

## Sıçan Akciğerinde Oluşturulan İskemik Önkoşullamanın Kalpteki İskemi Reperfüzyon Hasarı Üzerine Etkileri

Hasan Akkoç\*, İlker Kelle\*, Ebru Kale\*\*

### ÖZET

*Bir organ veya dokunun iskemi ve reperfüzyonu ile oluşturulan önkoşullama, başka bir arterin beslediği organ veya dokuyu da önkoşullayarak koruyucu etki gösterebilir. Bu durum uzak iskemik önkoşullama olarak adlandırılır. Biz bu çalışmamızda sıçan akciğerinde oluşturduğumuz önkoşullamanın kalpteki iskemi ve iskemi-reperfüzyon hasarı üzerindeki etkilerini incelemeyi hedefledik. Çalışmamızda 30 adet (n=6) Sprague-Dawley sıçan kullandık. Grupları şu şekilde oluşturduk; Grup 1: Kontrol Grubu (Sham Opere), Grup 2: Kalpte iskemi (30 dk), Grup 3: Kalpte iskemi (30 dk)-reperfüzyon (60 dk), Grup 4: Akciğerde iskemik önkoşullama sonrası kalpte iskemi (30 dk), Grup 5: Akciğerde iskemik önkoşullama sonrası kalpte iskemi (30 dk)-reperfüzyon (60 dk). Deney sonrası aldığımız sol kalp doku örneklerinde yüksek performanslı likit kromatografi kullanarak malondialdehid ile pürin nükleotid düzeylerini analiz ettik. Sonuç olarak, akciğerde oluşturulan iskemik önkoşullamanın kalpteki iskemi ve iskemi-reperfüzyon hasarı üzerinde koruyucu etkisinin olduğunu ve bu etkinin adenozin ile ilişkili olduğunu söyleyebiliriz.*

*Anahtar Kelimeler: Sıçan, Kalp, Akciğer, Uzak İskemik Önkoşullama, Adenozin*

## The Effects of Ischemic Preconditioning on Cardiac Ischemia-Reperfusion Injury in Rat Lung

### SUMMARY

*Ischemia and reperfusion of a tissue or a viscera may also show a protective effect such as development of preconditioning on the other tissues which have another source of arterial blood flow. This mechanism of action is known as remote ischemic preconditioning. In this study, we have investigated the effects of preconditioning induced by pulmonary artery occlusion on myocardial ischemia and ischemia-reperfusion injury on a rat model. For this purpose, we used adult, in both sex, 30 Sprague-Dawley rats (n=6). There were five experimental groups; Group 1: Control (Sham operated), Group 2: 30 minute myocardial ischemia induced by left coronary artery occlusion, Group 3: 30 minute left coronary artery occlusion followed by 60 minute reperfusion, Group 4: Pulmonary ischemic preconditioning followed by 30 minute left coronary artery occlusion, Group 5: Pulmonary ischemic preconditioning followed by 30 minute left coronary artery occlusion and 60 minute reperfusion. Malonyldialdehyde and purine nucleotide levels of myocardial tissue were measured by high performance liquid chromatography. As a conclusion, remote preconditioning evoked by pulmonary artery occlusion and reperfusion may induce a protective effect against myocardial ischemia and ischemia-reperfusion injury. It can be suggested that the protective effect of remote preconditioning is related with myocardial adenosine.*

*Key Words: Rat, Heart, Pulmonary, Remote Ischemic Preconditioning, Adenosine.*

\* Dicle Üniv. Tıp Fakültesi, Farmakoloji A.D./Diyarbakır\*\* Dicle Üniv. Tıp Fakültesi, Biyokimya AD. /Diyarbakır

## GİRİŞ

### İskemik Önkoşullama

İskemik önkoşullama (İÖ), tek veya tekrarlayan kısa süreli iskemik periyotların daha uzun süreli iskemik periyotlarda gelişebilecek organ, doku veya hücre hasarına karşı belirgin bir direnç oluşturması ile gerçekleşen koruyucu bir mekanizmadır. İÖ, ilk kez 1986 yılında Murry ve arkadaşları tarafından tanımlanmıştır (1). Daha sonraki yıllarda yapılan çalışmalarda İÖ'nün miyokardiyal nekroza karşı koruyucu etkisinin yanında aritmi, miyokardiyal sersemleme, koroner endotelial hasar ve mikrovasküler fonksiyon bozukluğuna karşı da koruyucu etkileri olduğu gösterilmiştir (2,3).

Önkoşullama iki farklı faz ile koruma sağlamaktadır. İlk faz (erken faz, akut faz, klasik faz, korumanın birinci penceresi), önkoşullamadan sonra dakikalar içinde oluşmakta ve etkisi 1-3 saat kadar sürmektedir. İlk faz geçici fakat önemli bir koruma sağlar ve oluşmasında protein sentezine ihtiyaç yoktur. Geç faz (gecikmiş faz, korumanın ikinci penceresi) önkoşullamadan 24 saat sonra belirginleşir. Geç fazın koruyucu etkisi 72-96 saate kadar sürebilir ve protein sentezine ihtiyaç duyar. Erken faz daha güçlü koruyucu etki göstermesine rağmen önkoşullamanın geç fazının miyokardiyal sersemlemeye karşı koruyucu etkisi daha belirgindir (4,5).

Adenozin (ADO), bütün hücrelerde doğrudan yada Adenozin Trifosfatın (ATP) hidrolizi sonucunda oluşan lokal bir hormondur. ADO'nun şimdiye kadar A1, A2 ve A3 olmak üzere üç reseptör alt tipi tanımlanmış ve klonlanmıştır (6).

İlk olarak 1991 yılında Liu ve arkadaşları, tavşan kalbinde ADO reseptör blokajı ile İÖ'ya bağlı korumanın ortadan kalktığını göstermişlerdir (7). ADO önkoşullamadaki etkilerini A1 ve A3 reseptörleri üzerinden gösterir. Bu reseptörlerin uyarılması ile aktive olan Protein kinaz C, önkoşullamanın uç efektörlerinden olan sarkolemmal ve mitokondriyal ATP'ye duyarlı potasyum ( $K_{ATP}$ ) kanallarının açılmasını ve sonrasında henüz aydınlatılmamış bir dizi mekanizmayla koruyucu etki oluşmasını sağlar (8,9).

### Uzak İskemik Önkoşullama

Bir organ veya dokunun iskemi ve reperfüzyonu ile oluşturulan önkoşullama, başka bir arterin beslediği organ veya dokuyu da önkoşullayarak koruyucu etki gösterebilir. Bu durum uzak iskemik önkoşullama (UIÖ) olarak adlandırılmıştır. İlk defa 1993 yılında Przyklenk ve arkadaşları tarafından tanımlanmıştır. Bu çalışmada köpek circumflex koroner arteri üzerinde uygulanan önkoşullamanın, sol ön inen koroner arterin beslediği alanlarda da koruyucu etki oluşturduğu gözlenmiştir (10). Daha sonraki yıllarda yapılan çalışmalarda ise iskelet kası (11), böbrek (12), mezenterik arter (13) ve femoral arterde (14) gerçekleştirilen önkoşullamaların da kalpteki iskemi-reperfüzyon hasarına karşı koruyucu etkileri gösterilmiştir.

Biz de bu çalışma ile sıçan akciğerinde oluşturduğumuz iskemik önkoşullamanın kalpteki iskemi veya iskemi-reperfüzyon hasarına karşı: i) koruyucu etki oluşturup oluşturmadığını ve ii) muhtemel bir koruyuculukta adenozinin bir rolünün olup olmadığını araştırmayı hedefledik.

## GEREÇ VE YÖNTEM

### Kullanılan Deney Hayvanları

Çalışmamızda Dicle Üniversitesi Sağlık Bilimleri Uygulama ve Araştırma Merkezinden temin edilen her iki cinsiyetten 250-350 g ağırlığında 30 adet Sprague-Dawley sıçan kullanıldı.

09/03/2004 tarihli ve 6 sayılı Dicle Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurul izni ile başlanan çalışmamız süresince hayvan hakları ile ilgili NIH tarafından belirlenen 'Hayvan Haklarının Korunması' hususundaki esaslara özenle uyuldu.

### Cerrahi Yöntem

Çalışma boyunca sıçanlar, stres oluşturmayacak ortamda barındırılmış olup herhangi bir yiyecek ve su kısıtlaması uygulanmamıştır. Sıçanlar, 120 mg/kg dozunda intraperitoneal tiyopental sodyum ile anestetize edilmişlerdir. Cerrahi işlem boyunca gerektiğinde 10 mg/kg dozunda intravenöz tiyopental sodyum uygulaması ile anestezi devam ettirilmiştir.

Rektal problu ısı kontrol cihazı kullanılarak hayvanların vücut ısılarının  $37\pm 1$  °C olması sağlanmıştır. Sıçanlara trakea entübasyonu yapılmış olup, ventilatör cihazı ile solunum sayısının dakikada 60, tidal volümün 1 ml/100 gr olması sağlanmıştır. Subkutan iğne elektrodları kullanılarak sürekli elektrokardiogram kaydı alınmıştır. Polietilen kateter kullanılarak sol karotid arter kanüle edilmiş ve basınç transduseri aracılığıyla arteriyel kan basınç değerleri bilgisayar ortamına aktarılmıştır. İlaç uygulamaları için sol femoral ven kanüle edilmiştir. Sıçanlara i.v. yolla 200 IU/kg heparin uygulamasından sonra sol parasternal torakotomi ile göğüs kafesi açılmıştır. Kalpte iskemi oluşturmak için sol koroner arterin (SKA) orijinine yakın yerinden 7/0 ipek iplikli atavmatik iğne geçirilmiştir. Akciğerde İÖ oluşturulan gruplarda ise sol pulmoner arter (SPA) izole edildikten sonra 7/0 ipek iplik geçirilerek oklüzyona hazır hale getirilmiştir. Koroner ve pulmoner arterlere düğüm atılırken, reperfüzyonu sağlamak ve arterlerde hasar oluşturmamak için iplikle arter arasına kısa bir polietilen kanül yerleştirildi. Tüm cerrahi işlemler süresince belirgin aritmi oluşan, ortalama arteriyel kan basınç değerleri kalıcı bir şekilde 60 mmHg'nin altına düşen ve çalışma sonunda ölçülen arteriyel pH değeri 7.35- 7.45, parsiyel karbondioksit değeri 32-48 mmHg aralığı dışında olan sıçanlar çalışma dışı bırakılmıştır. 15 dakika stabilizasyon için beklenildikten sonra deneysel protokoller uygulanmaya başlandı. Çalışmamız her grupta 6 (n=6) sıçan olacak şekilde beş grup şeklinde düzenlendi.

1.Grup: Kontrol Grubu (Sham opere)

2.Grup: Kalpte iskemi (30 dk SKA oklüzyonu) (K-İS)

3.Grup: Kalpte iskemi (30 dk SKA oklüzyonu)-Reperfüzyon (60 dk) (K-İR)

4.Grup: Akciğerde İÖ (5 dk SPA oklüzyonu-10 dk reperfüzyon, üç siklüs) + Kalpte İskemi (30 dk SKA oklüzyonu) (AC-İÖ+K-İS)

5.Grup: Akciğerde İÖ (5 dk SPA oklüzyonu-10 dk reperfüzyon, üç siklüs) + Kalpte İskemi (30 dk SKA oklüzyonu) - Reperfüzyon (60 dk) (AC-İÖ+K-İR)

Deney sonunda biyokimyasal analizler için sol ventrikül doku örnekleri alınmıştır. Biyokimyasal analiz için alınan doku örnekleri sıvı nitrojen ile muamele edildikten sonra -80°C'de saklanmıştır. Doku örnekleri alınan sıçanlar servikal dislokasyon yöntemiyle sakrifiye edilmiştir.

### **Biyokimyasal Analizler**

Saklanan sol ventrikül doku örneklerindeki malondialdehid (MDA) ve pürin nükleotid düzeyleri Yüksek Performanslı Likit Kromatografi (YPLK) kullanılarak analiz edildi. Bu analizler sırasında YPLK'ye spesifik kimyasal malzemeler kullanıldı.

### **MDA Analizi**

Yüksek Performanslı Likit Kromatografi cihazı ile MDA ölçümünde Jens Lykkesfeldt'in floresans dedektör kullanarak oluşturduğu metodu kullandık (15). Floresans dedektörün eksitasyon dalga boyu 515 nm, emisyon dalga boyu 553 nm olarak ayarlandı. Kolon fırını ise 30 °C'de çalışmak üzere ayarlandı. MDA analizi için 150x4.6 mm boyutlarında, partikül büyüklüğü 7µ olan C-8 kolon kullanıldı. Koruyucu kolon olarak 30x4.6 mm boyutlarında, partikül büyüklüğü 7µ olan C-8 kolon kullanıldı.

Malondialdehid ölçümü için saklanan doku örnekleri -80° C'den çıkarıldı ve her biri 100 mg ağırlığında olacak şekilde porsiyonlandı. Dokunun gramı başına 11.5 g/L'lik potasyum klorür solüsyonundan 9 ml eklenerek buz içerisinde homojenize edildi. Homejenizattan 40 µL alınıp üzeri distile su ile 100 µL'ye tamamlandı. Üzerine seyreltilmesinde etanolün kullanıldığı litrede 2.8 mMol 2,6-Di-tert-butil-4-metilfenol bulunan solüsyondan 20 µL eklendi. Üzerine litrede 81 gram sodyum dodesil sülfat bulunan solüsyondan 40 µL ve 200 ml asetik asit ile 8 gram tiyobarbitürik asitin bire bir oranında karıştırılmasıyla hazırlanan bir litrelik tiyobarbitürik asit solüsyonundan 600 µL eklendi. Bütün örnekler sodyum hidroksit kullanılarak pH değeri 3.5 olacak şekilde ayarlandı. Örnekler 95°C'de 60 dakika bekletildikten sonra akan su altında bekletilerek soğutuldu. Üzerlerine 200 µL distile su ve 1/15 oranındaki piridin/butanol karışımından 1000 µL eklendi. Sonrasında 3

1 dakika 16000 devirde santrifüj edildi. Santrifüj işlemi ile ayrıştırılan organik tabakadan 100 µL alınarak cihaza enjekte edildi. MDA düzeyleri pik alanı ölçülerek hesaplandı ve µMol/L olarak ifade edildi.

#### Pürin Nükleotidlerin Analizi

Pürin nükleotidlerinden ADO ve ATP'nin ölçümü için Volente ve arkadaşlarının uyguladıkları metottan yararlanıldı (16). Bu metottan farklı olarak mobil fazın hazırlanmasında tetrabütülamonyum hidrojen sülfat yerine tetrabütülamonyum bromür kullanıldı. YPLK' de ultraviyole ışık dedektörünün dalga boyu 220 nm, kolon fırınının ısı 25°C olacak şekilde ayarlandı. Pürin nükleotidlerinin ölçümünde 250x4.6 mm boyutlarında, 5 µ partikül büyüklüğüne sahip C-18 kolon kullanıldı.

Saklanan doku örnekleri 100 mg ağırlığında olacak şekilde standardize edildi. Her örneğe 5 ml 0.4 M perklorik asit eklenerek homojenize edildi. Homejenatın üzerine 0.8 ml 0.2 M potasyum hidroksit eklenerek iki dakika boyunca çalkalandı. Organik kısımlarının ayrıştırılması amacıyla 3000 devir ve 0°C'de 10 dakika santrifüj edilerek 20 µL'lik kısmı cihaza enjekte edildi. Pürin nükleotidlerinin düzeyleri pik alanı hesaplanarak bulundu ve µg/ml olarak ifade edildi.

#### İstatistiksel Analiz

Elde edilen verilerin istatistiksel analizi SPSS for Windows 9.9.0 kullanılarak yapılmıştır. Grupların ikili olarak karşılaştırılmasında Mann Whitney U testi kullanılmıştır. Sonucun  $p \leq 0.05$  olması durumunda veriler arasındaki farkın anlamlı olduğu kanısına varılmıştır.

#### BULGULAR

Kalpte iskemi (Grup 2; K-İS) yapılan grup ile AC'de İÖ sonrası kalpte iskemi (Grup 4; AC-İÖ+K-İS) yapılan grubun MDA düzeyleri istatistiksel olarak karşılaştırıldığında veriler arasındaki farklılık anlamlı bulunmuştur ( $p \leq 0.01$ ) (Tablo 1). Kalpte İR (Grup 3; K-İR) yapılan grup ile AC'de İÖ sonrası kalpte İR (Grup 5; AC-İÖ+K-İR) yapılan grubun MDA düzeyleri istatistiksel olarak karşılaştırıldığında veriler arasındaki farklılık anlamlı bulunmuştur ( $p \leq 0.01$ ) (Tablo 1). Kontrol grubuna ait MDA değerleri, K-İS ve K-İR yapılan gruplara ait

MDA değerleri ile istatistiksel olarak karşılaştırıldığında veriler arasındaki farklılık anlamlı bulunmuştur ( $p \leq 0.01$ ) (Tablo 1).

**Tablo 1.** Beş gruba ait MDA düzeyleri aritmetik ortalama  $\pm$  Standart hata olarak belirtilmiştir. (\* $p \leq 0.01$ )

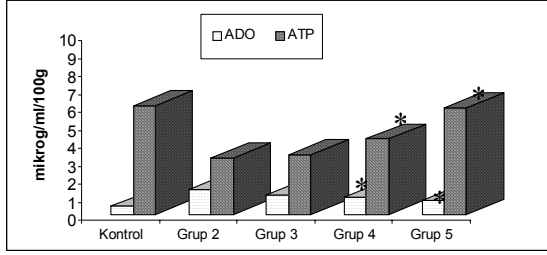
Gruplar	MDA (µmol/L)
Grup 1 (Kontrol)	0,17± 0,01
Grup 2 (K-İS)	0,42 ± 0,04
Grup 3 (K-İR)	0,35 ± 0,01
Grup 4 (AC-İÖ+K-İS)	0,26 ± 0,02*
Grup 5 (AC-İÖ+K-İR)	0,24 ± 0,02*

K-İS yapılan grup ile AC-İÖ+K-İS yapılan grubun ADO düzeyleri istatistiksel olarak karşılaştırıldığında veriler arasındaki fark anlamlı bulunmuştur ( $p \leq 0.01$ ) (Tablo 2, Grafik 1). K-İR yapılan grup ile AC-İÖ+K-İR yapılan gruplarının ADO düzeyleri istatistiksel olarak karşılaştırıldığında veriler arasında anlamlı bir fark bulunmuştur ( $p \leq 0.01$ ) (Tablo 2, Grafik 1).

K-İS grubu ile AC-İÖ+K-İS grubunun ATP düzeyleri arasındaki fark istatistiksel olarak karşılaştırıldığında anlamlı bulunmuştur ( $p \leq 0.01$ ) (Tablo 2, Grafik 1). K-İR grubu ile AC-İÖ+K-İR yapılan grubun ATP düzeyleri istatistiksel olarak karşılaştırıldığında veriler arasındaki farklılık anlamlı bulunmuştur ( $p \leq 0.01$ ) (Tablo 2, Grafik 1). Kontrol grubuna ait ADO ve ATP değerleri, K-İS ve K-İR gruplarından elde edilen değerler ile istatistiksel olarak karşılaştırıldığında veriler arasındaki farklılık anlamlı bulunmuştur (Tablo 2, Grafik 1).

**Tablo 2.** Her dört gruba ait Adenozin ve ATP düzeyleri aritmetik ortalama  $\pm$  Standart hata olarak belirtilmiştir. (\* $p \leq 0.01$ )

Gruplar	Adenozin (µgr/ml)	ATP (µgr/ml)
Grup 1 (Kontrol)	0,47± 0,06	6,09± 0,06
Grup 2 (K-İS)	1,43 ± 0,13	3,20 ± 0,10
Grup 3 (K-İR)	1,11 ± 0,06	3,34 ± 0,12
Grup 4 (AC-İÖ+K-İS)	0,97±0,08*	4,24 ± 0,20*
Grup 5 (AC-İÖ+K-İR)	0,81±0,08*	5,95 ± 0,25*



**Grafik 1.** Pürin nükleotidlerinin her bir grup içerisindeki dağılımı. Kalpte iskemi veya iskemi-reperfüzyon uygulanan gruptaki ADO düzeyleri uzak önkoşullanmış kalp gruplarına göre daha yüksek iken, ATP düzeyleri önkoşullanmış kalplerde daha yüksek seviyelerdedir.

(\* $p \leq 0.01$ )

### TARTIŞMA

Reperfüzyon hasarının en önemli nedeni, artan serbest radikallerin plazma ve organel membranları üzerinde başlattıkları lipid peroksidasyonudur. Lipid peroksidasyonunun yıkılım ürünü olan MDA, proteinlerin amino grupları ile şift bazı oluşturur ve tiyol grupları ile etkileşir. Lipid peroksidasyonu, ortamda doymamış yağ asitleri, oksijen ve metal katalizörler bulunduğu sürece logaritmik olarak artarken yeni serbest radikallerin oluşumuna yol açar. Bu nedenle reperfüzyon dönemi, lipid peroksidasyonu için gerekli koşulları sağlanması bakımından çok uygundur.

Reperfüzyon hasarının bir göstergesi olan MDA düzeyleri üzerine önkoşullamanın etkilerinin incelendiği bir çalışmada Soncul ve arkadaşları, izole domuz akciğerinde önkoşullama oluşturmak amacıyla iki siklus halinde beşer/5'er dakikalık iskemi-reperfüzyon periyodunun ardından akciğerleri 3 saat iskemi ve 30 dakika reperfüzyona maruz bırakmışlardır. Araştırmacılar çalışmanın sonunda önkoşullamanın MDA düzeylerini azalttığını ifade etmişlerdir (17).

Büyükateş ve arkadaşları, kardiyopulmoner by-pass geçiren insan kalplerinde yaptıkları çalışmada İÖ grubundaki MDA değerlerinin daha düşük bulunması ile ilgili olarak önkoşullamanın lipid peroksidasyonunu azaltıcı yönde etki gösterdiğine işaret etmektedir (18).

Bu ve benzeri çalışmalar ile MDA'nın lipid peroksidasyonunun önemli bir göstergesi

olduğu ve önkoşullamanın lipid peroksidasyonunu ve paralelinde de MDA düzeylerini azalttığı ortaya konulmuştur.

Biz de çalışmamızda, gerek akciğerde İÖ sonrası kalpte iskemi uyguladığımız grubun MDA değerlerini önkoşullamasız olarak kalpte iskemi uyguladığımız gruba göre, gerekse önkoşullama sonrası iskemi-reperfüzyon grubunun MDA değerlerini önkoşullamasız iskemi-reperfüzyon uyguladığımız gruba göre anlamlı bir şekilde düşük bulduk. Bu sonuçlar ile çalışmamızda gerçekleştirdiğimiz UİÖ'nün uzak olmayan İÖ'ya benzer bir şekilde lipid peroksidasyonunu ve ona bağlı oluşan hücre hasarı azalttığını söyleyebiliriz.

İlk kez tanımlanmasından sonra geçen yıllar içerisinde İÖ'da ADO'nun rolü birçok çalışmaya konu edilmiştir. Yapılan çalışmaların ortak sonucu ADO'nun İÖ korumasında önemli bir rol oynadığıdır. İskemiye maruz kalan hücrelerde ATP, iki yüksek enerjili fosfatını kaybederek Adenozin Monofosfat'a (AMP) dönüşür. AMP ise 5'-nükleotidaz enzimi aracılığıyla ADO'ya yıkılır. ADO, A1 ve A3 reseptörlerini uyararak PKC aktivasyonuna ve sonrasında sarkolemmal ve mitokondriyal  $K_{ATP}$  kanallarını açılmasını sağlayarak İÖ korumasının oluşumuna katkıda bulunur (7-9).

Geçen yıllar içerisindeki en önemli tartışma ADO'nun bu etkiyi/etkisini önkoşullamanın hangi aşamasında gösterdiği üzerinde yoğunlaşmıştır. Kitakaze ve arkadaşları 1993 yılında yaptıkları çalışmada, köpek kalbinde oluşturdukları İÖ modelinde ADO ve 5'-nükleotidaz'ın rolünü araştırmışlardır. Dört siklus halinde uyguladıkları beşer dakikalık önkoşullayıcı protokolün ardından 40 dk iskemi+120 dk reperfüzyon uygulamışlardır. Önkoşullama grubunun 120 dk'lık reperfüzyon döneminde koroner arteriyel ve venöz kanda ölçtükleri ADO düzeylerini ve 40 dk'lık iskemi periyodunun öncesi ve sonrasında ölçtükleri endokardiyal ve epikardiyal 5'-nükleotidaz aktivite düzeylerini önkoşullamasız iskemi-reperfüzyon uyguladıkları gruba ait verilerle karşılaştırmışlardır. Sonuç olarak araştırmacılar, önkoşullama grubunun 120 dk'lık reperfüzyon döneminde ADO düzeylerinin ve 40 dk'lık iskemi döneminin öncesi ve

sonrasında 5'-nükleotidaz aktivasyonunun önkoşullamasız gruba göre anlamlı bir şekilde yüksek olduğunu saptamışlardır (19). Yine Kitakaze tarafından 1996 yılında yapılan bir başka çalışmada ise önkoşullama modelinde PKC ve 5'-nükleotidaz aktivitesi arasındaki ilişki konu edilmiştir (20). Her iki çalışmanın sonucu olarak 5'-nükleotidaz aktivitesindeki sürekliliğin önkoşullama korumasının oluşumunda kritik bir rol oynadığını ileri sürülmüştür. Kitakaze'nin hipotezi; PKC'nin, 5'-nükleotidaz aktivasyonuna yol açtığı ve 5'-nükleotidaz aktif olarak kaldığı süre boyunca devamlı bir ADO oluşumuna ve korumaya yol açtığı şeklindedir.

Buna karşılık, birçok araştırmacı yaptıkları çalışmaların sonucunda Kitakaze'nin ileri sürdüğü hipoteze karşı çıkmışlardır. Örneğin, Van Wylen köpek kalbinde önkoşullayıcı protokol olarak iki siklüs halinde 5 dk iskemi+10 dk reperfüzyon periyodunun ardından 60 dk iskemi uygulamıştır. Kontrol grubu olarak da sadece 60 dk koroner iskemi gerçekleştirmiştir. Önkoşullayıcı protokol ve uzun süreli iskemi dönemlerinde sol ventrikül dokusunda interstisyel ADO düzeylerini periyodik olarak ölçmüş ve sonuç olarak ADO seviyelerindeki yükselmenin sadece önkoşullayıcı periyot döneminde görüldüğünü, uzun süreli iskemi döneminde ise böyle bir yükselmenin olmadığını ifade etmiştir (21).

Harrison ve arkadaşları ise izole sıçan kalplerinde yaptıkları çalışmada ADO düzeylerindeki düşmenin ATP tükenmesinden kaynaklanmadığını, önkoşullayıcı protokolün sağladığı koruma nedeniyle purin nükleotidlerinin daha az yıkılması nedeniyle oluştuğunu ileri sürmüşlerdir (22).

Bununla birlikte, Kitakaze ve arkadaşlarının öne sürdüğü hipotezin yanlış olduğunu öne süren araştırmacılar, İÖ'da ADO rolü konusunda ortak bir noktada buluşmuşlardır. Bu araştırmacılara göre önkoşullayıcı iskemi ve reperfüzyon dönemlerinde ATP hidrolizindeki artış nedeniyle ADO üretimi artmıştır. Bu dönemde ADO önkoşullama korumasının oluşumunda tetikleyici rolünü oynar ve oluşan koruma daha sonraki iskemi-reperfüzyon dönemlerinde ATP hidrolizini önler. Sonuç olarak araştırmacılar önkoşullama uygulanan

dokularda oluşan koruyucu etkinin ilerleyen dönemlerde hücrenin enerji düzeylerini koruyarak, ADO oluşumunu azalttığına dikkati çekmektedir.

Çalışmamızda kullandığımız uzak İÖ modeline benzer bir şekilde uzak organ olarak akciğerin kullanıldığı herhangi bir araştırma bulunmamaktadır. Daha önceki çalışmalarda ise infrarenal aorta, mezenterik arter, ekstremite arterleri ve renal arterde oluşturulan önkoşullamanın kalpteki iskemi-reperfüzyon hasarı üzerine etkileri incelenmiştir (14,23).

Uzak organ olarak renal arterin seçildiği bir çalışmada araştırmacılar ADO ve  $K_{ATP}$  kanallarının önkoşullama korumasının oluşumundaki rolünü incelemeyi hedeflemişlerdir. Elde edilen verilere göre araştırmacılar, ADO'nun uzak önkoşullama korumasının gelişiminde etkili olduğunu ve bu etkinin klasik önkoşullamaya benzer bir şekilde  $K_{ATP}$  kanalları üzerinden gerçekleştiğini ifade etmişlerdir (24).

Takaoka ve arkadaşları, tavşanlar üzerinde yaptıkları çalışmada renal arteri kullanarak oluşturdukları UİÖ'nün kalpteki İR hasarı üzerine olan etkilerini uzak olmayan İÖ ile ATP düzeyleri açısından karşılaştırmışlardır. Çalışma boyunca kalpteki ATP düzeylerini nükleer magnetik rezonans spektroskopisi cihazı ile devamlı olarak ölçmüşlerdir. Araştırmacılar kalpte İÖ ve UİÖ grupları arasında hasar oranları açısından yaptıkları karşılaştırmada anlamlı bir fark bulamamışlardır. Çalışmanın sonunda araştırmacılar, UİÖ'nün uzak olmayan İÖ'ye yakın bir koruma sağladığını ve hücrelerin enerji düzeylerine olan etkilerinin de benzer olduğunu saptamışlardır (25).

Çalışmamızda deneysel protokol sonrasında doku purin nükleotid seviyeleri ölçülmüştür. UİÖ sonrası kalpte iskemi oluşturduğumuz grubun ADO düzeyleri, sadece kalpte iskemi oluşturduğumuz gruba karşılaştırıldığında da anlamlı olarak düşük bulunmuştur. Benzer bir düşüklük, uzak önkoşullamalı ve önkoşullamasız olarak iskemi-reperfüzyon uyguladığımız gruplar arasında da tespit edilmiştir. Buna karşılık, ATP düzeyleri açısından incelendiğinde, UİÖ gruplarındaki seviyelerin daha yüksek olduğu görülmüştür. Bir başka deyişle, İÖ gruplarında ADO seviyeleri daha düşük iken,

yıkılımin azalmasına bağlı olarak ATP seviyeleri daha yüksek değerler almıştır. Elde ettiğimiz ATP verileri, Takaoka ve arkadaşlarının (25) çalışmalarında ulaştığı sonuçlarla uyum içerisindedir. Her ne kadar UİÖ modelinde olmasa bile Van Wylen (21), Harrison (22), De Jonge (26) gibi araştırmacıların, ADO seviyelerindeki yükselmenin önkoşullayıcı sıklık döneminde ATP yıkımının artmasına bağlı olduğu yönündeki ifadeleri ile bizim ulaştığımız sonuçlar benzerlik göstermektedir. Buna göre, ADO önkoşullayıcı dönemde tetikleyici rol oynamak suretiyle koruyucu etkinin oluşmasını sağlar. Önkoşullama koruması nedeniyle daha sonraki uzun süreli iskemi-reperfüzyon döneminde ATP yıkılımı azalır. Buna bağlı olarak da ATP yıkım ürünlerinden olan ADO seviyeleri uzun süreli iskemi döneminde daha düşük seyeder.

Sonuç olarak akciğerde oluşturduğumuz uzak iskemik önkoşullamanın kalpteki iskemi ve iskemi-reperfüzyon hasarına karşı koruyucu etkilerinin olduğunu ve bu koruyucu etkinin oluşmasında adozinin rol oynadığını söyleyebiliriz.

**Bu çalışma Dicle Üniversitesi Araştırma Proje Koordinatör'lüğü tarafından desteklenmiştir.**

#### KAYNAKLAR

1.Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation*, 1986; 74: 1124-1136.

2.Shiki K, Hearse DJ. Preconditioning of ischemic myocardium: reperfusion-induced arrhythmias. *Am J Physiol*, 1987; 253: H1470-1476.

3.Kaeffer N, Richard V, Francois A, et al. Preconditioning prevents chronic reperfusion-induced coronary endothelial dysfunction in rats. *Am J Physiol*, 1996; 271 (3 Pt 2): H842-H49.

4.Bolli R. The late phase of preconditioning. *Circ Res*, 2000; 87: 972-983.

5.Schulz R, Cohen MV, Behrends M, et al. Signal transduction of ischemic preconditioning. *Cardiovasc Res*, 2001; 52: 181-198.

6.Demiryürek Ş, Ceylan H, Demiryürek AT. İskemik önkoşullama ve etki mekanizması *Genel Tıp Dergisi*, 2003; 13: 187-194.

7.Liu GS, Thornton J, Van Winkle DM, et al. Protection against infarction afforded by preconditioning is mediated by A1 adenosine receptors in rabbit heart. *Circulation*, 1991; 84: 350-356.

8.Liu Y, Ytrehus K, Downey JM. Evidence that translocation of protein kinase C is a key event during ischemic preconditioning of rabbit myocardium. *J Mol Cell Cardio*, 1994; 126: 661-668.

9.Auchampach JA, Gross GJ. Adenosine A1 receptors, KATP channels, and ischemic preconditioning in dogs. *American J of Physiology*, 1993; 264: 1327-1336.

10.Przyklenk K, Bauer B, Ovize M, Kloner RA, Whittaker P. Regional ischemic 'preconditioning' protects remote virgin myocardium from subsequent sustained coronary occlusion. *Circulation*, 1993; 87: 893-899.

11.Liauw SK, Rubin BB, Lindsay TF, Romaschin AD, Walker PM. Sequential ischemia/reperfusion results in contralateral skeletal muscle salvage. *Am J Physiol*, 1996; 270: 1407-1413.

12.Pell TJ, Baxter GF, Yellon DM, Drew GM. Renal ischemia preconditions myocardium: role of adenosine receptors and ATP-sensitive potassium channels. *Am J Physiol*, 1998; 275: 1542-1547.

13.Patel HH, Moore J, Hsu KA, Gross GJ. Cardioprotection at a distance: Mesenteric artery occlusion protects the myocardium via an opioid sensitive mechanism. *J Mol Cell Cardiol*, 2002; 34: 1317-1323

14.Petrishchev NN, Vlasov TD, Sipovsky VG, Kurapeev DI, Galagudza MM. Does nitric oxide generation contribute to the mechanism of remote ischemic preconditioning? *Pathophysiology*, 2001; 7: 271-274.

15.Lykkesfeldt J, Determination of Malondialdehyde as Dithiobarbituric Acid Adduct in Biological Samples by HPLC with Fluorescence Detection: Comparison with Ultraviolet-Visible Spectrophotometry. *Clinical Chemistry*, 2001; 47: 1725-1727.

16. Volonte MG, Yuln G, Quiroga P, Consolini AE. Development of an HPLC method for determination of metabolic compounds in myocardial tissue. *J of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2004; 35: 647-653.
17. Soncul H, Öz E, Kalaycioglu S. Role of Ischemic Preconditioning on Ischemia-Reperfusion Injury of the Lung. *Chest*, 1999; 115: 1672-1677.
18. Buyukates M, Kalaycioglu S, Oz E, Soncul H. Effects of Ischemic Preconditioning in Human Heart. *Journal of Cardiac Surgery*, 2005; 20: 241-245.
19. Kitakaze M, Hori M, Takashima S, et al. Ischemic preconditioning increases adenosine release and 5'-nucleotidase activity during myocardial ischemia and reperfusion in dogs. Implications for myocardial salvage. *Circulation*, 1993; 87: 208-215.
20. Kitakaze M, Node K, Minamino T, et al. Role of activation of protein kinase C in the infarct size-limiting effect of ischemic preconditioning through activation of ecto-5'-nucleotidase. *Circulation*, 1996; 93: 781-791.
21. Van Wylen DG. Effect of ischemic preconditioning on interstitial purine metabolite and lactate accumulation during myocardial ischemia. *Circulation*, 1994; 89: 2283-2289.
22. Harrison GJ, Willis RJ, Headrick JP: Extracellular adenosine levels and cellular energy metabolism in ischemically preconditioned rat heart. *Cardiovascular Research*, 1998; 40: 74-87.
23. Weinbrenner C, Nelles M, Herzog N, Sarvary L, Strasser RH. Remote preconditioning by infrarenal occlusion of the aorta protects the heart from infarction: a newly identified non-neuronal but PKC-dependent pathway. *Cardiovasc Res*, 2002; 55: 590-601.
24. Theresa PJ, Baxter GF, Yellon DM, Drew GM. Renal ischemia preconditions myocardium: role of adenosine receptors and ATP-sensitive potassium channels. *Am J Physiol*, 1998; 275: 1542-1547.
25. Takaoka A, Nakae I, Mitsunami K, et al. Renal ischemia/reperfusion remotely improves myocardial energy metabolism during myocardial ischemia via adenosine receptors in rabbits: effects of "remote preconditioning." *J Am Coll Cardiol*, 1999; 33: 556-564.
26. De Jonge R, Bradamante S, Speleman L, De Jong W. Carbohydrates and purines in underperfused hearts, protected by ischemic preconditioning. *J Mol Cell Cardiol*, 1998; 30: 699-708.

#### **Yazışma Adresi**

Hasan AKKOÇ  
Dicle Üni. Tıp Fak. Farmakoloji AD. /Diyarbakır  
E-mail: hakkoc@dicle.edu.tr