

RAT ALT EKSTREMİTE İSKEMİ-REPERFÜZYON MODELİNDE İSKEMİK ÖNKOŞULLAMA VE ARDKOŞULLAMANIN ERKEN DÖNEM ETKİLERİ

Tuğrul Ünsal GÜNEŞ³, Muharrem İsmail BADAĞ¹, Tünay KURTĞLU¹, Aslıhan KARUL², Erdem Ali ÖZKISACIK¹, Berent DİŞÇİGİL¹

ÖZET

AMAÇ: Bu çalışmanın amacı kardiyovasküler cerrahide önemli bir morbidite ve mortalite nedeni olan iskemi-reperfüzyon (İR) hasarına karşı iskemik ön ve ard koşullama ile bunların birlikte kullanılmasının koruyucu etkilerinin rat alt ekstremitesinde oluşturulan deneysel modelde araştırılmasıdır.

GEREÇ ve YÖNTEM: Erkek Wistar-Albino ratları 5 gruba (n=40) ayrıldı. Sham grubunda (n=8) laparotomi yapıldı ancak iskemi oluşturulmadı. Kontrol (İR) grubunda (n=8) infrarenal aort 120 dk. süreyle klemplenecek şekilde oklüde edilerek yoluyla iskemi ve ardından 60 dk. süreyle reperfüzyon oluşturuldu. İskemik ard koşullama grubunda (n=8) reperfüzyon döneminin başlangıcında 5 dk. süreyle iskemi ve takiben 5 dk. reperfüzyon oluşturuldu ve bu işlem üç kez tekrar edildikten sonra reperfüzyon, kontrol grubunda olduğu şekilde tamamlandı. İskemik ön koşullama grubunda (n=8) uzun süreli iskemiden önce üç kez tekrarlanacak şekilde 10 dk.'lık iskemiye takip eden 10 dk. süreli reperfüzyon oluşturulduktan sonra İR meydana getirildi. İskemik ön koşullama ile birlikte iskemik ard koşullama grubunda (n=8) İR periyodu öncesinde üç siklus şeklinde 10 dk. iskemi ve 10 dk. reperfüzyon oluşturuldu ve reperfüzyon döneminin başlangıcında işlem üç siklus şeklinde 5 dk. iskemi ve 5 dk. reperfüzyon olarak tekrarlandı. Reperfüzyon periyodunun sonunda ratların sol gastrocnemius adalelerinden malondialdehit (MDA) ve nitrik oksit (NO) ölçümleri için doku örneği ve serum sitokin (TNF- α , IL 1- β , IL-6) değerlerinin belirlenmesi için kan örneği alındı.

BULGULAR: Çalışma gruplarında MDA düzeylerinin kontrol grubuna göre daha düşük düzeyde ve ard koşullama grubunda sonuçların istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülmüştür. İstatistiksel olarak anlamlı olmasa da en düşük TNF- α düzeyi ard koşullama grubunda saptanmıştır. İnterlökin 1- β düzeylerinin tüm gruplarda kontrol grubuna göre anlamlı olarak daha düşük olduğu gözlemlenmiştir. Ön koşullama ve ön koşullama ile birlikte ard koşullama gruplarında MDA düzeyleri kontrol grubuna göre düşük olmasına rağmen anlamlı bulunmamıştır.

SONUÇ: İskemik koşullama modellerinde kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olmamasına rağmen erken dönemde doku hasarının daha az olduğunu gözlemledik. İskemik koşullamanın etkilerinin aydınlatılması için daha ileri çalışmalara ihtiyaç olduğunu düşünmekteyiz.

Anahtar sözcükler: İskemik-reperfüzyon, ön koşullama, ard koşullama, sitokin

Effects of Ischemic Pre- and Post-conditioning in a Rat Model in Early Phase of Lower Extremity Ischemia-Reperfusion

SUMMARY

OBJECTIVE: Ischemia-reperfusion injury is a major cause of morbidity and mortality in cardiovascular surgery. The aim of this study was to evaluate the protective effects of ischemic pre- and post-conditioning and the concomitant application of these two methods in a rat model of lower extremity ischemia-reperfusion (IR).

MATERIALS and METHODS: Male Wistar-Albino rats (n=40) were divided into five groups. Sham group (n=8) underwent laparotomy without any ischemia. In the control group (IR; n=8), the infrarenal aorta was cross-clamped for 120 min. which was then followed by 60 min. reperfusion. In the ischemic post-conditioning group (n=8), a period of ischemia of 5 min. was followed by reperfusion for 5 min. and the procedure was repeated for three times before reperfusion. In the ischemic preconditioning (n=8) group, 3 cycles of 10 mins. of ischemia were followed by 10 mins of reperfusion was formed before IR. In another group synchronous application of pre- and post-conditioning (n=8) was achieved. At the end of the reperfusion period, biopsy of the left gastrocnemius muscle was performed to determine the tissue malondialdehyde (MDA) and nitric oxide (NO) levels and blood samples were withdrawn for analysing serum cytokine (TNF- α , IL 1- β , IL-6) levels.

RESULTS: Tissue MDA levels were observed to be lower compared to the control group, being significantly especially in the post-conditioning group. TNF- α levels were lowest in the post-conditioning group. Interleukin 1- β levels were found to be significantly lower in all groups compared with the control group. In the preconditioning and synchronous pre- and postconditioning groups MDA levels were lower than the control group levels.

CONCLUSION: Although the results were not statistically significant we observed that there was a tendency towards reduced tissue injury in models of ischemic conditioning. These findings suggest that further studies are needed in order to clarify the effects of ischemic conditioning.

Key words: Ischemia-reperfusion, preconditioning

¹Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Kalp ve Damar Cerrahisi AD, AYDIN, TÜRKİYE

²Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biokimya AD, AYDIN, TÜRKİYE

³Özel Tekden Hastanesi, Kalp ve Damar Cerrahisi Kliniği, KAYSERİ, TÜRKİYE

Kardiyovasküler sistemde dokuların gereksinimi olan kanın yeterince talebi karşılayabilmesi o doku veya organın fonksiyonlarını görmesi için temel kuraldır. Bu arz-taleb arasındaki dengesizlikler veya kesintiye uğramalar doku ve organın fonksiyon bozukluğuna yol açar. İskemi olarak adlandırdığımız bu sunumda yetersizlik ve daha sonra tekrar kanlanma yani reperfüzyon döngüsü organizmada çeşitli hasarlara neden olur. Ayrıca bu döngü sırasında oluşan birçok metabolitler uzak dokularda da olumsuz etki gösterir. İskemi-reperfüzyon (İR) hasarını azaltmak için son yıllarda farklı metodlar uygulanmıştır. İskemik ön koşullama ve ard koşullama ve bunların birlikte kullanımının yapıldığı birçok deneysel metod mevcuttur. Bu çalışmamızda rat alt ekstremitesinde oluşturulan İR ve iskemik ön koşullama, ard koşullama ve ikisinin beraber uygulandığı modellerde erken dönemde alt ekstremité iskelet kasında doku hasarına etkilerini araştırdık.

GEREÇ ve YÖNTEM

Kırk adet erkek 250-300 gr ağırlığında erişkin Wistar albino rat Adnan Menderes Üniversitesi Temel Tıp Bilimleri Deney Hayvanları Laboratuvarında 22 C° oda ısısında, rat kafesinde tutuldular ve standart kemirgen besini ile suya serbest erişimleri sağlandı. Anestezi indüksiyonunda intraperitoneal 100 mg/kg ketamin hidroklorür (Ketalar 50 mg/ml flakon, Parke-Davis, USA) kullanıldı, gerekli olduğunda deney boyunca anestezinin devamı için deney boyunca bir kez olmak üzere ek doz (50 mg/kg) verilmesi planlandı. Anestezi indüksiyonu sonrasında sıvı resüsitasyonu için internal juguler ven kateterizasyonu uygulandı. Boyun lateral kısmında, trakeaya paralel insizyon yapıldı ve ardından cilt altı dokusu diseke edildi. İnternal juguler vene venotomi yapıldı. Ven lümeni içine Polietilen PE-50 tubing kateter yerleştirildi ve askı için kullanılan ipek sütür ile ven duvarına ligatüre etmek suretiyle tespit edildi. Sıvı resüsitasyonu için Braun 8871 Compact Perfüzör ve Braun Perfüzör enjektörü kullanıldı. Rektum içine ısı probu yerleştirilerek vücut ısısı monitorize edildi. Hayvanların cerrahi hazırlık ve çalışma periyodu süresince 37±5 C° vücut ısısında tutulması amacıyla ısıtıcı lamba kullanılarak, her bir rat supine pozisyonda düzgün yüzeyde sabit pozisyon verilmek suretiyle cerrahi için hazırlandı. Anestezi derinliği, solunum sayısı kalp atım sayısı ve bıyık hareketlerinin kontrolü ile takip edildi. Ardından ratların kuyruklarının distalinden yaklaşık 1.5-2 cm'lik mesafeden kesilerek kan örneği alındı.

Median laparotomi ile abdomen açılarak, kısa barsaklar abdomenin sağ tarafına doğru ekarte edildikten sonra infrarenal abdominal aorta ulaşıldı. Retroperitoneal alan künt disseksiyonla ulaşıldıktan sonra infrarenal abdominal aort eksplore edildi. Aort 3-0 ipek ile dönülerek askıya alındı. Abdominal aort

klempajı için Vasco-Statt (REF 1001-535) vasküler klemp kullanıldı. Deneyin sonunda tüm gruplarda ratların sol gastrocnemius adalelerinden kas biyopsileri alındı. Ratlar dekapitasyon ile sakrifiye edildiler.

Deney Grupları ve Çalışma Protokolü Sham grubu (n=8)

Genel cerrahi hazırlık ve anestezi indüksiyonu sonrasında median laparotomi yapılarak infrarenal abdominal aort izole edildi. Bunu takiben aort oklüde edilmeyerek anestezinin idamesi sağlandı. Deney boyunca sıvı resüsitasyonu amacıyla 10 ml/kg %0.9 NaCl verildi. Deneyin 265. dakikasında doku ve kan örnekleri alınarak ratlar sakrifiye edildi.

İskemik/Reperfüzyon (kontrol) Grubu (n=8)

Genel cerrahi hazırlık ve anestezi indüksiyonu sonrasında median laparotomi yapıldı. İnfrenal abdominal aorta izole edildi. Aort non-travmatik vasküler bulldog klamp kullanılmak yoluyla oklüde edilerek 120 dk. süreyle iskemik oluşturuldu. İskemik periyod sonrasında, deneyin 180.dakikasında klemp kaldırılarak 60 dakika süreyle reperfüzyon sağlandı. Deney boyunca sıvı resüsitasyonu amacıyla 10 ml/kg %0.9 NaCl verildi. Deneyin 265. dakikasında doku ve kan örnekleri alınarak ratlar sakrifiye edildi.

İskemik ard koşullama grubu (n=8)

Genel cerrahi hazırlık ve anestezi indüksiyonu sonrasında median laparotomi yapıldı. İnfrenal abdominal aorta izole edilerek anestezinin idamesi sağlandı. Deney boyunca sıvı resüsitasyonu amacıyla 10 ml/kg %0.9 NaCl verildi. Deneyin 60. dakikasında aort non-travmatik vasküler bulldog klamp kullanılmak yoluyla oklüde edilerek 120 dakika süreyle iskemik oluşturuldu. Reperfüzyonun 1. dakikasında ardkoşullama algoritmine başlanarak non-travmatik vasküler klemp ile 5 dakika iskemik oluşturuldu, takip eden 5 dakika süreyle reperfüzyon yapıldı, ardından ikinci kez 5 dakika süre ile iskemik oluşturuldu ve 5 dakika reperfüzyon yapıldı ve üçüncü ve son olarak 5 dakika iskemik oluşturulduktan sonra 60 dakika süreyle reperfüzyon yapılarak deneyin 265. dakikasında doku ve kan örnekleri alınarak ratlar sakrifiye edildi.

İskemik ön koşullama grubu (n=8)

Genel cerrahi hazırlık ve anestezi indüksiyonu sonrasında median laparotomi yapıldı. Deney boyunca sıvı resüsitasyonu amacıyla 10ml/kg. %0.9 NaCl verildi. İnfrenal abdominal aort izole edilerek anestezinin idamesi sağlandı, deneyin 25. dakikasında non travmatik vasküler bulldog klamp kullanılmak suretiyle aort oklüde edildi. 10 dakikalık oklüzyon yapıldı sonrasında klemp kaldırıldı ve 10 dakika süreyle reperfüzyon sağlandı. Reperfüzyonun ardından aort tekrar klempe edildi ve 10 dakika iskemik oluşturulduktan sonra klemp kaldırılarak reperfüzyon sağlandı. Bunu takiben aort bir kez daha 10 dakika süreyle klempe edilerek iskemik oluşturuldu. Daha sonra klemp kaldırılarak 10 dakikalık reperfüzyon sağlandı ve deneyin 60. dakikasında iskemik

önkoşullama süreci sonlandırıldı. Üç siklus şeklinde on dakikalık iskemiye takip eden on dakika reperfüzyon olarak oluşturulan iskemik önkoşullama sürecinin sonlanması ile birlikte aort tekrar klempe edildi. Klempe 120 dakika sonra deneyin 205. dakikasında kaldırılarak 60 dakika süreyle reperfüzyon sağlandı. Deneyin 265. dakikasında doku ve kan örnekleri alınarak insizyon kapatılarak ratlar sakrifiye edildi.

İskemik ön koşullama ile birlikte İskemik ard koşullama grubu (n=8)

Genel cerrahi hazırlık ve anestezi indüksiyonu sonrasında median laparotomi yapıldı. Deney boyunca sıvı resüsitasyonu amacıyla 10 ml/kg %0.9 NaCl verildi. İnfrarenal abdominal aort izole edilerek takiben non travmatik vasküler bulldog klempe kullanılmak suretiyle aort oklüde edildi. 10 dakikalık oklüzyon sonrasında klempe kaldırıldı ve 10 dakika süreyle reperfüzyon sağlandı. Reperfüzyonun ardından aort tekrar klempe edildi ve 10 dakika iskemi oluşturulduktan sonra klempe kaldırılarak reperfüzyon sağlandı. Bunu takiben aort bir kez daha 10 dakika süreyle klempe edilerek iskemi oluşturuldu. Daha sonra klempe kaldırılarak 10 dakikalık reperfüzyon sağlandı ve deneyin 60. dakikasında iskemik önkoşullama süreci sonlandırıldı. Üç siklus şeklinde on dakikalık iskemiye takip eden on dakika reperfüzyon olarak oluşturulan iskemik önkoşullama sürecinin sonlanması ile birlikte aort tekrar klempe edildi. Klempe 120 dakika sonra deneyin 180. dakikasında kaldırılarak ardkoşullama süreci başlatıldı ve reperfüzyonun 1. dakikasında aorta klempe edilerek 5 dakika iskemi oluşturuldu, ardından 5 dakika süreyle reperfüzyon yapıldı, ikinci kez 5 dakika iskemi oluşturulacak ve sonra 5 dakika reperfüzyon yapıldı ve üçüncü kez 5 dakika iskemi oluşturulduktan sonra klempe kaldırılacak 60 dakika süreyle reperfüzyon sağlandı. Deneyin 265. dakikasında insizyon sonlandırılarak, doku ve kan örnekleri alınarak insizyon kapatılarak ratlar sakrifiye edildi.

Çalışma protokolü

Kan örnekleri soğuk zincir ile taşınmış ve 10 dakika süre ile 4000 devir/dk santrifüje edildikten sonra mikropipet ile ayrılan serumlar 85 C'ye derin soğutucuya konmuştur. Doku örnekleri, elde edildikten sonra soğuk zincir ile taşınmış ve 85 C'ye derin soğutucuya konmuştur. Dokuların homojenizasyonu, doku homojenizasyon tamponu ile 1:10 (w/v) olacak şekilde yapıldı. Doku homojenizasyon tamponu (1mM, pH:7.4); phenylmethylsulfonyl fluoride (C7H7FO25, Sigma, Kat. No.P-7626), di-natriumhydrogenphosphate-dihydrate (Na2HPO4.2H2O, MERCK, Kat. No. K25979680), potasyumdihydrogenphosphate (H2KPO4 MERCK, Kat. No. A986373), ethylenediaminetetraacetic asid-disodium salt (Na2EDTA) (C10H14N2O8Na2. 2H2O, Sigma, Kat. No. E-1644) kullanılarak hazırlandı.

Reperfüzyon sonunda oksidatif hasarın belirleyicisi olarak lipid peroksidasyonunu saptamak amacıyla deney sonunda dokuda lipid peroksidasyonunun belirleyicisi olarak malondialdehid (MDA) seviyesi ve endotel disfonksiyonu belirlemek amacıyla NO düzeyleri ölçüldü. Sonuç olarak çalışılan parametreler deney grupları arasında karşılaştırıldı.

Malondialdehid (MDA) Ölçüm Yöntemi

Doku MDA Konukoğlu ve ark. yöntemine göre belirlendi ¹, sonuçlar 1 mg yaş doku başına nmol olarak verildi (nmol/mg yaş doku).

Nitrik oksid (NO) Ölçüm Yöntemi

Doku NO düzeyleri Cortas NK ve ark. geliştirdiği kadmiyumla indirgeme yöntemine göre belirlendi ². Doku NO sonuçları 1 mg yaş doku başına mikromol olarak verildi (µmol/mg yaş doku).

İstatistiksel Değerlendirme

Deneyler sonucunda elde edilen veriler Pentium III işlemci bilgisayar aracılığı ile istatistik paket programı (SPSS 11.0 for Windows) kullanılarak analiz edildi. Verilerin dağılım özelliklerine göre gruplar arasındaki farklılık Mann Whitney-U testi ile ve Wilcoxon signed ranks testi ile değerlendirildi ve p değerinin 0.05'den küçük olması istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

BULGULAR

Çalışmada tüm gruplar için elde edilen serum sitokin değerleri tablo-1'de gösterilmiştir. İnterlökin 1-β değerlerinin kontrol grubunda diğer gruplarla kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı ölçüde yüksek olduğu göze çarpmaktadır. İnterlökin-6 değerleri incelendiğinde yine kontrol grubunda diğer gruplara kıyasla daha yüksek değerler elde edildiği görülmekle beraber fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. TNF-α açısından sonuçlar incelendiğinde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olmadığı ancak en düşük değerlerin iskemik ard koşullama grubunda olduğu gözlemlenmiştir.

Tablo-2'de doku malondialdehit (MDA) ve nitrik oksit (NO) seviyelerine ait sonuçlar görülmektedir. Doku MDA seviyesinin kontrol grubunda en yüksek olduğu ve ard koşullama grubunda diğer gruplarla kıyaslandığında istatistiksel olarak daha düşük olduğu tespit edilmiştir. Doku NO seviyeleri incelendiğinde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık tespit edilmemekle birlikte değerlerin sham grubunda en düşük olduğu ve ard koşullama grubunda diğer gruplardan daha düşük seviyede ve sham grubuna yakın bulunduğu görülmektedir.

TARTIŞMA

İskemi-reperfüzyon (İR) hasarı kardiyovasküler cerrahide organ hasarına yol açan ciddi bir problemdir.

Tablo 1. Serum sitokin değerleri.

Gruplar	İnterlökin1-β (pg/ml)	İnterlökin6 (pg/ml)	TNF-α (pg/ml)
<i>Sham</i>	44,46 \pm 3,1	0,38 \pm 0,03	18,52 \pm 6,9
<i>Kontrol</i>	63,29 \pm 3,5*	0,82 \pm 0,34	19,65 \pm 7,8
<i>Ön koşullama</i>	40,42 \pm 0,92	0,42 \pm 0,03	27,9 \pm 10,1
<i>Ard koşullama</i>	36,27 \pm 1,8	0,73 \pm 0,28	14,9 \pm 6,2
<i>Ön-Ard koşullama</i>	32,55 \pm 0,58	0,68 \pm 0,20	21,41 \pm 8,1

* Kontrol grubu ve diğer gruplar karşılaştırıldığında P<0,01 olarak bulundu. Değerler, ortalama ve \pm ortalamanın standart hatası olarak verildi.

Tablo 2. Doku malondialdehit ve nitrikoksit düzeyleri.

Gruplar	MDA (nanomol/gr)	NO (mikromol/gr)
<i>Sham</i>	8,3 \pm 0,5	20,01 \pm 4,5
<i>Kontrol</i>	8,8 \pm 0,7	31,96 \pm 7,6
<i>Ön koşullama</i>	7,6 \pm 1,1	34,14 \pm 7,5
<i>Ard koşullama</i>	6,5 \pm 0,4*	21,21 \pm 4,0
<i>Ön-Ard koşullama</i>	7,5 \pm 0,7	33,68 \pm 4,9

* Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında p<0,05 olarak bulundu. Değerler, ortalama ve \pm ortalamanın standart hatası olarak verildi.

İskemi-reperfüzyon hasarının klinik öneminin anlaşılması iskele ve reperfüzyon süreçlerinde doku hasarını azaltmak amacıyla birçok farmakolojik, cerrahi ve fiziksel girişimin potansiyel faydalarını ortaya koymayı amaçlayan çabalara yön vermiştir. İskemi-reperfüzyon hasarının klinik yansımaları da çok çeşitlidir ve geçici reperfüzyon aritmilerinden fatal multiorgan disfonksiyon sendromu (MODS) gelişimine kadar uzanan bir yelpaze oluşturmaktadır.

Vasküler cerrahide akut iskelet kası iskemisi mortalite ve morbiditeyi artırmaktadır. İnvaziv ve noninvaziv tedavi yöntemlerinin ilerlemesine rağmen, reperfüzyonun zararlı etkileri, üstesinden gelinmesi gereken bir problem olarak önemini korumaktadır. Ekstremitte revaskülarizasyonu, anevrizma tamiri ve serbest flep rekonstrüksiyonu gibi bir çok cerrahi prosedürde uzamış iskelet kası iskemisi söz konusu olabilmektedir. İskemi ve reperfüzyon klinikte önemli etkilere neden olan kas disfonksiyonu ve nekrozunu da içeren ciddi iskelet kası hasarına yol açabilmekte ve postoperatif komplikasyonlara yol açmaktadır.

İskemik koşullama bir dokunun kısa süreli ve ölümcül hasara yol açmayan iskele ve reperfüzyon periyodlarına maruz bırakılarak daha sonraki şiddetli, uzun süreli ve doku ölümü ile organ hasarına yol açan iskele- reperfüzyon (İR) hasarına karşı koruma sağlanmasıdır. Bu amaçla oluşturulacak koruyucu uyarı şiddetli ve hasara yol açan iskemiden önce (iskemik ön koşullama) veya reperfüzyonun başlangıcı esnasında (iskemik ard koşullama) ortaya

çıkartılabilir. Bunların yanısıra koruyucu uyarı şiddetli iskele reperfüzyon hasarının oluştuğu dokudan uzaktaki bir bölgede (uzak iskemik koşullama) bulunan doku veya organda da oluşturulabilir³.

İskemik ön koşullama ilk olarak 1986 yılında Murry ve ark. tarafından kalp dokusunda gösterilmiştir⁴. Bu fenomenin iskemik iskelet kasındaki koruyucu etkisi ilk olarak 1992'de Mousney ve Pang tarafından gösterilmiştir⁵. İskemik ön koşullama normotermik global iskemide iskelet kası hasarını azaltmanın kullanışlı bir yöntemi olarak öne sürülmüş ve sınırlı yan etkilerle kolaylıkla uygulanabilecek bir girişim olarak ilgi çekmiştir. İskelet kasında iskeminin zararlı etkilerine karşı iskemik ön koşullamanın sağladığı doku direncindeki artış enfarkt boyutlarında azalma, mikrosirkülasyonda ve postiskemik iskelet kası fonksiyonlarında iyileşme şeklinde kendisini göstermektedir⁶⁻¹⁰. İskemik önkoşullama oluşturularak deneysel modellerde iskele reperfüzyon hasarında koruyucu rol oynayan endojen mediyatörler ile tetikleyicilerin ortaya çıkarılması son dönemlerde yoğun bir araştırma konusu olmuştur¹¹⁻¹⁵.

İskemik ön koşullama iskele için korumayı bir takım fizyolojik mekanizmalarla sağlamaktadır. İskemik ön koşullama enerji ihtiyacını azaltmakta substratları korumakta ve metabolizmayı yavaşlatmaktadır. Böylece asit-baz ve elektrolit homeostazisi daha iyi kontrol edilmektedir. Ayrıca

önkoşullama uygulanmış dokularda oksidatif stres, nötrofil aktivasyonu, sitokin üretimi ve apoptozis azalmaktadır.

İskemik ard koşullama fenomeni ilk olarak 2002'de Vinten Johansen ve arkadaşları tarafından bildirilmiş¹⁶ ve literatürdeki ilk çalışmalar Zhao ve ark. tarafından yapılarak deney hayvanlarda iskemik ard koşullama ile miyokardiyumdaki infarkt sahasında anlamlı küçülme olduğu tespit edilmiştir^{17,18}. Ön koşullamanın klinikte uygulanabilmesi için iskeminin önceden bilinmesi gerekmekte iken, ard koşullamada böyle bir gereklilik olmaması, reperfüzyon fazında uygulanması ve klinik olarak anjiyoplasti, kardiyovasküler cerrahi, transplantasyon gibi alanlarda kullanılabilme imkanı bulunması nedeniyle ilgi çekicidir.

İskemik ard koşullamayı oluşturan moleküler sinyal mekanizmalarının iskemik önkoşullama ile büyük benzerlikler taşıdığı düşünülmektedir¹⁹. İskemik ard koşullama da reperfüzyonun tetiklediği hasar ile oksidanların aracılık ettiği hasarın geriletilmekte, reperfüzyona karşı oluşan lokal inflamatuvar cevabın hafifletmekte, ayrıca apoptozu, nötrofil ve endotel aktivasyonunu azaltmaktadır. Bununla birlikte iskemik ard koşullamayı ortaya çıkaran mekanizmalar halen tamamen anlaşılmış değildir. Bu mekanizmaların çeşitli otokoidler ve sitokinlerin oluşumu ve salınımının düzenlenmesini, erken reperfüzyon döneminde asidozun idamesini, protein kinazların aktivasyonunu, mitokondriyal fonksiyonların korunmasını ve mitokondriyal permeabiliteyi sağlayan porların açılmasının engellenmesini içeren bir dizi süreci içerdiği düşünülmektedir^{20,21}. Birçok farklı doku ve organ sistemi için aynı modelde iskemik ön ve ard koşullamanın etkileri çalışılmış ve iskemi-reperfüzyon hasarından koruyucu paralel etkiler gözlemlenmiştir. Miyokardiyal iskemi reperfüzyon modelinde gerek iskemik ön koşullama gerekse de ard koşullama kardiyak fonksiyonlarda düzelleme ve infarkt sahasında azalma sağlamıştır^{22,24}.

Tümör nekrozis faktör- α (TNF- α), İnterlökin-1 β (IL-1 β) ve İnterlökin-6 (IL-6) iskemi-reperfüzyon aracılı inflamatuvar süreçlerde anahtar rol oynayan pro-inflamatuvar sitokinlerdir. TNF- α ve IL-1 β 'nin inflamasyonun erken döneminde ortaya çıktığı benzer ortak sinyal molekülleri üzerinden etki gösterdiği bilinmektedir. TNF- α nötrofil aktivasyonuna ve endotelial lökosit adhezyon moleküllerinin salınmasına neden olarak nötrofil aracılı endotel hasarına katkıda bulunmaktadır. Aktive olan nötrofillerden salınan elastaz ve serbest oksijen radikalleri yoluyla endotel hasarı oluşmaktadır. Dahası TNF- α ve IL-1 β apoptozu tetiklemekte ve fagositler, T hücreleri ve endotel hücreleri tarafından salgılanan IL-6 üretimini kontrol etmektedirler. IL-6 ise B hücrelerinin matürasyonunu sağlanmasından ve nötrofillerin oksidatif patlaması ve serbest radikallerin salınmasından sorumludur²⁵.

İskemi-reperfüzyon fenomeninin temelinde bir kısmı birbirini tetikleyen bir dizi mekanizma yatmaktadır. Bu mekanizmalar arasında başrolü serbest oksijen radikallerinin aracılık ettiği doku hasarı oynamaktadır. Serbest radikallerin dokudaki en önemli zarar verici etkisi lipid peroksidasyonudur ve hücre membranındaki yağ asitleri ile fosfolipidler üzerinde oluşmaktadır. Oksijen serbest radikalleri fonksiyonel ve yapısal hücre değişikliklerine neden olan lipid peroksidasyonu yoluyla hücre hasar oluşturmaktadırlar²⁶. Bir ara ürün olan malondialdehid (MDA) poliunsatüre yağ asitlerinin çift bağları üzerine etki göstermektedir ve lipid peroksidasyonunun göstergesidir²⁷.

Nitrik oksit (NO), reperfüzyon süresince oluşan olaylarla ilgili bir çok biyokimyasal aşamada etkin bir moleküldür. Normal koşullarda NO güçlü bir vazodilatördür²⁸, makromoleküllerin postkapiller venüller boyunca transportunu kolaylaştırmakta²⁹ ve endoteldeki lökosit adhezyonundan koruyucu anti-adheziv bir madde³⁰ olarak görev yapmaktadır. Nitrik oksit süperoksit anyonları ile tepkimeye girer ve nötralize eder ancak bunun sonucunda sitotoksik bir molekül olan peroksinitrit meydana gelir. Normal endotel NO salınımı yaparken reperfüzyon sonrası endotelde NO üretimi giderek azalır. Endotelial hasar akımın başlamasından kısa bir süre sonra gözlenir ve azalmış NO üretimine bağlı olabilir. Öte yandan reperfüzyonda NO dışardan verildiğinde hem vasküler endotel hasarında hem de nötrofil aktivasyonunda azalma gözlenmiştir^{31,32}. Bu nedenlerle, reperfüzyonda NO'nun iki yönlü rolü olduğu düşünülebilir.

Çalışmamızda ratlarda oluşturulan ekstremité iskemi-reperfüzyon modelinde iskemik ön ve ard koşullamanın etkilerini serum pro-inflamatuvar sitokin düzeylerinin ve doku malondialdehit ve nitrik oksit seviyelerinin ölçülmesi yoluyla değerlendirdik. İskemik hasarın dokudaki önemli belirteçlerinden biri olan MDA düzeylerinin tüm iskemik koşullama gruplarında kontrol ve sham grubuna göre daha düşük düzeylerde olduğu görülmektedir, ancak sadece ard koşullama grubunda sonuçların istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük olduğu görülmüştür. Doku NO düzeylerinde de buna paralel sonuçlar göze çarpmaktadır. Bu bulgular iskemik koşullamanın doku düzeyinde oksidatif stresi engellemekte etki gösterdiğini düşündürmektedir.

Benzer şekilde, istatistiksel olarak anlamlı olmasa da, TNF- α düzeyinin en düşük, ard koşullama grubunda saptandığı görülmektedir. İnterlökin-1 β düzeyleri, tüm gruplarda kontrol grubuna göre anlamlı olarak daha düşük olarak saptanmış olup, her üç yöntemin de koruyucu etkisinin olduğunu düşündürmektedir. Pro-inflamatuvar sitokinlerden IL-1 β ve IL-6 seviyelerinin kontrol grubunda en yüksek olduğu bulunmuştur. Bu sonuçlar göz önüne alınarak iskemik koşullama yöntemlerinin iskemi-reperfüzyon ile ilişkili inflamatuvar hasarı azaltabileceğini

göstermektedir.

İskemik koşullama modellerinde kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olmamasına rağmen erken dönemde doku hasarının daha az olduğunu gözlemledik.

Benzer deneysel iskemik koşullama modellerini zenginleştirilerek reperfüzyon hasarı ve bu sürece etkileyen mekanizmaların aydınlatılması yolunda daha ayrıntılı çalışmalar artan bir ilgiyle devam etmektedir. Bu çalışmalar sayesinde ön koşullama ve ard koşullama fenomenleri hakkında daha ayrıntılı bilgi edinmek ve bu bilgiler ışığında reperfüzyon hasarına yönelik yeni klinik tedavi seçenekleri oluşturabileceği düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

1. Konukoglu D, Hatemi HH, Arıkan S, Demir M, Akçay T. Radioiodine treatment and oxidative stress in thyroidectomised patients for differentiated thyroid cancers. *Pharmacol Res* 1998; 4:311-5.
2. Cortas NK, Wakid NW. Determination of inorganic nitrate in serum and urine by a kinetic cadmium-reduction method. *Clin Chem*. 1990; 36:1440-3.
3. Hausenloy DJ, Yellon DM. The therapeutic potential of ischemic conditioning: an update. *Nat Rev Cardiol* 2011 Jun 21. Doi:10.1038/nrcardio.2011.85
4. Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation* 1986;74:1124-36.
5. Mousney RA, Pang CY, Boyd JB, Forrest C. Augmentation of skeletal muscle survival in the latissimus dorsi porcine model using acute ischemic preconditioning. *J Otolaryngol* 1992; 21:315-20.
6. Pasupathy S, Homer-Vanniasinkham S. Surgical implications of ischemic preconditioning. *Arch Surg* 2005; 140:405-9.
7. Saita Y, Yokoyama K, Itoman M. Protective effect of ischaemic preconditioning against ischaemia-induced reperfusion injury of skeletal muscle: how many preconditioning cycles are appropriate? *Brit J Plast Surg* 2002; 55:241-5.
8. Badhwar A, Bihari A, Dungey AA. Protective mechanisms during ischemic tolerance in skeletal muscle. *Free Rad Biol Med* 2004; 36:371-9.
9. Küntscher MV, Schrimbek EU, Menke H: Ischemic preconditioning by brief extremity ischemia before flap ischemia in a rat model. *Plastic and Reconst Surg* 2002;109: 2398-404.
10. Zhang F, Oswald T, Holt J. Regulation of inducible nitric oxide synthase in ischemic preconditioning of muscle flap in a rat model. *Ann Plast Surg* 2004;52:609-13.
11. Perrelli MG, Pagliaro P, Penna C. Ischemia/reperfusion injury and cardioprotective mechanisms: Role of mitochondria and reactive oxygen species. *World J Cardiol* 2011; 3:186-200.
12. Iadecola C, Kahles T, Gallo EF, Anrather J. Neurovascular protection by ischemic tolerance: Role of nitric oxide. *J Physiol* 2011 Jul 11 PMID:21746790
13. Garcia-Dorado D, Barba I, Inseste J. Twenty-five years of preconditioning: are we ready for ischemia? From coronary occlusion to systems biology and back. *Cardiovasc Res* 2011;91:378-81.
14. Theodoraki K, Tympa A, Karmanioliou I, Tsaroucha A, Arkadopoulos N, Symptis V. Ischemia/reperfusion injury in liver resection: a review of preconditioning methods. *Surg Today* 2011;41:620-9.
15. Yılmaz S, Arioz DT, Altindis M, Akaydin M, Kalaycı R, Kahraman A, Polat C. Short periods of preconditioning protects by decreasing the TNF-alpha and IL-6 values before laparoscopic surgery (a rat experiment). *Med Sci Monit* 2010;16 :BR75-9.
16. Baxter GF, Yellon DM. Current trends and controversies in ischemia-reperfusion research. Meeting report of The Hatter Institute 3rd International Workshop on Cardioprotection. *Basic Res Cardiol* 2003; 98:133-6.
17. Zhao Z-Q, Corvea JS, Halkos ME, et al. Inhibition of myocardial injury by ischemic postconditioning during reperfusion: comparison with ischemic preconditioning. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003;285:H579-88.
18. Kin H, Zhao Z-Q, Sun H-Y, et al. Postconditioning attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury by inhibiting events in the early minutes of reperfusion. *Cardiovasc Res* 2004;62:74-85.
19. Hausenloy DJ, Lecour S, Yellon DM. Reperfusion injury salvage kinase and survivor activating factor enhancement pro-survival signaling pathways in ischemic postconditioning: two sides of the same coin. *Antioxid Redox Signal*. 2011; 14:893-907.
20. Luna-Ortiz P, Torres JC, Pastelin G, Martínez-Rosas M. Myocardial postconditioning: anaesthetic considerations. *Arch Cardiol Mex* 2011;81:33-46.
21. Ovize M, Baxter GF, Di Lisa F, Ferdinandy P, Garcia-Dorado D, Hausenloy DJ, Heusch G, Vinten-Johansen J, Yellon DM, Schulz R; Working Group of Cellular Biology of Heart of European Society of Cardiology. Postconditioning and protection from reperfusion injury: where do we stand? Position paper from the Working Group of Cellular Biology of the Heart of the European Society of Cardiology. *Cardiovasc Res* 2010;87:406-23.
22. Yu GG, Zeng XJ, Wang HX, Lu LQ, Zheng SP, Ma LQ, Chang J, Wang J, Zhang DM, Du FH, Zhang LK. Cytochrome P450 2J3/epoxyeicosatrienoic acids mediate the cardioprotection induced by ischaemic post-conditioning, but not preconditioning, in the rat. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2011;38:63-70.
23. Knudsen AR, Kannerup AS, Dich R, Kruhøffer M, Funch-Jensen P, Grønbaek H, Mortensen FV. Expression of genes involved in rat liver angiogenesis after ischaemia and reperfusion: effects of ischaemic pre- and post-conditioning. *HPB (Oxford)*. 2010;12 :554-60.
24. Zhang WX, Yin W, Zhang L, Wang LH, Bao L, Tuo HF, Zhou LF, Wang CC. Preconditioning and postconditioning reduce hepatic ischemia-reperfusion injury in rats. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2009; 8:586-90.
25. Hasturk A, Atalay B, Calisaneller T, Ozdemir O, Oruckaptan H, Altınors N. Analysis of serum pro-inflammatory cytokine levels after rat spinal cord ischemia-reperfusion injury and correlation with tissue damage. *Turkish Neurosurgery* 2009;19:353-359.
26. Kellogg EW. Superoxide, hydrogen peroxide and singlet oxygen in lipid peroxidation by a xanthine system. *J Biol Chem* 1975; 250:8812.
27. Slater TF. Free radical mechanisms in tissue injury.

- Biochem J 1984;222: 1.
28. Ignarro LJ. Biological actions and properties of endothelium-derived nitric oxide formed and released from artery and vein. Circ Res 1989;65:1.
 29. Yuan Y, Granger HJ. Flow modulates coronary venular permeability by a nitric oxide-related mechanism. Am J Physiol 1992;263:H641.
 30. Kubes P, Granger DN. Nitric oxide modulates microvascular permeability. Am J Physiol 1992;262:H611.
 31. Johnson III G, Tsao PS, Lefer AM. Cardioprotective effects of authentic nitric oxide in myocardial ischemia with reperfusion. Crit Carre Med 1991;19:244-52.
 32. Lefer DJ, Nakanishi K, Johnston WE, et al. Anti-neutrophil and myocardial protecting action of SPM-5185, a novel nitric oxide (NO) donor, following acute myocardial ischemia and reperfusion in dogs. Circulation 1991;88:2337-50.

YAZIŞMA ADRESİ

Doç. Dr. Muharrem İsmail BADAĞ
Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Kalp ve
Damar Cerrahisi AD, AYDIN, TÜRKİYE

Telefon : 0.256.2194986
E-Posta : ibadak@mynet.com

Geliş Tarihi : 17.08.2011
Kabul Tarihi : 22.09.2011