

## İSKEMİK ÖNKOŞULLAMA VE N-ASETİL SİSTEİN'İN SIÇAN İSKELET KASI İSKEMİ-REPERFÜZYONUNDAKİ İNFLAMATUAR SÜREÇ ÜZERİNE OLAN ETKİLERİ

Uğur GÜRCÜN<sup>1</sup>, Tünay KURTOĞLU<sup>1</sup>, Çiğdem YENİSEY<sup>2</sup>, Erdem ÖZKISACIK<sup>1</sup>, Mehmet BOĞA<sup>1</sup>, Berent DİŞÇİGİL<sup>1</sup>

### ÖZET

**AMAÇ:** İskelet kasındaki iskemi-reperfüzyon (İ/R) hasarı, inflamatuvar mekanizmanın da önemli rol oynadığı karmaşık bir süreçtir. İskemik önkoşullama (İÖK) ve reaktif oksijen radikal tutucusu bir ajan olan N-asetilsistein'in (NAC), İ/R hasarını azaltıcı etkileri olduğu bilinmektedir. Bu çalışmada, İÖK ve NAC'ın İ/R hasarındaki inflamatuvar süreç üzerine olan etkilerini, ayrıca bu iki yöntemin birlikte kullanımının bu süreç üzerinde nasıl bir etki oluşturduğunu değerlendirmeyi amaçladık.

**GEREÇ ve YÖNTEM:** Otuz beş adet Sprague-Dawley cinsi siçan her birinde yedi siçan bulunan beş farklı gruba ayrıldı. Sham grubunda infrarenal abdominal aort izole edildi ancak iskemi oluşturulmadı. Kontrol grubunda infrarenal abdominal aort 120 dakika boyunca klempe edilerek alt ekstremitelerde iskemi, ardından 50 dakika süreyle reperfüzyon gerçekleştirildi. İÖK grubunda, İ/R öncesinde üç siklus şeklinde 10'ar dakikalık iskemi ve reperfüzyon uygulandı. NAC grubunda iskemik periyodun sonunda 20 mg/kg NAC intravenöz bolus olarak verildi ve reperfüzyon süresince 20 mg/kg/saat dozunda idamesi sağlandı. NAC+İÖK grubunda, İÖK sırasında aynı dozda ve eşit sürede NAC uygulandı. Tüm gruplarda reperfüzyon periyodunun sonunda serum proinflamatuvar sitokin (IL-1 $\beta$ , IL-6 ve TNF- $\alpha$ ) değerlerinin belirlenebilmesi için kan örnekleri alınarak siçanlar kurban edildi.

**BULGULAR:** Çalışmada incelenen tüm serum sitokin düzeylerinin kontrol grubunda sham grubuna göre anlamlı yüksek olduğu tespit edildi. Çalışma gruplarında da sitokin düzeylerinin sham grubuna göre ılımlı yüksek bulunmasına karşın, kontrol grubuna göre her üç grupta da belirgin düşük bulunduğu gözlemlendi. Çalışma gruplarının birbirleriyle olan karşılaştırmasında belirgin bir farklılık saptanmadı.

**SONUÇ:** Bu bulgular iskelet kasındaki İ/R hasarlanmasında inflamasyonun önemli bir rol oynadığını göstermektedir. Sonuçlarımız İÖK ve NAC'ın iskelet kasındaki İ/R aracılı inflamatuvar süreçte faydalı etkileri olduğunu düşündürmektedir. Serum proinflamatuvar sitokin seviyesi açısından iki yöntemin birbirine göre belirgin bir üstünlüğü bulunmadığı ve birlikte kullanımlarının ek bir fayda sağlamadığı gözlemlenmiştir.

**Anahtar sözcükler:** İskemi-reperfüzyon, iskemik önkoşullama, N-asetilsistein, sitokin

### Influence of Ischemic Preconditioning and N-Acetylcysteine on Inflammatory Process in Rat Skeletal Muscle Ischemia-Reperfusion

#### SUMMARY

**OBJECTIVE:** Skeletal muscle ischemia-reperfusion (I/R) injury is a complex process in which the inflammatory mechanisms play important role. Ischemic preconditioning (IPC) and reactive oxygen radical scavenger N-acetylcysteine (NAC) have been shown to attenuate I/R injury. We aimed to investigate the effects of IPC and NAC on I/R induced inflammation and the influence of synchronous application.

**MATERIALS and METHODS:** Thirty-five Sprague-Dawley rats were randomly assigned to five groups. In sham group, infrarenal aorta was isolated without induction of ischemia. In control group, ischemia was induced for 120 min, followed by reperfusion for 50 minutes. In IPC group, three cycles of 10 min ischemia, followed by 10 min reperfusion was formed preceding I/R. NAC group rats received an intravenous NAC (20 mg/kg) at the end of ischemic period and a maintenance dose of 20mg/kg/hr throughout the reperfusion. In IPC+NAC group, an equal amount of NAC was administered in an identical time period during IPC. Blood samples were obtained at the end of reperfusion for analysis of IL-1 $\beta$ , IL-6 and TNF- $\alpha$  level then rats were sacrificed.

**RESULTS:** All serum cytokine levels which were analyzed in this study were found to be significantly increased in control group in comparison with sham group. Although cytokine levels in the study groups were moderately increased as compared with sham group, all of three groups had significantly reduced levels than control group. There were no significant differences between the study groups regarding the serum cytokine levels.

**CONCLUSION:** These findings indicate that inflammation plays an essential role in skeletal muscle I/R injury. Our results suggested IPC and NAC exert beneficial effects on I/R induced inflammatory process in skeletal muscle. It was observed that there was no superiority of either of the measures over each other regarding the serum cytokine levels and concomitant use of them did not generate an additional benefit.

**Key words:** Ischemia-reperfusion, ischemic preconditioning, N-acetylcysteine, cytokine

İskelet kasındaki iskemi-reperfüzyon (İ/R) hasarı, vasküler cerrahide mortalite ve morbiditeyi artıran önemli bir sorundur. Bu sorunun çözümüne yönelik olarak, son yıllarda birçok ilaç ve yöntem

araştırılmaktadır. İskemi-reperfüzyon hasarlanmasının birçok farklı mekanizmanın rol oynadığı karmaşık bir süreç olması, araştırılan ilaç ve yöntemlerin bu karmaşık sürecin hangi aşamasına etki

<sup>1</sup>Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Kalp Damar Cerrahisi Anabilim Dalı, AYDIN, TÜRKİYE

<sup>2</sup>Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, AYDIN, TÜRKİYE

ederek koruma sağladığı sorusunu beraberinde getirmektedir. İskelet kasındaki İ/R hasarında inflamasyonun oynadığı önemli rol birçok araştırmayla gösterilmiş bir gerçektir<sup>1</sup>.

İskemik önkoşullama (İÖK) bir dokunun kısa süreli iskemi ve reperfüzyon periyotlarına maruz bırakılarak daha sonraki şiddetli İ/R hasarına karşı bu dokuda koruma sağlanması olarak tanımlanmaktadır<sup>2</sup>. Bu yöntemin birçok dokuyla birlikte iskelet kasında da İ/R hasarından koruyucu etkileri olduğu gösterilmiştir<sup>3</sup>. İskelet kasındaki İÖK koruyuculuğunun birçok farklı mekanizma üzerinden ortaya çıktığı bilinmektedir<sup>4,5</sup>. Mukolitik bir ajan olan N-asetilsistein (NAC) düşük molekül ağırlıklı, thiol grubu içeren bir bileşiktir. NAC'in İ/R hasarlanmasında, tüketilen hücre içi indirgenmiş glutatyon (GSH) rezervini artırarak koruyucu etki gösterdiği, ayrıca nitrik oksit üretim, transport ve depolanmasını artırarak endotel hasarını da azalttığı bildirilmiştir<sup>6-9</sup>.

Bu çalışmada, sıçan iskelet kası iskemi-reperfüzyon modelinde koruyucu etkileri daha önce gösterilmiş olan İÖK ve NAC'ın, inflamatuvar süreç üzerinden bir etki gösterip göstermediklerinin araştırılması amaçlanmıştır.

## GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışmada Adnan Menderes Üniversitesi Temel Tıp Bilimleri Deney Hayvanları Laboratuvarından elde edilen 230-255 gr ağırlığında otuz beş adet erkek Sprague-Dawley cinsi sıçan kullanıldı. Tüm hayvanlar 22°C oda ısısında kafeste tutularak standart kemirgen besini ile suya serbest erişimleri sağlandı. Anestezi induksiyonunda 100 mg/kg intraperitoneal Ketamin Hidroklorür (Ketalar, Parke-Davis, USA) ve idame için 50 mg/kg ek doz uygulandı. Hayvanların cerrahi hazırlık ve çalışma periyodu süresince 36-37,5°C vücut ısısında tutulması amacıyla ısıtıcı lamba kullanıldı.

N-asetilsistein infüzyonu ve sıvı resüsitasyonu için internal juguler ven Polietilen PE50 tubing kateter (Becton, Dickinson and Company, U.S.A.) ile kanüle edildi. Deney boyunca tüm gruplara sıvı resüsitasyonu amacıyla 10 ml/kg dozunda %0,9 NaCl verildi. N-Asetilsistein infüzyonu için %10'luk solüsyon ihtiva eden Asist ampul (Hüsni Arsan İlaçları AŞ, İstanbul, Türkiye) kullanıldı. 20 mg/kg dozunda N-asetilsistein, %0,9 NaCl çözeltisi içinde ve toplam hacim 10 ml/kg olacak şekilde hazırlandı. Bolus için 20mg/kg dozunda N-asetilsistein dilüe edilmeden verildi. Sıvı ve ilaç infüzyonları için Braun 8871 Compact Perfüzör ve Braun perfüzör enjektörü (Braun, Melsungen AG, Almanya) kullanıldı.

Mediyan laparotomi yapılarak infrarenal abdominal aort eksplore edildi. Abdominal aort klempajı için Vasco-Statt (REF 1001-535) vasküler klemp (Scanlan International, Inc. U.S.A. & Canada) kullanıldı. Deneyin sonunda tüm gruplardaki sıçanlar

kan örnekleri alındıktan sonra dekapitasyon ile sakrifiye edildi.

### Deney Grupları ve Çalışma Protokolü

Tüm gruplarda genel cerrahi hazırlık, anestezi induksiyonu ve kateterizasyonu takiben infrarenal abdominal aort izole edildikten sonra deneysel protokole başlandı. Her grupta yedi denek olan beş grup oluşturuldu:

**Sham Grubu (n=7):** Deney süresince infrarenal abdominal aort oklüde edilmedi ve deneyin 230. dakikasında kan örnekleri alınarak sıçanlar sakrifiye edildi.

**Kontrol Grubu (n=7):** Deneyin 60. dakikasında aort non-travmatik vasküler klemp ile oklüde edilerek 120 dakika süreyle iskemi oluşturuldu. İskemik periyod sonrasında, deneyin 180.dakikasında klemp kaldırılarak 50 dakika süreyle reperfüzyon sağlandı. Deneyin 230. dakikasında kan örnekleri alınarak sıçanlar sakrifiye edildi.

**İskemik önkoşullama (İÖK) grubu (n=7):** Deneye, abdominal aort klempajı ile on dakikalık iskemi ve ardından klemp kaldırılarak on dakikalık reperfüzyon oluşturularak başlandı. Bu prosedür üç siklus oluşturacak şekilde tekrar edildi ve böylece 60 dakika sonunda iskemik önkoşullama süreci tamamlanmış oldu. Bu süreci takiben aort tekrar klemp edilerek 120 dakikalık iskemi oluşturuldu. Deneyin 180. dakikasında klemp kaldırılarak 50 dakika süreyle reperfüzyon sağlandı. Deneyin 230. dakikasında kan örnekleri alınarak sıçanlar sakrifiye edildi.

**N-asetilsistein (NAC) grubu (n=7):** Deneyin 60. dakikasında aort non-travmatik vasküler klemp ile oklüde edilerek 120 dakika süreyle iskemi oluşturuldu. İskemik periyod sonrasında, deneyin 180.dakikasında klemp kaldırılarak 50 dakika süreyle reperfüzyon sağlandı. İskemik periyodun 115. dakikasında 20 mg/kg N-asetilsistein intravenöz bolus olarak verildi ve deneyin geri kalan süresi boyunca 20mg/kg/saat dozunda infüzyona devam edildi. Deneyin 230. dakikasında kan örnekleri alınarak sıçanlar sakrifiye edildi.

**İskemik önkoşullama ile eş zamanlı N-asetilsistein (İÖK+NAC) grubu (n=7):** İÖK grubunda tanımlanan şekilde iskemik önkoşullama prosedürü uygulandı. Ancak bu grupta iskemik önkoşullama süreci içinde, deneyin 5. dakikasında 20 mg/kg N-asetilsistein intravenöz bolus olarak verildi ve 20mg/kg/saat dozunda infüzyona başlandı. Deneyin 60. dakikasında iskemik önkoşullama sürecinin sonlanması ile birlikte N-asetilsistein infüzyonu da kesildi. Aort tekrar klemp edilerek 120 dakikalık iskemi oluşturuldu. Deneyin 180. dakikasında klemp kaldırılarak 50 dakika süreyle reperfüzyon sağlandı. Deneyin 230. dakikasında kan örnekleri alınarak sıçanlar sakrifiye edildi.

### Biyokimyasal Analiz

Kan örnekleri soğuk zincir ile taşınıp 10 dakika süreyle 4000 devir/dk santrifüje edildikten sonra mikropipet ile ayrılan serumlar -85 °C'de saklandı. Serum örneklerinde tümör nekrozis faktör- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interlökin-6(IL-6) ve interlökin-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ ) düzeylerinin tayini için ticari olarak satılan sıçan ELİSA kitleri (Bender MedSystems GmbH, Campus Vienna Biocenter 2 A-1030 Vienna, Austria) kullanıldı (Katalog numaraları TNF- $\alpha$  için BMS622, IL-6 için BMS625 ve IL-1 için BMS630). Sonuçlar standart eğriler kullanılarak Bioelisa Reader Elx800 (BIO-TEK, USA) ile hesaplandı. Intra-assay ve inter-assay değişkenlik katsayıları TNF- $\alpha$  ve IL-6 için sırasıyla < %5 ve < %10 iken, IL-1 $\beta$  için tümünde < %10 olarak hesaplandı.

### İstatistiksel Değerlendirme

Verilerin istatistiksel analizi için Windows SPSS (Statistical Package for Social Sciences) 14.0 versiyonu (SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA) istatistik paket programı kullanıldı. Veri dağılımına

bakılarak tüm gruplara önce Kruskal-Wallis testi uygulandı. Gruplar arasında anlamlılık saptanması üzerine ( $p < 0,05$ ), Mann Whitney- U testi ile gruplar ikişerli olarak birbirleriyle karşılaştırıldı. Bu karşılaştırma sonucunda p değerinin 0,05'den küçük olması istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Parametreler medyan değer  $\pm$  standart deviasyon (25-75 persantil) olarak verildi.

### BULGULAR

Çalışmada tüm gruplar için elde edilen serum IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  ve IL-6 değerleri sırasıyla Tablo 1, 2 ve 3'de verilmektedir. Serum IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  ve IL-6 değerlerinin her üçünün de kontrol grubunda sham grubuna göre yüksek olduğu görülmüştür. Kontrol grubundaki serum sitokin değerlerinin sham grubundaki serum değerlerine göre yüksekliği istatistiksel olarak ileri derecede anlamlı bulunmuştur. Çalışma gruplarında da her üç parametre sham grubuna göre yüksek bulunmasına karşın, bu yükseklik kontrol grubundaki kadar belirginlik

**Tablo 1.** Serum interlökin-1 $\beta$  düzeyleri (pg/ml).

Gruplar	Medyan değer $\pm$ standart deviasyon	25-75 persantil değerleri		
		25	50	75
Sham	135,88 $\pm$ 28,08	114,73	135,88	146,65
Kontrol *	238,57 $\pm$ 69,46	203,96	238,57	279,73
İÖK	183,50 $\pm$ 49,19	124,34	183,50	185,42
NAC	162,80 $\pm$ 64,87	104,07	162,80	209,34
İÖK+NAC	201,26 $\pm$ 45,13	135,50	201,26	218,96

İÖK: İskemik önkoşullama; NAC: N-asetilsistein

\*:  $p < 0,05$  (Kontrol grubunun diğer tüm gruplarla olan karşılaştırmasında)

**Tablo 2.** Serum tümör nekrozis faktör - $\alpha$  düzeyleri (pg/ml).

Gruplar	Medyan değer $\pm$ standart deviasyon	25-75 persantil değerleri		
		25	50	75
Sham	38,94 $\pm$ 14,08	37,88	38,94	53,38
Kontrol *	555,27 $\pm$ 166,98	476,39	555,27	679,50
İÖK	337,88 $\pm$ 75,52	219,87	337,88	344,09
NAC	374,53 $\pm$ 76,57	306,83	374,53	424,84
İÖK+NAC +	213,66 $\pm$ 111,87	126,70	213,66	356,52

İÖK: İskemik önkoşullama; NAC: N-asetilsistein

\*:  $p < 0,05$  (Kontrol grubunun diğer tüm gruplarla olan karşılaştırmasında)

+:  $p < 0,05$  (İÖK+NAC grubu ile NAC grubunun karşılaştırmasında)

**Tablo 3.** Serum interlökin-6 düzeyleri (pg/ml).

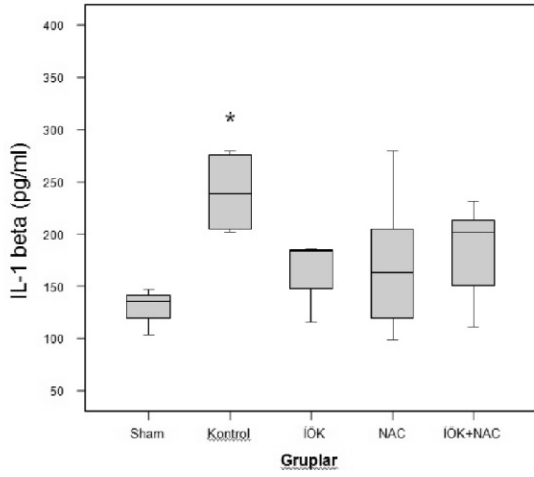
Gruplar	Medyan değer $\pm$ standart deviasyon	25-75 persantil değerleri		
		25	50	75
Sham *	156,66 $\pm$ 129,76	130,00	156,66	170,00
Kontrol	476,66 $\pm$ 270,47	330,00	476,66	690,00
İÖK	523,33 $\pm$ 181,50	420,00	523,33	603,33
NAC	453,33 $\pm$ 51,87	436,66	453,33	533,33
İÖK+NAC	476,66 $\pm$ 54,07	420,00	476,66	486,66

İÖK: İskemik önkoşullama; NAC: N-asetilsistein

\*:  $p < 0,05$  (Sham grubunun diğer tüm gruplarla olan karşılaştırmasında)

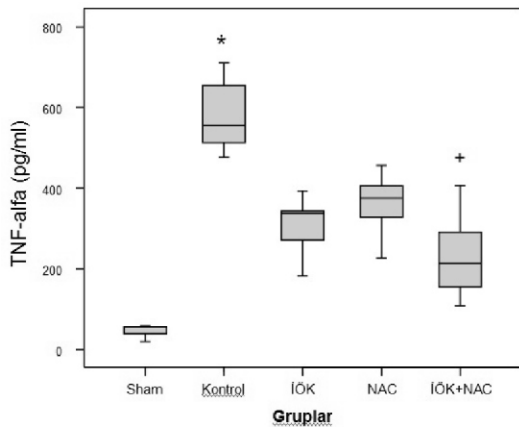
kazanmamıştır.

Kontrol grubunda IL-1 $\beta$  ve TNF- $\alpha$  değerlerinin tüm çalışma gruplarından anlamlı derecede yüksek olduğu tespit edilirken (Şekil 1 ve 2), IL-6 değeri için bu fark istatistiksel bir anlamlılık göstermemiştir (Şekil 3). İÖK ve NAC grupları arasında yapılan karşılaştırmada istatistiksel anlamlı bir fark bulunmamıştır. Aynı şekilde İÖK grubu ile İÖK + NAC grubu karşılaştırıldığında anlamlı bir farklılık saptanmazken, NAC ile İÖK + NAC grubunun karşılaştırmasında sadece TNF- $\alpha$  açısından İÖK + NAC grubu lehine anlamlı bir farklılık ortaya çıkmıştır (Şekil 2).



\*: p<0.05 (Kontrol grubunun diğer tüm gruplarla olan karşılaştırmasında)

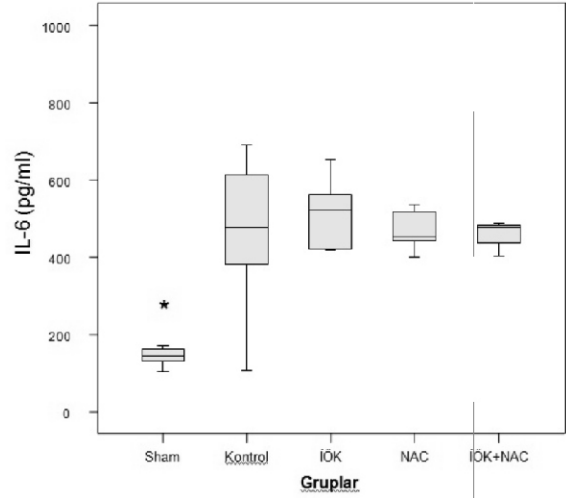
Şekil 1. Doku IL-1 $\beta$  düzeylerinin gruplara göre dağılımı.



\*: p<0.05 (Kontrol grubunun diğer tüm gruplarla olan karşılaştırmasında)

+: p<0.05 (İÖK+NAC grubu ile NAC grubunun karşılaştırmasında)

Şekil 2. Doku TNF- $\alpha$  düzeylerinin gruplara göre dağılımı.



\*: p<0.05 (Sham grubunun diğer tüm gruplarla olan karşılaştırmasında)

Şekil 3. Doku IL-6 düzeylerinin gruplara göre dağılımı.

## TARTIŞMA

Dokulara geçici olarak kan akımının kesilmesi ve bunu takip eden reperfüzyon; glutamat salınması, hücre içi kalsiyum birikimi, reaktif oksijen radikalleri (ROR) oluşumu ve membran lipidlerinin yıkılmasını içeren bir dizi olaya neden olmaktadır<sup>10</sup>. İskemi-reperfüzyon hasarı olarak adlandırılan bu durum mukozal geçirgenlikte artış, vasküler hasar, doku nekrozuna yol açmakta ve multipl organ hasarı ile sonuçlanabilmektedir. İskemi-reperfüzyon hasarlanmasında doğal antikorların birikimi, kompleman aktivasyonu ve nötrofil sekestrasyonu ile başlayan genel bir immün yanıt tetiklenmektedir<sup>11</sup>. İskemi aracılı nötrofil aktivasyonu ile buna eşlik eden ROR üretimi ve kompleman sisteminin aktivasyonu IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  gibi proinflamatuar sitokinlerin üretimi ve salınımına neden olarak inflammatuar yanıt oluşturmaktadır<sup>12</sup>. İskelet kası İ/R hasarlanmasındaki inflammatuar yanıt baskılandığında, oluşacak organ hasarının da azalacağı düşünülmektedir<sup>13</sup>. Bu çalışmada da İÖK ve NAC'ın, İ/R'daki inflammatuar yanıtı baskılayarak organ hasarını azaltıp azaltmayacaklarının belirlenmesi amaçlandı.

Sitokinler, organizmanın infeksiyon, inflamasyon ve immünolojik reaksiyonlar gibi çeşitli uyarılara yanıtında anahtar rol oynayan, lenfoid ve non-lenfoid birçok hücreden salgılanabilen düşük molekül ağırlıklı proteinlerdir<sup>14</sup>. TNF- $\alpha$ , nötrofil aktivasyonu ve endotelial lökosit adezyon moleküllerinin salınmasına neden olarak nötrofil aracılı endotel hasarına katkıda bulunur. IL-1 $\beta$ , apoptozis ve lökosit infiltrasyonuna sebep olarak inflammatuar kaskatta önemli rol oynayan, immün düzenleyici özelliği de olan bir sitokindir. TNF- $\alpha$  ve IL-1 $\beta$  inflamasyonun erken döneminde ortaya çıkarlar ve benzer ortak sinyal molekülleri üzerinden etki

göstererek IL-6 üretimini de kontrol ederler. IL-6; B ve T hücre fonksiyonlarının düzenlenmesi, nötrofillerin oksidatif patlaması ve serbest radikallerin salınması gibi birçok fonksiyonu olan bir sitokindir, sıklıkla proinflatuar sitokinlerin sistemik aktivasyonunun bir göstergesi olarak değerlendirilir<sup>15</sup>.

İskemi-reperfüzyon hasarında oluşan ROR, sinyal molekülleri gibi davranmakta ve özellikle proinflatuar sitokinlere ait genlerin transkripsiyonunu tetikleyebilmektedir. Gerek endojen gerekse de ekzojen kaynaklı tiol bileşiklerinin sitokin üretimini inhibe edebildikleri düşünülmektedir<sup>16</sup>. N-asetilsistein tiol içeren bir bileşiktir ve sülfhidril grupları yoluyla hem bir glutasyon prekürsörüdür, hem de direkt ROR tutucusu özelliği taşıyan bir ajandır. Oksidatif durumu değiştirmek yoluyla apoptozisi, anjiyogenezi, hücre büyümesini, nükleer transkripsiyonu ve sitokin üretimini kontrol eden sinyal mekanizmalarını etkileyebilmektedir. N-asetilsistein'in in-vitro ve in-vivo antiinflatuar etkileri olduğu gösterilmiştir<sup>17,18</sup>. Deneysel barsak transplantasyonu modelinde NAC tedavisinin, barsak İ/R hasarlanmasına bağlı artmış olan plazma sitokin (TNF- $\alpha$ , IL-8) düzeylerini azalttığı gösterilmiştir<sup>19</sup>. Hepatik İ/R hasarında, NAC tedavisiyle portal vendeki TNF- $\alpha$  ve plazma alanin aminotransferaz seviyelerinde azalma olduğu görülmüştür<sup>20</sup>. Khan ve ark. sıçan beyinde İ/R ile oluşan sitokin ekspresyonunun (TNF- $\alpha$  ve IL-1 $\beta$ ) reperfüzyon sırasında NAC verilmesiyle belirgin ölçüde azaldığını tespit etmişlerdir<sup>21</sup>. Peristeris ve ark. ise NAC tedavisinin serum TNF- $\alpha$  düzeyindeki lipopolisakkarid aracılı artışı inhibe ettiğini gözlemlemişler ve glutasyonun TNF- $\alpha$  üretimini endojen olarak kontrol ettiğini öne sürmüşlerdir<sup>22</sup>.

İskemik önkoşullama ilk kez 1986 yılında Murry ve ark. tarafından kalp dokusunda gösterilmiştir<sup>23</sup>. Daha sonra yapılan araştırmalar İÖK'nın İ/R hasarına karşı koruyucu etkisini, bir kısmı birbirini tetikleyen farklı mekanizmalarla sağladığını ortaya çıkarmıştır. İskemik önkoşullamanın koruyucu etkisinin ortaya çıkmasında, proinflatuar sitokin üretimi ve salınımını azaltmasının da rol oynadığına dair kanıtlar bulunmaktadır. Miyokardiyal İ/R modelinde İÖK yapıldığında infarkt sahasının daha küçük olduğu ve serum TNF- $\alpha$  ile IL-1 $\beta$  düzeylerinde azalma olduğu tespit edilmiştir<sup>24</sup>. Pera ve ark. İÖK uygulanmış sıçanlarda beyin dokusunda fokal iskemi sonrasında IL-1 $\beta$  ve IL-6 mRNA seviyelerinin daha düşük olduğunu göstermişlerdir<sup>25</sup>. Sıçanda pnömoperitonyum ile oluşturulan intraabdominal iskemide, İÖK ile serum TNF- $\alpha$  ve IL-6 düzeylerinde azalma sağlanmıştır<sup>26,27</sup>. İskemik önkoşullamanın iskelet kasındaki İ/R hasarından koruyucu etkisinin 1992'de Mousney ve ark.<sup>2</sup> tarafından bildirilmesinden sonra yapılan çalışmalar, diğer dokulara benzer şekilde farklı mekanizmaların bu koruyuculukta rolü olduğunu göstermiştir. Bunlardan bir kısmı

mikrovasküler disfonksiyonun, vazospazmın ve kapiller no-reflow fenomeninin azaltılması, doku oksijenasyonunun ise artırılması şeklinde sayılabilir<sup>3</sup>. İskemik önkoşullamanın iskelet kasındaki post-iskemik kontraktile bozukluğu ve inflammatuar yanıtı da azalttığı gösterilmiştir<sup>28,29</sup>. Bir diğer çalışmada da İÖK'nın sıçan adalesinde İ/R'a bağlı TNF- $\alpha$  düzeyindeki yükselmeyi geriletliği, lökosit adezyonu ile migrasyonunu azalttığı ve mikrosirkülatuar bozukluğu düzelttiği görülmüştür<sup>30</sup>.

Bizim çalışmamızda elde ettiğimiz bulgular da İÖK ve NAC'ın İ/R'daki inflammatuar sürece olumlu etkileri bulunduğunu düşündürdü. Sıçan iskelet kasındaki İ/R'a bağlı yükselmiş olan IL-1 $\beta$  ve TNF- $\alpha$  düzeylerinde İÖK ve NAC ile belirgin düşüş sağlanırken, IL-6 düzeyindeki düşüş istatistiksel anlamlı değildi. Benzer durum iki yöntemin birlikte kullanıldığı İÖK+NAC grubu için de geçerliydi. Her üç çalışma grubunda IL-6 düzeyinin, IL-1 $\beta$  ve TNF- $\alpha$  düzeyleri kadar belirgin düşmemesinin nedeni kan örneklerinin inflamasyonun erken döneminde alınması olabilir. İskemik önkoşullama ve NAC'ın sıçan iskelet kası İ/R'daki inflammatuar yanıtı olumlu etkileri karşılaştırıldığında, iki yöntemden birinin diğerine üstünlük sağlamadığı görüldü. İki yöntemin birlikte kullanılması durumunda da (İÖK+NAC grubu), İÖK grubu ile karşılaştırıldığında her üç sitokin düzeyi açısından anlamlı bir farklılık görülmezken, NAC grubuyla yapılan karşılaştırmada sadece TNF- $\alpha$  düzeyi açısından İÖK+NAC grubu lehine anlamlı bir farklılık ortaya çıktı. Bu yararlı etkideki belirginleşmeyi, NAC'ın glutasyon üzerinden TNF- $\alpha$  üretimindeki endojen kontrolü<sup>22</sup> ve İÖK'nın TNF- $\alpha$  düzeyine olan etkisinin birleşerek birbirini tamamlamasının sağlamış olabileceğini düşündük.

Sonuç olarak, iskelet kası İ/R'da inflammatuar mekanizma önemli bir rol oynamakta ve bu inflammatuar yanıtın baskılanmasında hem İÖK hem de NAC yararlı etkiler sağlamaktadır. Bu çalışmada elde edilen bulgular, yararlı etkiler açısından iki yöntemin birbirine üstünlüğünün olmadığı ve birlikte kullanımlarının da belirgin bir ilave koruma sağlamadığı şeklinde özetlenebilir.

## KAYNAKLAR

1. Gute DC, Ishida T, Yarimizu K, Korthuis RJ. Inflammatory responses to ischemia and reperfusion in skeletal muscle. *Mol Cell Biochem* 1998;179:169-87.
2. Mousney RA, Pang CY, Forrest C. Preconditioning: a new technique for improved muscle flap survival. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1992;107:549-52.
3. Saita Y, Yokoyama K, Nakamura K, Itoman M. Protective effect of ischaemic preconditioning against ischaemia-induced reperfusion injury of skeletal muscle: how many preconditioning cycles are appropriate? *Brit J Plast Surg* 2002;55:241-5.
4. Webster RS, Montero EF, Fagundes DJ, Zettler CG, Coiro J. The role of ischemic preconditioning at the gracilis muscle of rats in the early phase of reperfusion

- injury. *Acta Cir Bras* 2006;21:80-6.
5. Wang WZ. Investigation of reperfusion injury and ischemic preconditioning in microsurgery. *Microsurgery* 2009;29:72-9.
  6. Cakir O, Erdem K, Oruc A, Kilinc N, Eren N. Neuroprotective effect of N-acetylcysteine and hypothermia on the spinal cord ischemia-reperfusion injury. *Cardiovasc Surg* 2003; 11: 375-9.
  7. Hsu BG, Yang FL, Lee RP, Peng TC, Harn HJ, Chen HI. N-acetylcysteine ameliorates lipopolysaccharide-induced organ damage in conscious rats. *J Biomed Sci* 2004; 11:152-62.
  8. Singh RJ, Hogg N, Joseph J, Kalyanaraman B. Mechanism of nitric oxide release from S-nitrosothiols. *J Biol Chem* 1996;271:18596-603.
  9. Delgado JL, Landeras J, Carbonell LF, Parilla JJ, Abad L, Quesada T, et al. Effect of N-acetylcysteine on vascular endothelium function in aorta from oophorectomized rats. *Gen Pharmacol* 1999;32:23-7.
  10. Sayan H, Babül A, Ugurlu B. Effects of Nitric oxide donor and inhibitor on prostoglandin E2 like activity, malondialdehyde and reduced glutathione levels after skeletal muscle ischemia-reperfusion. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2001;65:179-83.
  11. Sullivan GM, Sarembock IJ, Linden J. The role of inflammation in vascular diseases. *J Leuk Biol* 67:591-602.
  12. Eltzschig HK, Collard CD. Vascular ischaemia and reperfusion injury. *Br Med Bull* 2004;70:71-86.
  13. Ioannau A, Dalle LJ, Tsokos GC. Immunopathogenesis of ischemia/reperfusion-associated tissue damage. *Clin Immunol* 2011;141:3-14.
  14. Dinarello CA. Proinflammatory cytokines. *Chest* 2000;118:503-8.
  15. Hasturk A, Atalay B, Calisaneller T, Ozdemir O, Oruckaptan H, Altunors N. Analysis of serum pro-inflammatory cytokine levels after rat spinal cord ischemia/reperfusion injury and correlation with tissue damage. *Turk Neurosurg* 2009;19:353-9.
  16. Gosset P, Wallaert B, Tonnel AB, Fourneau C. Thiol regulation of the production of TNF-alpha, IL-6 and IL-8 by human alveolar macrophages. *Eur Respir J* 1999;14:98-105.
  17. Gillissen A. Anti-inflammatory efficacy of N-acetylcysteine and therapeutic usefulness. *Pneumologie* 2011;65:549-57(Abstract).
  18. Palacio JR, Markert UR, Martínez P. Anti-inflammatory properties of N-acetylcysteine on lipopolysaccharide-activated macrophages. *Inflamm Res* 2011;60:695-704.
  19. Kostopanagiotou G, Avgerinos ED, Markidou E, Voiniadis P, Chondros C, Theodoraki K, Smyrniotis V, Arkadopoulos N. Protective effect of NAC preconditioning against ischemia-reperfusion injury in piglet small bowel transplantation: effects on plasma TNF, IL-8, hyaluronic acid, and NO. *J Surg Res* 2011;168:301-5.
  20. Jin X, Wang L, Wu HS, Zhang L, Wang CY, Tian Y, Zhang JH. N-acetylcysteine inhibits activation of toll-like receptor 2 and 4 gene expression in the liver and lung after partial hepatic ischemia-reperfusion injury in mice. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2007;6:284-9.
  21. Khan M, Sekhon B, Jatana M, Giri S, Gilg AG, Sekhon C, Singh I, Singh AK. Administration of N-acetylcysteine after focal cerebral ischemia protects brain and reduces inflammation in a rat model of experimental stroke. *J Neurosci Res* 2004;76:519-27
  22. Peristeris P, Clark BD, Gatti S, Faggioni R, Mantovani A, Mengozzi M, Orencole SF, Sironi M, Ghezzi P. N-acetylcysteine and glutathione as inhibitors of tumor necrosis factor production. *Cell Immunol* 1992; 140:390-9.
  23. Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation* 1986;74:1124-36.
  24. Yu M, Wen N, Wenzhong Z, Yuanchang X, Xiaoming D, Yongjin L. Effect of repeated ischaemic preconditioning on TLR4 and proinflammatory cytokines TNF-alpha and IL-1β in myocardial ischaemia-reperfusion injury in a rat model. *Arch Med Sci* 2010;6:843-7.
  25. Pera J, Zawadzka M, Kaminska B, Szczudlik A. Influence of chemical and ischemic preconditioning on cytokine expression after focal brain ischemia. *J Neurosci Res* 2004;78:132-40.
  26. Yilmaz S, Ario DT, Altindis M, Akaydin M, Kalayci R, Kahraman A, Polat C. Short period of preconditioning protects by decreasing the TNF-alpha and IL-6 values before laparoscopic surgery (a rat experiment). *Med Sci Monit* 2010;16:BR75-9.
  27. Cevrioglu AS, Yilmaz S, Koken T, Tokyol C, Yilmazer M, Fenkci IV. Comparison of the effects of low intra-abdominal pressure and ischaemic preconditioning on the generation of oxidative stress markers and inflammatory cytokines during laparoscopy in rats. *Hum Reprod* 2004;19:2144-51.
  28. Saito T, Komiyama T, Aramoto H, Miyata T, Shigematsu H. Ischemic preconditioning improves oxygenation of exercising muscle in vivo. *J Surg Res* 2004;120:111-8.
  29. Webster RS, Montero EF, Fagundes DJ, Zettler CG, Coiro J. The role of ischemic preconditioning at the gracilis muscle of rats in the early phase of reperfusion injury. *Acta Cir Bras* 2006;21:80-6.
  30. Hung LM, Wei W, Hsueh YJ, Chu WK, Wei FC. Ischemic preconditioning ameliorates microcirculatory disturbance through downregulation of TNF-alpha production in a rat cremaster muscle model. *J Biomed Sci* 2004;11:773-80.

#### YAZIŞMA ADRESİ

Doç. Dr. Uğur GÜRCÜN

Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Kalp Damar Cerrahisi Anabilim Dalı, AYDIN, TÜRKİYE

E-Posta : ugurcun@adu.edu.tr

Geliş Tarihi : 04.11.2012

Kabul Tarihi : 19.11.2012