

T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
KALP DAMAR CERRAHİSİ ANABİLİM DALI

Alt Ekstremitte İskelet Kasında İskemi/Reperfüzyon Hasarı Üzerine
İskemik Önkoşullama Ve İskemik Ardkoşullamanın Etkisinin Rat
Modelinde Araştırılması

UZMANLIK TEZİ
Dr.Tuğrul Ünsal GÜNEŞ

TEZ DANIŞMANI
Doç.Dr. Muharrem İsmail BADAĞ

AYDIN 2006

TEŞEKKÜR

Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Kalp Damar Cerrahisi Anabilim Dalı'nda Kasım 2000'den bu yana sürmekte olan uzmanlık eğitimime katkılarından ve desteklerinden dolayı başta Kalp Damar Cerrahisi Anabilim Dalı Başkanı Prof.Dr.Berent DIŞÇIĞIL olmak üzere, tezimin hazırlanmasında katkıda bulunan Doç.Dr. M.İsmail BADAĞ, değerli hocalarım Y.Doç.Dr. Uğur GÜRCÜN'e, Y.Doç.Dr. Mehmet BOĞA'ya ve Y.Doç.Dr. Erdem A. ÖZKISACIK'a, tezimin gerçekleşmesinde yardımını esirgemeyen Biyokimya Anabilim Dalından Doç.Dr. Aslıhan KARUL'a teşekkürü bir borç bilirim.

Ayrıca klinikte beraber çalıştığım arkadaşlarım Dr.Şenol GÜLMEN, Dr.Tünay KURTOĞLU, Dr. Nail SİREK ve Dr. Selim DURMAZ'a, servis ve ameliyathane çalışanları başta olmak üzere tüm Tıp Fakültesi mensuplarına teşekkür ederim.

Uzmanlık eğitimim boyunca desteklerini hep yanımda hissettiğim sevgili eşim Burcu GÜNEŞ'e ve aileme şükranlarımı sunarım.

İÇİNDEKİLER

GİRİŞ VE AMAÇ	4
GENEL BİLGİLER	5
İSKEMİK REPERFÜZYON HASARI	5
REPERFÜZYON HASARINDA YER ALAN MEKANİZMALAR	6
İSKEMİK ÖNKOŞULLAMA	9
İSKEMİK ARDKOŞULLAMA	13
İSKEMİK ARDKOŞULLAMADA TETİKLEYİCİ MEDİYATÖRLER VE SİNYAL MEKANİZMALARI	21
FARMAKOLOJİK ARDKOŞULLAMA	32
İNSANLARDA ARDKOŞULLAMA	33
ARDKOŞULLAMANIN DİĞER MODİFİYE REPERFÜZYON YÖNTEMLERİNDEN FARKLARI	35
ÖNKOŞULLAMA VE ARDKOŞULLAMA ARASINDAKİ BENZERLİKLER VE FARKLILIKLAR	36
İSKEMİK ÖNKOŞULLAMA VE ARDKOŞULLAMA İÇİN ORTAK HEDEF REPERFÜZYON HASARI KORUYUCU KİNAZ YOLU (RISK)	38
LİPİD PEROKSİDASYONU VE MALONDİALDEHİD OLUŞUMU	44
NİTRİK OKSİD (NO) YAPISI VE SENTEZİ	45
GEREÇ VE YÖNTEM	47
BULGULAR	53
TARTIŞMA	55
SONUÇ	58
KAYNAKLAR	59

GİRİŞ ve AMAÇ

Teknolojinin ilerlemesi ve klinik bilgi birikiminin artması, gün geçtikçe erken tanı ve etkili tedavi olanaklarına erişebilmemizi sağlamaktadır. Ne yazık ki bu gelişmelere rağmen, kalp, dolaşım ve merkezi sinir sistemini ilgilendiren ve organ iskemisi temelinde meydana gelen hastalıklar, tüm dünyada ölüm nedenleri arasında, öncelikli yerlerini korumaktadırlar. Kardiyovasküler hastalıkların tedavisinde amaç, dokuların temel gereksinimlerini karşılayabilmek için, dolaşım bütünlüğü ve sürekliliğini sağlamaktır. Dolaşımı kesintiye uğratarak iskemik kalan canlı dokuda, dolaşım tekrar sağlandığında oluşan reperfüzyonun neden olduğu zararlı etkiler, iskemik hasardan daha geniş çaplı ve daha ciddidir. İskemik dokunun kütlesi, bir ekstremitenin tümü ya da bir kısmı gibi, yeteri kadar geniş olduğunda reperfüzyon yalnızca lokal doku zedelenmesine değil, aynı zamanda uzak organ hasarına da yol açabilmektedir. İskemi ve reperfüzyon sürecinde hasarın büyük bölümünün reperfüzyon periyodunda oluştuğu ve doku hasarından reaktif oksijen radikallerinin sorumlu olduğu bilinmektedir. Süperoksid dismutaz, katalaz, mannitol, dimetilsülfoksid (DMSO) ve iloprost (uzun etkili bir prostosiklin analogu) gibi bir çok antioksidan ajanın iskemi/reperfüzyon hasarındaki son nokta olan mikrovasküler permeabilitedeki değişiklikleri azaltmakta etkili olduğu kanıtlanmıştır (1).

Bu çalışmada, deneysel bir modelde iskemik ardkoşullamanın kas dokusundaki iskemi-reperfüzyon hasarı üzerindeki etkisinin belirlenmesi ve iskemik önkoşullama ile karşılaştırılması ve iskemik önkoşullamanın iskemik ardkoşullama sürecine etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

GENEL BİLGİLER

İSKEMİK REPERFÜZYON HASARI

Reperfüzyon; iskemi sonucu oluşan nekroz ve apoptozisin neden olduğu doku hasarının yegane tedavisi olagelmıştır. Reperfüzyonun kendisinin de iskemi sonrasında hem geçici hem de letal hasara neden olabildiği bir çok çalışma ile gösterilmiştir. Reperfüzyon hasarı kardiyak cerrahide yıllardır tedavinin hedefi niteliğinde olmuştur. Reperfüzyon hasarı konsepti ilk olarak geç 1970 ve erken 1980'lerde Buckberg ve daha sonraları Braunwald ve Kloner tarafından popularize edilmiştir (2,3). O dönemlerde myokardiyal reperfüzyon hasarı kimi araştırmacılar tarafından heyecanla araştırılmakta iken bazı çevrelerde bu fenomenin varlığı halen tartışılmakta idi (4).

Reperfüzyon, iskemi sonrası iskeminin bıraktığı hasarı arttıran bir potansiyele sahiptir. Reperfüzyon hasarı endotelial ve mikrovasküler disfonksiyon, selüler nekroz ve apoptozisle karakterizedir. Reperfüzyon hasarına yol açan mekanizmalar, etkileyici bir düzen içindedirler (5).

1986'da JTCS dergisinde "iskemi sonrası kontrollü reperfüzyon çalışmaları" isimli bir makale yayınlandı (6). Global ya da bölgesel iskemi-reperfüzyon durumunda iskemik reperfüzyon hasarını azaltmak için stratejiler araştırmayı hedefleyen bir makaleydi. I/R hasarını azaltmak için, akım hızı, ısı gibi koşulları, pH, metabolik substratlar, kalsiyum azaltıcı ajanlar, antioksidanlar gibi içeriği kontrol eden yöntemlerle oluşturulan bir çeşit modifiye reperfüzyon ile I/R hasarının azaltılması amaçlanmakta idi (7). Modifiye reperfüzyon konsepti, I/R hasarında rol alan karmaşık mekanizmaların bir ya da birkaçını etkileyen tedavileri kapsamakta idi. Bölgesel hipotermi, alkalotik perfüzyonlar, hipokalsemi, metabolik etmenler, kardiyopleji uygulaması, dereceli ve yavaş reperfüzyon gibi stratejiler bu

Modifiye reperfüzyon yaklaşımından köken almakta idi (8,9). Bu stratejilerin ortaya atılmasından bu yana yaklaşık 20 yıl geçmiş olmasına rağmen reperfüzyon hasarını ortadan kaldıracak bir yöntem henüz kabul görmemiştir. Deneysel tedavilerin klinik kullanıma geçirilememiş olması, myokardiyal korumanın nazik durumu açısından önem taşımaktadır. Klinikte, erken reperfüzyon sağlayan trombolitikler ve anjiyoplasti ve cerrahi gibi tedaviler kullanılmaktadır ancak reperfüzyon hasarının, reperfüzyonun bazı faydalarına baskın gelmesi giderek artan bir şekilde ortaya konmaktadır (10). Bu nedenle reperfüzyon hasarı ve tedavisi bir çok araştırmacının ilgilendiği önemli bir alan haline almıştır. Koroner arter reperfüzyonunun ilk anlarında, endotelial disfonksiyon, kontraktıl disfonksiyon, nekrozis ve apoptozisin gözlenmesi sonucunda reperfüzyon çalışmalarına ağırlık verilmiştir (11,12).

REPERFÜZYON HASARINDA YER ALAN MEKANİZMALAR

İskemik dokunun infarktustan kurtulması için reperfüzyon şarttır. Ancak reperfüzyon iskeminin dokuda yapmış olduğu hasarı arttırarak infarkt sahasının genişlemesine neden olur. Bu olayların tamamına birden “reperfüzyon hasarı” denir. Reperfüzyonun zararlı etkilerinin büyük bir kısmı dokuya kan akımının başladığı ilk anlarda oluşmaktadır ve direk hücre hasarı ve hücre ölümü ile ilgilidirler. Ek olarak reperfüzyonun bazı etkileri, daha geç dönemlerde doku hasarı ve hücre ölümüne yol açan bir olaylar silsilesini tetikler (13).

1. Reaktif oksijen radikallerinin (ROS) hızlı üretimi:

Reperfüzyonun ilk dakikaları hatta saniyelerinde gözlenir. Aktif nötrofiller, stres ortamındaki kardiomyositler, aktive vasküler endotelyum ve perivasküler bir doku alanından kaynaklanırlar. Nötrofiller primer olarak NADPH oksidaz sistemi aracılığı ile Reaktif Oksijen Radikalleri (ROS) üretirler. Vasküler endotelial hücreler, endotelial

NAD(P)H oxidaz sistemi, Xantin oxidaz ve bazı durumlarda eNOS sistemiyle ROS üretirler (14,15).

2. Ozmotik gradiyent ve hücre şişmesi:

Anaerobik metabolizmanın metabolik ürünlerinin birikimi ile transsarkolemmal osmotik gradiyentte artış meydana gelir. Bu olaylar hücre içi su ve hücre volümü disregülasyonunun diğer nedenleri ile ve mikrovasküler obliterasyona sekonder oluşan hücre içi su birikimi ile eş zamanlı olur. Sarkolemma membranı, ROS aktivasyonuna sekonder oluşan lipid peroksidasyonu ve diğer olaylar sonucunda oluşan membran atak kompleksi (MAK) ve kompleman aktivitesi sonucunda meydana gelebilecek yırtılmalara karşı hassas hale gelir. Bu koşullarda, ozmotik gradiyent artışı ve su dağılımı düzensizliği, hassas hale gelmiş sarkolemmada yırtılmaya ve hücre şişmesine neden olur (16-18).

3. Sodyum-hidrojen değiştiricisinin aktivasyonu:

Hücre metabolizmasının anaerobik hale gelmesi, ATP'nin tüketilmesi enerji gerektiren Na-K ATPaz aktivitesinin azalması ile iskemi süresince hücre içinde protonların (H) birikmesine yol açar. Bu (H) birikimi, Na-H Exchange Tip 1 (NHE1) sisteminin aktivasyonuna neden olur. Bu sistemle bir (H) hücre dışına çıkarılırken bir (Na) hücre içine girer. Bu sistemin aktivasyonu, (Na) iyonunun hücre içinde net birikimine neden olur. Bu birikim, Na-Ca Exchange sistemini yavaşlatır ya da yönünün değişmesine neden olur. Bu şekilde (Na) iyonunu dışarı atmak için (Ca) iyonu hücre içine alınır ve sonuçta (Ca) iyonu hücrede birikmeye başlar. Na-H Exchange (NHE) sisteminin sadece iskemi süresince aktif olması ya da reperfüzyonda aktif olmasıyla birbirine karşıt bir durum oluşur. Sadece iskemi öncesinde NHE1 inhibitörlerinin verilmesiyle infarkt alanının azalması gözlenmektedir. Az sayıda çalışmada reperfüzyonda verilmesi ile de infarkt alanında azalmanın sağlandığı

gösterilmiştir. Bu sonuçlar, NHE1'in reperfüzyonun ilk anlarında da aktif olduğunu göstermektedir (19-22).

4. Kalsiyum yüklenmesi ile oluşan myokardiyal kontraktür:

Kontraktür, örneğin reperfüzyonun ilk anlarında gözlenen myokardiyumun kalınlaşması ve kısalması nekroz patogenezi ile bağlantılı olarak gösterilmiştir. Bu mekanizmanın had safhası "Stone heart" taş kalp durumudur ki bu fenomen, myokardiyal koruma stratejileri suboptimal olan kardiyak cerrahi geçirmiş hastalarda gözlenir. Hiperkontraktür injüri, iskemi boyunca hücrede kalsiyum yüklenmesi ve bu kalsiyum birikiminin reperfüzyon sırasında kontraktil süreci aşırı güçlendirerek hücre ölümüne yol açan kontrolsüz bir kontraktil süreci başlatması şeklinde meydana gelir (23).

5. Reperfüzyona lokal inflamatuvar ve oksidan yanıt:

Reperfüzyonun ilk dakikaları süresince Nötrofil-endotel etkileşimi; endotelial disfonksiyon, nekroz, hatta belki apoptozisten sorumlu lokal inflamasyon kaskadının aktivasyonuna yol açar. Nötrofil bağımlı ya da nötrofil bağımsız etkilerle endotelial hücreler ve kardiyomyositler oksidan ürünler üretirler ve bunlar nekroza neden olur. Reperfüzyona lokal inflamatuvar ve oksidan yanıtın, nötrofilleri kapsayan ve kapsamayan iki ayrı komponenti vardır (24,25).

6. Mitokondriyal Permaabilite Transizyon porlarının (mPTP) açılması:

Stres koşulları altında mitokondri iç membranında lokalize nonspesifik bir por açılır. Bu mPTP'lerin oluşması membran permaabilite karakteristiğini bozarak membran fonksiyonlarını kesintiye uğratar. Normalde membrandan geçemeyen proteinlerin içeri akışı ile mitokondri şişmesi meydana gelir. Proton gradiyentinde ve oksidatif fosforilasyonda bozulma meydana gelir. Reperfüzyonun erken dakikalarında oluşan bu mPTP'lerin açılması, nekroz ve

apoptosizin patogeneziyle yakın ilgilidir. Ayrıca reversibl iskemik değişikliklerden irreversibl hücre ölümüne geçişte anahtar faktör olabilir. mPTP'lerin açılması, reperfüzyonun ilk anlarında gözlenen oksidatif stres ve buna bağlı mitokondriyal kalsiyum yüklenmesi tarafından tetiklenir.

Reperfüzyonun ilk dakikalarında başlayan bu olaylar, dokuda kapiller permaabilite artışı, no-reflow fenomeni gibi daha geç oluşan manifestasyonları tetikliyor olabilirler (26,27).

İSKEMİK ÖNKOŞULLAMA

İskemik önkoşullama, bir dokunun ciddi iskemi periyodu öncesinde kısa süreli iskemi-reperfüzyon periyotlarına maruz bırakılarak, uzamış iskemi ve reperfüzyonun zararlı etkilerine karşı dirençli kılınması şeklinde tanımlanan bir fenomendir. Bu fenomen ilk olarak 1986 yılında Murry ve arkadaşları tarafından kalp dokusunda gösterilmiştir (28). İskemik önkoşullamanın kalp kasındaki iskemi-reperfüzyon hasarını sınırlayıcı etkisi iyi bilinmektedir, ancak iskelet kasındaki hasarı azaltıcı etkisi açık değildir. İskemik önkoşullamanın domuzda latismus dorsi adalesindeki postiskemik kas hasarını azaltmakta fayda sağladığı ve postiskemik reperfüze köpek gracilis adalesindeki mikrovasküler açıklığı artırdığı bildirilmiştir (29).

İskemik önkoşullama global iskemi sonrası egzersizi takiben kastaki resatürasyon süresinin uzamasını engellemiştir ki bu da periferik vasküler akımın korunmasında potansiyel bir role sahip olduğunu düşündürmektedir. İskelet kasında reperfüzyon sonrası myeloperoksidaz aktivitesinin artışı, reperfüzyonda kas dokusunda nötrofillerin arttığına göstergesidir. Ekstravaze olan nötrofiller iskemi-reperfüzyon hasarında aktif rol oynamaktadırlar. İskemik önkoşullama ile kastaki mieloperoksidaz aktivitesinin azaldığı gösterilmiştir. Mekanizma açık olmamakla beraber nötrofil akımını engellediği

düşünülmektedir. Uzamış iskemik tehdit öncesi kısa süreli iskemi-reperfüzyon periyodları ile iskemik önkoşullama oluşturulması normotermik global iskemi sırasında oluşan iskelet kası hasarını azaltmaktadır (30).

İskelet ya da kalp kasındaki iskemik önkoşullama için bir çok mekanizma öne sürülmektedir. Bunların arasında endojen bir mediatör olarak adenosin A₁ reseptörlerinin aktivasyonu, aktive A₁ reseptörleri aracılığıyla ATP-sensitif potasyum (K-ATP) kanallarının açılmasının stimülasyonu ve böylece potasyum akımında artış ile membran hiperpolarizasyonu, kollateral kan akımının artırılması, nötrofillerden toksik oksijen radikallerinin salınımının inhibisyonu ve nötrofil aracılı hasarın azaltılması, iskemiye karşı koruyucu olan endotelial prostasiklin ve/veya nitrik oksit salınımının artırılması, infarkta karşı direnci artıran stres proteinlerinin sentez ve salınımının artırılması ve protein kinaz C aracılı mekanizma yer almaktadır (31).

İskemik önkoşullama sürecini takiben antioksidanların seviyelerinde artış olduğu hipotezi bir çok kez öne sürülmüştür, ancak deneysel çalışmaların sonuçları çelişkilidir. Örneğin kemirgenlerin beyinde iskemik tolerans esnasında süperoksit dismutaz (SOD) seviyesinin arttığı gösterilmiştir. Ancak Mitchell ve arkadaşları beyin dokusunda iskemik tolerans esnasında sağlanan korumada SOD'ın rol oynadığını gösterememişlerdir. Köpek ve rat miyokardında iskemik tolerans süresince SOD, glutatyon peroksidaz, ve/veya katalaz seviyesinde artış gözlenirken, domuz miyokardında bunların seviyesinde herhangi bir değişme saptanmamıştır. Başka iki antioksidan sisteminin de koruyucu mediatörler olabileceğine inanılmaktadır. Bunlar nitrik oksit sentetaz ve hem oksijenazdır (32).

Serbest radikaller klasik önkoşullama sinyal kaskadının iletiminde önemli rol oynamaktadırlar. Ancak iskemik önkoşullama sürecinde tetikleyici mi yoksa mediatör mü oldukları henüz netlik kazanmamıştır. Serbest radikallerin iskemik önkoşullama sürecinde uyarı iletim kaskadında görevli kinazları direkt olarak stimüle edebildiği bilinmektedir.

İskemik önkoşullama ile elde edilen koruma, serbest radikal tutucuları olan N-2 merkaptopropionil glisin veya askorbik asit tarafından bloke edilebilmektedir (33). Das ve arkadaşları iskemik önkoşullama sırasında tirozin kinaz, p38 MAPK (Mitogen activated protein kinase) ve MAPKAPK-2 (MAPK activated protein kinase 2) fosforilasyonunda artış olduğunu ve bu kinazlardaki aktivasyon artışının hidroksil radikal tutucusu tarafından bloke edildiğini göstermişlerdir. Buna dayanarak serbest oksijen radikallerinin, iskemik önkoşullamada tirozin kinaz, p38 MAPK, MAPKAPK-2 ve NFkB aktivasyonunu içeren sinyal iletim kaskadı için gerekli olduğunu öne sürmüşlerdir (34). Kalp, öncesinde reaktif oksijen radikallerini tutacak şekilde N-asetilsistein ile preperfüze edildiğinde önkoşullama ile sağlanan kardiyoprotektif özellik tamamıyla kaybolmaktadır ki bu da iskemiye miyokardiyal adaptasyonda sağlıklı sinyalinin oluşturulmasında redoks sinyalinin etkin bir rol oynadığını göstermektedir (35). Pain ve arkadaşlarının çalışmasında tirozin kinaz inhibitörü genistein ile diazoksit tarafından tetiklenen önkoşullama engellenmiş ancak protein kinaz C (PKC) inhibitörü chelerythrine aynı etkiyi göstermemiştir. Aynı çalışmada diazoksit öncesinde serbest oksijen tutucuları olan N-2 merkaptopropionil glisin ve Mn(III) tetrakis-4-benzoik asit porfirin klorid verildiğinde kardiyoprotektif özelliğin bloke edildiği gözlenmiştir. Bu sonuçlar mitokondriyal KATP açılmasının önkoşullama olayında uç nokta değil bir tetikleyici olduğunu; mitokondriyal KATP açılmasının PKC aktivasyonundan sonraki akışta geldiğini, tirozin kinaz aktivasyonunu içerdiğini ve önkoşullama olayını serbest radikal üretimini içeren bir mekanizma ile tetiklediğini düşündürmektedir (36).

Sitokinler inflamatuvar hücreler, aktive endotel ve düz kas hücreleri ve tekrarlayıcı iskemiye maruz kalan hücreler tarafından üretilmektedir. Vasküler cerrahi ve iskemi-reperfüzyon kompleman aktivasyonuna, sitokinlerin salınımına ve nötrofil birikimi ile degranülasyonuna neden olabilmektedir. Bu sitokinlerin salınımı iskemi reperfüzyon hasarının yaygınlığı ile ilişkilidir ve organ hasarı ile sonuçlanabilmektedir. Femoral arter tromboembektomisi

geçiren olgularda reperfüzyon sonrasında lokal ve sistemik interlökin-6 konsantrasyonunda yükselme olduğu belirlenmiş ve iskemi-reperfüzyon hasarında önemli rol oynadığı bildirilmiştir (37). Bunun yanısıra turnike iskemisine maruz kalan ortopedik cerrahi hastalarında reperfüzyon periyodunda TNF-alfa ve interlökin-1beta seviyelerinde anlamlı yükselme gözlenmiştir (38). Groenveld ve ark. tarafından yapılan çalışmada ise elektif abdominal aort cerrahisine giden hastalarda postoperatif dönemde interlökin-6 ve interlökin-8 düzeylerinde artış saptanmıştır (39). Kritik alt ekstremite iskemisi bulunan hastalarda hipoperfüze iskelet kasında interlökin-1 β ve interlökin-6 gen ekspresyonunda belirgin derecede artış olduğu gösterilmiştir (40). Gaines ve ark. ratlarda akut ekstremite iskemi reperfüzyonunda, iskemik periyod esnasında sistemik bir TNF cevabının tetiklendiğini bildirmişler ve bunun da iskelet kası hasarına katkıda bulunduğunu belirtmişlerdir (41).

Vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) endotel hücrelerine özgü bir mitojen ve potent bir anjiyojenik ajandır. VEGF'in endotel fonksiyonlarını ve tamirini düzenleyici özelliği olduğu ve iskemi-reperfüzyon hasarından koruyucu rol oynadığı düşünülmektedir (42). Rat modelinde Langendorff kalbinde VEGF'nin iskemi reperfüzyon hasarını azalttığı gösterilmiştir (43). Deneysel olarak oksijen sunumundaki azalma ile VEGF'nin üretiminde artış olduğu gözlenmiştir (44,45).

İskemik önkoşullamadaki koruma için popüler olan hipotez şudur: mitokondrilerin kısmi olarak depolarize edilmesiyle reperfüzyonda kalsiyum girişi azalmakta bu da mitokondri ve hücre sağkalımı açısından enerji durumunun daha hızlı bir şekilde düzeltilmesine imkan vermektedir. İskemik önkoşullama esnasında mitokondri iç membranında bulunan ATP bağımlı potasyum kanalları açılarak matriks hacmini artırmakta, yağ asitlerinin oksidasyonunu aktive etmekte, enerjiyi karaciğerde glukoneogenesis için yönlendirmekte ve adalelerde mekanik iş gücünü artırmaktadır. Mitokondriyal hacmi K

siklusunu ve yağ asidi oksidasyonu yoluyla kontrol eden bu kanalların iskemik önkoşullamada görevli olduğu gösterilmiştir.

İSKEMİK ARDKOŞULLAMA

İskemik ardkoşullama konsepti, reperfüzyonun ilk başlangıcında, belirlenmiş bir algoritmi izleyecek şekilde reperfüzyonun kısa süreli tekrarlayıcı mekanik kısa kesintiler serisi olarak tanımlanmıştır bu kesintilerin süreleri türlere göre değişmektedir. Algoritim, türlere bağlı olarak 1 - 3 dakika kadar sürer(13). Rat ve farede 10-15 sn, köpek ve tavşanda 30sn, İnsanda 60 sn, gibi tür büyüdükçe süre uzamaktadır (46). Ardkoşullama ilk olarak Cliveden-Berkshire'da Ağustos 2002'de Hotter Institute 3. International workshop on cardioprotection'da Vinten Johansen ve ark. tarafından açıklanmıştır (47). İlk çalışmalar 2003 yılında Zhao ve Halkos tarafından yayınlanmıştır (48).

Zhao ve arkadaşları, 2003 yılında köpeklerde ve 2004 yılında ratlarda uzamış myokard iskemisi sonrası reperfüzyonun başlangıcında, tekrarlayan, kısa, aralıklı iske mi periyotları oluşturarak infarktüs alanında küçülme olduğunu bildirmişlerdir(48,49). Yang ve arkadaşları, 2004 yılında tavşanlarda myokardda ardkoşullama ile tripheniyoltetrazolium chloride (TTC) ile boyanan infarkt alanında belirgin (yaklaşık %40) azalma olduğunu ortaya koymuşlardır (50).

Myokard infarktüsü sonrası, infarkt alanının boyutu, remodeling'in yaygınlığı ve ciddiyeti ve hastaların prognozu açısından belirleyicidir(51,52).

Reperfüzyon hasarı, bir çok hücre tipini (endotel, nötrofil, kardiyomiyosit), proinflamatuvar mediyatörleri, oksidanları, iyonik ve metabolik dishomeostazisi hücre sel ve moleküler sinyalleri kapsayan karmaşık bir süreçtir. I/R hasarına katılan eden bu etkenlerin bazıları hasarın ilk anlarında yer alırken, bir kısmı da daha sonraki aşamalarda etkinleşirler.

Ardkoşullama ile infarkt alanı ve apoptoziste düşüş olduğu gözlenmiştir. İnfarkt alanındaki azalma I/R hasarından korunmada altın standart metod olan önkoşullama ile sağlanan azalmaya benzer ölçüdedir.

Oluşan kalp koruyucu etki ile; endotelial hücre aktivasyonu ve disfonksiyonunda, doku superoksit anyon üretimi, nötrofil aktivasyonu ve dokuda nötrofil akümülyasyonunda, mikrovasküler hasar, doku ödemi, intraselüler ve mitokondriyal kalsiyum birikiminde azalma meydana gelir(13).

Ardkoşullama sürecinde etki gösteren tetikleyici ve mediyatörlerin, hücre ölümünde azalma ile fonksiyonel bağlantısı bulunduğu kanıtlanmıştır. Ardkoşullama ile oluşan myokard korunmasında; eNOS, Nitrik asit, Guanilil siklaz, K-ATP kanallarının açılması, mitokondriyal permaabilite transizyon porlarının (mPTP) kapanması ve adenzin de rol almaktadır. Ayrıca ERK1/2 ve PI3 kinaz-AKT yolakları gibi hayatta kalmayı sağlayan hücre içi yolakların etkinleşmesi de ardkoşullama ile yakın ilişkilidir.

Reperfüzyonun ilk dakikalarında kısa ve birbirini takip eden reoklüzyon ve reperfüzyon periyotları şeklinde uygulanan ardkoşullama, erken reperfüzyonun hidrodinamiklerini mekanik olarak değiştirir. Ayrıca, ardkoşullama, reperfüzyonun çeşitli manifestasyonlarını azaltmaya yönelik endojen mekanizmaları uyarır. Bu mekanizmalar, moleküler olayları tetikleyen adenzin ve opioidler gibi ligandları, Protein Kinaz C, ATP sensitif mitokondriyal K kanalları ve koruyucu (survival) kinazları kapsar.

Ayrıca ardkoşullama, p38, JNK, mitogen activated protein kinase (MAPK) gibi yolları inhibe eder. Endotel ve kardiyomyositlerin oksidanlardan, sitokinlerden ve inflamatuvar hücrelerden zarar görmesini azaltır. Mitokondriyal permaabilite transizyon porlarının (mPTP) oluşumunu inhibe eder. Böylece ardkoşullama bir çok şekilde etki eden değişik mekanizmaları harekete geçirir. . Diğer yollar ve mekanizmalar henüz aydınlatılmamıştır.

Ardkoşullama ile ilgisi olan yolakların bir çoğunun, önkoşullama sürecinde de var oldukları gösterilmiştir, ancak etkinleşme zamanları farklıdır, ayrıca ERK1/2 gibi bazılarının ise önkoşullama ile bağlantısı yok gibi görünmektedir.

Klinik fayda açısından, önkoşullamanın klinikte uygulanabilmesi için, iskeminin önceden bilinmesi gerekmekte iken, ardkoşullama, anjiyoplasti, kardiyovasküler cerrahi ve transplantasyon gibi konularda klinikte kullanılabilir.

Akut myokardiyal infarktüs geçiren hastalarda yapılan iki klinik çalışmada infarkt alanını azaltmada efektif olduğu gösterilmiştir. Ardkoşullama, hayvan modelleri ve hastalarda iskemi reperfüzyon hasarı kavramını indirek olarak desteklemekte ve reperfüzyon hasarını azaltarak kardiyak koruma sağlamaktadır (5).

Zhao ve ark.'ın 2004 yılında yayınladıkları çalışmalarında iskemik ardkoşullamanın myokardiyal korumada altın standart olan önkoşullama ile karşılaştırılması yapılmıştır. Bu çalışmada, köpek modelinde sol ön inen koroner arter (LAD)'de 60 dakika iskemi ve arkasından 180 dakika reperfüzyon yapılmıştır. Bir grupta reperfüzyon sonrası 30 saniyelik reoklüzyon yapılarak bu algoritim üç siklus devam ettirilerek ardkoşullama yapılmıştır, daha sonra reperfüzyon 180 dakikaya tamamlanmıştır. Diğer bir grupta asıl iskemi öncesi beş dakika iskemi, on dakika reperfüzyon yapılarak önkoşullama uygulanmıştır. Beklendiği gibi önkoşullama grubunda, kontrol grubuna kıyasla infarkt alanında yaklaşık %40 azalma sağlamıştır. Şaşırtıcı olarak ardkoşullama uygulanan grupta gözlenen infarkt alanı, önkoşullama grubundaki ile kıyaslanabilir düzeyde bulunmuştur. Bu infarkt alanındaki azalmanın, her üç grupta bölgesel iskemi alanındaki kollateral kan akımından bağımsız olduğu belirtilmiştir. İnfarkt alanındaki azalma, reperfüzyon sonrasında bakılan serum kreatinin kinaz aktivitesi ile de doğrulanmıştır. Nötrofil akümülyasyonu (doku MPO aktivitesi), önkoşullama ve ardkoşullama gruplarında kontrol grubuna kıyasla belirgin azalmış olarak bulunmuştur. Doku MPO aktivitesi, risk alanına nötrofil akümülyasyonunu tahmin etmeye

yarayan bir belirteç olsa da nötrofillerin lokalizasyonunu tanımlayamaz (vasküler endotele adezyon yada interstisyuma transmigrasyon). Ek olarak ardkoşullamanın nötrofil göçünü azalttığı gözlenmesi nedeniyle, infarkt alanındaki azalmanın, nötrofil aracılı hasarın (nötrofil kaynaklı oksidanlar ve sitokinler) azalması sonucu mu yoksa azalmış vasküler ve myokardiyal hasar sonucu bölgeye nötrofil göçünün azalması nedeniyle mi olduğunu belirleyememektedir. Nötrofillerin tartışmalı rolü, ilerde nötrofillerin bulunmadığı preparasyonlardan elde edilen sonuçlar ortaya konduğunda tartışılacaktır(32).

Zhao, ardkoşullama'nın postiskemik koroner arterde Nitrik oksit sentazın endotel bağımlı stimülatörlerine vazodilatasyon cevabı yani endotel fonksiyonunu koruduğunu da bildirmiştir. Bu koruma da önkoşullama ile sağlanan endotel fonksiyonu korunması ile karşılaştırılabilir düzeydedir. Ardkoşullamada, koroner arter vasküler endotelde p-selectin yüzey ekspresyonu da önkoşullamada olduğu gibi azalmıştır ve önkoşullama ile oluşan azalma ile kıyaslanabilir ölçüdedir. Bu azalmanın koroner arterde proinflamatuvar durumun azalması sonucu olduğu düşünülmektedir. Dahası, postiskemik LAD'nin endotelinde süperoksit radikal üretimi, ardkoşullama grubunda kontrol grubuna göre azalmıştır. Ardkoşullama ve önkoşullama gruplarında görülen doku ödeminde azalma, vasküler endotel aktivasyonu ve disfonksiyonu ile orantılıdır. Zhao ve ark.,ardkoşullama uygulanmış postiskemik myokardiyumda, reperfüzyon sonrası parankim ve vasküler/perivasküler alanda oksidan üretimini, dihydroethidiumfluorescence ile ölçmüşler azaldığını görmüşler ve bunun reperfüze alanda oksidan hasarın azalması yolunda yorumlamışlardır. Plazma lipid peroksidasyonu ürünü olan MDA, önkoşullama ve ardkoşullama gruplarında, oksidan hasarın azalması ile paralel şekilde azalmış olarak bulunmuştur (48).

İnfarkt azaltıcı etkinin, koroner vasküler endotel aktivasyon (p-selectin ekspresyonu) ve disfonksiyonu ile açık ilişkisi olduğunu biliyoruz.ek olarak Halkos ve ark., ardkoşullamanın reperfüzyon aritmisi insidansını da azalttığını bildirmişlerdir (53). Bu bilgi Galagudza ve

ark.'ın izole perfüze rat kalpleri ile yapılan çalışmalarıyla da doğrulanmıştır (54). Bu çalışmalar, ardkoşullama ile oluşan kalp koruyucu etkinin mekanizmalarını da ortaya koymaktadır. Bu çalışmalar, nötrofillerin olmadığı hücre kültürlerinde ya da izole perfüze kalplerde yapılmıştır. Bu sayede reperfüzyon hasarına karşı ardkoşullama ile oluşan korumanın inflamatuvar hücre bağımlı komponenti kadar inflamatuvar hücrelere bağımlı olmayan komponentinin de etkili olduğunu ortaya koymuşlardır. Bu kanıtlar reperfüzyon hasarının multikomponent etyolojisi olduğunun kanıtı niteliğindedir.

Myokard iskemisi nedeniyle oluşan infarktın boyutunu azaltmak için bilinen en efektif tedavi hızlı bir şekilde sağlanan reperfüzyondur. Ancak, iskeminin oluşturduğu hasara ek olarak reperfüzyon kendisi de hasar oluşturmaktadır. Reperfüzyon hasarı hem hücre içi sistemleri hem de hücrenin çevresini etkileyen bir süreçtir.

Reperfüzyon hasarının myokard dokusundaki manifestasyonları aşağıdaki şekilde sıralanabilir

(5):

1. Endotel ve vasküler disfonksiyon nedeniyle azalmış kan akımı.
2. Metabolik disfonksiyon.
3. Kontraktıl disfonksiyon.
4. Disritmiler.
5. Hücre sel nekrozis.
6. Apoptozis.

Koroner vasküler endotel, iskemi reperfüzyon hasarına uğramıştır, bunun manifestasyonları:

- Bazal nitrik oksit üretimi ile ilgisi olduğu gösterilen nitrik oksit sentaz stimülatörü asetil koline vazodilatasyon yanının azalması (55).
- Bazal nitrik oksit üretiminin kaybına sekonder, nötrofillerin koroner vasküler endotele adherens eğilimi (56).
- P-selectin yüzey ekspresyonunda artma (57,58).

- Artmış süperoksit anyon üretimi.

Zhao ve ark. post iskemik koroner arter endotel disfonksiyonunun ardkoşullama ile düzeldiğini göstermişlerdir (48).

Ek olarak ardkoşullama, p-selectin yüzey ekspresyonunu post iskemik koroner arter vasküler endotele PMN nötrofil adezyonu ve risk altındaki iskemik myoradyiyuma nötrofil akümülyasyonunun (MPO aktivitesi) azaltmıştır.

Halkos ve ark. (53), ardkoşullama yapılan kalplerde risk altındakialanda , ardkoşullama yapılan kalplerde risk altındaki alanda, endotel hasarının azalmış olduğunu göstergesi olarak daha az dihydroethidium fluorescence tutulumunun olduğunu bildirmişlerdir.

Bu bilgiler ardkoşullamanın endotelial aktivasyon ve disfonksiyonunu azalttığını desteklemektedir.

Kin ve ark. ardkoşullamanın uygulandığı periyodu kalp koruma için kritik olduğunu gösterdiler. Eğer reoklüzyon reperfüzyon periyotları, reperfüzyonun başlagıcından 1 dakika geçtikten sonra başlarsa infarkt azaltıcı etki ortadan kalkmaktadır (49).

Ardkoşullamanın gecikmesi ile kalp koruyucu etkinin yok olmasını Yang ve Philip de göstermişlerdir (50,59).

Ardkoşullama ile oluşan koruyucu etkilerin, önkoşullama ile oluşan etkileri arttırıp arttırmadığını belirlemek için önkoşullama ve ardkoşullama protokolleri köpek modelinde birleştirilmiştir (53). Her iki yöntemin tek başına uygulandığı gruplar ile iki yöntemin birlikte uygulandığı grup arasında, infarkt alanında azalma post iskemik myokardiyumda anyon üretimi ve post iskemik endotel fonksiyonları bakımından anlamlı fark bulunmamıştır. İzole perfüze rat kalbinde yapılan bir çalışma ile benzer sonuçlar Tsang ve ark. tarafından da bildirilmiştir (60).

Ancak Yang ve ark. 45 dakika oklüzyon, 3 saat reperfüzyon uyguladıkları invivo tavşan modelinde önkoşullama ve ardkoşullamayı birlikte uygulamışlar ve her iki yöntemin birlikte

olduğu grupta, tek başlarına uygulandıkları gruplara göre infarkt alanında azalma açısından anlamlı fark bulmuşlardır (50).

Tutarlı olmayan bu sonuçların nedeni, türler arasındaki farklılıklar olabilir. Ayrıca additif etki, daha uzun oklüzyon periyotları uygulanması ile netlik kazanabilir. Daha uzun oklüzyonlar, additif etki için bir eşik değeri oluşturabilir.

Böyle küçük bir manevra ile sağlanan kardiyoproteksiyon, uzun süre kalıcı olur mu? Ya da oluşan kalp koruma sadece hasarın patogenezinde bir gecikmeden mi ibaret? Bu kritik bir sorudur çünkü ardkoşullama, erken reperfüzyon dönemindeki olayları engellemekte ancak geç olaylar (6-24 saat) etkilenmemektedir. Aslında infarkt alanındaki azalma 24-72 kadar uzamaktadır (61,62). Bu nedenle ardkoşullamanın infarkt azaltıcı etkisi, kaçınılmaz hasarların ertelenmesinden çok infarktın uzun dönem azaltılması gibi görünmektedir.

Son çalışmalardan elde edilen verilere göre, ardkoşullamanın oluşturduğu kalp koruyucu etki açısından, reperfüzyonun ilk saniyeleri kritik öneme sahiptir. Otuz dakika sol ana koroner oklüzyonu ve ardından üç saat reperfüzyon uygulanan bir invivo rat modelinde üç veya altı siklus halinde on saniyelik ardkoşullama periyotları infarkt alanında azalma meydana getirmiş ve bunun yanında lipid peroksidasyonu ürünleri (MDA) düzeylerinde azalma saptanmıştır. Eğer ardkoşullama, üç siklus kadar gecikirse infarkt azaltıcı etkisinin kaybolduğu görülmüştür (49). Ardkoşullama uygulanmış köpek çalışmalarında olduğu gibi risk altındaki dokudaki DHE'un pozitif floresansı, azalmış olarak bulunmuştur bu da oksidan hasarın azaldığı şeklinde yorumlanmıştır.

Aynı rat modelinde reperfüzyon başlangıcından 1 dakika sonra ardkoşullama uygulanması ile bu etkiler ortadan kalkmıştır ancak ilginç olarak risk altındaki dokuda nötrofil akümülyasyonu azalması değişmemiştir (49).

Yang ve ark. çalışmalarında invivo tavşan modelinde otuz dakika koroner arter oklüzyonu sonrası otuz saniyelik ardkoşullama algoritmi kullanarak myokardiyal reperfüzyon

hasarının patogeneğinde reperfüzyonun ilk dakikalarının kritik olduğu sonucu vurgulanmıştır. Dahası bu kısa ve kritik periyotta yapılan girişimlerin, reperfüzyonun sonraki dönemlerine göre, ortaya çıkan hasarda daha belirgin azalmaya yol açtığı gösterilmiştir **(50)**.

Ardkoşullama algoritminin iki önemli zamansal karakteristiği;

1. uygulanan siklus sayısı
2. reoklüzyon ve reperfüzyon epizotlarının süresidir.

Kin ve ark., rat modelinde üç siklus ya da altı siklus uygulanması ile aynı oranda infarkt alanında azalma sağlandığını göstermişlerdir. Kalp koruma ve vasküler koruma sağlamada siklusların sayısından çok her siklusun süresi daha önemlidir. İn vivo köpek tavşan modellerinde otuz saniyelik algoritim (otuz saniye reoklüzyon, otuz saniye reperfüzyon) efektif bulunmuştur. Ayrıca izole perfüze tavşan modelinde otuz saniyelik 4 ve 6 siklus halinde uygulanan algoritmelerin, infarkt alanında aynı oranda efektif azalma sağladığı gösterilmiştir **(49,50)**.

Cohen'in grubuna ait daha sonraki bir çalışmada izole perfüze tavşan kalblinde on saniye gibi kısa süreli algoritim ile belirgin olarak daha iyi kalp korumanın sağlandığı görölmüştür. Ancak bu kadar kısa periyotların etkinitesi in vivo tavşan kalbinde test edilmemiştir. in vivo ve in vitro (Langendorf) rat modelinde ise 10 saniyelik periyotlar efektif bulunmuştur **(63)**. İn vivo domuz modelinde otuz saniyelik periyotlar koruma sağlamada başarısız olmuştur ve bu aşamada domuzda daha uzun siklus sürelerinin efektif olup olmadığı açık değildir. **(17)**.

ARDKOŞULLAMADA TETİKLEYİCİ MEDİYATÖRLER VE SİNYAL MEKANİZMALARI

Ardkoşullamada rol alan mediyatörler

Adenozin:

Ardkoşullama, kısa ve aralıklı iskemi-reperfüzyon periyotları şeklinde uygulanan bir yöntemdir ancak bu algorithmdede reperfüzyon periyotları mı yoksa iskemi periyotları mı kalp korumada önem arz etmektedir bu henüz açıklığı kavuşmuş değildir. Asıl iskemiye takiben uygulanan bu reoklüzyon periyotları Adenozin, Bradikinin, ya da opioid gibi otakoidlerin üretimini değiştiriyor olabilir. Buna karşın reperfüzyonun kesintili olması, endojen salınmış olan adenozin ya da pürin yan ürünlerinin uzaklaştırılmasında gecikmeye neden oluyor olabilir (64). İki ayrı araştırmada ardkoşullamada endojen salınan adenozinin etkili olduğu bildirilmiştir. Kin ve ark. 2004'de AHA bilimsel toplantısında, izole perfüze rat kalbi modelinde ardkoşullama süresince endojen adenozin salınımının ortamdaki uzaklaşmasının geciktiğini bildirmişlerdir (64). Ek olarak koroner arter oklüzyon ve reperfüzyonunun yapıldığı bir rat modelinde adeozin reseptörlerinin, reperfüzyondan beş dakika önce intravenöz verilen 10mg/kg dozunda non selektif adenozin reseptör antagonisti 8-SPT (8-p sulphophenyl theophylline) uygulamasının, ardkoşullama ile oluşan kalp koruyucu etkiyi ortadan kaldırdığını bildirmişlerdir. Bu gözlem aynı toplantıda koroner arter oklüzyon ve reperfüzyonu yapılan bir insitu tavşan modeli ile çalışan Philips ve ark. tarafından da desteklenmiştir (59).

Adenozin A2A reseptör subtipinin aktivasyonu özellikle anti inflamatuvar etkisi nedeniyle reperfüzyon sürecinde önemlidir (65). A2A reseptör blokörü olan ZM241385 ardkoşullama ile oluşan kalp korunmasını ortadan kaldırmaktadır (64). Daha sonraki çalışmalarda adenozin A2A ve A3 reseptörlerinin aktivasyonu kalp koruyucu etkile ilgili olup, A1 subtipinin

etkisinin olmadığı gösterilmiştir (65). Bu bilgiler ışığında, endojen salının adenozinin ortamdaki uzaklaştırılması geciktiğinde, intravasküler adozin konsantrasyonunda artış ve kalp korumada artış meydana gelmektedir. İntravasküler adozin reperfüzyon tedavisinin fizyolojik etkileri ilginç olarak ardkoşullama ile oluşan etkilere paralellik göstermektedir (66).

Adozin, uzak ardkoşullama olarak adlandırılan kalp koruyucu fenomende de rol üstlenmiştir Bu konseptte bir renal arterin 5 dakika oklüzyonu, sonrası myokardiyal iskemi ve reperfüzyon yapılmaktadır. Renal arter oklüzyonu açıldıktan 1 dakika sonra koroner oklüzyon yapılmıştır. Bu uzak ardkoşullama ile infarkt alanında belirgin düşüş sağlanmıştır. İnfarkt azaltıcı etkinin, koroner arter oklüzyonundan 5 dakika önce verilen non selektif adozin antagonisti 8-SPT ile ortadan kalktığı gözlemlenmiştir. Renal arterin kalıcı oklüzyonu, kalpte infarkt alanında azalma sağlamamıştır. Ayrıca renal arter oklüzyonu ve reperfüzyonundan sonra 1 dakikadan fazla beklendiğinde de kalpte infarkt alanını azaltıcı etki sağlanamamıştır(67). Bu nedenle renal perfüzyon sonrası direkt dolaşıma ya da nöral yollara katılacak ve kalpte reperfüzyon hasarından koruyucu etki yapacak adozin gibi bir mediyatörün varlığı gerekmektedir.

Adozinin diğer etki yerleri henüz açıklığa kavuşturulamamıştır. Bu nedenle endojen adozinin yüksek konsantrasyonları, adozinerjik G protein bağlı reseptörler yoluyla etki eden kalp koruyucu bir tetikleyici olarak etki ediyor olabilir. Adozinin ardkoşullamadaki fonksiyonu, önkoşullamada olduğundan şüphesiz farklı şekildedir. Ancak ardkoşullamada sadece reperfüzyon döneminde etkilidir. Önkoşullamada ise iskemi öncesi ve iskemi süresince etkinlik göstermektedir. Endojen adozin, ardkoşullama süresince aktive olmuş koroner vasküler endotel hücreleri ve myositler tarafından oksidanların ve sitokinlerin salınımını azaltıyor olabilir, ayrıca nötrofiller üzerindeki inhibe edici etkisi zaten iyi bilinmektedir (63) .

Endojen opioidler

Opioidler, G-protein bağı reseptörler aracılığı ile önkoşullamada tetikleyici rolünde etkinlik göstermektedirler (68,69). Bir çalışmada, in vivo rat modelinde opioid antagonisti naloxane veya naloxane metiodine, reperfüzyondan 5 dakika önce uygulandığında ardkoşullama ile oluşan infarkt azaltıcı etkinin ortadan kalktığı gözlenmiştir. Ayrıca “kappa” reseptör subtipi ya da “delta” reseptör subtipinin spesifik inhibisyonuyla da ardkoşullamanın ortadan kalktığı gözlemlenmiştir (70). Ayrıca ardkoşullamanın, endojen salınan opioid miktarını arttırdığı mı yoksa reseptöre bağlanma özelliklerinde mi değişiklik yaptığı henüz bilinmemektedir. Ancak bilinen odur ki ardkoşullama ile Protein Kinaz C'nin etkinleşmesi ve mitokondriyal K-ATP kanallarının açılması endojen opioidlerin etkileşimiyle olduğu düşünülmektedir.

Nitrik oksit:

Nitrik oksit, reperfüzyon süresince oluşan olaylarla ilgili bir çok biyokimyasal aşamada etkin bir moleküldür. NO, difüzyonun sınırladığı oranda süperoksit anyonları ile tepkimeye girer ve nötralize eder, ancak bunun sonucunda potansiyel sitotoksik oksidan bir molekül olan peroksinitrit meydana gelir. Erken reperfüzyon fazında süperoksit anyonları ile oluşan respiratuar yanma ile vasküler endotelden endojen NO üretimi aynı zamana rastlar ve yüksek oranda peroksinitrit oluşumuna neden olabilir (71). Normal endotel NO salınımı yaparken reperfüzyon sonrası koroner vaskülerendotelyumda NO üretimi giderek azalır. Endotelial hasar akımın başlamasından kısa bir süre sonragözlenir ve azalmış NO üretimine bağlı olabilir. Öte yandan reperfüzyonda NO dışardan verildiğinde hem vasküler endotel hasarında hem de nötrofil aktivasyonu azalma gözlenmiştir (72,73). Bu nedenlerle, reperfüzyonda NO'nun da ROS gibi iki yönlü rolü olduğu düşünülebilir.

Cohen, Downey ve Yang, NO'nun, ardkoşullamanın kalp koruyucu etkileri ile ilgili hücre içi bir sinyal molekülü gibi etkinlik gösterdiğini vurgulamışlardır.

NO'nun ardkoşullamada ile sağlanan kalp koruyucu etkilerde rol aldığını ilk olarak Yang göstermiştir (50). İn situ tavşan koroner arter oklüzyonu modelinde, NO sentaz inhibitörü L-NAME (N-nitro L-arginin metil ester) reperfüzyondan hemen önce verildiğinde ardkoşullamanın infarkt azaltıcı etkisi ortadan kalkmıştır.

NO'nin cGMP yolağı aracılığıyla etki ettiği bildirilmiştir (63,74). NO, iskemi reperfüzyon mekanizmalarının bir çok aşamasında ve değişik düzeylerde yer alıyor kabul edilmiştir. Bu çeşitli fonksiyonların hangisi ardkoşullamada ön plana çıkıyor henüz bilinmemektedir.

NO aracılı korumanın yegane mekanizmasının nötrofillerin inhibisyonu ile anti inflamatuvar etki olmadığını ve ardkoşullama yapılan dokuda K-ATP kanallarının açılmasına ve mPTP'lerin inhibisyonuna aracılık etmesinin NO'nun olası etkinlikleri olduğu öne sürülmüştür. Ancak K-ATP kanallarının açılmasında ve mPTP'lerin inhibisyonunda NO'nun rolü henüz net olarak ortaya konamamıştır (74).

Yang ve ark.(50) çalışması, Nitrik oksit sentaz (NOS) 'ın da ardkoşullama ile oluşan kalp korumada rol aldığını göstermiştir. Reperfüzyondan hemen önce L-NAME verilerek yapılan NOS blokajı infarkt alanında bir değişiklik yapmamakta ancak ardkoşullama ile birlikte bu işlem uygulandığında ardkoşullamanın etkisini tamamen inhibe etmektedir. İzole perfüze rat kalplerinde, ardkoşullama ile endotelial izoformu olan eNOS'un fosforillenmiş halinin (fosfo-eNOS), reperfüzyondan yedi dakika sonra ardkoşullama yapılmamış gruba göre miktarının artması, eNOS'un da ardkoşullamada rol aldığı fikrini desteklemektedir(60). Pagliaro ve ark. (74) ardkoşullamanın L-NAME ya da guanilil siklaz inhibitörü 1H-(1,2,4) oxadiazolo-(4,3,a)quinoxaline-1-one (ODQ) ile bloke edilebileceğini göstermişlerdir. Bu sonuca göre NO-cGMP yolağına dikkat çekilmiştir. NO sentaz, iskemi-reperfüzyonun bir çok aşamasında yer almaktadır. Sağlıklı vasküler endotel, eNOS aktivitesi yoluyla aralıklı olarak NO sentezlemektedir. İskemi-reperfüzyon sonrası koroner endotelde NO salınımı azalmaktadır (75,56). Direk akım ile gösterilmemiş olsa da ardkoşullama uygulanmış

kalplerde vasküler endotelden NO salınımı, azalmış p-selectin ekspresyonu, azalmış nötrofil adherensi ve vazodilatasyon nedeniyle korunmuş olabilir (köpek modelinde ardkoşullama ile asetilkoline vazodilatasyon yanıtının arttığı gösterilmiştir) (48,53). Tüm bu fizyolojik yanıtlar artmış NO üretimi ile ilgilidir. Vasküler doku (76) ve kardiyomiyositlerde (77) NO'yu sentezleyen primer enzim eNOS'tur. eNOS, serine 1177 aminoasitinde Akt aracılığıyla oluşan bir fosforilasyonla aktifleşir. eNOS ayrıca ardkoşullama yapılmış dokuda PI3 kinaz-Akt aktivitesinin ve reperfüzyon hasarında yer alan, Tsang tarafından gösterilmiş olan diğer yolların (RISK) da hedefi durumundadır (60,78).

NO, mitokondriyal PTP'lerin açılmasını inhibe ediyor olabilir, ayrıca K-ATP kanalı sonrası cGMP ve PKG seviyesinde görev alan bir sinyal molekülü de olabilir. Bu nedenlerle NO, iskemi-reperfüzyona moleküler yanıt ve inflamatuvar yanıtların inhibisyonunda görevli olabilir.

Ardkoşullamaya katılan mekanizmalar

Ardkoşullama literatüründe, tetikleyici mediyatör ve efektör kavramları ile kalp koruyucu mekanizmaların bileşenleri açıklanmaya çalışılmıştır. Ancak bir mekanizmada mediyatör olan bir madde, başka bir takım tepkimeler dizisi için tetikleyici rolü üstlenebilir. Sözelimi Penna ve ark. reaktif oksijen radikallerinin de ardkoşullamanın erken fazında bir tetikleyici gibi çalıştığını ifade etmişlerdir. Ayrıca ardkoşullamada tanımlanmış klasik ligand tetikleyiciler (adenozin gibi) de bulunmaktadır. K-ATP kanallarını ve Protein Kinaz C, tetikleyicilerin aktivitesi sonucu aktifleştiği için birer mediyatör olarak tanımlanırlar (64,70).

Önkoşullama ve ardkoşullamada benzer molekül ve yollar bulunmakla birlikte bunların mekanizmalar içindeki rolü ve aktifleşme zamanı farklılıklar göstermektedir. Ek olarak hücre için toksik olan bir molekülün (ROS gibi) miktarının sitotoksik düzeyden sitoprotektf düzeye

indirilmesinin kalp koruyucu mekanizmalar açısından yeri olup olmadığı açık değildir. Ayrıca bu moleküler modifikasyonu tetikleyici ya da mediyatör olarak basit şekilde sınıflandırmak da kolay değildir.

ROS üretimi

ROS'un reperfüzyon hasarı süresince önemi büyüktür. Proteinleri ve membran lipidlerini okside eder ve redoks sensitif sinyal kaskadlarını aktive eder. Reperfüzyonun başlangıcından itibaren endotel hücrelerini, kardiyomyositler ve aktive nötrofilleri de kapsayan çeşitli hücelerden kaynaklanan dakikalar süren bir solunumsal yanma "respiratuar burst" meydana gelir (79-81).

Bu oksidatif yanmayı daha ılımlı ancak uzun süreli bir süperoksit anyon üretimi takip eder. Ancak bu süperoksit anyonların aynı zamanda intraselüler sinyal mekanizmalarında ve endojen kalp korumaya da katkısı vardır. Bu nedenle ardkoşullamada serbest oksijen radikallerinin rolü iki yönlüdür.

Zhao ve Kin, postiskemik myokardiyum ve endotel hücrelerinde yüksek ROS seviyelerinin üç saate kadar devam ettiğini göstermişlerdir. Post iskemik myokardiyumda ROS üretimi, artmış MDA plazma düzeyleri ile belirlenmektedir. MDA oksidan üretimine sekonder olarak artmış lipid peroksidasyonunun bir göstergesi kabul edilir. Ardkoşullama, *invivo* süperoksit (O⁻) anyon üretimini belirgin şekilde düşürmektedir. Bu düşüşe MDA aktivitesindeki düşüş de eşlik etmektedir. Bu düşüşün reperfüzyondan sonra 1 ve 3 saat sonrasına kadar devam ettiği iki ayrı çalışmada gösterilmiştir (48,49).

Neonatal kardiyomyositlerde *in vitro* hipoksik ardkoşullama ile süperoksit anyon üretiminin ve laktat dehidrogenaz (LDH) aktivitesinin azaldığı gösterilmiştir. Hücre kültürü ortamında LDH, morfolojik hücre hasarı ve nekrozun belirleyicilerinden biri olarak kabul edilir. Serviddo ve ark. ardkoşullamanın bir varyantı olarak hücre kültüründe mormoksemi periyotları olmadan kısa süreli bir hipoksemi periyodu oluşturmuş, ve reoksijenizasyon

fazında peroksit üretiminin azaldığını tespit etmişlerdir (82). Burada ROS üretimindeki azalma, myokardiyumdaki endojen potansiyel antioksidan mekanizmalar nedeniyle olabilir. Örneğin azalmış glutatyon düzeylerinin korunması, endojen potansiyel koruyucu mekanizmalardan biri olarak kabul edilir.

Sonuçta ROS üretiminde azalma, ardkoşullamanın aktif bir mekanizması ile mi oluyor yoksa daha az doku hasarına yanıt olarak mı meydana geliyor kesin olarak bilinmemektedir. Sitotoksik etkili olmasına karşın ROS, iskemik önkoşullamada kalp koruyucu sinyallerle ilgili bulunmuştur. Penna ve ark., 10'ar saniye 5 siklus ardkoşullama yaptıkları izole rat kalplerinde ardkoşullama öncesi ROS yakalayıcısı olan NAC verildiğinde ardkoşullamanın bloke olmadığını ancak ardkoşullama sırasında NAC verildiğinde infarkt azaltıcı etkinin bloke olduğunu ayrıca, önkoşullama öncesi verildiğinde önkoşullamanın koruyucu etkisini de bloke ettiğini göstermişlerdir (83).

Bu sonuçlara göre ROS kalp koruyucu mekanizmalarda bir tetikleyici olarak etki ediyor olabilir. Aslında in vitro modelde myokardiyum dışındaki ROS kaynakları olan nötrofiller ve endotel hücreleri olmadığı için ölçülen düzeyler daha düşük bulunmuş olabilir. ROS üretiminin mi yoksa azalmasının mı ardkoşullamada rol oynadığı henüz netlik kazanmamıştır ancak her iki durumun da önemi olması olasıdır.

Proinflamatuvar sitokinlerin indüksiyonu

Zhao ve Halkos'a göre reperfüzyon hasarına karşın koruyucu olan mekanizma, aynı zamanda reperfüzyona inflamatuvar yanıtı da azaltmaktadır. Ancak bu görüşe karşı başka bir gözlem hücre kültürü ve izole preparasyonlarda inflamatuvar hücreler ortamda olmadan yapılan deneylerle gelmektedir (84-87).

Bu görüşe göre kalp koruyucu etki, inflamatuvar hücrelerden bağımsızdır. Önceki çalışmalarda proinflamatuvar sitokinler olarak gösterilen TNF alfa ve IL6'nın ardkoşullama ile azaldığı gösterilmiştir (84).

Sitokinler ve inflamatuvar hücrelerin fonksiyonu henüz tam olarak ortaya konmamıştır. Ek olarak sitokinler, iskemi reperfüzyon myokardiyumunda nötrofilleri aktive ederken (88), ardkoşullama ile oluşan kalp koruyucu etki ve azalmış sitokin-inflamatuvar hücre yanıtı arasında nasıl bir ilişki olduğu henüz tam olarak açık değildir.

Doku faktörü ekspresyonu

Vasküler endotelin trombin aracılı aktivasyonu nedeniyle, buna sebep oldu düşünülen Doku faktörünün iskemi reperfüzyon hasarına katkısı olduğundan şüphelenilmektedir. Trombin, vasküler endotelde p-selectin ekspresyonunu uyarır, vasküler endotelde p-selectin ekspresyonu nötrofillerin miyokardiyuma göçünde ilk basamaktır. Ek olarak trombin, kalsiyum yüklenmesi ile ilgili mekanizmalar vasıtasıyla direk hücre ölümüne katkı sağlıyor olabilir (89).

Jiang ve ark. bir çalışmada in vivo domuz modelinde toraks açılmadan, koroner anjiyoplasti balonu ile 75 dakika LAD oklüzyonu ve 3 saat reperfüzyon sağlamışlar ve ardkoşullama 30 saniyelik periyotlar halinde uygulanmış ve çalışmanın sonunda ardkoşullama ile risk alanındaki iskemik miyokardiyumda doku faktörü protein ekspresyonu ve trombin aktivitesinde azalma ve Vasküler endotelde p-selectin immün reaktivitesinde belirgin düşüş ve infarkt boyutlarında belirgin azalma tespit edilmiştir. Böylece ardkoşullama ile doku faktörü-trombin yolağının down regülasyonu ve iskemi reperfüzyona inflamatuvar yanıtın inhibisyonu kalp koruma açısından yeni bir mekanizma sayılabilir

K-ATP kanalları:

Ardkoşullamada moleküler sinyal mekanizmaları ve subselüler etkileşimler rol oynamaktadır. Bu mekanizmalar, önkoşullamada olanlara benzer şekildedir. Ancak önkoşullamada iskemi süresince olan ve ardkoşullamada reperfüzyon süresince olan etkileşimler dizisi birbirinden kesinlikle farklıdır. Yang ve ark.(90) ATP bağlı K kanallarının

kalp korumadaki rolünü ortaya koymuşlardır. K-ATP kanallarının glibenclamid ile nonselektif blokajı ardkoşullamanın infarkt azaltıcı etkisini ortadan kaldırmıştır. Daha önemlisi, mitokondriyal K-ATP kanallarının selektif blokörü olan 5-Hidroksi Decanoate (5HD), ardkoşullamanın bu etkisini ortadan kaldırmaktadır. Bu da kalp koruyucu etkinin bu mitokondriyal K-ATP kanallarının spesifik aktivasyonu yoluyla olduğunu göstermektedir. Bu kanallar önkoşullama için de önem taşımaktadırlar (91,92). Sarkolemmal K-ATP kanallarının (sinerjik ya da paralel) bir rolünün olup olmadığı gösterilmemiştir. Ayrıca bu K-ATP kanalları aktivasyonunun ardkoşullama ile aynı anda mı yoksa daha mı geç olduğu açık değildir.

İntraselüler protein Kinaz C'nin aktivasyonu

Protein Kinaz C (PKC), önkoşullamada sinyal iletiminde anahtar enzim rolündedir. Önkoşullamanın aksine ardkoşullamada PKC ve izoformlarının rolü ile ilgili fazla bilgi yoktur.

Zotta ve ark in vivo rat iskemi reperfüzyon modelinde reperfüzyondan 5 dakika önce PKC inhibitörü chelerythrine verilerek ardkoşullamanın etkisinin bloke olduğunu göstermişlerdir (5). Ek olarak PKC epsilon'un blokajı ardkoşullamanın infarkt azaltıcı etkisini ortadan kaldırmıştır. Western Blot analizi ile gösterilmiştir ki, ardkoşullama, kalp koruyucu izoform olarak kabul edilen PKC epsilon miktarında artış ve PKCdelta izoformunda azalmaya yol açmaktadır (93,94).

İntraselüler kalsiyum yüklenmesinin azalması

İntraselüler kalsiyum yüklenmesin kardiyomiyositler için öldürücü olduğu iyi bilinmektedir (95,96). Erken reperfüzyon sırasında hücre içi yoğun kalsiyum birikimi sonunda sekonder etkiler oluşur. Kontraktıl rigor oluşumu, kalsiyum aracılı enzimlerin aşırı stimülasyonu ve mitokondrilerde mPTP'lerin oluşması bunlardan bir kaçıdır (97,98).

3 saat hipoksi ve 6 saat reoksijenizasyonda tutulan neonatal rat kardiyomiyositleri 5'er dakikalık 3 siklus boyunca hipoksik ardkoşullama yapıldıktan sonra intraselüler ve mitokondriyal kalsiyum yükünde azalma saptanmıştır ve bu azalma, hücre ölümünde azalma ile beraberdir(87). Ancak ardkoşullama ile özellikle in vivo koşullarda intraselüler kalsiyum düzeylerinin düşmesi ile oluşan fizyolojik sonuçlar henüz bilinmemektedir.

Koruyucu ve öldürücü kinazların aktivasyonu

Tsang ve ark., izole perfüze rat kalbinde reperfüzyonun ilk 15 dakikası için PI3K-Akt inhibitörü olan LY294002 ve Wortmannin verilmesi ile ardkoşullamanın etkisiyle oluşan fosfo-Akt'nin oluşumunun inhibe edildiğini, bunu yanında eNOS ve p70S6K aktivasyonlarının da inhibe olduğunu bildirmişlerdir. Bu çalışmada PI3K-Akt'nin ardkoşullama ile oluşan korumadaki rolü gösterilmiştir (60).

MEK/ERK1/2 (mitogen activated protein/extracellular signal regulating kinase) yolağının infarkt alanında azalma ile yakın ilgisi olduğu gösterilmiştir. ERK1/2 antagonisti PD98059 ile kalp koruyucu etkinin ortadan kalktığı gösterilmiştir. Subepikardiyal iskemik alanda ardkoşullama ile p-ERK düzeylerinde artış olduğu saptanmıştır. İn vivo ve in vitro modellerden elde edilen bilgilere göre p38 ve JNK1 ve 2 SAPK gibi öldürücü kinazlar inflamatuvar sitokinler ve oksidanlara yanıt olara aktifleşerek myokardiyal iskemi reperfüzyon hasarında yer alırlar (99-101).

Ardkoşullamada öldürücü kinazlar ile ilgili modülasyona dair çok az bilgi mevcuttur. İzole neonatal rat kardiyomiyositlerinde yapılan hipoksik ardkoşullamada p38 ve JNK MAPK gibi öldürücü kinazların inhibe olduğu bildirilmiştir (84). Bu öldürücü kinazlardaki azalma, kültür ortamında TNF α üretiminin azalması ile birlikte ancak bu ikisi arasında anlamlı bir bağlantı gösterilememiştir.

Tüm bu öldürücü ve koruyucu kinazların modülasyonu, reperfüzyonun ilk anlarında olmakta ve ardkoşullama ile oluşan kalp korumaya etki edebilmektedirler. Ancak

ardkoşullama, kinazların stimülatörlerini nasıl değiştirdiği ve bu öldürücü ve koruyucu kinazlar arasındaki dengenin, kalp koruma için ne derece önemli olduğu henüz açık değildir.

mPTP (Mitochondrial permeability transition pore)'lerin oluşumu:

K-ATP kanallarına ek olarak ardkoşullamanın bir diğer efektörü, mPTP'lerdir. mPTP'lerin açılması, iskemi reperfüzyon sonrası hücre ölümünde anahtar rolü üstlenmektedir (102,103). mPTP'ler, iskemi süresince kapalı olan ancak erken reperfüzyon ile birlikte mitokondrilerde oluşmaya başlayan porlardır (104). Özellikle koruyucu kinazlar, intraselüler kalsiyum ve NO, bu porların oluşum sürecinde önem taşırlar. Her ne kadar intraselüler pH gibi diğer faktörler de mPTP'lerin açılmasına etki edebilirse de NO tarafından mPTP'lerin açılmasının engellenmesi ve oksijen radikalleri ve kalsiyum düzeylerinin düşüşü, ikisi birlikte ardkoşullama ile oluşan kalp koruyucu etkinin mekanizmalarından biri olabilir. Buna göre mPTP'lerin açılmasını önlemenin kalp korumada anlamlı olduğu gösterilmiştir (105,106). mPTP'ler ardkoşullama için nihai bir hedef niteliğindedirler.

Ayrıca mPTP'lerin açılmasının inhibisyonunun; ardkoşullama ile oluşan kalp koruyucu etkinin, endotel aktivasyonu, süperoksit anyon üretimi ve lipid peroksidasyonu gibi diğer fizyolojik ve hücrel manifestasyonlarından sorumlu olup olmadığı da belli değildir.

FARMAKOLOJİK ARDKOŞULLAMA

Reperfüzyondan hemen önce ya da reperfüzyon ile birlikte yapılan işlemlerle reperfüzyon hasarı azaltılmaya çalışılmaktadır. Bu işlemlerden mekanik olanları ardkoşullama ve dereceli reperfüzyon ya da lokal hipotermi olabileceği gibi farmakolojik girişimler de olabilir. Literatür, reperfüzyon sırasında çeşitli ajanlar verilerek yapılan reperfüzyon farmakoterapileri

ile yapılmış yayınlarla doludur. Bu ajanlar, adenozin analogları, nitrik oksit, insülin, statinler, opioidler, ve diğer başka ajanlardır.

Bu ajanların reperfüzyonda verilmesi ile myokardiyal koruma sağlanması yolunda çok miktarda deneysel bilgi olmasına rağmen hiçbiri klinik rutin kullanıma girmemiştir. Adenozin reseptörünün olası etkileşimi, NO ve G protein bağlı reseptörler ile tetiklenmesi yollar ve efektörlerin aktivasyonu, reperfüzyon hasarını azaltmaya yönelik farmakolojik bir yaklaşımı olası olası kılmaktadır. Chiari ve ark. inhalasyon anestetiklerinin reperfüzyon sırasında verilmesiyle ardkoşullama ile oluşan kalp korumaya benzer bir koruma oluştuğunu bildirmişlerdir. Bu farmakolojik yaklaşım, diğer daha önce araştırılan farmakolojik uygulamalardan farklı olup olmadığı henüz açıklık kazanmamıştır. Reperfüzyon sürecinde farmakolojik uygulama sırasında bir veya birkaç kez yıkama periyodunun yapılmasının sürekli kesintisiz uygulamaya göre daha fazla fayda sağlayıp sağlamayacağı henüz açık değildir. İskemi sonrası reperfüzyonun ilk anlarının reperfüzyon olaylarına etki edebilme açısından önemi büyüktür (13).

Ne yazık ki hiçbir ilaç ya da tedavi ile reperfüzyon hasarının tüm mekanizmalarını taklit etme ya da bunların oluşumunu engellemek mümkün olmamıştır. Ancak reperfüzyon farmakoterapileri uygulanan deneysel çalışmalarda bir hedef de ardkoşullamayı taklit edebilmek olmuştur. Bu konu ile ilgili olarak İnhalasyon anestetiklerinden izofluran ve sevofluran reperfüzyon başlangıcında verilerek ardkoşullama benzeri etki sağlanmış, infarkt alanında küçülme elde edilmiştir (107,108).

İzofluranın, reperfüzyon başlangıcında verilmesi ile GSK3 beta (glukojen sentaz kinaz) aracılığı ile mPTP'lerin açılmasını inhibe ettiği düşünülmektedir. Ayrıca bu çalışmada inefektif dozda izofluran ve inefektif periyotlarla yapılan (10sn) mekanik ardkoşullama kombine edildiğinde efektif kalp koruma sağlandığı görülmüş ve izofluranın kalp koruma eşliğini düşürdüğü şeklinde yorumlanmıştır. Buradan çıkan sonuçla ilaç uygulamaları ile

ardkoşullama gibi mekanik manevraların kombinasyonu reperfüzyon hasarını azaltmada daha etkili olabilir. Sevofluran ile oluşan etki ise K-ATP kanallarının açılması şeklindedir (108). Ayrıca bir Na-H exchange inhibitörü olan cariporide, in vivo rat modelinde reperfüzyonun başında verildiğinde ardkoşullamanın etkisini arttırdığı bulunmuştur. Böylece farmakolojik ajanlar ile ardkoşullamanın taklit edilebileceği ya da etkisinin artırılabilceği yolunda olumlu adımlar atılmıştır.

İNSANLARDA ARDKOŞULLAMA

İki yeni çalışmada klasik ardkoşullama, koroner arter hastalığı olan seçilmiş hastalarda uygulanmıştır. Perkütan koroner girişim uygulanan 17 hastanın 10 tanesine reperfüzyon sağlandıktan 3-5 dakika sonra 90 saniye balon inflasyonu uygulanmıştır. Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında ST segment elevasyonlarının magnitudünün daha az olduğu, ve ST segmentlerinin daha erken normale döndüğü gözlenmiştir (109). 37 hastanın alındığı çok merkezli bir başka çalışmada 1 dakikalık 4 siklus halinde ardkoşullama uygulanmış sonuçta infarkt boyutu kontrol grubuna göre anlamlı düşük, akım hızı ise kontrol grubuna göre anlamlı yüksek bulunmuştur ayrıca ardkoşullama uygulanan hastalarda herhangi bir istenmeyen etki görülmemiştir.

Bu çalışmalara göre, ardkoşullama, koroner arter hastalığı olan insanlar için güvenilir ve faydalı bir tedavi seçeneği haline gelebilir. Bu bilgiler daha geniş hasta popülasyonlarında yapılacak çalışmalarla desteklenmelidir. Ayrıca bu yeni çalışmalarda, hipertansiyon, hiperkolesterolemi, obezite, DM gibi komorbiditelerin de araştırılması gerekmektedir.

Sağlıklı insan gönüllülerde yapılan yeni bir çalışmada önkolda geçici iskemi oluşturularak ardkoşullama uygulanmış ve iskemi reperfüzyon nedeniyle meydana gelen endotel disfonksiyonunun ardkoşullama sayesinde engellendiği gösterilmiştir. Bu çalışmada brakiyal

arter çapı ultrasonografik olarak ölçülmüş ve kola sarılan basınç kafının 200 mmHg şişirilmesi yardımıyla brakiyal arterde 20 dakika süreyle oklüzyon meydana getirilmiş, ardından 20 dakika reperfüzyon sağlanarak brakiyal arter çapları tekrar ölçülmüştür. Brakiyal arterde endotelial fonksiyon, Akım aracılı Dilatasyon (FMD) tekniği ile değerlendirilmiştir. Bu teknikte önkolda dirseğin hemen altında başka bir basınç kafı 300 mmHg basınçta 5 dakika tutularak önkolda reaktif hipeemi oluşması sağlanmış, reperfüzyon sonrası önkolda oluşturulan reaktif hiperemiye brakiyal arterin vazodilatasyon yanıtı ultrasonografik olarak incelenmiştir (110).

Sonuçta reperfüzyonun hemen başlangıcında uygulanan 10'ar saniyelik üç siklus ve 30'ar saniyelik üç siklus ardkoşullama algoritmelerinin endotelial disfonksiyonu engellediği görülmüştür. Reperfüzyon başlangıcından 1 dakika sonra 10'ar saniyelik algoritimde uygulanan geç ardkoşullamada ise endotelial disfonksiyonun engellenemediği ortaya konmuştur. Bu çalışmada ardkoşullamanın uygulama zamanının sikluslarının sürelerinden daha önemli olduğu vurgulanmıştır. Koroner arter iskemi reperfüzyon modelinin incelendiği diğer insan çalışmalarına göre ardkoşullama algoritmelerindeki farklılığın, çalışmaya konu olan dokunun vaskülatüründeki anatomik ve fizyolojik farklılıklara bağlı olduğu belirtilmiştir (110).

Ayrıca bu modelde oluşturulan geçici endotelial disfonksiyonun reperfüzyon sonrası 60 dakika içinde spontan düzelen bir çeşit "endotelial stunning" olduğu vurgulanmaktadır. Ardkoşullamanın sağladığı olumlu etkinin NO sentez ve/veya aktivitesinin korunması ile ilgili olduğu savunulmaktadır (110). Ateroskleroz gibi endotelial disfonksiyona predispozan faktörlerin varlığında ardkoşullamanın endotel fonksiyonu koruyucu etkileri araştırılması gereken önemli bir konudur.

ARDKOŞULLAMANIN DİĞER MODİFİYE REPERFÜZYON YÖNTEMLERİNDEN FARKLARI

Reperfüzyonun ilk başlangıcında ardkoşullama algoritminin zamansal biçimi, ardkoşullamayı reperfüzyonu modifiye eden stratejilerin toplandığı bir kategoriye sokar. Ancak ardkoşullamada oluşan koruyucu etki, reperfüzyon koşullarını modifiye eden diğer stratejilere göre daha farklıdır. Örneğin kademeli reperfüzyonda koroner kan akımı sıfırdan başlayarak yavaş yavaş artırılır (**112-115**). Bu şekilde infarkt alanında %30-60 arasında azalma olur ancak ardkoşullamanın aksine endotelial fonksiyon korunmamıştır (**53**). Ek olarak kademeli reperfüzyonda myokardiyumda risk altındaki iskemik alanına nötrofil akümülyasyonunda artış mevcuttur, ancak ardkoşullama nötrofil göçünü azaltmaktadır. Bu nedenle ardkoşullama ile kademeli reperfüzyon arasında farklılık mevcuttur. Nötrofil göçünü ve aktivasyonunu azaltan yöntemler infarkt alanında azalmaya yol açmışlardır. Ardkoşullamada nötrofillerin rolünün invivo olarak daha ayrıntılı araştırılması gereklidir. Tetikleyici ligandlar olan Adenozin, NO, K-ATP kanalları açısından da her iki strateji arasındaki farklılıklar henüz aydınlatılmamıştır. Bu nedenle, ardkoşullamanın diğer modifiye reperfüzyon formlarından tam olarak ayrı olup olmadığı açık değildir.

ÖNKOŞULLAMA VE ARDKOŞULLAMA ARASINDAKİ BENZERLİKLER VE FARKLILIKLAR

Her iki fenomenin bir takım ortak özellikleri vardır. İskemik ya da farmakolojik olsun önkoşullama ile ardkoşullama arasındaki ilk fark, uygulama zamanıdır. Birisi iskemi öncesinde, diğeri ise reperfüzyon başlangıcında yer alır. Ayrıca önkoşullama, dokunun iskemiye toleransını arttırıcı adaptif değişiklikler oluşmasını uyarırken ardkoşullamanın bu

çeşit bir adaptif etkisi yoktur. Önkoşullamanın adaptif etkilerinin, reperfüzyon sırasında da ortaya çıkması sözkonusu olabilir. Ancak bu fikir henüz geçerlilik kazanmamıştır.

Ardkoşullamada rol alan faktörler kabaca iki gruba ayrılır. Birinci grup tetikleyici ve ikinci grup mediyatör/efektör olarak değerlendirilir. Bu faktörler, erken reperfüzyon süresince aktif olmak zorundadırlar. Oysa önkoşullamadaki adaptif değişiklikler yalnızca iskemi öncesinde yer alırlar. Örneğin süperoksit anyonları, önkoşullamada tetikleyici rol oynayıp bir çok mekanizmayı harekete geçirirken, ardkoşullamada süperoksit anyonlarının azalması oksidan aracılı hücre hasarının azalmasına yol açmaktadır (49,116). Ardkoşullama ile ilgili mekanizmaların aktivasyonunu açıklamak için tetikleyici ve mediyatör/efektör konseptleri ile ilgili bilgiler işe yarayabilir. Ancak önkoşullamanın geç etkisinin mekanizmaları halen açıklığa kavuşmamıştır. Ayrıca her iki fenomende bir takım efektörler ortak olsa da fizyolojik etkileri ve mekanizmaların oynadığı roller oldukça farklıdır.

Halkos (53) önkoşullama ve ardkoşullama ile infarkt alanında azalma meydana geldiğini ancak bu iki fenomenin birbirinin etkisini arttırmadığını ortaya koymuştur. Tsang ve ark (60) izole rat kalbinde aynı şekilde ardkoşullama ve önkoşullamanın birbirine etkisi olmadığını göstermişlerdir. Ancak Yang ve ark. (50) 45 dakika oklüzyon ve üç saat reperfüzyon yapılan invivo tavşan modelinde önkoşullama ve ard koşullamanın birbirine arttırıcı etkisi olduğunu bildirmişlerdir. Bu arttırma etkisinin iskemi süresi ile ilgili olup olmadığı açık değildir. Önkoşullama ve ardkoşullamanın birbirinin etkisini arttırıp arttırmadığının ortaya konması, her iki yolun kullandığı moleküler yolların ortak ve farklılıklarının anlaşılması için yarar sağlayabilir.

Varolan bilgiler her iki yöntemin kalp koruyucu etki için aynı fizyolojik ve hücrenel yaklaşımı gösterdiği yolundadır. Her iki yöntem ile, infarkt alanında azalma, endotel disfonksiyonunda azalma, koroner vasküler endotele ve dokuya nötrofil adherensi ve akümülyasyonunda azalma, post-iskemik myokardiyumda süperoksit anyon üretiminde azalma,

reperfüzyon aritmelerinde azalma ortaya konmuştur. Ayrıca koruyucu kinazların olaya karışması, mPTP'lerin inhibisyonu ve apoptoziste azalma ortak yönlerdir (62). Her iki yöntemin adenosin gibi otakoid reseptörlerine ve PI3 kinaz-Akt yolağı gibi sinyal yollarına bağımlılığı, mekanizmalarında benzerliğin bulunduğunu gösterebilir. Önkoşullamada aktifleşmeyen ancak ardkoşullamada aktifleşen bir yolak olan ERK1/2 gibi bazı farklılıklar mevcuttur (50,117). Her iki süreçte ortak olan K-ATP kanalları ve mPTP gibi efektörlerin aktive olma zamanları farklı olduğu için kalp koruyucu etki de farklı olabilir.

İSKEMİK ÖNKOŞULLAMA VE ARDKOŞULLAMA İÇİN ORTAK HEDEF REPERFÜZYON HASARI KORUYUCU KİNAZ YOLU (RISK)

RISK (Reperfusion Injury salvage Kinases) olarak bilinen prosurvival kinazlar olan Phosphatidylinositol-3-OH kinase(PI3K)-Akt ve p42/p44 extracellular signal regulated kinase (Erk1/2) reperfüzyon hasarından korunmada önemli birer hedef oluşturmaktadırlar Akt ve ERK1/2 gibi “prosurvival” kinazların reperfüzyon sırasında aktivasyonunun myokardiyal I/R hasarına karşı güçlü etkileri olduğu ortaya konmuştur. Reperfüzyon süreci başında RISK yolağının aktivasyonunun, kalbi iskemi reperfüz hasarından koruduğu gösterilmiştir (118).

Son bilgiler ışığında, bu koruyucu RISK yolağının aktivasyonu, hem önkoşullama hem de yeni bir fenomen olan ardkoşullama ile oluşmaktadır (119). Reperfüzyon sırasında RISK yolağının farmakolojik upregülasyonu, önkoşullama ve ardkoşullamanın her ikisinin kalp koruyucu etkilerini arttırmaktadır. Letal reperfüzyon hasarı sırasında myosit ölümüne apoptozis neden olmakta ve PI3K-Akt ve ERK1/2 prosurvival kinazlar apoptozise engel olmaktadır. Bu prosurvival kinazlar, insülin, urokortin, bradikinin, opioid reseptör

agonistleri ve atorvastatin gibi ajanların aktive ettiği çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir. Reperfüzyon sürecinde RISK yolağının farmakolojik aktivasyonunun, hem apoptotik hem de nekrotik hücre ölümüne karşı koruyucu etkileri olduğu, infarkt alanında azalmanın tespit edildiği çalışmalarda kanıtlanmıştır **(118)**.

Sonuç olarak önkoşullama ve ardkoşullama, kalp koruyucu etkilerini RISK yolağı aracılığıyla göstermekte ve bu etki mitokondriyal mPTP'lerin inhibisyonu yoluyla olmaktadır. Bu yüzden RISK yolağının reperfüzyon sırasında farmakolojik manuplasyonu önkoşullama ve ardkoşullama etkilerinin ortaya çıkmalarına yol açabilir.

Önkoşullamada Akt veErk1/2'nin rolü:

Prosurvival kinazlar (PI3K-Akt ve Erk1/2)'nin önkoşullamadaki rolünü inceleyen çalışmalar, bu kinazları RISK yolağının içinde araştırmıştır. İlk çalışmalarda, önkoşullama sinyallerinin membrandan hücre içindeki mitokondriya gibi birimlere iletilmesinde görevli bileşenler olarak değerlendirilmişlerdir.

İlk olarak Tong ve ark. **(120)**, PI3K-Akt yolağının önkoşullama sinyal kaskadının bileşeni olduğunu ortaya koymuştur. İzole perfüze rat kalbinde standart önkoşullamanın, Akt ve hedefi GSK beta'yı iskemi periyodundan hemen önce fosforilasyonu ve bu kinazların fosforilasyonunun kalp koruma için gerekli olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca Downey laboratuvarında **(121-123)** yapılan çalışmalarda önkoşullama sinyal kaskadının hücre membranından mitokondriye PI3K-Akt yolağını da kapsayan bir dizi farklı bileşenin katılımıyla iletildiğini gösterdiler.

Erk1/2'nin önkoşullamanın oluşumunda potansiyel sinyal bileşeni olup olmadığı açık değerildir, ancak bazı çalışmalarda standart önkoşullama uyarımının iskemi öncesi periyotta, Erk1/2'nin fosforilasyonu ile sonuçlandığı gösterilmiştir **(124)**. Bazı çalışmalarda da

önkoşullama uyarımı ile Erk1/2 fosforilasyonunda değişiklik olmadığı gösterilmiştir (125). Son çalışmalara göre mitokondriyal reaktif oksijen türevleri (ROS) salınımı ile Erk1/2 aktivasyonu olmaktadır.

1. Önkoşullama fazı süresince potansiyel sinyal komponenti olarak Akt ve Erk1/2'nin rolü:

Önkoşullama uyarımına yanıt olarak astilkolin, bradikinin, opioidler ve noradrenalin gibi otakoidler, G-protein bağlı reseptör'ü (GPCR) aktive eder, matriks metalloproteinaz'ı yardımıyla Epidermal büyüme faktörü reseptörünün (EGFR) transaktivasyonuna neden olur. EGFR, Src-kinaz bağımlı olarak PI3K-Akt yolağını aktive eder. PI3K-Akt yolağının uyarılması, eNOS fosforilasyonunu ve aktivasyonunu ve bunun da, NO aracılığıyla Guanilat siklaz (GC) aktivasyonuna yol açar.GC, Protein Kinaz G'yi (PKG) aktive eder. PKG'de mitokondriyal K-ATP kanallarını aktive eder ve açar. Bu da mitokondriden ROS salınımına yol açar. ROS'ların kaynağı elektron transport zinciridir (ETC). ROS, Erk1/2'yi de kapsayan önkoşullama mediyatörler zincirini aktive eder.

2. Önkoşullamada Akt ve Erk1/2'nin rolü: reperfüzyon sırasında

Önceden bahsedilen çalışmalarda PI3K-Akt ve ERK1/2'nin, önkoşullamanın sinyal bileşenleri olduğu ortaya konmuştı. Reperfüzyon sırasında bu bileşenlerin etkileşimleri bir çok yeni araştırmanın konusunu oluşturmaktadır. Bu yeni çalışmalar, iskemi izleyen reperfüzyon dönemine odaklanmışlardır. İskemi öncesi yapıda önkoşullama uyarımı, postiskemik reperfüzyon fazında olan çok önemli olayları modifiye ederek kalp koruyucu etki oluşturabilmektedir. Bu çok önemli olaylardan biri, hücre ölümü açısından kritik olan mPTP'lerin açılmasıdır. Bu nedenle önkoşullama, reperfüzyon sırasında mPTP'lerin açılmasını engelleyerek kalbi korunmaktadır (106).

İzole perfüze edilen rat kalbi ile çalışma ile PI3K-Akt ve ERK1/2 bileşenlerinin her ikisinin de fosforilasyonu ortaya konmuştur. İlginç olarak önkoşullama uyarımı, kinaz fosforilasyonunda, İskemi öncesinde birincil kinaz fosforilasyonu ve reperfüzyon sırasında ikincil kinaz fosforilasyonu olmak üzere bifazik yanıt oluşturuyor görünmektedir.

Bu kinazların, önkoşullama ile ilişkili fosforilasyonunun reperfüzyon sırasında farmakolojik olarak inhibisyonu, infarkt alanında önkoşullama ile oluşan azalmanın ortadan kalkmasına yol açmaktadır. Bu da önkoşullamanın koruyuculuğunu sağlamada RISK yolağının her iki bileşeni olan PI3K-Akt ve ERK1/2'nin her ikisinin de gerekli olduğunu gösterir (119).

İskemi-reperfüzyon hasarının izole tavşan kalbi modelinde yapılan bir çalışmada, reperfüzyon sırasında Wortmannin (bir RISK inhibitörü) varlığında önkoşullamaya bağlı koruyucu etkinin ortadan kalktığı gösterilmiştir. Bu çalışmadan çıkan sonuç, koruyucu etkinin oluşabilmesi için reperfüzyon fazında Akt fosforilasyonunun gerekli olduğunu destekler niteliktedir. Bu çalışmada PI3K-Akt inhibitörünün reperfüzyon döneminde onbeş dakika geç uygulanması halinde önkoşullamaya bağlı korumanın ortadan kalktığını gösterilmiştir ve Akt fosforilasyonunun reperfüzyonun ilk otuz dakikası boyunca gerekli olduğunu ortaya koymuşlardır (126).

Ardkoşullamada RISK yolağı

Vinten Johansen ve ark. (48), iskemik ardkoşullama adını verdikleri, iskemi sonrası reperfüzyon başlangıcında kısa iskemi ve reperfüzyon periyotlarından oluşan ve köpek kalp modelinde infarkt alanında önemli küçülme oluşturan kalp koruyucu bir fenomen tanımladılar.

Daha sonraki çalışmalarda ardkoşullamanın apoptotik hücre ölümü, endotel disfonksiyonu, oksidatif stres ve nötrofil akümüülasyonu gibi reperfüzyon hasarının diğer sonuçlarında da azalma oluşturduğu ortaya konmuştur (48).

Bu fenomen, 1980'lerden beri kalp korumak amacıyla yapılan çalışmalardan ortaya çıkan modifiye reperfüzyon formudur (8).

Heusch, (127) bu fenomen için, "yeni şişede eski bir şarap" tanımlamasını kullanmıştır. İskemik ardkoşullama kavramı, kalp korumada potansiyel hedef olarak reperfüzyon fazına odaklanmayı sağlamıştır.

Ardkoşullama oluşumunda RISK yolağının rolünü araştıran yeni çalışmalarda; izole perfüze rat kalbinde iskemik ardkoşullamanın reperfüzyon sırasında RISK yolağının aktivasyonu ile kalp koruması sağladığını ortaya koymuştur. Ardkoşullama 6 siklus 10 saniye epizodlarla olarak uygulanmış ve reperfüzyon fazında Akt fosforilasyonu sağlanmıştır (60). Önemli olan, ardkoşullama ile oluşan bu Akt fosforilasyonunun farmakolojik olarak inhibisyonu ile infarkt azaltıcı etki tamamen ortadan kalkmıştır. Bu da koruyucu etki için RISK yolağının ne derece gerekli olduğunu göstermektedir(60).

Ayrıca Downey ve ark. yaptıkları çalışmalarda RISK yolağının ERK1/2 komponentinin inhibisyonu ile de ardkoşullamanın koruyucu etkisinin artadan kalktığını göstermişlerdir (50). Bu bulgular göstermiştir ki RISK yolağının her iki bileşeni olan Akt ve ERK1/2 ardkoşullamanın kalp koruyucu etkisi için mutlak surette gereklidir.

RISK yolağı potansiyel aktivasyon mekanizması

Önkoşullama ve ardkoşullamanın RISK yolağını nasıl aktive ettiği kesin olarak bilinmemektedir, önkoşullama için bu konuda iki teori vardır.

1. Önkoşullama uyarımına yanıt olarak iskemi öncesinde Akt ve ERK1/2'de başlangıç aktivasyonu olur, bu durum kinaz yolaklarını harekete geçirir hatta hücreiçi kinaz dağılımını gerçekleştirir ve reperfüzyon sırasında kinazların fosforillenmesi için potansiyelize edilir.
2. Önkoşullama uyarımı ile reperfüzyon sırasında RISK yolağının aktivasyonu için mediyatör görevi üstlenen bir faktör bulunuyor olabilir (adenozin, ROS, PKC gibi).

EPO, insülin, statinler gibi farmakolojik faktörler de önkoşullama ve ardkoşullama benzeri etki ile RISK yolağını aktive edebilir ve bunun sonucunda mPTP'lerin açılmasını inhibe ederek aynı koruyucu etkiyi oluşturabilirler.

Reperfüzyon sırasında RISK yolağının farmakolojik uyarımı p70S6K fosforilasyonu ile, endotelial NO sentaz fosforilasyonu, Bcl-2 bağlı öldürücü promotor fosforilasyonu, GSK3 beta fosforilasyonu ile sonuçlandığını göstermişlerdir **(128-130)**. Reperfüzyon sırasında nonfarmakolojik olarak RISK yolağının aktivasyonu ve önkoşullama ile p70S6K'nin ve eNOS fosforilasyonu olduğu gösterilmiştir **(119)**.

Bu koruyucu sinyal yollarının çoğu mitokondriyalarda özellikle oksidatif stres, mitokondriyal kalsiyum yüklenmesi ve ATP tükenmesi nedeniyle reperfüzyonun ilk dakikalarında açık bulunduğu inanılan mPTP'lere etki ediyor gibi görünmektedir **(131)**. Önkoşullama ve ardkoşullama, kalbi mPTP'lerin açılmasını engelleyerek korumaktadırlar. Bu nasıl olur?

RISK yolağının aktive olmasıyla mPTP'lerin açılımını inhibe eden bir çok koruyucu mekanizma çalışmaya başlamaktadır.

- BAD ve Bcl-2bağlı X protein gibi, etkilerini mPTP'leri açarak gösteren çeşitli pro-apoptotik faktörlerin fosforilasyonu ve inaktivasyonu.
- NO salınımı yaparak mPTP'lerin açılımını inhibe eden eNOS'un fosforilasyonu ve aktivasyonu.
- GSK3 beta'nın fosforilasyonu ve inhibisyonu ile mPTP oluşumunun inhibisyonu.
- ERK1/2 bileşeni, mitokondriyal PKC ϵ ile fonksiyonel bir kompleks oluşturması ve mPTP'lerin açılımının engellenmesi.

Ardkoşullama ile ilgili son bilgilere göre, endojen üretilen adenzinin ortamdan uzaklaşmasındaki gecikme ve reseptör aktivasyonu, kardiyak koruma için gereklidir **(64)**.

Buna göre ortamdaki adenozin tarafından G protein bağı reseptör yardımıyla RISK yolağının aktivasyonu gerçekleşiyor olabilir.

RISK yolağının bileşenleri olan ERK1/2 ve Akt'nin mPTP'lerin açılmasını inhibe ederek kalp koruma için genel bir etki sağladığı ve bu güçlü etkilerin farmakolojik ajanlar ya da önkoşullama ve ardkoşullama gibi manevralarla başlatılabildiği bilinmektedir. Önemli olan, bu ortak yolak, reperfüzyon zamanında başlatılabilir bu da klinik reperfüzyon koşullarında etkileyici bir tedavi stratejisi oluşturabilir.

LİPİD PEROKSİDASYONU VE MALONDİALDEHİD OLUŞUMU

Lipid peroksidasyonunun başlaması için, bir lipid yapısına atak yaparak, metilen ($-CH_2-$) grubundan bir hidrojen atomu çıkartabilecek reaktiflikte herhangi bir örneğin ortamda olması yeterli olmaktadır. Satüre ya da monoansatüre yağ asidleri, bu ataklara, poliansatüre yağ asidlerine göre (PUFA) daha direçli olmasına rağmen, membranların çoğu ve lipoproteinler PUFA yan zincirleri içermektedirler. Malondialdehit (bazen malonaldehit olarak da isimlendirilmektedir) oluşumu yıllardan beri lipid peroksidasyonuna odaklanmanın nedeni olmuştur, çünkü *in vitro* tiyobarbitürik asid (TBA) testi serbest MDA'yı saptamada ve lipid peroksidasyonunu göstermede en yaygın olarak kullanılan test olma özelliğini günümüzde halen korumaktadır. Her ne kadar, demir tuzlarının varlığında, karaciğer mikrozomlarının peroksidasyonunda çok büyük miktarlarda oluşsa da, gerçekte, MDA çoğu lipidlerin peroksidasyonu sırasında sadece küçük bir miktar oluşmaktadır .

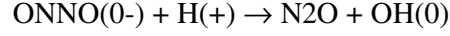
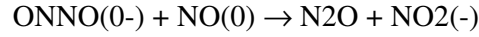
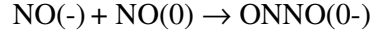
MDA, linolenik, araşidonik ve doksahexanoik asid gibi, ikiden daha fazla çift bağ içeren PUFA'ların peroksidasyonu sırasında, çok fazla miktarlarda oluşmaktadır. Ayrıca, MDA eikozanoid metabolizması sırasında da, enzimatik olarak oluşabilmektedir. Ortamın pH'ına

bağlı olarak MDA çeşitli formlarda bulunabilmektedir. Fizyolojik pH'larda, 'serbest' MDA enolat anyonu şeklinde olup, amino asid gruplarının büyük bir kısmına karşı düşük reaktivitesi vardır. Bununla beraber, pH düştükçe reaktivitesi oldukça artmaktadır. Fizyolojik durumlarda MDA, serbest amino asidlere göre, proteinlere daha hızlı bir şekilde saldırmakta olup, bu da bir çok modifiye olmuş rezidüler (özellikle lizin) ve molekül içi ve moleküller arası çapraz bağlar oluşturmaktadır.

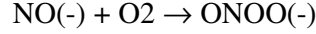
Aynı zamanda MDA, DNA bazları ile de reaksiyona girmekte ve mutajenik lezyonlar oluşturabildiği ileri sürülmektedir. MDA, memeli dokularında hızla metabolize olmaktadır. Aldehit dehidrogenaz enzimi MDA'ı bir dikarboksilik asid olan malonik asidin semialdehit formuna dönüştürmektedir. MDA gibi, deoksi şekerler, nükleozidler veya benzoatlar gibi diğer ürünlerin peroksidasyonu da TBA ile, aynı dalga boyunda ölçülebilecek şekilde renkli bileşikler oluşturmaktadır. Bu nedenle MDA ölçümünün daha iyi tanımlanması için, son zamanlarda genellikle tiobarbitürik aside-reaktif maddeler (Thiobarbituric Acid-Reactive Substances, TBARS) terimi kullanılmaktadır.

NİTRİK OKSİD (NO) YAPISI VE SENTEZİ

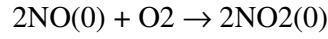
Nitrik oksid (nitrojen monoksit, NO) renksiz bir gazdır. Suda orta derecede çözünür olup (20 C'de en fazla 2 mM), organik çözücülerde, tıpkı O₂ gibi, daha fazla çözünmektedir. Bu nedenle, NO hücreler arasında rahatlıkla diffüze olabilmektedir. Nitrik oksid molekülü ortaklanmamış bir elektronu bulunmasından dolayı paramanyetik bir molekül olup, serbest radikaldir. Eğer ortaklanmamış elektron, bir-elektron oksidasyonu yoluyla çıkartılacak olursa, nitrozonyum katyonu (NO⁻) oluşur. Bir-elektron indirgenmesi ise, nitrozil anyonu (NO⁺) oluşmasına neden olmaktadır. NO⁻ reaktif olup, kısa ömürlüdür ve NO ile reaksiyona girerek nitroz oksid (N₂O) ve muhtemelen OH oluşturur.



NO(-), aynı zamanda, O₂ ile reaksiyona girerek peroksinitrit oluşturmaktadır.



NO(0) havaya maruz kaldığında, O₂ ile reaksiyona girmekte ve kahverengi nitrojen dioksit (NO₂(0)) gazı oluşturmakta olup, bu NO(0)'dan daha reaktif bir serbest radikaldir.



Nitrik Oksid Sentezi

NO(0), yaşayan organizmada, bir grup enzim olan ve nitrik oksid sentaz (NOS) olarak isimlendirilen üç farklı enzim yoluyla sentezlenmekte olup, bunlar bir amino asit olan L-arjinini, NO(0) ve L-sitrülline dönüştürürler. Bu reaksiyonda oksijen gerekmektedir ve NOS enzimi dört tane kofaktör içermektedir: FAD, FMN, tetrahidrobiopterin ve hem. Tıpkı sitokrom P450'de olduğu gibi, hem yapısı, enzimin tam ortasında yer almaktadır. Yine, P450'de olduğu gibi NOS, NO(0)'u bağlayabilmekte ve bu enzimin aktivitesinde azalmaya yol açabilmektedir. NOS ve kofaktörleri, arjininin yokluğunda O₂(0-) oluşumuna yol açabilmektedir, fakat bunun fizyolojik önemi henüz kesin açık değildir. L-arjininin, NO(0)'a dönüşmesi, beş tane elektron oksidasyonunu gerektirmekte ve elektronlar NADPH'dan sağlanmaktadır. NOS'un aktivitesi sağlıklı dokularda dikkatli bir şekilde regüle edilmektedir.

Üç tip NOS enzimi olup bunlar:

1. Nöronal NOS (nNOS); orijinal olarak sinir sistemi dokularında tanımlanmış olup, her zaman bu hücrelerde bulunmaktadır.

2. Endotelial NOS (eNOS); endotel hücrelerde saptanmış olup, kan basıncının regülasyonunda NO(0)'nun sentezi için gereklidir. Endotelden türeyen NO(0) orijinal olarak endotelden-türeyen gevşetici faktör (endothelium-derived relaxing factor, EDRF) olarak tanımlanmıştır. Sağlıklı dokularda NOS enzimi etkisini gösterebilmesi için Ca(+2) ve kalmodulin proteinlerine gereksinme duymakta, böylece hücre içi 'serbest' Ca(+2)'un düşük olması durumunda NOS aktivitesi engellenmektedir.
3. İndüklenebilen NOS (iNOS); kronik enflamasyon durumunda ise, indükleyici NOS olarak isimlendirilen 'ekstra' bir NOS aktivitesi ortaya çıkmaktadır. iNOS, ilk olarak endotoksin ve bazı sitokinlere maruz kalan makrofajlarda ve karaciğer hücrelerinde tanımlanmıştır. iNOS kalmodulini çok sıkı bir şekilde bağlamakta ve aktivitesi esas olarak Ca(+2)'dan bağımsız olmaktadır. Hızlı bir şekilde NO(0) oluşumu sağlamakta ve normalden daha fazla lokalize konsantrasyonlara ulaşmakta ve mikromolar konsantrasyonlarda bulunmaktadır.

NOS enzimini sınıflarken, belirli noktalara dikkat çekilmektedir; çünkü farklı NOS enzimleri, insan vücudunda multiple bir şekilde lokalize olmuş durumdadırlar. Örneğin, nNOS hem santral, hem de periferel sinir sisteminde çeşitli nöronlarda bulunmaktadır, fakat eNOS'da bazı nöronlarda tanımlanabilmektedir. Her ne kadar, eNOS sabit ise de, düzeyleri vasküler endotelde (örn; kesi stresiyle) indüklenebilmektedir. iNOS akciğerde, NO(0) oluşumu sırasında görülebilmektedir. nNOS nöronlarda belli muamelelerden sonra indüklenebilmektedir. Bazı hastalıklarda görülen fazla miktardaki NO(0) üretimi, çoğu zaman (her zaman değil) iNOS ile ilgili olup, hastalığın patolojisine katkıda bulunduğu düşünülmektedir. Ratlarda ve farelerde, fagositler (özellikle makrofajlar) özellikle enflamasyon sırasında NO(0) üreticisidirler; fakat insanlarda fagositler, en azından in vitro denemelerde, NO(0) oluşumu için isteksiz olup, bunun için sitokinlere uzun süre maruz kalmaları gerekmektedir.

GEREÇ ve YÖNTEM

Kırk adet erkek 250-300 gram ağırlığında erişkin Wistar albino rat Adnan Menderes Üniversitesi Temel Tıp Bilimleri Deney Hayvanları Laboratuvarında muhafaza edildiler. Tüm hayvanlar 22 C oda ısında, rat kafesinde tutuldular ve standart kemirgen besini ile suya serbest erişimleri sağlandı. Deneyde kullanılan tüm ratlar yapılacak işlemler öncesinde tartılarak vücut ağırlıkları kaydedildi. Anestezi indüksiyonunda intraperitoneal 100mg./kg. ketamin hidroklorür (Ketalar 50mg./ml. flakon, Parke-Davis, USA) kullanıldı, gerekli olduğunda deney boyunca anestezinin devamı için deney boyunca bir kez olmak üzere ek doz (50mg./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 disekte edildi. Fasyanın hemen altında, internal juguler ven subklavyen vene döküldüğü bölgede eksplore edilerek 4-0 ipek kullanılarak askıya alındı. 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. Venöz yolda tıkanıklık oluşmasını engellemek amacıyla mililitresinde 5 ünite Heparin içeren %0.9 NaCl çözeltisinden 0.2 cc. verilerek venöz yol yıkandı. 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 37.0±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 eksplere edildi. Aort 3-0 ipek ile dönülerek askıya alındı. Abdominal aort klempajı için Vascu-Stat (REF 1001-535) vasküler klemp kullanıldı. Deneyin sonunda tüm gruplarda ratların sol gastrocnemius adalelerinden kas biyopsileri alındı. Bunun ardından toraks duvarı orta hattın sol tarafından açıldı ve intrakardiyak ponksiyon ile kan örneği elde edildi. 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 10ml./kg. %0.9 NaCl verildi. Deneyin 265. dakikasında doku ve kan örnekleri alınarak ratlar sakrifiye edildi.

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

Genel cerrahi hazırlık ve anestezi indüksiyonu sonrasında median laparotomi yapıldı. İnfrarenal abdominal aorta izole edildi. Aorta 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 10ml./kg. %0.9 NaCl verildi. Deneyin 265. dakikasında doku ve kan örnekleri alınarak ratlar sakrifiye edildi.

İskemik ardkoşullama grubu (n=8)

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

İskemik önkoşullama grubu (n=8)

Genel cerrahi hazırlık ve anestezi indüksiyonu sonrasında median laparotomi yapıldı. Deney boyunca sıvı resüsitasyonu amacıyla 10ml/kg. %0.9 NaCl verildi. İnfrarenal abdominal aort izole edilerek anestezinin idamesi sağlandı, deneyin 25. dakikasinda non-travmatik vasküler bulldog klempe kullanılmak suretiyle aort oklüde edildi. 10 dakikalık oklüzyon yapıldı 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. dakikasinda 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. dakikasınca kaldırılarak 60 dakika süreyle reperfüzyon sağlandı. Deneyin 265. dakikasınca doku ve kan örnekleri alınarak insizyon kapatılarak ratlar sakrifiye edildi.

İskemik önkoşullama ile birlikte İskemik ardkoşullama grubu (n=8)

Genel cerrahi hazırlık ve anestezi indüksiyonu sonrasında median laparotomi yapıldı. Deney boyunca sıvı resüsitasyonu amacıyla 10ml/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. dakikasınca 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. dakikasınca kaldırılarak ardkoşullama süreci başlatıldı ve reperfüzyonun 1. dakikasınca 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 kaldırılarak 60 dakika süreyle reperfüzyon sağlandı. Deneyin 265. dakikasınca reperfüzyon 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); phenylmethylsulfonylfluoride ($\text{C}_7\text{H}_7\text{FO}_2\text{S}$, Sigma, Kat. No.P-7626), di-natriumhydrogenphosphate-dihydrate ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, MERCK, Kat. No. K25979680), potasyumdihydrogenphosphate (H_2KPO_4 MERCK, Kat. No. A986373), ethylenediaminetetraacetic asid-disodium salt (Na_2EDTA) ($\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_8\text{Na}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, Sigma, Kat. No. E-1644) kullanılarak hazırlandı.

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

Malondialdehid (MDA) Ölçüm Yöntemi

Kakkar ve ark. yöntemine göre çalışıldı, sonuçlar nmol/ml olarak verildi.

Nitrik oksid (NO) Ölçüm Yöntemi

BIOXYTECH (Kat. No. 22116) yöntemi modifiye edilerek manuel yöntemle saptandı. Örnekler ve standartlar, ELISA mikroplate reader'de 540 nm'de okutuldu. Konsantrasyon

hesapları otomatik olarak cihaz tarafından hesaplanmış olup, doku hesaplamaları sonucunda, sonuçlar (mikromol/L) olarak verildi.

İstatistiksel Değerlendirme

Deneyle sonucunda elde edilen veriler Pentium III işlemci bilgisayar aracılığı ile istatistik paket programı (SPSS 11.0 for Windows) kullanılarak analiz edildi. Verilerin dağılım 6zelliklerine g6re gruplar arasındaki farklılık Mann Whitney-U testi ile ve Wilcoxon signed ranks testi ile değerlendirildi ve p değerinin 0.05'den k6çük olması istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

BULGULAR

Her biri 8 deney hayvanı içeren beş gruba ait preoperatif ve postoperatif serum Malondialdehit (MDA) (nanomol/ml) ve Nitrik oksit (NO) (mikromol/L) örnekleri Tablo I’de görülmektedir.

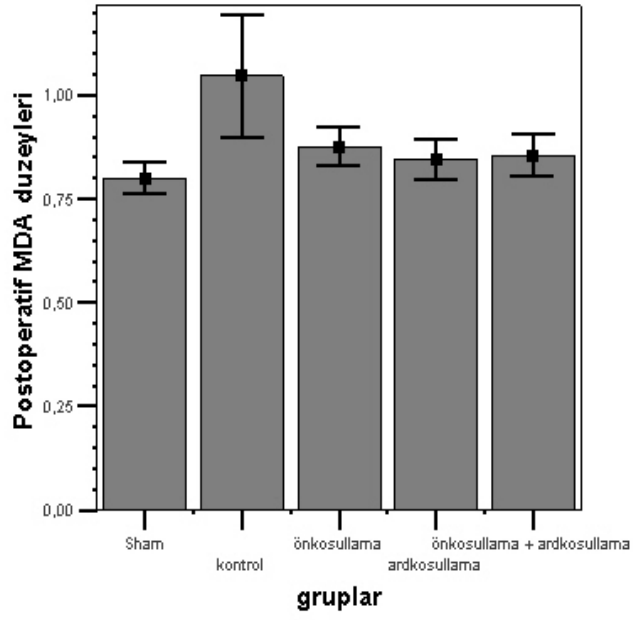
Tablo I. Preoperatif ve postoperatif serum MDA ve NO düzeyleri.

Değerler ortalama \pm standart deviasyon olarak verilmiştir.

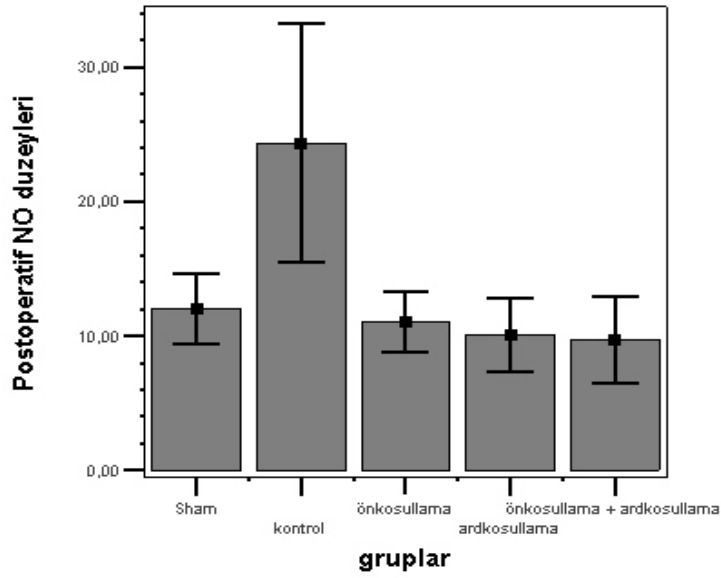
GRUPLAR	MDA (nanomol/ml)		NO(mikromol/L)	
	preop	postop	preop	Postop
Sham	0,95 \pm 0,06	0,80 \pm 0,04	11,04 \pm 5,57	11,99 \pm 3,08
Kontrol	1,00 \pm 0,08	1,04 \pm 0,17	28,53 \pm 9,66	24,35 \pm 210,61
ardkoşullama	1,00 \pm 0,07	0,84 \pm 0,05	17,26 \pm 14,84	10,07 \pm 3,24
Önkoşullama	1,01 \pm 0,11	0,87 \pm 0,05	13,01 \pm 6,46	11,02 \pm 2,71
önkoşullama + ardkoşullama	0,98 \pm 0,06	0,85 \pm 0,06	13,49 \pm 3,28	9,71 \pm 3,85

$p < 0,05$ anlamlı fark olarak kabul edildi. Sonuçta postoperatif örneklerde serumda MDA düzeyleri için, kontrol grubu sham grubuna göre anlamlı yüksek bulundu. Önkoşullama ve ardkoşullama ve her ikisinin birlikte uygulandığı gruplarda MDA düzeyleri kontrol grubuna göre anlamlı düşük bulundu.

NO düzeyleri, kontrol grubunda sham grubuna göre anlamlı yüksek bulundu. Diğer gruplarda kontrol grubuna göre anlamlı düşük bulundu.



Şekil 1. Postoperatif MDA düzeyleri.



Şekil 2. Postoperatif NO düzeyleri.

TARTIŞMA

İskeminin yegane tedavisi olan reperfüzyon, iskeminin dokuda yapmış olduğu hasarı arttırarak infarkt sahasının genişlemesine neden olur. Bu süreç “reperfüzyon hasarı” olarak adlandırılır. Reperfüzyon hasarı konsepti ilk olarak geç 1970ve erken 1980’lerde Buckberg ve daha sonraları Braunwald ve Kloner tarafından ortaya atılmıştır (2,3). Reperfüzyonun zararlı etkilerinin büyük bir kısmı ilk anlarda oluşmakta ve direk hücre ölümü ile ilgilidirler(13). Reperfüzyon hasarı kardiyak cerrahide yıllardır tedavinin hedefi niteliğinde olmuştur.

İskemik önkoşullama, bir dokunun ciddi iskemi periyodu öncesinde kısa süreli iskemi-reperfüzyon periyotlarına maruz bırakılarak, uzamış iskemi ve reperfüzyonun zararlı etkilerine karşı dirençli kılınması şeklinde tanımlanan bir fenomendir. Bu fenomen ilk olarak 1986 yılında Murry ve arkadaşları tarafından kalp dokusunda gösterilmiştir (28). İskemik önkoşullamanın kalp kasındaki iskemi-reperfüzyon hasarını sınırlayıcı etkisi iyi bilinmektedir, ancak iskelet kasındaki hasarı azaltıcı etkisi açık değildir.

İskemik ardkoşullama konsepti, reperfüzyonun ilk başlangıcında, belirlenmiş bir algoritmi izleyecek şekilde reperfüzyonun kısa süreli tekrarlayıcı mekanik kısa kesintiler serisi olarak tanımlanmıştır bu kesintilerin süreleri türlere göre değişmektedir. Algoritm, türlere bağlı olarak 1 - 3 dakika kadar sürer (13).

Reperfüzyon hasarı, bir çok hücre tipini proinflamatuvar mediyatörleri, oksidanları, hücresel ve moleküler sinyalleri kapsayan karmaşık bir süreçtir. Ardkoşullama ile myokarda infarkt alanı ve apoptoziste düşüş olduğu gözlenmiştir. İnfarkt alanındaki azalma I/R hasarından korunmada altın standart metod olan önkoşullama ile sağlanan azalmaya benzer ölçüdedir. Ardkoşullama ile; endotelial hücre aktivasyonu ve disfonksiyonu azalır, doku

superoksit anyon üretimi, nötrofil aktivasyonu ve dokuda nötrofil akümülyasyonu azalır, mikrovasküler hasar, doku ödemi, intraselüler ve mitokondriyal kalsiyum birikiminde belirgin düşüş meydana gelir. Ardkoşullama ile oluşan koruyucu etkide; eNOS, Nitrik asit, Guanilil siklaz, K-ATP kanallarının açılması, mitokondriyal permaabilite transizyon porlarının (mPTP) kapanması ve adenzin de rol almaktadır. Ayrıca ERK1/2 ve PI3 kinaz-AKT yolakları gibi hayatta kalmayı sağlayan hücreiçi yolakların etkinleşmesi de ardkoşullama ile yakın ilişkilidir. Ayrıca, ardkoşullama, reperfüzyonun çeşitli manifestasyonlarını azaltmaya yönelik endojen mekanizmaları uyarır. Bu mekanizmalar, moleküler olayları tetikleyen adenzin ve opioidler gibi ligandları, Protein Kinaz C, ATP sensitif mitokondriyal K kanalları ve koruyucu (survival) kinazları kapsar.

Yapılan çok sayıda deneysel çalışmanın verilerine göre, myokardiyal iskemi-reperfüzyon infarkt alanı azalmasında siklus sayısından çok iskemi-reperfüzyon intervallerinin süresi önemlidir. Daha küçük yapıdaki canlılarda daha kısa, daha büyük canlılarda ise daha uzun süreler gerekli gibi görünmektedir. Boyuta bağlı bu efektif siklus uzunluğu farkının sebepleri karmaşıktır. Sinyal yolaklarında türe bağlı farklılıklar, tetikleyici ve mediyatörlerin etkinlik zamanındaki farklılıklar ve iskemi ciddiyetine etki eden kollateral kan akımı ve mitokondriyal metabolizma hızına bağlı farklılıklar bunlar içinde sayılabilir. Kalp hızı, kan basıncı ve duvar gerilimi ile belirlenen metabolik hız, infarkt alanının belirleyicilerinden olduğu için öneme sahiptir. Ayrıca reperfüzyon sırasında salınan otakoidler, sitokinler ve oksidanların miktarı da önemlidir.

Özet olarak, ardkoşullama reperfüzyonun başında uygulanırsa potent kalp koruyucu etki sağlamaktadır. Eğer uygulama çok az da olsa gecikirse koruyucu etki ortadan kalkmaktadır. Ardkoşullama ile kalp koruyucu etkinin sağlandığı bir çok merkez tarafından doğrulanmıştır (49,50,53,54,59,60,63).

Bundan dolayı ardkoşullama myokardiyumda bir çok hücre tipinde post iskemik hasarın multipl manifestasyonlarını azaltan bir reperfüzyon tedavisidir. Ancak henüz bölgesel iskemi reperfüzyon modellerinde myokardiyal stunningi azaltıp azaltmadığını inceleyen bir çalışma yapılmamıştır. Bu da gelecek araştırmaların konusu olabilir.

Ardkoşullama ile ilgili çalışmaların büyük çoğunluğu rat, köpek gibi hayvan deneylerinde gerçekleştirilen myokardiyal iskemi-reperfüzyon modellerinde yapılmıştır. Bu konuda halihazırda iskelet kası dokusunda reperfüzyon hasarını inceleyen yeterli sayıda çalışma bulunmamaktadır. İnsanda in vivo yapılan araştırmalar da henüz oldukça az sayıdadır.

Çalışmamızda, serum NO düzeyleri karşılaştırıldığında Sham grubuna göre kontrol grubunda anlamlı yüksek bulunmuştur. Bu durum iskemi reperfüzyon hasarının göstergesidir. Diğer gruplarda kontrol grubuna göre anlamlı düşük bulunması, uygulanan yöntemler ile iskemi-reperfüzyon hasarının azaldığına işaret etmektedir. Sham grubuna göre kontrol grubunda Postop MDA düzeyinin anlamlı yüksek bulunması dokuda iskemi-reperfüzyon hasarı nedeniyle lipid peroksidasyonu ve lökosit birikimini göstermektedir. Diğer gruplarda MDA düzeylerinin kontrol grubuna göre anlamlı düşük oluşu, bu gruplarda reperfüzyon hasarının daha az meydana gelmesi nedeniyledir. Çalışmamızın sonucuna göre önkoşullama ile ardkoşullama birbirini potansiyalize etmiş gibi görünmektedir.

SONUÇ

İskemik önkoşullamanın ve ardkoşullamanın myokardiyal iskemi-reperfüzyon hasarından koruyucu ve infarkt alanını azaltıcı etkisi in vivo ve in vitro deneysel bir çok çalışma ile gösterilmiştir. Bu çalışmada iskelet kasında iskemik reperfüzyon hasarı oluşturarak ardkoşullama ve önkoşullama prosedürlerinin reperfüzyon hasarı üzerine etkisini incelemek amaçlandı. Preop ve postop alınan kan örnekleri ile serumda MDA ve NO düzeyleri saptandı.

İskelet kasında iskemi-reperfüzyon hasarına ardkoşullama ve önkoşullamanın tek başına ve birlikte uygulanması ile oluşan etkilerin araştırılması için serum MDA ve NO düzeylerinin incelenmesi ile anlamlı sonuç elde edilmiştir. Bu çalışma yoluyla, önkoşullama ve ardkoşullamanın birlikte uygulanması ile reperfüzyon hasarını azaltıcı etki oluşabildiği sonucuna varılabilir. Benzer deneysel iskemi-reperfüzyon modellerini, doku parametreleri, hücre kültürleri, organ banyosu preparasyonları ve patolojik incelemelerle zenginleştirilerek reperfüzyon hasarı ve bu sürece etkiyen mekanizmaların aydınlatılması yolunda daha ayrıntılı çalışmalar artan bir ilgiyle devam etmektedir. Bu çalışmalar sayesinde önkoşullama ve ardkoşullama fenomenleri hakkında daha ayrıntılı bilgi edinme ve bu bilgiler ışığında reperfüzyon hasarına yönelik yeni klinik tedavi seçenekleri oluşturabilmek mümkün olacaktır.

ÖZET

GİRİŞ

Teknolojinin ilerlemesi ve klinik bilgi birikiminin artması, gün geçtikçe erken tanı ve etkili tedavi olanaklarına erişebilmemizi sağlamaktadır. Ne yazık ki bu gelişmelere rağmen, kalp, dolaşım ve merkezi sinir sistemini ilgilendiren ve organ iskemisi temelinde meydana gelen hastalıklar, tüm dünyada ölüm nedenleri arasında, öncelikli yerlerini korumaktadırlar. Kardiyovasküler hastalıkların tedavisinde amaç, dokuların temel gereksinimlerini karşılayabilmek için, dolaşım bütünlüğü ve sürekliliğini sağlamaktır. Dolaşımı kesintiye uğratarak iskemik kalan canlı dokuda, dolaşım tekrar sağlandığında oluşan reperfüzyonun neden olduğu zararlı etkiler, iskemik hasardan daha geniş çaplı ve daha ciddidir. İskemik dokunun kütlesi, bir ekstremitenin tümü ya da bir kısmı gibi, yeteri kadar geniş olduğunda reperfüzyon yalnızca lokal doku zedelenmesine değil, aynı zamanda uzak organ hasarına da yol açabilmektedir. İskemi ve reperfüzyon sürecinde hasarın büyük bölümünün reperfüzyon periyodunda oluştuğu ve doku hasarından reaktif oksijen radikallerinin sorumlu olduğu bilinmektedir.

AMAÇ

Bu çalışmada, deneysel bir modelde iskemik ardkoşullamanın kas dokusundaki iskemi-reperfüzyon hasarı üzerindeki etkisinin belirlenmesi ve iskemik önkoşullama ile karşılaştırılması ve iskemik önkoşullamanın iskemik ardkoşullama sürecine etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Kırk adet erkek 250-300 gram ağırlığında erişkin Wistar albino rat beş gruba ayrıldı. Sham grubunda anestezi indüksiyonu sonrası mediyan laparotomi yapıldı ancak iskemi oluşturulmadı. Kontrol grubunda İnfrarenal abdominal aorta non-travmatik vasküler bulldog

klamp kullanılmak yoluyla oklüde edilerek 120 dk. süreyle iskemi oluşturuldu. İskemik periyod sonrasında, klemp kaldırılarak 60 dakika süreyle reperfüzyon sağlandı.

Ardkoşullama grubunda Deneyin 60. dakikasinda aorta non-travmatik vasküler bulldog klamp kullanılmak yoluyla oklüde edilerek 120 dakika süreyle iskemi oluşturuldu. Reperfüzyonun 1. dakikasinda ardkoşullama algoritmine başlanarak non-travmatik vasküler klemp ile 5 dakika iskemi oluşturuldu, takip eden 5 dakika süreyle reperfüzyon yapıldı, ardından ikinci kez 5 dakika süre ile iskemi oluşturuldu ve 5 dakika reperfüzyon yapıldı ve üçüncü ve son olarak 5 dakika iskemi oluşturulduktan sonra 60 dakika süreyle reperfüzyon yapılarak deney sonlandırıldı.

Önkoşullama grubunda üç siklus şeklinde on dakikalık iskemiye takip eden on dakika reperfüzyon olarak oluşturulan iskemik önkoşullama sürecinin sonlanması ile birlikte aort tekrar klempe edilerek 120 dakika iskemi oluşturuldu. Ardından 60 dakika süreyle reperfüzyon sağlandı ve deney sonlandırıldı.

Önkoşullama ve ardkoşullamanın birlikte uygulandığı grupta İnfrarenal abdominal aort izole edilerek üç siklus şeklinde on dakikalık iskemiye takip eden on dakika reperfüzyon olarak oluşturulan iskemik önkoşullama sürecinin sonlanması ile birlikte aort tekrar klempe edildi. Klemp 120 dakika sonra kaldırılarak ardkoşullama süreci başlatıldı ve reperfüzyonun 1. dakikasinda 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 klamp kaldırılarak 60 dakika süreyle reperfüzyon sağlandı ve deney sonlandırıldı.

BULGULAR

$p < 0,05$ anlamlı fark olarak kabul edildi. Sonuçta postoperatif örneklerde serumda MDA düzeyleri için, kontrol grubu sham grubuna göre anlamlı yüksek bulundu. Önkoşullama ve

ardkoşullama ve her ikisinin birlikte uygulandığı gruplarda MDA düzeyleri kontrol grubuna göre anlamlı düşük bulundu.

NO düzeyleri, kontrol grubunda sham grubuna göre anlamlı yüksek bulundu. Diğer gruplarda kontrol grubuna göre anlamlı düşük bulundu.

TARTIŞMA

İskeminin yegane tedavisi olan reperfüzyon, iskeminin dokuda yapmış olduğu hasarı arttırarak infarkt sahasının genişlemesine neden olur. Bu süreç “reperfüzyon hasarı” olarak adlandırılır. Reperfüzyon hasarı konsepti ilk olarak geç 1970ve erken 1980’lerde Buckberg ve daha sonraları Braunwald ve Kloner tarafından ortaya atılmıştır (2,3). Reperfüzyonun zararlı etkilerinin büyük bir kısmı ilk anlarda oluşmakta ve direk hücre ölümü ile ilgilidirler (13). Reperfüzyon hasarı kardiyak cerrahide yıllardır tedavinin hedefi niteliğinde olmuştur.

İskemik önkoşullama, bir dokunun ciddi iskemi periyodu öncesinde kısa süreli iskemi-reperfüzyon periyotlarına maruz bırakılarak, uzamış iskemi ve reperfüzyonun zararlı etkilerine karşı dirençli kılınması şeklinde tanımlanan bir fenomendir. Bu fenomen ilk olarak 1986 yılında Murry ve arkadaşları tarafından kalp dokusunda gösterilmiştir (28). İskemik önkoşullamanın kalp kasındaki iskemi-reperfüzyon hasarını sınırlayıcı etkisi iyi bilinmektedir, ancak iskelet kasındaki hasarı azaltıcı etkisi açık değildir.

İskemik ardkoşullama konsepti, reperfüzyonun ilk başlangıcında, belirlenmiş bir algoritmi izleyecek şekilde reperfüzyonun kısa süreli tekrarlayıcı mekanik kısa kesintiler serisi olarak tanımlanmıştır bu kesintilerin süreleri türlere göre değişmektedir. Algoritm, türlere bağlı olarak 1 - 3 dakika kadar sürer (13). Çalışmamızda, serum NO düzeyleri karşılaştırıldığında Sham grubuna göre kontrol grubunda anlamlı yüksek bulunmuştur. Bu durum iskemi reperfüzyon hasarının göstergesidir. Diğer gruplarda kontrol grubuna göre anlamlı düşük bulunması, uygulanan yöntemler ile iskemi-reperfüzyon hasarının azaldığına işaret etmektedir. Sham grubuna göre kontrol grubunda Postop MDA düzeyinin anlamlı yüksek

bulunması dokuda iskemi-reperfüzyon hasarı nedeniyle lipid peroksidasyonu ve lökosit birikimini göstermektedir. Diğer gruplarda MDA düzeylerinin kontrol grubuna göre anlamlı düşük oluşu, bu gruplarda reperfüzyon hasarının daha az meydana gelmesi nedeniyledir. Çalışmamızın sonucuna göre önkoşullama ile ardkoşullama birbirini potansiyalize etmiş gibi görünmektedir.

SONUÇ

İskelet kasında iskemi-reperfüzyon hasarına ardkoşullama ve önkoşullamanın tek başına ve birlikte uygulanması ile oluşan etkilerin araştırılması için serum MDA ve NO düzeylerinin incelenmesi ile anlamlı sonuç elde edilmiştir. Bu çalışma yoluyla, önkoşullama ve ardkoşullamanın birlikte uygulanması ile reperfüzyon hasarını azaltıcı etki oluşabildiği sonucuna varılabilir.

KAYNAKLAR

1. Köksal C, Bozkurt AK, Cangel U. Attenuation of ischemia/reperfusion injury by N-acetylcysteine in a rat hind limb model. *J Surg Res.* 2003 May 15;111(2): 236-9.
2. Follette DM, Fey K, Buckberg GD. Reducing postischemic damage by temporary modification of reperfusate calcium, potassium, pH and osmolarity. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1981;82:221-38.
3. Braunwald E, Kloner RA Myocardial reperfusion: a double edged sword? *J Clin Invest* 1985;76:1713-1719.
4. Przyklenk K. Lethal myocardial “reperfusion injury”: The opinions of good men. *J Thrombosis Thrombolysis* 1997;4:5-6.
5. Zhao ZQ, Vinten-Johansen Postconditioning: Reduction of reperfusion-induced injury. *J Cardiovasc Res* 2006;70:200-11.
6. Buckberg GD. Studies of controlled reperfusion after ischemia: I. When is cardiac muscle damaged irreversibly? *J Thorac Cardiovasc Surg* 1986;92:483-87.
7. Vinten-Johansen J, Ronson RS, Thourani VH, et al. Surgical myocardial protection. In: Gravlee GP, Davis RF, Kurusz M, Utley JR (eds). *Cardiopulmonary Bypass Principles and Practice*. Lippincot Williams & Wilkins Pliledelphia, PA 2000 pp 14-264.
8. Okamoto F, Allen BS, Buckberg GD, et al. Studies of controlled reperfusion after ischemia: XIV. Reperfusion conditons: Importance of ensuring gentle versus sudden reperfusion during relief of coronary occlusion. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1986;92:613-20.
9. Vinten-Johansen J, Rosenkranz ER, buckberg GD, et al. Studies of controlled reperfusion after ischemia: VI. Metabolic and histochemical benefits of regional blood

- cardioplegic reperfusion without cardiopulmonary bypass. *J Thorac Cardiovascular Surg* 1986;92:535-42.
10. Bolli R, Becker L, Gross G et al. Myocardial protection at a crossroads: The need for translation into clinical therapy. *Circ Res* 2004;95:125-34.
 11. Vinten-Johansen J, Buckberg GD, Okamoto F, et al. Studies of controlled reperfusion after ischemia:V. Superiority of surgical versus medical reperfusion after regional ischemia. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1986;92:525-34.
 12. Vinten-Johansen J, Edgerton TA, Howe HR, et al. Immediate functional recovery and avoidance of reperfusion injury with surgical revascularization of short-term coronary occlusion. *Circ* 1985;72:431-39.
 13. Vinten-johansen J, Zhao ZQ, Zatta AJ, et al. Postconditioning A new link in nature's armor against myocardial ischemia-reperfusion injury. *Basic Res Cardiol* 2005;100:295-310.
 14. Ambrosio G, Zweier JL, Flaherty JT, et al. The relationship between oxygen radical generation and impairment of myocardial energy metabolism following post-ischemic reperfusion. *J mol Cell Cardiol* 1991;23:1359-74.
 15. Kevin LG, Camara AKS, Riess ML, et al. Ischemic preconditioning alters real-time measure of O₂ radicals in intact hearts with ischemia and reperfusion. *Am J Physiol (Heart Circ Physiol)* 2003;284: H566-74.
 16. Jennings RB, Reimar KA, Steenbergen C. Myocardial ischemia revisited: the osmolar load, membrane damage and reperfusion. *J Mol Cell Cardiol* 1986;18:769-80.
 17. Schwartz LM. Ischemic postconditioning during reperfusion fails to protect against lethal myocardial ischemia-reperfusion injury in pigs. *Circulation* 2004;110:III-106.
 18. Lucchesi BR. Complement, neutrophils and free radicals: mediators of reperfusion injury. [Review]. *Arzneim-Forsch/Drug Res* 1994;44:420-32.

19. Allen DG, Xiao XH. Role of the cardiac Na⁺/H⁺ exchanger during ischemia and reperfusion. *Cardiovasc Res* 2003;57:934-41.
20. Gross GJ, Gumina RJ. Cardioprotective effects of Na⁺/H⁺ Exchange inhibitors. *Drugs of the future* 2001;26:253-60.
21. Gumina RJ, Auchampach JA, Wang R, et al. Na⁺/H⁺ Exchange inhibition-induced cardioprotection in dogs: effects on neutrophils versus cardiomyocytes. *Am J Physiol (Heart Circ Physiol)* 2000;279:H1563-70.
22. Klein HH, Pich S, Bohle RM, et al. Na⁺/H⁺ Exchange inhibitor cariporide attenuates cell injury predominantly during ischemia and not at onset of reperfusion in porcine hearts with low residual blood flow. *Circulation* 2000;102:1977-82.
23. Piper HM, Garcia-Dorado D, Ovize M. A fresh look at reperfusion injury. *Cardiovasc Res* 1998;38:291-300.
24. Lefer AM, Weyrich AS, Buerke M, et al. Role of selectins, a new family of adhesion molecules, in ischemia-reperfusion injury. *Cardiovasc Res* 1994;28:289-94.
25. Lefer AM, Tsao PS, Lefer DJ, et al. Role of endothelial dysfunction in the pathogenesis of reperfusion injury after myocardial ischemia. *FASEB J* 1991;5:2029-34.
26. Crompton M. The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death. *Biochem J* 1999;341:233-49.
27. Halestrap AP, Kerr PM, Javadov S, et al. Elucidating the molecular mechanism of the permeability transition pore and its role in reperfusion injury. *Biochim Biophys Acta* 1998;1366:79-94.
28. Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation* 1986 Nov;74(5):1124-36.

29. Whetzel TP, Stevenson TR, Sharman RB. The effect of ischemic preconditioning on the recovery of skeletal muscle following tourniquet ischemia. *Plast Reconstr Surg*. 1997 Dec;100(7):1767-75.
30. Saito T, Komiya T, Aramoto H. Ischemic preconditioning improves oxygenation of exercising muscle in vivo. *J Surg Res*. 2004 Jul;120(1):111-8.
31. Saita T, Yokoyama K, Nakamura K. Protective effect of ischemic preconditioning against ischemia-induced reperfusion injury of skeletal muscle: how many preconditioning cycles are appropriate? *British Journal of Plastic Surgery* 2002;55:241-5.
32. Badhwar A, Bihari A, Dungey AA. Protective mechanisms during ischemic tolerance in skeletal muscle. *Free Radic Biol Med* 2004 Feb 1;36(3):371-9.
33. Weinbrenner C, Schulze F. Remote preconditioning by infrarenal aortic occlusion is operative via δ -1 Opioid Receptors and Free Radicals in vivo in the Rat. *Cardiovasc Res* 2004;61:591-9.
34. Tsai BM, Wang M, March KL. Preconditioning: evolution of basic mechanisms to potential therapeutic strategies. *Shock* 2004;21(3):195-209.
35. Das DK, Maulik N. Preconditioning potentiates redox signaling and converts death signal into survival signal. *Arch Biochem Biophys* 2003 Dec;420(2):305-11. Review.
36. Pain T, Yang XM, Critz SD. Opening of mitochondrial K(ATP) channels triggers the preconditioned state by generating free radicals. *CircRes* 2000 Sep;87(6):460-6
37. Ege T, Us MH, Sungun M, Duran E. Cytokine response in lower extremity ischemia/reperfusion. *J Int Med Res*. 2004 Mar-Apr;32(2):124-31.
38. Wakai A, Wang JH, Winter DC, et al. Tourniquet-induced systemic inflammatory response in extremity surgery. *J Trauma*. 2001 Nov;51(5):922-6.

39. Groenveld AB, Raijmakers PG, Rauwerda JA, Hack CE. The inflammatory response to vascular surgery-associated ischemia and reperfusion in man: effect on postoperative pulmonary function. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 1997 Nov;14(5):351-359.
40. Testa M, De Ruvo E, Russo A, et al. Induction of interleukin-6 gene expression in hypoperfused skeletal muscle of patients with peripheral arterial disease. *Ital Heart J.* 2000 Jan;1(1):64-7.
41. Gaines GC, Welborn MB.3rd, Moldawer LL, et al. Attenuation of skeletal muscle ischemia/reperfusion injury by inhibition of tumor necrosis factor. *J Vasc Surg.* 1999 Feb;29(2):370-6.
42. Kryger Z, Dogan T, Zhang F, et al. Effects of VEGF administration following ischemia on survival of the gracilis muscle flap in the rat. *Ann Plast Surg.* 1999 Aug;43(2):172-8.
43. Luo Z, Diaco M, Murohara T, et al. Vascular endothelial growth factor attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury. *Ann Thorac Surg.* 1997 Oct;64(4):993-8.
44. Hashimoto E, Ogita T, Nakaoka T, et al. Rapid induction of vascular endothelial growth factor expression by transient ischemia in rat heart. *Am J Physiol.* 1994 Nov;267(5 Pt 2):1948-54.
45. Banai S, Shweiki D, Pinson A, et al. Upregulation of vascular endothelial growth factor expression induced by myocardial ischemia: implications for coronary angiogenesis. *Cardiovasc Res.* 1994 Aug;28(8):176-9.
46. Stat P, Rioufol G, Piot C, et al. Postconditioning the human heart. *Circulation* 2005;112:2143-8.

47. 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;98:133-36.
48. 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.
49. 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.
50. Yang X-M, Proctor JB, Cui L, et al. Multiple, brief coronary occlusions during early reperfusion protect rabbit hearts by targeting cell signaling pathways. *J Am Coll Cardiol* 2004;44:1103-10.
51. Pfeffer JM, Pfeffer MA, Fletcher PJ, Braunwald E. Progressive ventricular remodeling in rat with myocardial infarction. *Am J Physiol* 1991;260:H1404-14.
52. St. John Sutton M, Pfeffer MA, Moye L, et al. Cardiovascular death and left ventricular remodeling two years after myocardial infarction. *Circulation* 1997;96:3294-9.
53. Halkos ME, Kerendi F, Corvera JS, et al. Myocardial protection with postconditioning is not enhanced by ischemic preconditioning. *Ann Thorac Surg* 2004;78:961-9.
54. Galagudza M, Kurapeev D, Minasian S, et al. Ischemic postconditioning: brief ischemia during reperfusion converts persistent ventricular fibrillation into regular rhythm. *Eur J Cardio-thorac Surg* 2004;25:1006-10.
55. Engelman DT, Watanabe M, Engelman RM, et al. Constitutive nitric oxide release is impaired after ischemia and reperfusion. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1995;110:1047-53.

56. Ma X-L, Weyrich AS, Lefer DJ, et al. Diminished basal nitric oxide release after myocardial ischemia and reerfusion promotes neutrophil adherence to coronary endothelium. *Circ Res* 1993;72:403-12.
57. Palazzo AJ, Jones SP, Anderson DC, et al. Coronary endothelial P-selection in pathogenesis of myocardial ischemia-injury. *Am J Physiol (Heart Circ Physiol)* 1998;275:H1865-72.
58. Weyrich AS, Ma X-L, Lefer DJ, et al. In vivo neutralization of P-selectin protects feline heart and endothelium in myocardial ischemia and reperfusion injury. *J Clin Invest* 1993;91:2620-9.
59. Philipp SD, Downey JM, Cohen MV, et al. Postconditioning must be initiated in less than 1 minute following reperfusion and is dependent on adenosine receptors and PI3-kinase. *Circulation* 2004;100:III-168 [Abstract].
60. Tsang A, Hausenloy DJ, Mocanu MM, et al. Postconditioning: a form of “modified reperfusion” protects the myocardium by activating the phosphatidylinositol 3-kinase-Akt pathway. *Circ Res* 2004;95:230-2.
61. Mykytenko J, Reeves JG, Kin H, et al. Postconditioning reduces infarct size via mitochondrial KATP channel activation during 24 hors of reperfusion. *J Mol Cell Cardiol* 2005;38:830 [Abstract].
62. Argaud L, Gateau-Roesch O, Raisky O, et al. Postconditioning inhibits mitochondrial permeability transition. *Circulation* 2005;111:194-7.
63. Yang X-M, Downey JM, Cohen MV. Postconditioning’s protection is not dependent on circulating blood factors or cells but requires PI3-kinase and guanylyl cyclase activation. *Circulation* 2004;110:III-168.

64. Kin H, Loyfe MT, Amerson BS, et al. Cardioprotection by “postconditioning” is mediated increased retention of endogenous intravascular adenosine and activation of A^{2a} receptors during reperfusion. *Circulation* 2004;110:III-168[Abstract].
65. Kin H, Zatta AJ, Loyfe MT, et al. Postconditioning reduces infarct size via adenosine receptor activation by endogenous adenosine. *Cardiovasc Res* 2005;67:124-33.
66. Todd J, Zhao Z-Q, Williams MW, et al. Intravascular adenosine at reperfusion reduces infarct size and neutrophil adherence. *Ann thorac Surg* 1996;62:1364-72.
67. Kerendi F, Kin H, Halkos ME, et al. Remote postconditioning: brief renal ischemia and reperfusion applied before coronary artery reperfusion reduces myocardial infarct size via endogenous activation of adenosine receptors. *Bas Res Cardiol* 2005;100:404-12.
68. Gross GJ. Role of opioids in acute and delayed postconditioning. *J Mol Cell Cardiol* 2003;35:709-18.
69. Schultz JE, Gross GJ. Opioids and cardioprotection. *Pharmacol Ther* 200;89:123-37.
70. Kin H, Zatta AJ, Jiang R, et al. Activation of opioid receptors mediates infarct size reduction by Postconditioning. *J mol Cell Cardiol* 2005;38:827 [Abstract].
71. Wang P, Zweier JL. Measurement of nitric oxide and peroxynitrite generation in the postischemic heart. Evidence for peroxynitrite-mediated reperfusion injury. *J Biol Chem* 1996;271:29223-30.
72. 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.
73. 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.

74. Pagliaro PR, Rastaldo R, Pena C, et al. Nitric oxide (NO)-cyclic guanosine monophosphate (cGMP) pathway is involved in ischemic preconditioning in the isolated rat heart. *Circulation* 2004;110:III-136[Abstract].
75. Guo J, Murohara T, Buerke M, et al. Direct measurement of nitric oxide release from vascular endothelial cells. *J Appl Physiol* 1996;81:774-9.
76. Kelly RA, Balligand J-L, Smith TW. Nitric oxide and cardiac function. *Circ Res* 1996;79:363-80.
77. Balligand JL, Kozbik L. Nitric oxide-dependent parasympathetic signaling is due to activation of constitutive endothelial (type III) nitric oxide synthase in cardiac myocytes. *J Biol Chem* 1995;270:14582-6.
78. Haudenloy DJ, Yellon DM. New directions for protecting the heart against ischemia-reperfusion injury:targeting the Reperfusion Injury Salvage Kinase (RISK) pathway. *Cardiovasc Res* 2004;61:448-60.
79. Vinten Johansen J. Involvement of neutrophils in the pathogenesis of lethal myocardial reperfusion injury. *Cardiovasc Res* 2004;61:481-97.
80. Herkert O, Diebold I, Brandes RP, et al. NADPH oxidase mediates tissue factor-dependent surface procoagulant activity by thrombin in human vascular smooth muscle cells. *Circulation* 2002;105:2030-6.
81. Duilio C, Ambrosio G, Kuppusamy P, et al. Neutrophils are primary source of O₂ radicals during reperfusion after prolonged myocardial ischemia. *Am J Physiol (Heart Circ Physiol)* 2001;280:H2649-57.
82. Serviddio G, Di Venosa N, Federici A, et al. Brief hypoxia before normoxic reperfusion (postconditioning) protects the heart against ischemia-reperfusion injury by preventing mitochondria peroxide production and glutathione depletion. *FASEB J* 2005;19:354-61.

83. Penna C, Rastaldo R, Mancardi D, et al. Post-conditioning induced cardioprotection requires signaling through a redox-sensitive mechanism, mitochondrial ATP-sensitive K⁺ channel and protein kinase C activation. *Bas Res Cardiol* (in press).
84. Zhao Z-Q, Sun H-Y, Wang N-P, et al. Hypoxic postconditioning attenuates cardiomyocyte apoptosis via inhibition of jnk and p38 kinases pathway. *J Mol Cell Cardiol* 2005;38:870[Abstract].
85. Darling CE, Jiang R, Maynard M, et al. Postconditioning via shuttering reperfusion limits myocardial infarct size in rabbit hearts: role of ERK1/2. *Am J Physiol (Heart Circ Physiol)* 2005;289:H1618-26.
86. Tsang A, Hausenloy DJ, Macanu MM, Yellon DM. Postconditioning—a form of “modified reperfusion” protects the myocardium by activating the P13K-Akt pathway. *Circulation* 2004;110:III167[Abstract].
87. Sun H-Y, Wang N-P, Kerendi F, et al. Hypoxic postconditioning reduces cardiomyocyte loss by inhibiting ROS generation and intracellular Ca₂₊ overload. *Am J Physiol* 2005;288:H1900– 8.
88. Dreyer WJ, Michael LH, West MW, et al. Neutrophil accumulation in ischemic canine myocardium: Insights into time course, distribution, and mechanism of localization during early reperfusion. *Circulation* 1991;84:400– 11.
89. Mirabet M, Garcia-Dorado D, Ruiz-Meana M, et al. Thrombin increases cardiomyocyte acute cell death after ischemia and reperfusion. *J Mol Cell Cardiol* 2005;39:277– 83.
90. Yang X-M, Downey JM, Cohen MV. Multiple, brief coronary occlusions during early reperfusion protect rabbit hearts by activation of ERK and production of nitric oxide. *Circulation (Suppl)* 2003;108:158.

91. Gross GJ, Fryer RM. Mitochondrial KATP channels: Triggers or distal effectors of ischemic or pharmacological preconditioning? *Circ Res* 2000;87:431– 3.
92. Oldenburg O, Cohen MV, Yellon DM, Downey JM. Mitochondrial K-ATP channels: role in cardioprotection. *Cardiovasc Res* 2002;55:429–37.
93. Inagaki K, Begley R, Ikeno F, Mochly-Rosen D. Cardioprotection by e-protein kinase C activation from ischemia continuous delivery and antiarrhythmic effect of an e-protein kinase C-activating peptide. *Circulation* 2005;111:44– 50.
94. Inagaki K, Hahn HS, Dorn II GW, Mochly-Rosen D. Additive protection of the ischemic heart ex vivo by combined treatment with δ -protein kinase C inhibitor and e-protein kinase C activator. *Circulation* 2003;108:869– 75.
95. Herzog WR, Vogel RA, Schlossberg ML, et al. Short-term low dose intracoronary diltiazem administered at the onset of reperfusion reduces myocardial infarct size. *Int J Cardiol* 1997;59:21 –7.
96. Mukherjee SB, Das M, Sudhandiran G, Shaha C. Increase in cytosolic Ca^{2+} levels through the activation of non-selective cation channels induced by oxidative stress causes mitochondrial depolarization leading to apoptosis-like death in *Leishmania donovani* promastigotes. *J Biol Chem* 2002;277:24717–27.
97. Piper HM, Garcia-Dorado D. Prime cause of rapid cardiomyocyte death during reperfusion. *Ann Thorac Surg* 1999;68:1913– 9.
98. Halestrap AP, Clarke SJ, Javadov SA. Mitochondrial permeability transition pore opening during myocardial reperfusion—a target for cardioprotection. *Cardiovasc Res* 2004;61:372– 85.
99. Cicconi S, Ventura N, Pastore D, Bonini P, Di Nardo P, Lauro R, et al. Characterization of apoptosis signal transduction pathways in HL-5 cardiomyocytes

- exposed to ischemia/reperfusion oxidative stress model. *J Cell Physiol* 2003;195:27–37.
100. Yue T-L, Wang C, Gu J-L, et al. Inhibition of extracellular signal-regulated kinase enhances ischemia/reoxygenation-induced apoptosis in cultured cardiac myocytes and exaggerates reperfusion injury in isolated perfused heart. *Circ Res* 2000;86:692–9.
101. Bogoyevitch MA, Gillespie-Brown J, Ketterman AJ, et al. Stimulation of the stress-activated mitogen-activated protein kinase subfamilies in perfused heart. p38/RK mitogen-activated protein kinases and c-Jun N-terminal kinases are activated by ischemia/reperfusion. *Circ Res* 1996;79:162–73.
102. Di Lisa F, Menabo R, Canton M, et al. Opening of the mitochondrial permeability transition pore causes depletion of mitochondrial and cytosolic NAD(+) and is a causative event in the death of myocytes in postischemic reperfusion of the heart. *J Biol Chem* 2001;276:2571–5.
103. Griffiths EJ, Halestrap AP. Protection by cyclosporin A of ischemia/reperfusion-induced damage in isolated rat hearts. *J Mol Cell Cardiol* 1993;25:1461–9.
104. Griffiths EJ, Halestrap AP. Mitochondrial non-specific pores remain closed during cardiac ischaemia, but open upon reperfusion. *Biochem J* 1995;307:93–8.
105. Hausenloy DJ, Duchon MR, Yellon DM. Inhibiting mitochondrial permeability transition pore opening at reperfusion protects against ischaemia-reperfusion injury. *Cardiovasc Res* 2003;60:617–625.
106. Hausenloy DJ, Maddock HL, Baxter GF, Yellon DM. Inhibiting mitochondrial permeability transition pore opening: a new paradigm for myocardial preconditioning? *Cardiovasc Res* 2002;55:534–543.

107. Obal D, Dettwiler S, Favoccia C, et al. The influence of mitochondrial KATP-channels in the cardioprotection of preconditioning and postconditioning by sevoflurane in the rat in vivo. *Anesth Analg* 2005;101:1252–60.
108. Feng J, Lucchinetti E, Ahuja P, et al. Isoflurane postconditioning prevents opening of the mitochondrial permeability transition pore through inhibition of glycogen synthase kinase 3 β . *Anesthesiology* 2005;103:987–95.
109. Laskey WK. Brief repetitive balloon occlusions enhance reperfusion during percutaneous coronary intervention for acute myocardial infarction: a pilot study. *Catheter Cardiovas Interv* 2005;65:361–7.
110. Loukogeorgakis SP, Panagiotidou AT, Yellon DM, et al. Postconditioning protects against endothelial ischemia-reperfusion injury in the human forearm. *Circulation* 2006;113:1015-19.
111. Hori M, Kitakaze M, Sato H, et al. Staged reperfusion attenuates myocardial stunning in dogs. Role of transient acidosis during early reperfusion. *Circulation* 1991;84:2135–2145.
112. Pisarenko OI, Shulzhenko VS, Studneva IM, Kapelko VI. Effects of gradual reperfusion on postischemic metabolism and functional recovery of isolated guinea pig heart. *Biochemical Medicine and Metabolic Biology* 1993;50:127–134.
113. Sato H, Jordan JE, Zhao Z-Q, Sarvotham SS, Vinten-Johansen J. Gradual reperfusion reduces infarct size and endothelial injury but augments neutrophil accumulation. *Ann Thorac Surg* 1997;64:1099–1107.
114. Ueno T, Yamada T, Yoshikai M, et al. Effect of gradual reperfusion on ventricular function after 6-h preservation. *Cardiovasc Surg* 1993;1:695–700.

115. Vinten-Johansen J, Lefer DJ, Nakanishi K, et al. Controlled coronary hydrodynamics at the time of reperfusion reduces postischemic injury. *Cor Art Dis* 1992;3:1081–1093.
116. Zhao Z-Q, Sun H-Y, Wang N-P, et al. Hypoxic post-conditioning reduces cardiomyocyte loss by inhibiting reactive oxygen species-triggered mitochondrial calcium overload. *Circulation (Suppl)* 2003;108:IV-174.
117. Kim SO, Baines CP, Critz SD, et al. Ischemia induced activation of heat shock protein 27 kinases and casein kinase 2 in the preconditioned rabbit heart. *Biochemistry and Cell Biology-Biochimie et Biologie Cellulaire* 1999;77:559–567.
118. Yellon DM, Baxter GF. Reperfusion injury revisited: is there a role for growth factor signaling in limiting lethal reperfusion injury? *Trends Cardiovasc Med* 1999;9:245–49.
119. Hausenloy DJ, Tsang A, Mocanu MM, et al. Ischemic preconditioning protects by activating pro-survival kinases at reperfusion. *Am J Physiol* 2005;288:H971–H76.
120. Tong H, Chen W, Steenbergen C, et al. Ischemic preconditioning activates phosphatidylinositol-3-kinase upstream of protein kinase C. *Circ Res* 2000;87:309–15.
121. Oldenburg O, Qin Q, Krieg T, et al. Bradykinin induces mitochondrial ROS generation via NO, cGMP, PKG, and mitoKATP channel opening and leads to cardioprotection. *Am J Physiol* 2004;286:H468–76.
122. Krieg T, Cui L, Qin Q, et al. Mitochondrial ROS generation following acetylcholine-induced EGF receptor transactivation requires metalloproteinase cleavage of proHB-EGF. *J Mol Cell Cardiol* 2004; 36:435–43.
123. Krieg T, Qin Q, Philipp S, et al. Acetylcholine and bradykinin trigger preconditioning in the heart through a pathway that includes Akt and NOS. *Am J Physiol* 2004;287:H2606–H11.

124. Fryer RM, Pratt PF, Hsu AK, et al. Differential activation of extracellular signal regulated kinase isoforms in preconditioning and opioid-induced cardioprotection. *J Pharmacol Exp Ther* 2001;296:642–49.
125. Behrends M, Schulz R, Post H, et al. Inconsistent relation of MAPK activation to infarct size reduction by ischemic preconditioning in pigs. *Am J Physiol* 2000;279:H1111–19.
126. Hausenloy DJ, Tsang A, Yellon DM. The reperfusion injury salvage kinase pathway: a common target for both ischemic preconditioning and postconditioning. *Trends cardiovasc Med* 2005;15:69-75.
127. Heusch G. Postconditioning: old wine in a new bottle? *J Am Coll Cardiol* 2004;44:1111-2.
128. Jonassen AK, Sack MN, Mjos OD, et al. Myocardial protection by insulin at reperfusion requires early administration and is mediated via Akt and p70s6 kinase cell survival signaling. *Circ Res* 2001;89:1191–8.
129. Bell RM, Yellon DM. Bradykinin limits infarction when administered as an adjunct to reperfusion in mouse heart: the role of PI3K, Akt and eNOS. *J Mol Cell Cardiol* 2003;35:185–93.
130. Gross ER, Hsu AK, Gross GJ. Opioid-induced cardioprotection occurs via glycogen synthase kinase beta inhibition during reperfusion in intact rat hearts. *Circ Res* 2004;94:960–6.
131. Hausenloy DJ, Yellon DM. The mitochondrial permeability transition pore: its fundamental role in mediating cell death during ischaemia and reperfusion. *J Mol Cell Cardiol* 2003;35:339–41.