

SERUM NİTRİK OKSİT SEVİYESİ DERİ TRANSPLANTASYONU SONRASINDA AKUT REJEKSİYONU GÖSTEREN BİR KRİTER OLABİLİR Mİ?

Cem PERK* Murat ŞAROĞLU* Elif TAŞKIN**
Cenan OKTAY*** Serdar ÖZTEZCAN****

Can the Level of Serum Nitric Oxide be a Criterion Showing Acute Rejection Following Experimental Skin Transplantation?

Summary: Nitric oxide (NO) is an important immunoregulation molecule taking part in cell immunology and it has been reported to be involved in homograft rejection in organ transplantation. In this study, serum levels of 39 Wistar - Albino types rats with skin transplantation were measured and nitric oxide was investigated whether to be a criterion showing acute rejection. Rats were separated in four groups; I.: control group, II.: autotransplanted group, III.: only homotransplantation was made, IV.: homotransplantation + immunosuppression with cyclosporin. NO levels were measured in serum samples taken from the rat in 0.-5. and 10. days and no significant difference was observed when the groups were compared to each other. These results suggest that levels of serum NO can not be a reliable criterion for showing acute rejection in experimental skin homotransplantation.

Key Words: Serum nitric oxide, transplantation.

Özet: Nitrik oksit (NO), hücre immünolojisinde rol oynayan önemli bir immünoregülatör moleküldür ve organ transplantasyonlarında homograft rejeksiyonları ile ilgisi olabileceği belirtilmektedir. Bu çalışmada deri transplantasyonu yapılan 39 adet Wistar albino sıçanda, serum NO düzeyleri ölçülerek, nitrik oksidin akut rejeksiyonu gösteren bir kriter olup olamayacağı araştırıldı. Denekler, 1. grup kontrol, 2. grup ototransplantasyon, 3. grup yalnızca homotransplantasyon ve 4. grup homotransplantasyonla birlikte bir immunsupresif (siklosporin) uygulanan şekilde dört gruba ayrıldı. Tüm deneklerden 0., 5. ve 10. günlerde alınan serum örneklerinde NO seviyeleri ölçüldü. Gruplar birbirleri ile karşılaştırıldığında istatistiki olarak anlamlı bir fark bulunamadı. Sonuç olarak serum NO seviyesinin, deneysel deri homotransplantasyonunda akut rejeksiyonun saptanmasında güvenilir bir kriter olamayacağı kanısına varıldı.

Anahtar Sözcükler: Serum nitrik oksit, transplantasyon.

* İ.Ü. Veteriner Fakültesi Cerrahi A.B.D., Avcılar, İstanbul.

** İ.Ü. Veteriner Fakültesi Morfoloji A.B.D., Avcılar, İstanbul.

*** SSK Okmeydanı Eğitim Hastanesi, Genel Cerrahi Servisi, Okmeydanı, İstanbul.

**** İ.Ü. Tıp Fakültesi Biyokimya A.B.D., Çapa, İstanbul.

Giriş

1980 yılında endotel hücrelerinden asetilkolin uyarısı ile sentezlenen ve damar düz kaslarını gevşeten bir maddenin varlığı ortaya konuldu. 1987'de bunun nitrik oksit (NO) olduğu ve bir çok hücre içi biyolojik fonksiyonlarda rol aldığı saptandı (1, 2, 3). Nitrik oksit, 2 atom içeren, özellikle yağda çözünen, son derece dayanıksız ve renksiz bir gazdır. Biyolojik membranları kolayca geçebilir ve vücutta düşük konsantrasyonlarda, fizyolojik bir düzenleyici olarak görev yapar. Organizmada geniş dağılımı olan nitrik oksit sentaz (NOS) katalizörlüğünde, L-arginin'in L-sitruiline dönüşümü sırasında NO oluşturulur (8). Sulandırılmış çözeltilerde, NO'nun yarılanma ömrü 10 saniyeden daha kısadır ve spontan olarak nitrite ve nitrate okside olur (4, 5). NO damar tonusunun düzenlenmesinde, trombosit adhezyon ve agregasyonunun inhibisyonunda rol oynar. Ayrıca radikal, vazodilatör ve nörotransmitter olarak görev yapar. Aktiflenmiş makrofajlardan büyük miktarlarda sentezlenir (3, 5, 6, 8).

NO sentezinin akut homogreft rejeksiyonlarında (atılımlarında) da arttığı belirtilmiştir (7, 8, 9). Homogreft rejeksiyonlarında yoğun bir lenfosit ve mononükleer hücre infiltrasyonu mevcuttur. Greftteki küçük damarların endoteli bozulur, trombüsler oluşur, kan dolaşımı durur ve greft nekrotik hale gelerek rejeksiyon gerçekleşir (10).

Tanaka ve ark. (13), 1995 yılında yaptıkları deneysel bir çalışmada, pankreas transplantasyonu sonrasında postoperatif 7. günde yani rejeksiyon dönemi esnasında serum nitrit ve nitrat sentezinin arttığını bildirmişlerdir. Um ve ark. (14), 120 ratla yaptıkları başka bir çalışmada deri flebinin periferik sirkülasyonunda endotel kaynaklı NOS'ın (nitrik oksit sentaz) rol oynadığını ve NO substratı L-arginin verilmesiyle deri flebinde iskemik nekrozun azaldığını belirtmişlerdir.

Benvenuti ve ark. (2), kalp transplantasyonu sonrası rejeksiyon gelişen hastalarda immün cevap devam ettiği sürece ileri düzeyde bir serum nitrat artışı tespit etmişlerdir. Akciğer transplantasyonu sonrasında da gerek solunum havasında gerekse serumda yüksek NO seviyeleri ölçülmüştür (8, 9).

Nitrik oksidin muhtemel dual etkisinden dolayı karışık sonuçlar da ortaya konulmuştur. Dedeoğlu ve ark. (5), böbrek transplantasyonu sonrasında akut rejeksiyon gelişen çocuk hastaların idrarlarında NO atılımının anlamlı derecede azaldığını ve antirejeksiyon tedavisi ile idrar NO konsantrasyonunun cevap olarak arttığını belirtmişlerdir.

Materyal ve Metod

Çalışma İ. Ü. Veteriner Fakültesi Cerrahi Anabilim Dalı'nda gerçekleştirildi. Bu amaçla 39 adet 200-250 g ağırlığında Wistar albino dişi rat kullanılarak 4 grup oluşturuldu. Çalışma grubundaki deneklerin tümüne eter anestezisi uygulandı, sırt bölgesi derisinde 1.5 x 2.5 cm büyüklüğünde full-thickness tekniğine uygun olarak, oto ve homotransplantasyon gerçekleştirildi.

- 1- Grup: Kontrol (n=9)
 2-Grup: Ototransplantasyon (n=9)
 3-Grup: Homotransplantasyon (n=12)
 4-Grup: Homotransplantasyon + İmmünoşüpresyon (n=9)

İmmünoşüpresör olarak 25 mg/kg/gün Siklosporin (Sandimmun, 50 mg/ml) i.m. uygulandı.

0., 5. ve 10. günlerde sıçanların kuyruk venlerinden 2 ml kan alınarak serumda nitrik oksitin stabil yıkım ürünleri olan nitrit ve nitratın spektrofotometrik ölçümleri yapıldı. Nitrat, nitrat redüktaz ile nitrite indirgenerek Nitrit Griess reaksiyonu ile ELİSA fotometrisinde okundu. Sonuçlar $\mu\text{mol/L}$ olarak ifade edildi. Gruplar birbirleri ile karşılaştırılarak istatistiksel analizler Student-t testi ile yapıldı.

Bulgular

Çalışmada her grup içerisinde 0-5. gün; 0-10. gün ve 5.-10. gün kuyruk ucundan alınan kandan NO seviyelerinin karşılaştırmaları yapıldı. Ölçülen serum NO seviyelerinde, gruplar arasında ortalamalar açısından istatistiksel bir farklılık olup olmadığı araştırıldı. Elde edilen değerler Tablo 1'de gösterilmiş olup, grup içi serum NO seviyeleri açısından istatistiksel bir anlamlılık tespit edilemedi.

Tablo 1. Grup içi serum NO ortalamaları.
Grup içi serum ortalamaları arasında fark tespit edilmedi.

Table 1. The average values of serum nitric oxide in groups.
There was no difference between the average values of serum nitric oxide in groups.

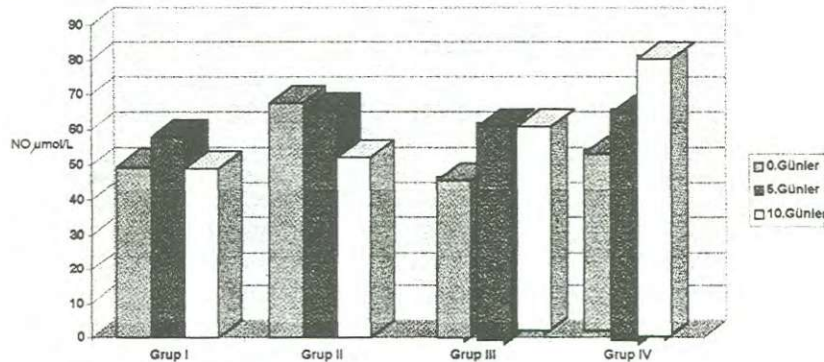
Günler	Grup I (n=9)	Grup II (n=9)	Grup III (n=9)	Grup IV (n=12)
0. gün → 5. gün →	X ₀ =50±11 X ₅ =58±25 t = 0.621 S.d.: 16 p>0.05	X ₀ =68±5 X ₅ =65±7 t = 0.610 S.d.: 16 p>0.05	X ₀ =47±7 X ₅ =63±2 t = 1.521 S.d.: 22 p>0.05	X ₀ =52±17 X ₅ =67±29 t = 1.140 S.d.: 16 p>0.05
0.gün → 10.gün →	X ₀ =50±11 X ₁₀ =49±70 t = 0.075 S.d.: 16 p>0.05	X ₀ =68±50 X ₁₀ =52±21 t = 1.366 S.d.: 16 p>0.05	X ₀ =47±70 X ₁₀ =60±24 t = 1.059 S.d.: 22 p>0.05	X ₀ =52±17 X ₁₀ =81±66 t = 1.870 S.d.: 16 p>0.05
5.gün → 10.gün →	X ₅ =58±25 X ₁₀ =49±70 t = 0.0543 S.d.: 16 p>0.05	X ₅ =65±70 X ₁₀ =52±21 t = 1.136 S.d.: 16 p>0.05	X ₅ =63±20 X ₁₀ =60±24 t = 0.190 S.d.: 22 p>0.05	X ₅ =67±29 X ₁₀ =81±66 t = 0.857 S.d.: 16 p>0.05

Gruplar arası yapılan karşılaştırmalarda ise Tablo 2'deki değerler saptandı. Gruplar arasında günlere bağlı olarak ölçülen serum NO seviyelerinin karşılaştırılmasında istatistiksel anlamlılık bulunamadı. Özellikle greft ömrünün oldukça kısa olduğu ve doğal olarak akut rejeksiyon gözlemlenen Grup III, diğer gruplar ile karşılaştırıldığında serum NO seviyeleri açısından anlamlılık tespit edilemedi. Günlere bağlı olarak ölçülen grup içi serum NO seviyeleri Grafik 1'de; gruplar arası serum NO düzeyleri ise Grafik 2'de belirtilmiştir.

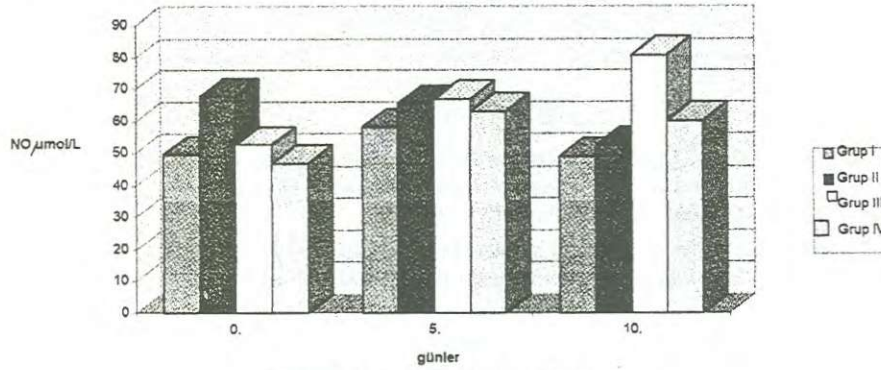
Tablo 2. Gruplar arası ikili karşılaştırmalarda serum NO seviyeleri.
Bu karşılaştırmalarda serum NO düzeyleri açısından anlamlılık saptanmadı.
Table 2. Between the groups in dual comparisons according to the serum NO.
There was no significance between the groups in dual comparisons according to the serum NO levels.

Günler	I-II	I-III	I-IV	II-III	II-IV	III-IV
0	X1=50±11 X2=68±50 t=1.874 S.d.: 16 p>0.05	X1=50±11 X3=47±70 t=0.414 S.d.: 19 p>0.05	X1=50±11 X4=52±17 t=0.308 S.d.: 16 p>0.05	X2=68±50 X3=47±70 t=2.939 S.d.: 19 p<0.05	X2=68±50 X4=52±17 t=1.215 S.d.: 16 p>0.05	X3=47±70 X4=52±17 t=0.221 S.d.: 19 p>0.05
5	X1=58±25 X2=65±70 t=0.561 S.d.: 16 p>0.05	X1=58±25 X3=63±20 t=0.311 S.d.: 19 p>0.05	X1=58±25 X4=67±29 t=0.641 S.d.: 16 p>0.05	X2=65±70 X3=63±20 t=0.014 S.d.: 19 p>0.05	X2=65±70 X4=67±29 t=0.139 S.d.: 16 p>0.05	X3=63±20 X4=67±29 t=0.233 S.d.: 19 p>0.05
10	X1=49±70 X2=52±21 t=0.285 S.d.: 16 p>0.05	X1=49±70 X3=60±24 t=0.878 S.d.: 19 p>0.05	X1=49±70 X4=81±66 t=1.046 S.d.: 16 p>0.05	X2=52±21 X3=60±24 t=0.477 S.d.: 19 p>0.05	X2=52±21 X4=81±66 t=1.776 S.d.: 16 p>0.05	X3=60±24 X4=81±66 t=1.597 S.d.: 19 p>0.05

Grafik 1. Grup-içi serum NO ortalamaları
Fig. 1. The mean values of serum NO within groups.



Grafik 2. Günlere bağlı olarak karşılaştırılan gruplararası serum NO seviyeleri.
Fig. 2. Serum NO levels between groups compared in connection with days.



Tartışma ve Sonuç

NO'nin bir çok biyolojik sistemlerde rolü vardır. NO vazodilatasyon, trombosit adezyon ve agregasyon inhibisyonu, düz kas hücre proliferasyonu ve migrasyon inhibisyonu gibi etkileri olan vazoaaktif bir maddedir (3). Damar endotelindeki yapısal NO sentezi, damarların fizyolojik tonusunu sürdürürken, nötrofil ve aktif makrofajlarda hücre içi parazitler ve tümör hücrelerine karşı gelişen immün cevapta sitotoksik etkiye aracılık eder (11). NO'nin immün sistemle yakın ilişkisi, homotransplantasyon hatta ksenotransplantasyon sonrası kural gereği oluşan rejeksiyonları gösteren bir kriter olup olamayacağı sorusunu gündeme getirmiştir (12).

Nitrik oksitin damar endotelinde üstlendiği fonksiyonlardan esinlenerek bu çalışmada da deneklere full-thickness otograft ve homograft deri transplantasyonları yapılarak rejeksiyon öncesi ve rejeksiyon esnasında serum NO seviyelerinin anlamlılığı araştırılmıştır. Böylelikle transplantasyon cerrahisinde, serum nitrik oksit seviyesinin akut rejeksiyonun bir göstergesi olup olmayacağını belirlemek amaçlanmıştır.

Transplantasyon cerrahisinde farklı dokularda çalışan araştırmacılar (2, 7, 8, 9,13), serum nitrik oksit düzeylerinde transplantasyon sonrasındaki rejeksiyon döneminde artışlar saptamışlardır. Buna karşın böbrek transplantasyonu sonrasında akut rejeksiyon gelişen olgularda, idrarda nitrik oksit düzeyinin anlamlı derecede azaldığı Dedeoğlu ve ark. (5) tarafından ortaya konulmuştur. Bu çalışmada dört gruba ayrılan ratların sırt derisinde full - thickness homotransplantasyon yapılarak özellikle akut rejeksiyon dönemine rastlayan günlerde (5. ve 10. günlerde) serum nitrit ve nitrat seviyeleri Griess ayırıcı ile spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. Deneysel modelimizde grup I - II - IV (Rejeksiyon gelişmeyen veya rejeksiyon gelişimi engellenen gruplar) özellikle grup- III (doğal olarak rejeksiyon gerçekleşen grup) ile serum NO seviyeleri açısından karşılaştırılmış ve istatistiksel anlamlılık saptanamamıştır. Her ne kadar grup II ile III arasında 0. günlerde yapılan ölçümlerde istatistiksel bir farklılık tespit edilmiş olsa da 0. gün olmasından dolayı, grup II ve III'ün kontrol grubu ile olan karşılaştırmaları istatistiksel olarak anlamsız bulunmuştur.

Sonuç olarak yaptığımız deneysel çalışmada full-thickness deri homotransplantasyonu sonrası oluşan akut rejeksiyon dönemi süresince ölçülen serum NO seviyelerinde anlamlı bir yükseliş veya düşüş tespit edilememiştir. NO'nun çeşitli sistemlerdeki rolünden ve değişken etkisinden dolayı daha kapsamlı çalışmalara gereksinim vardır.

Kaynaklar

1. Auchincloss, H. and Russell, P. S. (1994): Transplantation Immunology and Immunogenetics. In: Morris P.J. and Malt R.A. editors. Oxford Textbook of Surgery: Mechanisms of graft rejection. 1st ed. New York: Oxford University Press: 633-636.
2. Benvenuti, C., Bories, P. N., and Loisançe, D. (1996): Increased serum nitrate concentration in cardiac transplant patients. A marker for acute allograft cellular rejection. *Transplantation*, 61 (5): 745-749.
3. Casanova, D., Martino, E., Perojo, I., Ramos, C., Erce, C., Rodrigues, A., Salas, E., Berrazueta, J. R., and Amado, J. A. (1998). Is the high level of nitric oxide metabolites a marker in early rejection after experimental islet pancreas transplantation? *Transplant. Proc.*, 30 (2): 639-640.
4. Castillo, J., Berrazueta, J. R., Herrera, L., Val-Bernal, J. F., Gomez, J., Sanchez, M. J., Riestra, A., Garcia-Unzueta, M. T., Amado, J. F., Salas, E. and Gomez-Fleitas, M. (1996): Nitric oxide production during the hyperacute vascular rejection. *J. Surg. Res.*, 63 (2): 375-380.
5. Dedeoglu, I. O. and Feld, L. G. (1996): Decreased urinary excretion of nitric oxide in acute rejection episodes in pediatric renal allograft recipients. *Transplantation*, 62 (12): 1936-1938.
6. Grisham, M. B., Johnson, G. G., Gautreaux, M. D. and Berg, R. D. (1995): Measurement of nitrate and nitrite in extracellular fluids: A window to systemic nitric oxide metabolism. *Methods*, 7: 84-90.
7. Guarner G., Soriano G., Tomas A., Bulbena O., Novella M.T., Balanzo J., Vilardell F., Mourelle M. and Moncada S. (1993): Increased serum nitrite and nitrate levels in patients with cirrhosis: Relationship to endotoxemia. *Hepatology*, 13: 1139-1143.
8. Gümüştas, M. K., Görgün, F. M., İkitimur, E., Okay, G., Belce, A., Altuğ, T. ve Kökoğlu, E. (1997): Streptozotisin ile kronik diabetik yapılan sıçanların beyin dokusu nitrik oksit metabolizmasının incelenmesi. Serbest Radikaller ve Antioksidanlar Araştırma Derneği 1. Ulusal Kongresi 30 Ekim-2 Kasım Side-Antalya.
9. Kilbourn, R. G., Jubran, A., Gross, S. S., Griffith, O. W., Lewi, R., Adam, J. and Lonato, R. F. (1990): Reversal of endotoxin - mediated shock by N-Methyl-L-Arginine an inhibitor of nitric oxide synthesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 172: 1132-1138.
10. Kostra, P., Jang, E., Watson, E. D., Stewart, J. L. and Daniel, E. E. (1990): Nitric oxide synthase in the autonomic nervous system of canine ileum. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 264: 234-239.
11. Mizuta, T., Fujii, Y., Minami, M., Tanaka, S., Utsumi, T., Kosaka, H., Shirakura, R. and Matsuda, H. (1997): Increased nitric oxide levels in exhaled air of rat lung allografts. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, 113 (5): 830-835.
12. Moilanen, E. and Vapaatalo, H. (1995): Nitric oxide in inflammation and immune response. *Ann. of Med.*, 27: 359-367.
13. Tanaka, S., Kamiike, W., Ito T., Uchikoshi, F., Matsuda, H., Nozawa, M., Kumura, E., Shiga T. and Kosaka, H. (1995): Generation of nitric oxide as a rejection marker in rat pancreas transplantation. *Transplantation*, 60 (7): 713-717.
14. Um, S. C., Suzuki, S., Toyokuni, S., Kim, B. M., Tanaka, T., Hiai H. and Nishimura, Y. (1998): Involvement of nitric oxide in survival of random pattern skin flap. *Plast. Reconstr. Surg.*, 101 (3): 785-792.