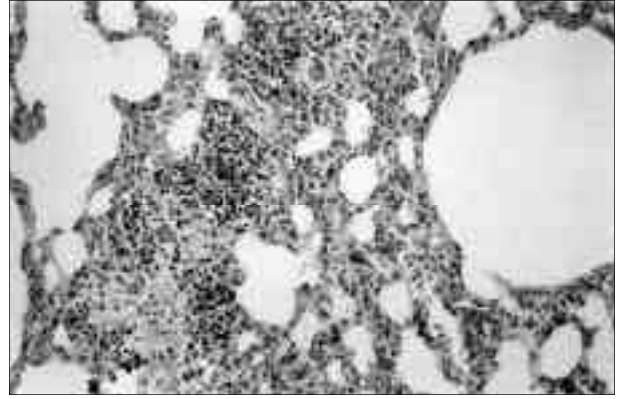
Spesimenler % 10 formalin ile fikse edilerek parafine gömülmüş ve 4 mikron kalınlığında kesiler alınıp hematoksilin ve eosin ile boyanmıştır. Bütün örnekler ışık mikroskopisi altında incelenmiştir.

#### **İstatistiksel Çalışma:**

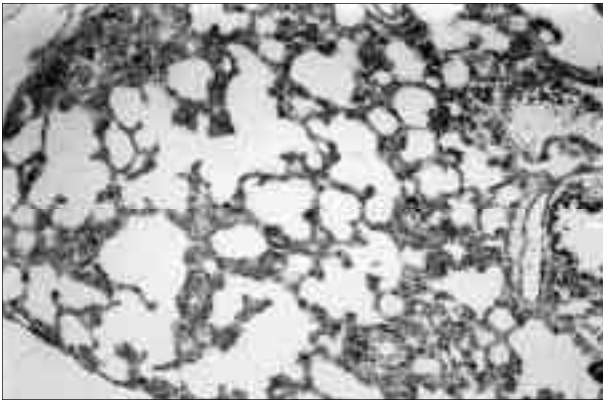
Değerler mean  $\pm$  Standart Deviasyon (SD ) olarak belirtilmiştir. Kruskal Wallis nonparametrik ANOVA ve Dunn's multiple comparison testleri çalışma ve kontrol grubunu karşılaştırmak için kullanılmış ve *p* değeri < 0.05 ise anlamlı olarak kabul edilmiştir.



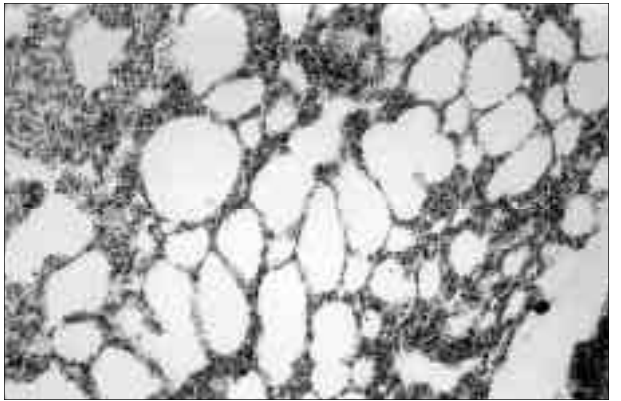
**Resim 1.** Kontrol grubu akciğer dokusu ışık mikroskopisi resmi, alveolar yapının bozulduğu, interstisyel ve periarteriyal ödem gösterilmiştir. Hemotoxylin ve eosin boyaması. Büyütme X 66.



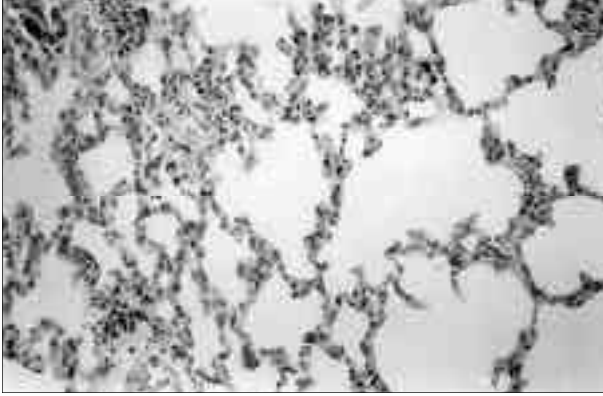
**Resim 2.** Kontrol grubu akciğer dokusu ışık mikroskopisi resmi, artmış lökositik infiltrasyon gösterilmiştir. Hemotoxylin ve eosin boyaması. Büyütme X 66.



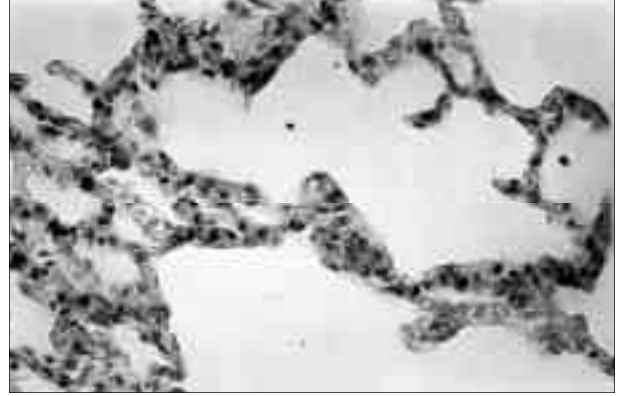
**Resim 3.** 1mg / kg / gün FK506 almış çalışma grubu akciğer dokusu ışık mikroskopisi resmi, kontrol grubuna göre daha az periarteryal ve interstisyel ödem ve daha az bozulmuş alveoler yapı ile daha az nötrofil infiltrasyonu gösterilmiştir. Hemotoxylin ve eosin boyaması. Büyütme X 66.



**Resim 4.** 0.5 mg / kg / gün FK506 almış çalışma grubu akciğer dokusu ışık mikroskopisi resmi, kontrol grubuna göre daha az bozulmuş alveoler yapı ile daha az nötrofil infiltrasyonu gösterilmiştir. Hemotoxylin ve eosin boyaması. Büyütme X 66.



**Resim 5.** 0.3 mg / kg / gün FK506 almış çalışma grubu akciğer dokusu ışık mikroskopisi resmi, normale yakın alveolar yapı ve az sayıda nötrofil infiltrasyonu gösterilmiştir. Hemotoxylin ve eosin boyaması. Büyütme X 66.



**Resim 6.** 0.3 mg / kg / gün FK506 almış çalışma grubu akciğer dokusu ışık mikroskopisi resmi, alveolar duvarı yapan hücrelerin normale yakın dizilimi gösterilmiştir. Hemotoxylin ve eosin boyaması. Büyütme X 132.

## Bulgular

### Biyokimyasal Bulgular:

FK506 verilen hayvanlarda lipid peroksidasyon ürünü olan MDA düzeyinde azalma tesbit edilmiş ve bu azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (Tablo 2). Total glutathione ve konjuge dien düzeyleri açısından çalışma ve kontrol grupları arasında anlamlı bir fark saptanmamıştır (Tablo 3-4).

### Histopatolojik Bulgular:

Farklı dozlarda FK506 alan çalışma grubunun ışık mikroskopisinde nötrofil infiltrasyonunda azalma tesbit edilmiştir. Daha az intraalveolar kanama, kan damarları etrafında daha az ödem ve intraalveolar septum kalınlığı normale yakın olarak gözlenmiştir. Ancak kontrol grubunda (normal saline solusyonu alan grup) alveolar yapı tamamen bozulmuştur. Alveolar septa kalınlaşmış ve interstisyel ödem tesbit edilmiştir. Alveoller etrafında büyük odaklar oluşturan lökositik infiltrasyon, intraalveolar fibrin depozitleri ve intraalveolar kanama büyük boyutta bir akciğer hasarının göstergesidir (Resim 1-6).

## Tartışma

İskemi reperfüzyon hasarının temelinde reperfüzyon esnasında dokunun oksijenasyonu sonucu ortaya çıkan oksijen radikalleri bulunmaktadır [1]. Reperfüze olmuş doku serbest oksijen radikalleri oluşumuna bağlı nekrotik değişiklikler gösterebilir. Reaktif oksiradikaller birçok kaynaktan salınabilir, bunların arasında en önemli olanı ise aktive olmuş nötrofillerdir [11]. İskemi reperfüzyon hasarında nötrofillerin rolü geniş olarak çalışılmış ve bu rolün önemi vurgulanmıştır [6,12,13]. Reperfüzyonu takiben oluşan akciğer hasarındaki en önemli patolojik olay, aktive nötrofiller tarafından salınan serbest radikallerin neden olduğu endotel hücre hasarındır [14]. Plasmada bulunan proinflamatuvar ajanlardan kompleman faktörleri, sitokinler (IL-6, IL-8, TNF), platelet activating faktör ve lökotrienler de endotel hücre hasarına sebep olmaktadır [20,21]. Pulmoner vasokonstriksiyon, hipertansiyon, ve artmış pulmoner vasküler geçirgenlik endotel hücre fonksiyonu

bozulmasının en sık görülen sonuçlarıdır [4]. Bu nedenle akciğer hasarının oluşumunu engellemek için yapılması gereken en önemli şey nötrofil infiltrasyonunun önlenmesidir [15].

FK506 (Tacrolimus) güçlü bir immunosupresif olmasının yanısıra enflamasyon sırasında nötrofil infiltrasyonunu da modüle etmektedir [16].

MDA lipid peroksidasyonun son ürünüdür ve bu çalışmada lipid peroksidasyonunun ciddiyetini tesbit etmek için kullanılmıştır. Çalışmamızda sıçanların bilateral alt ekstremitelerinde oluşturulan iskemi ve reperfüzyon akciğer dokusunda MDA seviyelerinin yükselmesine sebep olmuştur. Kontrol grubundaki artmış MDA düzeyleri, histolojik çalışmada tespit edilen nekroz ve artmış nötrofil infiltrasyonu ile iyi bir korelasyon göstermiştir. Kontrol grubunda gözlenen MDA düzeyleri FK506 verilen gruplarda belirgin olarak azalmıştır. FK506' nın doku hasarını önlemedeki etkisi, büyük olasılıkla nötrofil kemotaksisini, infiltrasyonunu ve faktör salınımını inhibe etmesine ve serbest oksijen radikallerinin salınımını azaltmasına bağlıdır. Ancak mekanizma tam olarak açıklanamamıştır. FK506' nın nötrofil infiltrasyonunu, sitokin ve lenfokinlerin salınımına olan etkisi ile modüle ettiği düşünülmektedir [8,15,17].

Bu çalışmada doku GSH düzeyleri de ölçülmüş ancak FK506' nın glutathione sistemi üzerine belirgin bir etkisi tespit edilememiştir. Bu da bize FK506' nın intraselüler koruma etkisinin glutathione sisteminden farklı bir sistem üzerinden olabileceğini düşündürmüştür. Bu hipotezi doğrulamak için daha fazla çalışmaya gerek vardır.

Histopatolojik olarak lökositik infiltrasyon açısından çalışma gruplarında kontrol grubuna göre belirgin bir azalma gözlenmiştir.

Sonuç olarak, histopatolojik incelemede gözlenen artmış nötrofil infiltrasyonu ve dokuda artmış MDA düzeyleri doku hasarı ile nötrofil infiltrasyonu ve serbest radikal oluşumu arasında yakın bir ilişkiyi düşündürmektedir. Çalışmamızın sonuçlarına göre alt ekstremitte iskemi ve reperfüzyonu ile ilişkili akciğer hasarının FK506 kullanımı ile düzeldiği ve uzak organ hasarına neden olan nötrofil infiltrasyonunun engellendiği saptanmıştır. Ancak kesin etki mekanizmasının tesbiti için ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

*\*Bu deneysel çalışma Fujisawa CO tarafından desteklenmiştir.*

## Kaynaklar

1. Prem JT, Eppinger M, Lemmon G, Miller S, Nolan D, Peoples J. The role of glutamine in skeletal muscle ischemia/reperfusion injury in the rat hind limb model. *Am J Surg* 1999;178:147-150.
2. Klausner JM, Paterson IS, Valeri R, Hechtman HB. Limb ischemia induced increase in permeability is mediated by leucocytes and leukotriens. *Ann Surg* 1988;208:755-60.
3. Klausner JM, Paterson IS, Kozbik L, Valeri R, Shepro D, Hechtman HB. Oxygen free radicals mediate ischemia-induced lung injury. *Surgery* 1989;105:192-9.
4. Bengisun U, Koksoy C, Bengisun JS, Bayraktaroglu G, Camur A, Aras N. Ischemia and reperfusion injury: prevention of pulmonary hypertension and leukosequestration following lower limb ischemia. *Prostaglandin Leukot Essent Fatty Acids* 1997;56:117-120.
5. Fantini GA, Conte MS. Pulmonary failure following lower torso ischemia: clinical evidence for remote effect of reperfusion injury. *Am J Surg* 1995;61:316-9.
6. İsbir S, Akgün S, Ak K, Zeybek Ü, Aydın M, Civelek A, Tekeli A, Çobanoğlu A. Akut alt ekstremite iskemi/reperfüzyon hasarının akciğer serbest oksijen radikalleri üzerine olan etkisi. *TKDCD* 2000;8:2,629-31.
7. Dhar Dk, Nagasue N, Kimoto T, et al. The salutary effect of FK506 in ischemia reperfusion injury of the canine liver. *Transplantation* 1992;54:583-8.
8. Kubes P, Hunter J, Granger DN. Effects of cyclosporine A and FK506 on ischemia reperfusion injury induced neutrophil infiltration in the cat. *Dig. Dis. Sci.* 1991;36:1469-72.
9. Sakr M, Zetti G, McClain C, et al. The protective effect of FK506 pretreatment against renal ischemia reperfusion injury in rats. *Transplantation* 1992;53:987-91.
10. Nishinaka Y, Sugiyama S, Yokota M, et al. Protective effect of FK506 on ischemia reperfusion induced myocardial damage in canine heart. *J Cardiovasc Pharmacol* 1993;21:448-54.
11. Cetinkale O, Bilgic L, Bolayirli M, Sengul R, Ayan F, Burcak G. Involvement of neutrophils in ischemia reperfusion injury of inguinal island skin flaps in rats. *Plast Reconstr Surg* 1998;102:153-160.
12. Lee C, Kerrigan CL, Tellado JM. Altered neutrophil function following reperfusion of an ischemic myocutaneous flap. *Plast Reconstr Surg* 1992;89:916-23.
13. Cetinkale O, Bilgic L, Ayan F, Kandilci A. Neutrophil mediated injury ischemic skin flaps: Amelioration of ischemic injury by cyclosporine in the rat. *Ann Plast Surg* 1996;37:66-74.
14. Messent M, Griffiths MJD, Evans TW. Pulmonary vascular reactivity and ischemia reperfusion injury in the rat. *Clin Sci.* 1993;85:71-5.
15. Reilly PM, Schiller HJ, Bulkley GB. Pharmacologic approach to tissue injury mediated by free radicals and other reactive oxygen metabolites. *Am J Surg* 1991;161:488-503.
16. Cetinkale O, Konukoglu D, Senel O, Kemerli GD, Yazar S. Modulating the functions of neutrophils and lipid peroxidation by FK506 in a rat model of thermal injury. *Burns* 1999;25:105-12.
17. Kawano K, Kim YI, Goto S, Ono M, Kobayashi M. A protective effect of FK506 in ischemically injured rat livers. *Transplantation* 1991;52:143-5.
18. Ellman GL. Tissue sulphhydryl groups. *Arch Biochem Biophys.* 1959;82:70-7.
19. Julier K, Maekness MI, Dean JD, Durrington PN. Susceptibility of low and high density lipoproteins from diabetic subjects to in vitro oxidative modification. *Brit Diab Assoc Diab Med* 1999;16:415-23.
20. Graeme MR. Ischaemia / reperfusion, inflammatory responses and acute lung injury. *Thorax* 1997;52:841-2.
21. Tilney NL, Paz D, Ames J, Gasser M, Laskowski I, Hancock WW. Ischemia-reperfusion injury. *Transplant Proc* 2001;33:843-4.