

İloprostun Deneysel Aortik İskemi-Reperfüzyon Modelinde İskelet Kası Hasarına Etkisi

The Effect of Iloprost on Skeleton Muscle Injury in an Experimental Model of Aortic Ischemia-Reperfusion

Dr. İlker TEKİN,^a
Dr. İlker KİRİŞ,^b
Dr. Nermin KARAHAN,^c
Dr. Onur AKTÜRK,^d
Dr. Namık DELİBAŞ,^d
Dr. Ahmet ÖCAL^b

^aKalp ve Damar Cerrahisi Kliniği, Evliya Çelebi Devlet Hastanesi, Kütahya

^bKalp ve Damar Cerrahisi AD,

^cBiyokimya AD,

^dPatoloji AD,

Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi, Isparta

Geliş Tarihi/Received: 20.11.2008

Kabul Tarihi/Accepted: 14.04.2009

Bu çalışma özet olarak "III. Kardiyojoloji ve Kardiyovasküler Cerrahide Yenilikler Kongresi" ve "57th European Society of Cardiovascular Surgery International Congress"de sunulmuştur.

Yazışma Adresi/Correspondence:

Dr. İlker TEKİN

Evliya Çelebi Devlet Hastanesi,

Kalp ve Damar Cerrahisi Kliniği,

Kütahya,

TÜRKİYE/TURKEY

drtekin@hotmail.com

ÖZET Amaç: Bu çalışmanın amacı, iloprostun aortik iskemi-reperfüzyon (İ-R) sonrası oluşan iskelet kası hasarına etkisini araştırmaktır. **Gereç ve Yöntemler:** Yirmi dört adet Wistar-Albino rat rastgele olarak üç gruba ayrıldı (n= 8); kontrol (sham laparotomi), aortik İ-R (120 dakika iskemi ve 120 dakika reperfüzyon) ve aortik İ-R + iloprost (120 dakika reperfüzyon süresince 0.45 µg/kg/saat dozda intravenöz infüzyon). Biyokimyasal analizler için kan ve histopatolojik değerlendirme için gastrocnemius kas örnekleri alındı. Malondialdehid (MDA), kreatinin fosfokinaz (CPK), "intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1)", "vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1)" ve P selektin plazma düzeyleri ölçüldü. Gastrocnemius kas doku örneklerinde, P selektin, L selektin, "tumor necrosis factor-alpha (TNF-α)", CD11b, CD18, ICAM-1 ve "cyclooxygenase-2 (COX-2)" için immünohistokimyasal değerlendirme yapıldı. **Bulgular:** Plazma MDA, CPK, P selektin ve ICAM-1 düzeylerini aortik İ-R anlamlı derecede arttırırken (p< 0.05'e karşı kontrol grubu), iloprost anlamlı derecede azalttı (p< 0.05'ye karşı AIR grubu). Aortik İ-R grubunda P selektin, L selektin, TNF-α, CD11b, CD18, ICAM-1 ve COX-2 immünoaktivitesi kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksekti (p< 0.05). Aortik İ-R + iloprost grubunda P selektin, L selektin, CD18 ve COX-2 immünoaktivitesi aortik İ-R grubuna göre anlamlı derecede düşüktü (p< 0.05). **Sonuç:** Bu çalışmanın sonuçları, iloprostun aortik İ-R sonrası oluşan iskelet kası hasarını azalttığını göstermektedir. İloprostun bu yararlı etkisinde, aortik İ-R sonrası artmış lokal ve sistemik adezyon molekülleri ifadesinin azaltılması önemli role sahiptir.

Anahtar Kelimeler: Abdominal aorta; adezyon molekülleri; reperfüzyon hasarı; iskelet kası

ABSTRACT Objective: The purpose of this study was to examine the effect of iloprost on skeleton muscle injury that occurs following aortic ischemia-reperfusion (I-R). **Material and Methods:** Twenty four Wistar-Albino rats were randomized into three groups (n = 8) as follows: control (sham laparotomy), aortic I-R (120 min ischemia and 120 min reperfusion), and aortic I-R + iloprost (0.45 µg/kg/hour intravenous infusion during 120 min reperfusion). Blood samples for biochemical analysis and gastrocnemius muscle samples for histopathological examinations were obtained. Plasma levels of malondialdehyde (MDA), creatine phosphokinase (CPK), intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), vascular cell adhesion molecule (VCAM-1) and P selectin were measured. In gastrocnemius muscle samples, immunohistochemical analyses were done for P selectin, L selectin, tumor necrosis factor-alpha (TNF-α), CD11b, CD18, ICAM-1 and cyclooxygenase-2 (COX-2). **Results:** Aortic I-R significantly increased (p< 0.05 vs control) whereas iloprost significantly decreased (p< 0.05 vs aortic I-R) the plasma levels of MDA, CPK, P selectin and ICAM-1. In the AIR group, immunoreactivity of P selectin, L selectin, TNF-α, CD11b, CD18, ICAM-1 and COX-2 were significantly higher than in the control group (p< 0.05). In the AIR + iloprost group, immunoreactivity of P selectin, L selectin, CD18 and COX-2 were significantly lower than in the AIR group (p< 0.05). **Conclusion:** The results of this study show that, iloprost attenuates skeleton muscle injury that occurs following aortic I-R. Decrement of increased local and systemic expression of adhesion molecules after AIR has an important role in this beneficial effect of iloprost.

Key Words: Aorta, abdominal; cell adhesion molecules; reperfusion injury; muscle, skeletal

İskemi reperfüzyon (İ-R) hasarı; birçok hastalık (serebrovasküler olay, şok, travma) ve medikal/cerrahi girişim (trombolitik tedavi, koroner anjiyoplasti, transplantasyon, kardiyopulmoner bypass, anevrizma cerrahisi, periferik arter cerrahisi) için ortak klinik tablodur. İ-R; artmış oksidan oluşumu, kompleman aktivasyonu, lökosit-endothel-platelet adezyon ve etkileşimi, mikrovasküler geçirgenlik artışı, endotel bağımlı vazodilatasyon disfonksiyonu ve inflamatuvar molekül (sitokin, kemokin) artışı ile karakterizedir.^{1,2} İ-R hasarı gelişmesinde lökosit-endothel ve lökosit-platelet etkileşimleri merkezi rol oynar.³

Reperfüzyon sonrası aktive olmuş lökositlerin endotele yapışıp interstisyel alana geçişleri lökosit yuvarlanma, adezyon ve diapedezi süreçlerini içerir. Lökosit yuvarlanması selektin ailesi (lökosit; L selektin, endotel; P/E selektin) aracılığıyla gerçekleşir. Bunu endotel, platelet ve lökositlerden sentezlenen kemokin ve kemoatraktanların lökositlerle etkileşimi ve lökosit yüzey β_2 integrin (CD11b/CD18) ifadesi izler. Lökosit yüzey β_2 integrin ve endotel yüzey vasküler hücre adezyon molekülü/intraselüler adezyon molekülü [vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1)/intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1)] etkileşimi güçlü adezyonla sonuçlanır. Bunu platelet endotelial hücre adezyon molekülü [endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1)] aracılı lökosit interstisyel göçü izler.⁴ Reperfüzyon sonrası iskemik dokuya olan sürekli lökosit göçü, İ-R'ye bağlı doku hasarının devamını ve genişlemesini sağlar. Lökositler, proteolitik enzim (elastaz) ve serbest oksijen radikalleri sentezi ve kapiller seviyede mikrodolaşım tıkanıklığı ile hasara katkıda bulunurlar.^{1,3,5} Reperfüzyon sonrası iskemik dokuda biriken ilk hücreler plateletler olup, endotel aktivasyonu ve lökosit birikimine katkıda bulunurlar. Nitrik oksit (NO), prostasiklin, adenozin ve reaktif oksijen türevleri (ROT) platelet aktivasyonu ve platelet aracılı hasarı kontrol eder.^{3,6}

Alt ekstremite İ-R hasarında lokal ve sistemik etkiler gözlenir. Lokal etkiler iskelet kası ve damar endotelinde gözlenirken, sistemik etkiler başlıca akciğer, kalp, beyin ve böbrekler olmak üzere tüm organlarda gözlenebilir.⁷ Alt ekstremite İ-R'de

mikrovasküler disfonksiyon ve kas değişiklikleri birbirleriyle paralel seyretmekte olup, prognoz kas hasarı miktarına bağlıdır. Reperfüzyonla oluşmuş inflamatuvar yanıt, geri dönüşümlü zedelenme miktarı ile doğru, nekrotik kas miktarı ile ters orantılıdır. Fasyatomi, antitrombotik ve antiinflamatuvar tedaviyle geri dönüşümlü zedelenmiş bölgedeki mikrovasküler disfonksiyon hedeflenir.⁷

İloprost, primer olarak endotel hücresi tarafından araşidonik asitten sentezlenen epoprostenol [prostaglandin (PG) I₂, prostasiklin]'ün sentetik karboksilin analogudur. İloprost; vazodilatör, antiplatelet ve sitoprotektif etkileri dışında fibrinolitik aktivite ve kırmızı küre elastikiyetinde artış, damar düz kas proliferasyonu, lökosit-endothel adezyon molekülleri yüzey ifadesi ve sitokin tümör nekrozis faktör-alfa (TNF- α), interlökin (IL)-1, IL-6 oluşumunda azalma meydana getirerek mikrodolaşım fonksiyonunda koruma sağlar.^{8,9}

İloprostun İ-R'ye bağlı oluşmuş lokal ve uzak organ hasarındaki koruyucu etkinliği klinik ve deneysel olarak gösterilmiştir. Ancak iloprostun alt ekstremite İ-R sonrası oluşan gastroknemius kas hasarına adezyon molekülleri üzerinden etkisi henüz yeterince araştırılmamıştır. Bu çalışmanın amacı, iloprostun aortik İ-R sonrası oluşan iskelet kası hasarına etkisini araştırmaktır. Bunu araştırmak için ratlarda infrarenal abdominal aorta oklüzyon-reperfüzyonu yapılmış ve iloprostun gastroknemius kasında oluşan İ-R hasarına etkisi değerlendirilmiştir.

GEREÇ VE YÖNTEMLER

Bu çalışmada, Süleyman Demirel Üniversitesi "Deneysel Hayvan Üretim Laboratuvarı"ndan temin edilen, her iki cinsten ve ortalama ağırlıkları 200-250 g olan 24 adet Wistar-Albino cinsi rat kullanıldı. Ratlar rastgele ve eşit sayıda (n= 8) olarak üç gruba ayrıldı. Ratlar deney öncesi bir hafta süre ile tel kafeslerde, 12 saat gece 12 saat gündüz sirkadiyen ritimde, ortam sıcaklığı 24-26°C ve nem oranı %50-60 olacak şekilde tutuldu. Ratların beslenmesinde standart ticari pellet yemi ve şehir içme suyu kullanıldı. Ratların çalışmadan 12 saat öncesinden yemleri kesildi, ancak bu dönemde su içmelerine izin verildi. Tüm ratların bakımları; Tıbbi Araştır-

malar Ulusal Derneği tarafından biçimlendirilen “Deney Hayvanlarının Bakım Prensipleri”ne ve “Laboratuvar Hayvanı Kaynakları Enstitüsü” tarafından hazırlanıp Ulusal Sağlık Enstitüsü tarafından yayınlanan (NIH basım no. 85-23, 1985 revize edildi) “Laboratuvar Hayvanlarının Bakım ve Kullanımı İçin Kılavuz”una uygun olarak yapıldı. Çalışma protokolü ve deneysel metot Süleyman Demirel Üniversitesi Etik Kurulu tarafından onaylandı (29.09.2005 tarih ve 10/05 sayılı Etik Kurul kararı).

DENEY MODELİ

Ratlar, eşit sayıda (n= 8) ve rastgele olarak üç gruptan birine dahil edildi. Kontrol grubunda (n= 8), diğer gruplara uygulanan cerrahi işlemin stresi ve süresi eşit olacak şekilde laparotomi ve abdominal aort diseksiyonu işlemi uygulandı, ancak İAA’ya oklüzyon uygulanmadı. AİR grubunda (n= 8), cerrahi işlem olan laparotomi ve abdominal aort diseksiyonu ardından İAA’ya 120 dakika süre ile atravmatik mikrovasküler klemp ile oklüzyonu takiben 120 dakikalık reperfüzyon işlemi uygulandı. AİR + iloprost grubunda (n= 8), infrarenal aortadaki 120 dakikalık iskemik periyod sonrası klemp kaldırılarak, reperfüzyon periyod başlangıcıyla 0.45 µg/kg/saat dozunda iloprost (İlomedin® 20 µg/mL, Bayer Schering Pharma AG, Berlin, Almanya) intravenöz (IV) infüzyonuna başlandı ve 120 dakikalık reperfüzyon periyodu boyunca infüzyon devam etti. İlaç dozuna karar verilirken Belkin ve ark.nın benzer deneysel çalışması göz önünde bulunduruldu.¹⁰ İlaç infüzyonu için; uygun antisepsi sonrası, “cutdown” metoduyla, kuyruk venine 24 G branül yerleştirildi. Her bir rat için 120 dakika içinde verilmesi gereken toplam iloprost miktarı 2 cc serum fizyolojik içerisinde dilüe edilip bir perfüzyatör ile (compact perfusator®, Braun, Almanya) kuyruk veninden yapıldı.

AORTİK İSKEMİ-REPERFÜZYON

Deney başlangıcında; intramusküler enjeksiyonla, 50 mg/kg dozda ketamin hidroklorür (Ketalar® flakon, Parke-Davis, ABD) verilerek anestezi sağlandı. İşlem, bir ısıtma lambası altında, ratlar supin pozisyonda iken gerçekleştirildi. Ciltleri aseptik olarak hazırlanan ratlara orta hat laparotomi yapıldı.

Bağırsakların ıslak gazlı bez yardımıyla uzaklaştırılmasının ardından İAA dikkatli bir şekilde explore edildi. İAA’ya, travmatik olmayan bir mikrovasküler klemp (vascu-statts II®, midi straight 1001-532; Scanlan Int., St. Paul, MN, ABD) konuldu. 120 dakika sonra İAA’daki mikrovasküler klemp kaldırıldı ve 120 dakika süreyle reperfüzyon sağlandı. Aortik iskemi; klempleme işlemi sırasında distal aortada pulsasyonun kaybolmasıyla, aortik reperfüzyon ise; klempin kaldırılması sonrası distal aortada pulsasyonun geri gelmesiyle onaylandı. Böylece “no-reflow” fenomeni ekarte edildi. Kontrol grubunu oluşturacak ratlarda laparotomi ve abdominal aort diseksiyonu eşit sürede (240 dakika) uygulandı, ancak bu grupta İ-R oluşturulmadı. İ-R dönemlerinde peritoneal boşluktan ısı ve sıvı kaybını en az miktara indirmek için; İAA’ya klemp konulması ve kaldırılması sonrası dönemlerinde, peritoneal boşluğa serum fizyolojik uygulanıp, batin insizyonu geçici olarak ıslak gazlı bez ile sarılarak kapatıldı. Reperfüzyon süresi sonunda; tüm ratlarda, median laparotomi kesisi yukarıya doğru ilerletilerek mediasten açıldı, kalbe ulaşıldı ve 5 cc’lik enjektör yardımıyla sağ ventriküler boşluktan kan alındı. Aynı şekilde, median laparotomi kesisi sağ inguinal alana ilerletilerek sağ gastroknemius kas doku örneği alındı. Ratlardan alınan kanlar, oda sıcaklığında yarım saat bekletildikten sonra, 4000 rpm’de 10 dakika santrifüj edildi ve rat plazma örnekleri -70°C’de saklandı. Kas doku örnekleri ise immünohistokimyasal ve hematoksilen-eozin değerlendirme yapılmıncaya kadar %10’luk formaldehid solüsyonu içinde saklandı.

BIYOKİMYASAL İŞLEMLER

-70°C’de saklanmış olan rat plazma örnekleri oda sıcaklığına getirilerek, malondialdehid (MDA), kreatinin fosfokinaz (CPK), P selektin, ICAM-I ve VCAM-I değerleri ölçüldü.

a) Malondialdehid

Plazma MDA düzeyleri, “High Performance Liquid Chromatography (HPLC)” metoduyla, bir ticari kit (Immundiagnostic serum/plazma MDA kiti®, Immundiagnostic Systems, Frankfurt, Almanya) kullanılarak ve HPLC cihazında (Finnigan MAT TS700, Thermo Finnigan, San Jose, CA, ABD) ölçüldü.

çüldü. Plazma MDA düzeyleri $\mu\text{mol/L}$ olarak ifade edildi.

b) Creatine Phosphokinase

Plazma CPK düzeyleri, spektrofotometrik yöntemle (340 nm dalga boyunda), bir ticari kit (Abbott Clinical chemistry CPK Kit No: 7D63-20[®], Abbott Laboratories, Abbott Park, IL, ABD) kullanılarak, spektrofotometre cihazında (Aeroset Automated Instrument Analyzer, Abbott Laboratories, Abbott Park, IL, ABD) ölçüldü. Plazma CPK düzeyleri U/L olarak ifade edildi.

c) P selektin (CD62P)

Plazma P selektin düzeyleri, ELISA yöntemiyle (450 nm dalga boyunda) bir ticari kit (Mouse sP-Selectin Quantikine[®], R&D Systems, Inc., Minneapolis, ABD) kullanılarak, bir ELISA cihazında (EL x 808 IU ultramicroplate reader Biotek Instruments, Winooski, Vermont, ABD) ölçüldü. Plazma P selektin düzeyleri ng/mL olarak ifade edildi.

d) Intercellular Adhesion Molecule-1 (CD54)

Plazma ICAM-1 düzeyleri, ELISA yöntemiyle (450 nm dalga boyunda), bir ticari kit (Mouse sICAM-I Quantikine[®], R&D Systems, Inc., Minneapolis, ABD) kullanılarak, bir ELISA cihazında (EL x 808 IU ultramicroplate reader Biotek Instruments, Winooski, Vermont, ABD) ölçüldü. Plazma ICAM-1 düzeyleri ng/mL olarak ifade edildi.

e) Vascular Cell Adhesion Molecule-1

Plazma VCAM-1 düzeyleri, ELISA yöntemiyle (450 nm dalga boyunda), bir ticari kit (Mouse sVCAM-I Quantikine[®] R&D Systems, Inc., Minneapolis, ABD) kullanılarak, bir ELISA cihazında (EL x 808 IU ultramicroplate reader Biotek Instruments, Winooski, Vermont, ABD) ölçüldü. Plazma VCAM-1 düzeyleri ng/mL olarak ifade edildi.

GASTROKNEMİUS KAS DOKU ÖRNEKLERİNİN HİSTOPATOLOJİK DEĞERLENDİRMESİ

Histopatolojik inceleme için doku örnekleri %10'luk tamponlu nötral formaldehid solüsyonunda 24 saat fikse edildi. Örneklerin tümü doku takip cihazında (Shandon Pathcenter) rutin takibe alınarak parafin bloklar hazırlandı. Bu parafin bloklar-

dan mikrotom (Leica Rotary) ile her doku örneği için 5 μm kalınlığında seri kesitler hazırlanarak hematoksilin eozin (HE) ve immünohistokimyasal (İHK) boyalar ile boyandı. Tüm patolojik incelemeler, kesitlerin hangi gruba ait olduğunu bilmeyen bir patoloj tarafından kör olarak yapıldı.

a) Hematoksilin Eozin Değerlendirme

Kesitler hematoksilin (Mayer's Hematoxylin, 06002L[®], Bio-Optica, Milano, İtalya) ve eozin ile boyandı ve ışık mikroskobu ile değerlendirildi.

b) İmmünohistokimyasal Boyama Tekniği ve Değerlendirme

İHK boyama tekniği: Seçilen parafin bloklardan elde edilen 5 μm kalınlığındaki kesitler poly-L-lizin kaplı lamlara alınarak, 37°C'lik etüvde 1 gece bekletildi. Sonrasında 10 dakika ksilene konularak deparafinize edilen kesitler %96'luk saf alkolde 5 dakika bekletilerek dehidratasyon sağlandı. Ardından 2 dakika distile suda yıkandı. Bu işlemi takiben, antijen geri alımının sağlanabilmesi için, sitratlı tampon (pH: 6) solüsyonu içinde, 98 °C'de 20 dakika kaynatıldı ve aynı tampon içerisinde oda ısısında 20 dakika soğutuldu. Sonrasında İHK boyamaya geçildi. İlk olarak, endojen peroksidaz aktivitesini ortadan kaldırmak için, %3'lük hidrojen peroksit ile bloklama işlemine tabi tutulup, 20 dakika inkübasyon yapıldı ve 5 dakika Fosfat Buffer Solüsyonu (PBS) ile yıkandı. Sonrasında 5 dakika protein blok (Large Volume Ultra V Block, TA-125-UB[®], Lab Vision Corporation, Fremont, CA, ABD) uygulandı. Bu işlemi takiben, kesitler yıkanmadan üzerlerindeki bloke eden solüsyon silkeleterek primer antikorlar uygulandı.

Uygulanan her bir primer antikor için farklı dilüsyon oranı ve inkübasyon zamanı uygulaması yapıldı;

1. P-selectin goat polyclonal (M-20/ SC-6943[®], Santa Cruz Biotechnology, Inc. Santa Cruz, California, ABD), 1/100 dilüsyon, 60 dakika inkübasyon,

2. L-selectin goat polyclonal (N-18/SC-6946[®], Santa Cruz Biotechnology, Inc. Santa Cruz, California, ABD), 1/100 dilüsyon, 60 dakika inkübasyon.

3. TNF-alpha mouse monoclonal (clone P/T2[®], Histopathology Ltd, Hungary), 1/50 dilüsyon, 30 dakika inkübasyon.

4. CD11b (CBL 11[®], Chemicon International, Inc., Temecula, California, ABD), 1/100 dilüsyon, 60 dakika inkübasyon.

5. İntegrin β2 (CD18) (M 18/2- SC-18862[®], Santa Cruz Biotechnology, Inc. Santa Cruz, California, ABD), 1/100 dilüsyon, 60 dakika inkübasyon.

6. ICAM-I (CD54) mouse monoclonal (15,2 / SC-107[®], Santa Cruz Biotechnology, Inc. Santa Cruz, California, ABD), 1/100 dilüsyon, 60 dakika inkübasyon.

7. Siklooksijenaz (COX)-2 goat polyclonal (M-19/SC-1747[®], Santa Cruz Biotechnology, Inc. Santa Cruz, California, ABD), 1/200 dilüsyon, 60 dakika inkübasyon.

Sonrasında primer antikorlar PBS'de 5 dakika yıkanıp, sekonder antikor (Biotinylated Goat Anti Polyvalent, TP-125-BN[®], Lab Vision Corporation, Fremont, CA, ABD) damlatılıp 20 dakika inkübasyon yapıldı. Tekrar PBS'de 5 dakika yıkanarak, tersiyer antikor (Large Volume Streptavidin Peroxidase, TS-125-HR[®], Lab Vision Corporation, Fremont, CA, ABD) damlatıldı ve 20 dakika inkübasyonda bırakıldı. 5 dakikalık PBS yıkaması tekrarlandı. Sonrasında diaminobenzidin (DAB) kromojen (TA-125-HD[®], Lab Vision Corporation, Fremont, CA, ABD) damlatılıp, 5-15 dakika inkübasyon sağlandı ve distile suda yıkandı. Dokular Mayer's hematoksilin (Mayer's Hematoxylin, 06002L[®], Bio-Optica, Milano, İtalya) içinde 1 dakika süreyle zıt boyandı. Ardından distile suda 2-5 dakika yıkanıp alkolden geçirildi. Havada kurutulan preparatlar ksilene konularak entellan ile kapatıldı.

İHK değerlendirme: Gastroknemius kas doku kesitlerinde, P selektin, L selektin, TNF-α, CD11b, CD18, ICAM-1(CD54) ve COX-2 boya tutulum yoğunluğu ve şiddeti incelendi.

Tüm doku kesitlerinin P selektin, L selektin, TNF-α, CD11b, CD18, ICAM-1 (CD54) İHK boyamalarında; boya tutulum ve yoğunluğu, Andrej ve

ark.nın yaptığı çalışmadaki skorlama sistemi referans alınarak; -, + ve ++ (-: Boyama yok, +: Hafif boyanma, ++: Şiddetli boyanma) olarak derecelendirildi. İHK bulguların gruplara göre ortalama skorları (-): Boyama yok, 0 puan, (+): Hafif, 1 puan ve (++) : Şiddetli, 2 puan olarak derecelendirilerek hesaplandı.¹¹

Tüm doku kesitlerinin COX-2 değerlendirilmesinde; boya tutulum ve yoğunluğu, yine Andrej ve ark.nın yaptığı çalışmadaki skorlama sistemi referans alınarak; -, +, ++ ve +++ (-: Boyama yok, +: Hafif boyanma, ++: Orta boyanma, +++: Şiddetli boyanma) olarak derecelendirildi.¹¹ İHK bulguların gruplara göre ortalama skorları (-): Bulgu yok, 0 puan, (+): Hafif 1 puan, (++) : Orta, 2 puan ve (+++) : Şiddetli, 3 puan olarak derecelendirilerek hesaplandı.

İSTATİSTİKSEL ANALİZ

İstatistiksel analizin yapılmasında bilgisayar programı olarak SPSS 13 (SPSS Inc., Chicago, IL, ABD) kullanıldı. Sayısal değişkenler ortalama ± standart sapma şeklinde sunuldu. P değerinin 0.05'ten küçük olması istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Biyokimyasal ve histopatolojik bulguların istatistiksel değerlendirilmesi sırasında gruplar arasındaki anlamlı farkların belirlenmesinde Kruskal-Wallis testi, iki grup arasındaki farkın belirlenmesinde de Mann-Whitney U testi kullanıldı. Kruskal-Wallis testi için p< 0.01 değerleri ve Mann-Whitney U testi için p< 0.05 değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

BULGULAR

BİYOKİMYASAL DEĞERLENDİRME

Gruplara ait plazma örneklerindeki MDA (µmol/L), CPK (U/L), P selektin (ng/mL), ICAM-1 (ng/mL), VCAM-1 (ng/mL) değerleri Tablo 1'de görülmektedir. AİR grubundaki plazma MDA, CPK, P selektin, ICAM-1 ve VCAM-1 değerleri kontrol grubundaki değerlere göre anlamlı derecede daha yüksekti (p< 0.05). AİR + iloprost grubunda ise plazma MDA, CPK, P selektin ve ICAM-1 değerleri AİR grubundaki değerlere göre anlamlı derecede daha düşüktü (p< 0.05). AİR + iloprost grubundaki

TABLO 1: Biyokimyasal inceleme sonuçları.

	Kontrol grubu	AİR grubu	AİR + iloprost grubu
MDA (μmol/L)	0.75 ± 0.20	1.19 ± 0.36 ^a	0.53 ± 0.16
CPK (μ/L)	10478.60 ± 2240.49	19711.33 ± 8160.41 ^a	10818.00 ± 1455.76
P selektin (ng/mL)	2.27 ± 0.43 ^a	8.73 ± 5.39 ^a	4.17 ± 2.10
ICAM-1 (ng/mL)	18.88 ± 2.45 ^a	24.64 ± 5.42 ^a	13.13 ± 2.50
VCAM-1 (ng/mL)	4.56 ± 1.99	14.93 ± 7.81 ^b	6.35 ± 1.72

^a= p < 0.05 vs diğer gruplar, ^b= p < 0.05 vs kontrol grubu.

MDA: Malondialdehid, CPK: Kreatinin fosfokinaz, ICAM-1: Intracellular cell adhesion molecule-1, VCAM-1: Vascular cell adhesion molecule-1.

plazma VCAM-1 değeri AİR grubundaki değere göre daha düşüktü, ancak aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildi (p > 0.05).

HİSTOLOJİK DEĞERLENDİRME

Gastroknemius kas dokularının HE boyama ile incelemelerinde, kontrol, AİR, AİR + iloprost gruplarında belirgin morfolojik değişiklik saptanmadı. Grupların İHK skorları ve değerlerin gruplar arasındaki istatistiksel analizi ise Tablo 2 ve 3'te görülmektedir.

Kontrol grubuna ait gastroknemius kas doku kesitlerinin İHK değerlendirmesinde, P selektin, L selektin, TNF-α, CD11b, CD18 ve ICAM-1 için immünoreaktivitenin olmadığı (ortalama skor: -) görüldü (Tablo 2), (Resim 1a, 2a, 3a). COX-2 için ise kas dokusu içi endotel hücre immünoreaktivitesinin hafif düzeyde (ortalama skor: +) olduğu saptandı (Tablo 3), (Resim 4a).

AİR grubuna ait gastroknemius kas doku kesitlerinin İHK değerlendirmesinde, P selektin, L selektin, TNF-α, CD11b, CD18 ve ICAM-1 için

TABLO 2: İmmünohistokimyasal inceleme (P selektin, L selektin, TNF-α, CD11b, CD18, ICAM-1) sonuçları.

	Kontrol grubu (n= 8) (Grup I)				AİR grubu (n= 8) (Grup II)				AİR + iloprost grubu (n= 8) (Grup III)				Kruskal-Wallis P	Mann-Whitney U p < 0.05
	-	+	++	Ortalama skor	-	+	++	Ortalama skor	-	+	++	Ortalama skor		
P selektin	8	0	0	-	0	0	8	++	1	5	2	+	p < 0.01	I-II, II-III, I-III
L selektin	8	0	0	-	0	1	7	++	1	6	1	+	p < 0.01	I-II, II-III, I-III
TNF-α	8	0	0	-	0	2	6	++	0	6	2	+	p < 0.01	I-II, I-III
CD11b	7	1	0	-	0	3	5	++	0	5	3	+	p < 0.01	I-II, I-III
CD18	8	0	0	-	0	3	5	++	0	7	1	+	p < 0.01	I-II, II-III, I-III
ICAM-1 (CD54)	8	0	0	-	0	2	6	++	0	4	4	+	p < 0.01	I-II, I-III

TNF-α = Tumor necrosis factor-alpha, ICAM-1= Intercellular adhesion molecule-1.

TABLO 3: İmmünohistokimyasal inceleme (COX-2) sonuçları.

	Kontrol grubu (n= 8) (Grup I)					AİR grubu (n= 8) (Grup II)					AİR + iloprost grubu (n= 8) (Grup III)					Kruskal-Wallis P	Mann-Whitney U p < 0.05
	-	+	++	+++	Ort. skor	-	+	++	+++	Ort. skor	-	+	++	+++	Ort. skor		
Gastroknemius Kas	-	+	++	+++	Ort. skor	-	+	++	+++	Ort. skor	-	+	++	+++	Ort. skor		
COX-2	0	5	3	0	+	0	0	3	5	+++	0	4	3	1	++	p < 0.01	I-II, II-III

Ort. skor= Ortalama skor.

immünoreaktivitenin şiddetli düzeyde (ortalama skor: ++) olduğu görüldü (Tablo 2), (Resim 1b, 2b, 3b). COX-2 için ise kas dokusu içi endotel hücre immünoreaktivitesinin şiddetli düzeyde (ortalama skor: +++) olduğu saptandı (Tablo 3), (Resim 4b).

AİR + iloprost grubuna ait gastroknemius kas doku kesitlerinin İHK değerlendirmesinde, P selektin, L selektin, TNF- α , CD11b, CD18 ve ICAM-1 için immünoreaktivitenin hafif düzeyde (ortalama skor: +) olduğu görüldü (Tablo 2), (Resim 1c, 2c, 3c). COX-2 için ise kas dokusu içi endotel hücre immünoreaktivitesinin orta düzeyde (ortalama skor: ++) olduğu saptandı (Tablo 3), (Resim 4c).

Gruplara ait İHK değerlendirme sonuçları birbirleriyle karşılaştırıldığında, AİR grubundaki P selektin, L selektin, TNF- α , CD11b, CD18, ICAM-1 ve COX-2 immünoreaktiviteleri kontrol grubundaki değerlere göre anlamlı derecede daha yüksekti ($p < 0.05$), (Tablo 2, 3). AİR + iloprost grubundaki P selektin, L selektin, CD18 ve COX2 immünoreaktivitelerinin ise AİR grubundaki değerlere göre anlamlı derecede daha düşük olduğu saptandı ($p < 0.05$), (Tablo 2, 3).

TARTIŞMA

Bu çalışmanın sonuçları, iloprostun aortik İ-R sonrası oluşan iskelet kası hasarını azalttığını göstermektedir. Bu düşüncüyü destekleyen ana bulgular;

1. AİR + iloprost grubundaki plazma MDA, CPK, P selektin ve ICAM-1 değerlerinin, AİR grubundaki değerlere göre anlamlı derecede düşük olması,

2. Gastroknemius kas örneklerinin İHK incelemesinde AİR + iloprost grubuna ait P selektin, L selektin, CD18 ve COX-2 immünoreaktivitelerinin AİR grubundaki değerlere göre anlamlı derecede düşük bulunmasıdır.

Bildiğimiz kadarıyla çalışmamız, İAA oklüzyon-reperfüzyonu sonrası iskelet kası hasarında iloprostun adezyon molekülleri üzerinden etkisi ile ilgili olarak yapılmış ilk deneysel çalışmadır.

MDA, araşidonik asit metabolizmasında, poli-ansatüre yağ asitlerinin peroksidasyonu sonucu oluşan stabil bir son üründür. Doku İ-R hasarında,

artmış serbest oksijen radikalleri (özellikle hidrok-sil radikali), hücre zarı fosfolipidlerinin peroksidasyonuna neden olarak hücre zarı bütünlüğünde bozulma, hücre şişmesi ve ölümüne neden olur.^{1,12} Dolayısıyla, bu kısır döngü sırasında meydana gelen ve stabil bir molekül olan MDA düzeyi ölçümü ile reaktif oksijen türevleri, membran hasarı ve lipid peroksidasyonu derecesi hakkında fikir sahibi olunabilir.¹³ Çalışmamızda, AİR sonrası plazma MDA değerinin anlamlı derecede yükseldiği görülmüştür. İR hasarı sonrası plazma MDA düzeylerinin yükseldiğini gösteren birçok deneysel çalışma vardır.¹⁴⁻¹⁶ AİR + iloprost grubundaki plazma MDA düzeylerinin, AİR grubundaki düzeye göre anlamlı derecede düşük olduğunu bulduk. Bozkurt ve ark., deneysel AİR modelinde iloprost ve E vitamininin iskelet kası hasarına olan etkisini araştırmışlar ve iloprost uygulaması ile AİR sonrası MDA düzeyinin anlamlı derecede azaldığını göstermişlerdir.¹⁵ Benzer şekilde, deneysel AİR modelinde iloprost ve pentoksifilin iskelet kası hasarına etkisinin araştırıldığı bir çalışmada, iloprostun kontrol grubuna göre doku MDA düzeylerinde anlamlı azalma sağladığı saptanmıştır.¹⁷ Çalışmamızda, AİR + iloprost grubundaki MDA değerlerinin AİR grubuna göre düşük olması, iloprostun, AİR sonrası oluşan lipid peroksidasyonu miktarını azalttığını düşündürmektedir.

Kas hasarının belirlenmesinde görüntüleme yöntemleri ve kas içi enzim plazma düzeylerinin ölçümü kullanılır. Fizyolojik şartlarda, enzim molekülleri plazma zarından sınırlı miktarda geçebilirler, ancak herhangi bir nedenle (hipoksi, viral, bakteriyel, fizik ajanlar) hücre zarı hasar gördüğünde seçici geçirgenlik özelliği bozulur ve hasarın derecesi, sitoplazmik konsantrasyonu ve molekül büyüklüğüne bağlı olarak hücre dışına çıkarlar. İskelet kası hasarının tespitinde kullanılan moleküller arasında, CPK, miyoglobulin, aspartat aminotransferaz (AST), laktat dehidrogenaz (LDH), beyin natriüretik peptid (BNP), atriyal natriüretik peptid (ANP), karbonik anhidraz, troponin ve kas yapı proteinleri yer alır.¹⁸ Bunların arasında CPK, en yüksek duyarlılığa sahip olup klinikte en çok kullanılan enzimdir ve kas hücresi kasılma veya taşıma sistemlerinde ATP yenilenmesinden sorum-

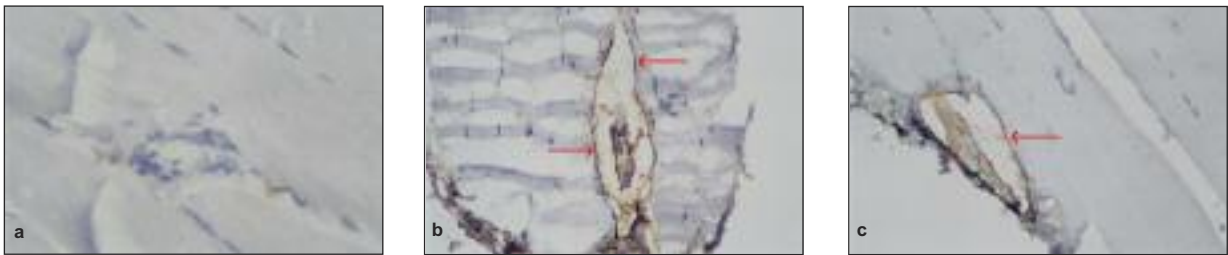


RESİM 1: Gastroknemius kas P seletin immünohistokimyasal kesitleri (200x DAB). **a:** Kontrol grubu P seletin immünohistokimyasal kesiti (200x DAB) (boyanma yok, skor: 0). **b:** AİR grubu P seletin immünohistokimyasal kesiti (200x DAB) (güçlü boyanma, skor: ++) (ok ile işaretli). **c:** AİR + iloprost grubu P seletin immünohistokimyasal kesiti (200x DAB) (zayıf boyanma, skor: +) (ok ile işaretli).

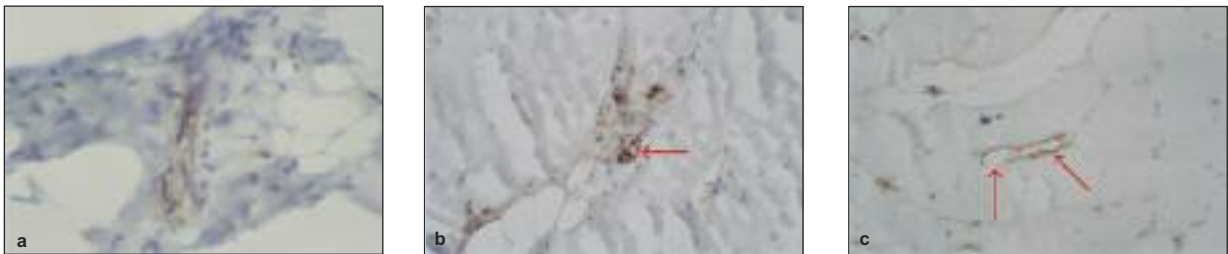
ludur.¹⁸ Çalışmamızda, AİR sonrası plazma CPK düzeyleri anlamlı derecede artmıştır. İR hasarı sonrası plazma CPK düzeylerinin arttığını gösteren birçok deneysel ve klinik çalışma vardır.^{15,19-21} Biz ise AİR + iloprost grubunda plazma CPK düzeylerinin AİR grubundaki düzeylere göre anlamlı derecede düşük olduğunu bulduk. Bozkurt ve ark., iloprost uygulaması ile AİR sonrası CPK değerlerinin anlamlı derecede azaldığını bulmuşlardır.¹⁵ Miyokardiyal İ-R hasarında da iloprost uygulanan grupta, İ-R grubuna göre plazma CPK değerlerinde anlamlı düşüş olduğu bildirilmiştir.¹⁹⁻²¹ Çalışmamızda AİR + iloprost grubunda elde edilen plazma

CPK düzeylerindeki anlamlı azalma benzer çalışmalar ile uyumludur. Bu bulgu, iloprostun, AİR sonrası oluşan iskelet kası hasarını azalttığını düşündürmektedir.

P seletin, endotel hücre Weibel-Palade cisimcikleri ve platelet alfa granüllerde yapısal olarak bulunan bir adezyon molekülüdür. Endotel hücresi ve plateletler aktive olduğunda P seletin hücre yüzey ifadesinde hızlı bir artış oluşarak bu hücrelerin lökosit, lenfosit ve monosit ile olan etkileşimlerinde önemli rol oynar.^{12,22,23} Çalışmamızda, AİR grubundaki plazma P seletin düzeylerinin, kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek ol-



RESİM 2: Gastroknemius kas L Seletin immünohistokimyasal kesitleri (200xDAB). **a:** Kontrol grubu L Seletin immünohistokimyasal kesiti (200xDAB) (boyanma yok, skor; 0). **b:** AİR grubu L Seletin immünohistokimyasal kesiti (200xDAB) (güçlü boyanma, skor; ++) (ok ile işaretli). **c:** AİR+iloprost grubu L Seletin immünohistokimyasal kesiti (200xDAB) (zayıf boyanma, skor; +) (ok ile işaretli).



RESİM 3: Gastroknemius kas CD18 immünohistokimyasal kesitleri (200xDAB). **a:** Kontrol grubu CD18 immünohistokimyasal kesiti (200xDAB) (boyanma yok, skor; 0). **b:** AİR grubu CD18 immünohistokimyasal kesiti (200xDAB) (güçlü boyanma, skor; ++) (ok ile işaretli). **c:** AİR+iloprost grubu CD18 immünohistokimyasal kesiti (200xDAB) (zayıf boyanma, skor; +) (ok ile işaretli).



RESİM 4: Gastrocnemius kas COX-2 immünohistokimyasal kesitleri (200x DAB). **a:** Kontrol grubu COX-2 immünohistokimyasal kesiti (200x DAB) (hafif boyanma, skor; +). **b:** AİR grubu COX-2 immünohistokimyasal kesiti (200x DAB) (şiddetli boyanma, skor; +++) (ok ile işaretli). **c:** AİR+iloprost grubu COX-2 immünohistokimyasal kesiti (200x DAB) (orta boyanma, skor; ++) (ok ile işaretli).

duğunu bulduk. Mathru ve ark. ise, alt ekstremiteye turnike uygulanması sonrası diz cerrahisi uygulanan hastalarda NO'nun reperfüzyonla oluşmuş inflamatuvar yanıtı etkisini inceledikleri çalışmalarında İ-R grubundaki plazma P seletin düzeyinin kontrol grubundaki düzeye göre anlamlı bir şekilde yüksek olduğunu bildirmişlerdir.²⁴ Çalışmamızda, AİR grubundaki P seletin immünoaktivitesinin kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde arttığı saptanmıştır. Wei ve ark.nın yaptığı rat kremaster kası İ-R modelinde mikrovasküler disfonksiyona diazoksit etkisinin araştırıldığı çalışmada ise, kremaster kas doku örneklerinde P seletin mRNA ekspresyonunun İ-R grubunda kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde yükseldiği bulunmuştur.²⁵ Çalışmamızda AİR + iloprost grubu P seletin immünoaktivitesinin AİR grubuna göre anlamlı düzeyde azaldığı görülmüştür. Hepatik İ-R modelinde PGE1 infüzyonunun etkisini araştıran bir çalışmada, doku ve plazma P seletin düzeylerinin İ-R grubunda kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde arttığı, İ-R + PGE1 grubunda ise İ-R grubuna göre anlamlı düzeyde azaldığı tespit edilmiştir.²⁶ Çalışmamızda, AİR + iloprost grubundaki hem biyokimyasal hem de histopatolojik olarak ölçülen P seletin düzeylerinin AİR grubundaki düzeylere göre anlamlı derecede düşük olduğu görülmektedir. Bu sonuçlar, iloprostun AİR sonrası oluşan iskelet kası hasarını azaltıcı etkisinin P seletin aracılı olabileceğini düşündürmektedir.

ICAM-1 ve VCAM-1, immünglobulin süper ailesi içinde yer alan adezyon molekülleridir. ICAM-1 endotel, lökosit, dermal fibroblast ve melanositlerde; VCAM-1 ise endotel hücrelerinde yapısal olarak bulunur. TNF- α , IL-1 β ve

lipopolisakkarid gibi sitokinler aracılığıyla ICAM-1 ve VCAM-1 hücre yüzey ifadeleri artışı, bu hücrelerin sırasıyla β 2 integrin (CD11a/CD18 ve CD11b/CD18) ve β 1 integrin (VLA-4) ailesine üye hücre yüzey molekülleri ile olan etkileşimlerini artırır. Bu integrin moleküller nötrofil, monosit, lenfosit, eozinofil, bazofil ve makrofajlarda bulunurlar. Dolayısıyla endotel-lökosit adezyonu ve birçok inflamatuvar olayda önemli rol oynarlar.^{22,23,27,28} Çalışmamızda, AİR grubu plazma ICAM-1 ve VCAM-1 düzeylerinin kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde arttığı gözlenmiştir. Mickley ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada İAA anevrizmasının cerrahi ve endovasküler tamir yöntemlerinin her ikisinde de anlamlı plazma ICAM-1 düzey artışı saptanmış, ancak artışın cerrahi grupta daha yüksek olduğu gözlenmiştir.²⁹ Biz, AİR grubundaki ICAM-1 immünoaktivitesinin kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde arttığını bulduk. Huda ve ark., diz cerrahisi sırasında hemostaz amaçlı konulan turnikeye ikincil gelişen iskelet kası İ-R hasarında ICAM-1 mRNA ifadesinin kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde arttığını saptamışlardır.³⁰ Lozano ve ark. ise deneysel suprarenal aortik İ-R modelinde NO'nun İ-R böbrek hasarı üzerine etkisini araştırdıkları çalışmalarında İ-R grubunda böbrek dokusu ICAM-1 ifadesinin kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde yükseldiğini saptamışlardır.³¹ Sonuçlarımızla paralellik gösteren bu çalışma sonuçları da, AİR'nin ICAM-1 ve VCAM-1 ifadesi üzerinde etkili olduğunu düşündürmektedir. AİR grubundaki anlamlı derecede yüksek doku ICAM-1 immünoaktivitesi ve plazma ICAM-1/VCAM-1 düzeyleri sırasıyla, bu grupta lokal ICAM-1 ve sis-

temik ICAM-1/VCAM-1 ifadelerindeki artışa işaret etmektedir. AİR'nin, ICAM-1 ve VCAM-1 aracılığı ile endotel-lökosit etkileşimini arttırdığı da speküle edilebilir. Bunun yanında, AİR grubunda artmış plazma ICAM-1 düzeylerinin AİR + iloprost grubunda anlamlı düzeyde azaldığını bulduk. Mazzone ve ark. sistemik skleroz ve periferik arter hastalığı hastalarında, iloprostun kontrol grubuna göre plazma ICAM-1 düzeyinde anlamlı düşüş oluşturduğunu saptamışlardır.³² Mittag ve ark., sistemik sklerozla ilişkili Raynaud fenomeninde iloprostun etkisini araştırdıkları çalışmalarında, plazma ICAM-1 düzeylerinde belirgin düşme saptamışlardır.³³ Bizim çalışmamızın ve benzer çalışmaların sonuçları paralellik göstermekte ve iloprostun AİR sonrası artmış ICAM-1 ifadesini azalttığını ve dolayısıyla AİR sonrası indüklenen endotel-lökosit etkileşimini inhibe edebileceğini düşündürmektedir.

L selektin, nötrofiller ve monositlerin tamamına yakınında, T ve B lenfositlerin büyük bölümünde ve natural killer (NK) hücrelerin bir alt grubunda ifade edilen bir adezyon molekülüdür.^{12,22,23} Lenfositlerin lenf nodlarını hedefleyebilmesinde ve sitokinle aktive olmuş nötrofillerin endotel hücrelerine bağlanmasında (yuvarlanma etkisi) önemli rol oynar.^{12,22,23} Çalışmamızda, AİR grubundaki L selektin immünoaktivitesinin kontrol grubundaki eş değer immünoaktiviteye göre anlamlı derecede arttığı gözlenmiştir. Wei ve ark.,²⁵ rat kremaster kas İ-R modelinde mikrovasküler disfonksiyona diazoksidin etkisini araştırdıkları çalışmalarında, kremaster kas doku örneklerinde İ-R grubunda L selektin mRNA ifadesinin kontrol grubuna göre anlamlı derecede yükseldiğini saptamışlardır. AİR grubunda artmış L selektin immünoaktivitesi, lokal olarak artmış L selektin ifadesine işaret etmektedir. L selektin sitokinle aktive olmuş nötrofillerin endotel hücrelerine bağlanmasında (yuvarlanma etkisi) önemli rol oynadığı için, AİR, L selektin aracılığı ile nötrofil-endotel hücresi arasındaki yuvarlanma etkisini artırıyor olabilir.^{12,22,23} Bunun yanında, AİR + iloprost grubunda L selektin immünoaktivitesinin AİR grubuna göre anlamlı düzeyde azaldığı gözlemlendi. Bu sonuç da, iloprostun, AİR ile indüklenmiş lokal L selektin ifadesini ve

dolaylı olarak nötrofil-endotel etkileşimini azalttığını düşündürmektedir.

İntegrin süper ailesi, hücre-hücre ve hücre-matriks etkileşimi sağlayan heterodinamik hücre yüzey proteinleri olup, α ve β zincirler içerir ve başlıca üç gruba ayrılırlar.¹² Birinci grupta, $\beta 2$ alt grubu içeren LFA-1 ($\alpha L\beta 2$: CD11a/CD18), Mac-1 ($\alpha M\beta 2$: CD11b/CD18) ve P150,90 ($\alpha X\beta 2$: CD11c/CD18), ikinci grupta, $\beta 1$ alt grubu içeren VLA-4 ($\alpha 4\beta 1$: CD49d/CD29) ve üçüncü grupta $\beta 7$ alt grubu içeren $\alpha 4\beta 7$ yer alır.¹² $\beta 2$ integrinler, LFA veya CD11a-cCD18 olarak da adlandırılır. Reperfüzyona bağlı inflamatuvar yanıt lökositlerde $\beta 2$ integrin, endotelde ise immünglobulin süper aile üyelerinin oluşumunu uyararak güçlü lökosit-endotel adezyonuna neden olur.³ Bu integrin-ICAM/VCAM etkileşimleri lökositlerin değişik patolojik durumlarda selektif birikimi için bir mekanizma oluşturur²⁷ CD11a/CD18 ve CD11b/CD18'in endotel hücresindeki reseptörlerinin sırasıyla ICAM-I ve ICAM-II olduğu bilinmektedir.²⁷ Platelet-lökosit adezyonu da, yuvarlanma ve adezyon aşamalarını içermekte olup, sırasıyla platelet P selektin ve ICAM-2/GPIb α /JAM-3 molekülleri ile lökosit PSGL-1 ve CD11b/CD18 molekülleri arasındaki etkileşimi gerektirir.³⁴ Çalışmamızda, AİR grubuna ait CD11b ve CD18 immünoaktivitelerinin kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde arttığı saptandı. Bu bulgu, AİR sonrası oluşan sistemik inflamatuvar yanıtın lökosit CD11b ve CD18 ifadesini veya bir başka deyişle $\beta 2$ integrin ifadesini arttırdığını düşündürmektedir. Ayrıca, çalışmamızda AİR grubuna ait doku örneklerinde artmış ICAM-1 immünoaktivitesi de, AİR'nin, endotel hücrelerinde CD11b ve CD18 için hedef reseptör konsantrasyonunu yükselterek endotel hücresi-CD11b ve CD18 etkileşimlerini indüklemiş olabileceğini düşündürmektedir. İndüklenmiş ICAM-1-CD11b/CD18 etkileşimleri de güçlü endotel-lökosit adezyonuna yol açar. Norwood ve ark., abdominal aort anevrizması cerrahi onarımı sırasında gerçekleşen nötrofil aracılı sistemik inflamasyonun kaynağını araştırdıkları çalışmalarında, bu hastalarda nötrofil yüzey CD11b ifadesinde kontrol grubuna göre anlamlı yükseliş saptamışlardır.³⁵

COX iki izoforma sahip olup, COX-1 tüm hücrelerde yapısal olarak bulunur, COX-2 ise inflamatuvar yanıtta ikincil oluşur. Vasküler endotel doku PGI₂ sentezi ve aterom plaklarının oluşum sürecinde COX-2 enzim aktivitesinin gösterilmesi selektif COX-2 inhibitörlerinin ateroskleroz sürecini yavaşlatabileceği düşüncesini doğurmuştur.³⁶ Sito kinler ve büyüme faktörleri bu enzimin aktivasyonunu arttırırlar. Çalışmamızda, AİR grubundaki COX-2 immünoreaktivitesinin kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde arttığı ve AİR + iloprost grubunda ise AİR grubuna göre anlamlı düzeyde azaldığı saptandı. Dupouy ve ark., deneysel tek taraflı alt ekstremite İ-R hasarı modelinde COX-1 ve COX-2 ifade zamanlamasını araştırmışlar ve İ-R grubu iskelet kası COX-2 mRNA ifadesinin kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde arttığını bulmuşlardır.³⁷ Benzer şekilde, Matsuyama ve ark. da, deneysel renal arter İ-R modelinde, İHK olarak, endotel hücre COX-2 ifadesinin İ-R grubunda kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde yükseldiğini saptamışlardır.³⁸ Sonuçlarımız, AİR'nin lokal COX-2 ifadesini indüklediğini düşündürmektedir. İskelet

kasındaki artmış lokal COX-2 ifadesi AİR sonrası sentezlenen ve dolaşıma salınan inflamatuvar mediyatörler tarafından indüklenmiş olabilir. İloprost uygulaması ile lokal COX-2 ifadesinin anlamlı derecede azalması da, iloprostun olası antiinflamatuvar etkisine bağlı olabilir.

SONUÇ

Bu çalışmanın sonuçları, iloprostun ratlarda aortik İ-R sonrası oluşan iskelet kası hasarını azalttığını göstermektedir. İloprost bu yararlı etkisini oluştururken, aortik İ-R sonrası artmış olan adezyon molekülleri ifadesini azaltmıştır. Bunun yanında, iloprostun bu etkisinin altında yatan tüm mekanizmaların aydınlatılabilmesi için yeni deneysel çalışmalara gereksinim vardır.

Teşekkür

Bu makalenin istatistiksel değerlendirilmesinin yapılmasında katkılarından dolayı Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi, Halk Sağlığı Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Doç.Dr. A. Nesimi Kişioğlu'na teşekkür ederiz.

KAYNAKLAR

- Siemionow M, Arslan E. Ischemia/reperfusion injury: a review in relation to free tissue transfers. *Microsurgery* 2004;24(6):468-75.
- Seal JB, Gewertz BL Vascular dysfunction in ischemia-reperfusion injury. *Ann Vasc Surg* 2005;19(4):572-84.
- Xu Y, Huo Y, Toufektsian MC, Ramos SI, Ma Y, Tejani AD, et al. Activated platelets contribute importantly to myocardial reperfusion injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006; 290(2):H692-9.
- Anaya-Prado R, Toledo-Pereyra LH, Lentsch AB, Ward PA. Ischemia/reperfusion injury *J Surg Res* 2002;105(2):248-58.
- McMichael M, Moore RM DVM. Ischemia-reperfusion injury pathophysiology, part. *J Vet Emerg Crit Care* 2004;14(4):231-41.
- Krötz F, Sohn HY, Pohl U. Reactive oxygen species: players in the platelet game. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004;24(11):1988-96.
- Blaisdell FW. The pathophysiology of skeletal muscle ischemia and the reperfusion syndrome: a review. *Cardiovasc Surg* 2002;10(6): 620-30.
- Della Bella S, Molteni M, Mocellini C, Fumagalli S, Bonara P, Scorza R. Novel mode of action of iloprost: in vitro down-regulation of endothelial cell adhesion molecules. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 2001;65(2-3):73-83.
- Grant SM, Goa KL. Iloprost. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic potential in peripheral vascular disease, myocardial ischaemia and extracorporeal circulation procedures. *Drugs* 1992;43(6):889-924.
- Belkin M, Wright JG, Hobson RW 2nd. Iloprost infusion decreases skeletal muscle ischemia-reperfusion injury. *J Vasc Surg* 1990; 11(1):77-83.
- Khandoga A, Enders G, Biberthaler P, Krombach F. Poly(ADP-ribose) polymerase triggers the microvascular mechanisms of hepatic ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2002;283(3):G553-60.
- Kumar V, Abbas AK, Fausto N. Cellular adaptations, cell injury and cell death. In: Kumar V, Abbas AK, Fausto N, eds. *Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease*. 7th ed. India: WB Saunders Co; 2004. p. 3-46.
- Kingston R, Kelly CJ, Murray P. The therapeutic role of taurine in ischaemia-reperfusion injury. *Curr Pharm Des* 2004;10(19):2401-10.
- Baltalari A, Ozcan V, Bir F, Aybek H, Sacar M, Onem G, et al. Ascorbic acid (vitamin C) and iloprost attenuate the lung injury caused by ischemia/reperfusion of the lower extremities of rats. *Ann Vasc Surg* 2006;20(1):49-55.
- Bozkurt AK. Alpha-tocopherol (Vitamin E) and iloprost attenuate reperfusion injury in skeletal muscle ischemia/reperfusion injury. *J Cardiovasc Surg (Torino)* 2002;43(5):693-6.
- Güven A, Tunç T, Atabek C, Uysal B, Topal T, Erdoğan E, et al. [Effects of N-acetylcysteine and ebselen on rat intestinal ischemia/reperfusion injury.] *Türkiye Klinikleri J Cardiovasc Sci* 2008;20(1):1-7.
- Emrecan B, Tulukoğlu E, Bozok S, Aksun M, Yağdı S, Ozcan AV, et al. Iloprost and pentoxifylline attenuate ischemia-reperfusion injury in skeletal muscle in rabbit model. *Ulus Travma Acil Cerrahi Derg* 2008;14(3):182-7.
- Murray RK, Granger DK, Mayes PA, Rodwell VW. *Harper'in Biyokimyası*. 24. Baskı, Barış Kitabevi, İstanbul, 1998. p. 24-68.

19. Ferrari R, Cargnoni A, Curello S, Boffa GM, Ceconi C. Effects of iloprost (ZK 36374) on glutathione status during ischaemia and reperfusion of rabbit isolated hearts. *Br J Pharmacol* 1989;98(2):678-84.
20. Ferrari R, Cargnoni A, Ceconi C, Curello S, Belloli S, Albertini A, et al. Protective effect of a prostacyclin-mimetic on the ischaemic-reperfused rabbit myocardium. *J Mol Cell Cardiol* 1988;20(12):1095-106.
21. Bhargava AS, Preus M, Khater AR, Günzel P. Effect of iloprost on serum creatine kinase and lactate dehydrogenase isoenzymes after isoprenaline-induced cardiac damage in rats. *Arzneimittelforschung* 1990;40(3):248-52.
22. Güç D. Adezyon molekülleri. *Adhesion Molecules. Joint Dis Rel Surg* 2004;18(1):158-63.
23. Saygılı Ö, Gültekin F. [Intercellular adhesion molecules]. *Türkiye Klinikleri J Med Sci* 1999; 19(6):362-5.
24. Mathru M, Huda R, Solanki DR, Hays S, Lang JD. Inhaled nitric oxide attenuates reperfusion inflammatory responses in humans. *Anesthesiology* 2007;106(2):275-82.
25. Wei W, Wei FC, Hung LM. Diazoxide ameliorates microcirculatory disturbances through PKC-dependent pathway in I/R-injured rat cremaster muscles. *J Biomed Sci* 2005;12(3): 521-9.
26. Hafez T, Moussa M, Nesim I, Baligh N, Davidson B, Abdul-Hadi A. The effect of intraportal prostaglandin E1 on adhesion molecule expression, inflammatory modulator function, and histology in canine hepatic ischemia/reperfusion injury. *J Surg Res* 2007;138(1):88-99.
27. Elangbam CS, Qualls CW Jr, Dahlgren RR. Cell adhesion molecules-update. *Vet Pathol* 1997;34(1):61-73.
28. Fantone JC, Ward PA. Inflammation. In: Rubin E, Farber JL, eds. *Pathology*. 2nd ed. Philadelphia, PA; JB Lippincott Co, 1994. p.33-6.
29. Mickley V, Gallmeier U, Galster A, Scharrer-Pamler R, Brückner UB, Sunder-Plassmann L. [Monitoring ischemia-/reperfusion syndrome in abdominal aortic aneurysm--conventional operation versus stent implantation] *Langenbecks Arch Chir Suppl Kongressbd.* 1998;115(Suppl I):7-11.
30. Huda R, Solanki DR, Mathru M. Inflammatory and redox responses to ischaemia/reperfusion in human skeletal muscle. *Clin Sci (Lond)* 2004;107(5):497-503.
31. Lozano FS, López-Novoa JM, Rodriguez JM, Barros MB, García-Criado FJ, Nicolás JL et al. Exogenous nitric oxide modulates the systemic inflammatory response and improves kidney function after risk-situation abdominal aortic surgery. *J Vasc Surg* 2005;42(1):129-39.
32. Mazzone A, Faggioli P, Cusa C, Stefanin C, Rondena M, Morelli B. Effects of iloprost on adhesion molecules and F1 + 2 in peripheral ischemia. *Eur J Clin Invest* 2002;32(12): 882-8.
33. Mittag M, Beckheinrich P, Hausteil UF. Systemic sclerosis-related Raynaud's phenomenon: effects of iloprost infusion therapy on serum cytokine, growth factor and soluble adhesion molecule levels. *Acta Derm Venereol* 2001;81(4):294-7.
34. Diacovo TG, Roth SJ, Buccola JM, Bainton DF, Springer TA. Neutrophil rolling, arrest, and transmigration across activated, surface-adherent platelets via sequential action of P-selectin and the beta 2-integrin CD11b/CD18. *Blood* 1996;88(1):146-57.
35. Norwood MG, Horsburgh T, Bown MJ, Sayers RD. Neutrophil activation occurs in the lower limbs of patients undergoing elective repair of abdominal aortic aneurysm. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2005;29(4):390-4.
36. McAdam BF, Catella-Lawson F, Mardini IA, Kapoor S, Lawson JA, FitzGerald GA. Systemic biosynthesis of prostacyclin by cyclooxygenase (COX)-2: the human pharmacology of a selective inhibitor of COX-2. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96(1):272-7.
37. Dupouy VM, Ferre PJ, Uro-Coste E, Lefebvre HP. Time course of COX-1 and COX-2 expression during ischemia-reperfusion in rat skeletal muscle. *J Appl Physiol* 2006;100(1): 233-9.
38. Matsuyama M, Yoshimura R, Hase T, Kawahito Y, Sano H, Nakatani T. Study of cyclooxygenase-2 in renal ischemia-reperfusion injury. *Transplant Proc* 2005;37(1):370-2.