T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ANESTEZİYOLOJİ VE REANİMASYON
ANABİLİM DALI

TEK TARAFLI ALT EKSTREMİTE RAT İSKEMİ REPERFÜZYON MODELİNDE UZAK İSKEMİK ÖNKOŞULLAMANIN MİYOKARD LİPİD PEROKSİDASYONUNA ETKİLERİ

DR. ÖMER TORUN ŞAHİN

UZMANLIK TEZİ

İZMİR-2007

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ANESTEZİYOLOJİ VE REANİMASYON
ANABİLİM DALI

TEK TARAFLI ALT EKSTREMİTE RAT İSKEMİ REPERFÜZYON MODELİNDE UZAK İSKEMİK ÖNKOŞULLAMANIN MİYOKARD LİPİD PEROKSİDASYONUNA ETKİLERİ

UZMANLIK TEZİ

DR. ÖMER TORUN ŞAHİN

Danışman Öğretim Üyesi: Yard.Doç.Dr. Çimen Olguner

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR……i
TABLO LİSTESİ……..ii
ŞEKİL LİSTESİ……...iii
RESİM LİSTESİ……....iv
GRAFİK LİSTESİ……v
KISALTMALAR……vi
ÖZET……vii
SUMMARY……viii
GİRİŞ……1
AMAÇ……2
GENEL BİLGİLER……3
I- TURNİKE……3
II- İSKEMİ REPERFÜZYON……5
III- SERBEST OKSİJEN RADİKALLERİ……..9
Reaktif oksijen ürünleri' nin kaynağı……9
Kalpte reaktif oksijen ürünlerinin zararlı etkileri……10
IV- İSKEMİK ÖNKOŞULLAMA……13
UZAK İSKEMİK ÖNKOŞULLAMA……15
GEREÇ VE YÖNTEM……17
Deney grupları ve protokol……17
Çalışma protokolü şeması……18
Uzak iskemik önkoşullama yöntemi……19
Kalp dokusunda HPLC yöntemi ile MDA ölçümü……...20
Kalp dokusunun histopatolojik değerlendirilmesi……21
BULGULAR……..22
MDA……22
Kalp histopatolojik hasar değerlendirmesi……24
TARTIŞMA……26
SONUÇ VE ÖNERİLER……...31
KAYNAKLAR……32
Ek 1: ETİK KURUL İZİN BELGESİ……43

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim süresince bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım, hekimlik sanatının ve anesteziyolojinin temel ilkelerini öğrendiğim hocalarım; Sayın Prof. Dr. Zahide Elar'a, Sayın Prof. Dr. Emel Sağıroğlu'na, Sayın Prof. Dr. Ali Günerli'ye, Sayın Prof. Dr. Atalay Arkan'a, Sayın Prof. Dr. Erol Gökel'e,

Tez araştırmamı destekleyen, yapımı ve yazımı sırasında katkı ve yardımlarını esirgemeyen danışman hocam Sayın Yard. Doç. Dr. Çimen Olguner'e,

Tezimin hazırlanmasında yardımcı olan Yard. Doç. Dr. Uğur Koca' ya, Yard. Doç. Dr. Hakan Bodur' a, Dr.Ulaş Bağatır' a, Dr. Burak Küçükebe'ye

Asistanlığım süresince birlikte çalıştığım, eğitimime katkıda bulunan bölümümüz tüm öğretim üyeleri ve uzmanlarına,

Asistanlık döneminin heyecanını, stresini ve güzelliklerini birlikte yaşadığımız tüm asistan arkadaşlarıma,

Anestezi teknikeri arkadaşlarıma, ameliyathane, yoğun bakım, derlenme ünitesi, ağrı ünitesi, gündüz hastanesi hemşire ve personeli ile bölüm sekreterlerine ve tanıma fırsatı bulduğum tüm hastane çalışanlarına,

Hayatım boyunca benden desteğini, sevgisini ve sabrını esirgemeyen aileme,

Sevgili kardeşim Dr. Tamer Şahin' e,

Sonsuz sevgi ve saygılarımı sunar, teşekkür ederim.

Dr. Ömer Torun Şahin

TABLO LİSTESİ

Tablo 1: İskemi reperfüzyon hasarının miyokarda etkileri

Tablo 2: Çalışma gruplarının Malondialdehit değerleri

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1: Süperoksit radikali oluşumu
Şekil 2: İR sonrası hücrede gözlenen inflamatuvar yanıtı açıklayan mekanizmalar
Şekil 3: İskemi reperfüzyon hasarı sonrası uzak organ hasarı oluşumu
Şekil 4: ROÜ' nün kaynakları ve antioksidan savunma
Şekil 5: Reaktif oksijen ürünleri metabolizması
Şekil 6: İR sırasında miyokardda meydana gelen olaylar

RESİM LİSTESİ

Resim 1: Ratta sol alt ekstremite kan akımının lazer akımölçerle gösterilmesi

Resim 2: Ratta sol alt ekstremite kan akımı kesilmesinin lazer akımölçerle gösterilmesi

Resim 3: Sham grubunda histopatolojik görünüm

Resim 4: İR grubunda histopatolojik görünüm

Resim 5: İÖK grubunda histopatolojik görünüm

Resim 6: İÖK+İR grubunda histopatolojik görünüm

GRAFİK LİSTESİ

Grafik 1: Grupların MDA değerlerinin dağılımı

KISALTMALAR

İR: ……İskemi reperfüzyon

İÖK:……İskemik önkoşullama

$ETCO_2$:……..Endtidal karbondioksit

ATP:……..Adenozin trifosfat

Ca^{++}:……..Kalsiyum

Na^{+}:……...Sodyum

ROÜ:……Reaktif oksijen ürünleri

NOS:……Nitrik oksit sentaz

COX-2……..Siklooksijenaz-2

NO……Nitrik oksit

PAF……..Platelet aktive edici faktör

TNFα……Tümör nekroz faktör α

LTB_4……..Lökotrien B_4

H_2O_2……Hidrojen peroksit

İCAM-1……İntersellüler adezyon molekülü-1

LP……Lipid peroksidasyonu

MDA……Malondialdehit

$ONOO^-$……Peroksinitrit

NADPH……...Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat

OH^-……...Hidroksil

AMİ……..Akut miyokard infarktüsü

L-NAME……Nitro-L-Arjinin-Metil esteri

PKC……..Protein kinaz C

K^+ATP……...ATP' ye bağımlı K^+

MAP-kinaz……Mitojenle aktive olan kinaz

i NOS……...İndüklenebilen nitrikoksit sentaz

MLA……....Monofosforil lipid A

HPLC……High Performance Liquid Chromatography

KHHS……Kalp Histolojik Hasar Skoru

MPO……..Miyeloperoksidaz

ÖZET

TEK TARAFLI ALT EKSTREMİTE RAT İSKEMİ REPERFÜZYON MODELİNDE UZAK İSKEMİK ÖNKOŞULLAMANIN MİYOKARD LİPİD PEROKSİDASYONUNA ETKİLERİ

Dr. Ömer Torun Şahin, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Anesteziyoloji ve Reanimasyon Anabilim Dalı, İzmir/Türkiye.

Günlük pratikte sık kullanılan turnikenin aynı zamanda bir iskemi reperfüzyon (İR) modeli olduğu bilinmektedir. Bu çalışmada direkt miyokard iskemisi oluşturmadan, tek taraflı alt ekstremite İR' sinin, lipid peroksidasyonu (LP) üzerine etkisi ve olası etkinin uzak iskemik önkoşullama (İÖK) ile engellenip engellenemeyeceği araştırılmak istendi.

Çalışmaya, her birinde 7 denek bulunan 4 grup dahil edildi. *Sham* grubuna (n=6) herhangi bir işlem yapılmaksızın toplam çalışma süresi kadar anestezi uygulandı, İR grubunda (n=6) sol arka bacağa 4 saat iskemiyi takiben 2 saat reperfüzyon, İÖK grubuna (n=7), sol arka bacağa 3 döngü halinde 10 dk iskemi, 10 dk reperfüzyon, İÖK+İR grubuna (n=7) İÖK daki işlemlerin ardından 4 saat iskemi ve 2 saat reperfüzyon uygulandı.

Deney sonunda total kan volümü aspire edilerek ratlar sakrifiye edildi. Doku malondialdehit (MDA) düzeyi ve histopatolojik değerlendirme için kalp çıkarıldı.

Sham grubunun MDA düzeyleri İR grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı olarak düşük bulunurken, İÖK ve İÖK+İR grupları ile kıyaslandığında fark saptanmadı. İR grubundaki MDA düzeyleri İÖK ve İÖK+İR grupları ile karşılaştırıldığında anlamlı olarak yüksek bulundu. Tüm grupların kalp histolojik hasar skorları "0" olarak değerlendirildi.

Bu çalışmada tek taraflı alt ekstremite İR' nun miyokardda lipid peroksidasyonuna yol açtığı ve uzak İÖK ile bu etkinin azaltıldığı gösterildi. Uzak İÖK' nın kliniğe uyarlanabilecek; turnike eşliğinde ekstremite cerrahisi geçirecek yüksek riskli olgularda, perioperatif kardiyak sorunları azaltma potansiyeline sahip alternatif bir yöntem olarak denenebileceği sonucuna varıldı.

Anahtar kelimeler: İskemi reperfüzyon, iskemik önkoşullama, lipid peroksidasyonu.

SUMMARY

EFFECTS OF REMOTE İSCHEMIC PRECONDITIONING ON MYOCARDIAL LIPID PEROXIDATION IN UNILATERAL LOWER LIMB RAT ISCHEMIA REPERFUSION MODEL

Dr. Ömer Torun Şahin, Dokuz Eylül University, Faculty of Medicine, Department of Anesthesiology and Reanimation, İzmir

It has been known that tourniquet application is widely used in every day practice and is, however, an ischemia reperfusion (IR) model. In this study it is planned to investigate the effect of unilateral lower limb IR on lipid peroxidation, without constitution of any direct myocardial ischemia and prevention of this probable effect by remote ischemic preconditioning (IP).

Four groups of rats consisting of 7 subjects were included in the study. The *Sham* group (n = 6) served as time controls, they remained anesthetized for the whole duration of study; the IR group (n= 6) underwent 4 hour of left lower limb ischemia followed by 2 hour reperfusion; in the IP group (n=7) the left lower limbs of rats were exposed to three cycles of 10 minutes of ischemia followed by 10 minutes of reperfusion; IP plus IR group (n= 7) underwent ischemic preconditioning as in the IP group followed by 4 hours of ischemia and 2 hours of reperfusion .

At the end of the study period rats were sacrified by exasanguination of total blood volume. Hearts were totally excised for later tissue MDA level determination and histopathological examination.

MDA levels of Sham group compared with IR group was significantly lower, whereas there was no significant difference between Sham and IP and IP+IR groups. MDA levels in IR group was significantly higher than the ones in IP and IP+IR groups. The heart histological injury scores of all groups were determined as “0”.

Unilateral lower limb ischemic reperfusion causes lipid peroxidation on myocardium and this effect can be reduced by remote ischemic preconditioning. In this study we concluded that remote IP can be tried as an alternative method that can be adapted to clinical use and has a potential to reduce the perioperative cardiac problems, for high risky patients who were scheduled for extremity surgery in which tourniquet application would be used.

Keywords: Ischemia reperfusion, ischemic preconditioning, lipid peroxidation.

GİRİŞ

Kansız bir cerrahi alan sağlamak amacıyla ortopedik, vasküler ve rekonstruktif ekstremite cerrahilerinde sık olarak kullanılan turnike, aynı zamanda bir iskemi reperfüzyon modelidir. Açığa çıkan toksik oksidanlar hem turnike uygulanan ekstremitede hem de dolaşıma geçerek uzak organlarda hasara yol açmaktadır (1,2).

İskemik periyod boyunca dokuda oluşan serbest oksijen radikalleri ve süperoksit radikaller, turnikenin açılmasından sonra mikrovasküler permeabilite artışına, doku ödemine ve endoteliyal hasara yol açabilmektedir. Buna ek olarak aktive olan adezyon molekülleri ve sitokinler sistemik inflamatuvar yanıt oluştururlar (3,4).

Kalp, aktive olmuş sitokin ve lökositlerin en önemli hedef organlarından biridir. Serbest radikaller ve onların non – radikal reaktanları iskemi reperfüzyonda (İR) oluşan kardiyak hasarda kritik rol oynamaktadırlar. Serbest radikaller iskemi sonrası geri dönüşümlü post iskemik kontraktil disfonksiyon, disritmiler, kardiyak hücre ölümü ve kronik kardiyovasküler hastalıklarla yakından ilişkilidirler (5).

İskemi reperfüzyon hasarından korunmaya yönelik klinik ve laboratuvar çalışmalar sürmekle birlikte iskemik önkoşullama bu yöntemlerin en önde gelenlerinden birisidir. Organlar kısa süreli iskemi ve reperfüzyona maruz bırakıldıklarında, ardından gelen uzun süreli iskemiyle oluşan reperfüzyonda hasar daha az olmaktadır. Bu durum iskemik önkoşullama (İÖK) olarak adlandırılmaktadır (6). Yöntem ilk kez 1986 yılında Murry ve ark. tarafından köpek kalbinde yapılan araştırma ile gösterildi (7). Miyokard iskemi reperfüzyon hasarına miyokardiyal önkoşullamanın etkileri yaygın olarak araştırılmış ve yararları vurgulanmıştır (6-12). İlerleyen yıllarda İÖK' nin çeşitli doku ve organlarda İR ile indüklenmiş doku hasarını (iskelet kası, böbrek, akciğer, barsak, karaciğer ve beyin) azalttığı gösterilmiştir (13-18). Ayrıca sağlıklı gönüllülerde reperfüzyonun indüklediği nötrofil aktivasyonundan koruduğu saptanmıştır (19).

Olguner ve ark. (20) tek taraflı alt ekstremite turnike modelinde uygulanan İÖK' nin reperfüzyonla oluşan akciğer hasarını azalttığını bildirmişlerdir. Bununla birlikte, ekstremite iskemisine karşı uzak organlarda İÖK' nin koruyucu etkilerini araştıran

çalışmalar nadirdir. Miyokard İR hasarında uzak İÖK' nin (rat alt ekstremitesi veya mezenter artere uygulanan) yararı doğrulanmış (21,22), ancak, tek taraflı ekstremite İR' sinde yine ekstremiteye uygulanan İÖK' nin kalbe olan etkisini gösteren bir çalışmaya literatürde rastlanmamıştır.

Ekstremite ameliyatlarında turnike uygulaması sonrası özellikle geriyatrik, yandaş kardiyak sorunu olan hastalarda sık olarak solunumsal ve hemodinamik yan etkilerle karşılaşılmaktadır (23). Alt ekstremiteye turnike uygulanması planlanan riskli olgularda İÖK ile operasyon sırasında veya sonrasında ortaya çıkabilecek reperfüzyon etkilerinin azaltılması ön görülebilir. Bu klinik senaryodan yola çıkarak turnike uygulamaları ile miyokardda ortaya çıkan hasara uzak İÖK' nin etkisi araştırılmak istendi.

AMAÇ

Ratlarda turnike ile oluşturulmuş tek taraflı alt ekstremite İR modelinde, uzak İÖK' nin miyokarda olan etkilerinin araştırılması planlandı.

GENEL BİLGİLER

Vasküler, ortopedik ve rekonstrüktif cerrahide intraoperatif kanamayı azaltması ve cerrahi işlemi kolaylaştırması nedeniyle yaygın olarak kullanılan turnike uygulaması aynı zamanda istemli oluşturulan bir İR modelidir. Açığa çıkan toksik oksidanlar hem turnike uygulanan organlarda hem de dolaşıma geçerek uzak organlarda hasara yol açmaktadır (1,2).

I-TURNİKE

Turnike uygulaması ile oluşan hemodinamik ve metabolik değişiklikler; turnike fazına (inflasyon-deflasyon), turnike inflasyon süresine, iskemik alanın büyüklüğüne, anestezi yöntemine ve hastanın kardiyovasküler durumuna göre değişir (24).

Hemodinamik değişiklikler sağlıklı kişilerde minimal olmakla birlikte, zayıf kardiyak rezervi olan hastalar turnike inflasyonu veya deflasyonunu tolere edemeyebilirler (2).

İnflasyondan sonra periferik vasküler rezistans ve venöz kan volümü artışına bağlı olarak sistemik arter basıncı ve kardiyak debi hafif yükselir. Santral venöz basınç ve sistolik kan basıncındaki bu geçici artış yavaş yavaş turnike öncesi düzeye geri döner. Ancak, zayıf ventriküler kompliyansı veya yaygın variköz venleri olan hastalarda pulmoner arter basıncında önemli artış izlenebilir. Uyluğa bilateral turnike uygulanan hastalarda, dolaşım yüklenmesi ve kardiyak arrest bildirilmiştir (2,24,25).

Deflasyon ile iskemik ekstremitenin reperfüzyonu başlar. Postiskemik reaktif hiperemi ile birlikte periferik vasküler rezistansın azalması ve ekstremitenin reperfüzyonu sonucu büyük volümde kanın ekstremiteye geri dönmesi, pulmoner vasküler rezistans, santral venöz basınç ve arteriyel kan basıncında azalmaya neden olur (2,24,25).

Turnike deflasyonu ile iskemik alandan hiperkapnik venöz kanın sistemik dolaşıma geçmesi ve kardiyak debinin artması end tidal karbondioksit ($ETCO_2$)' de geçici artışa neden olur. Bu artış alt ekstremite turnike deflasyonlarından sonra daha fazla görülmektedir (24).

Turnikeden sonra ekstremitenin reperfüzyonu, pulmoner mikrovasküler zedelenmeye neden olur; pulmoner kapiller membran permeabilitesi artar ve ödem oluşur. Akciğerlerde nötrofil sekestrasyon artışı da gösterilmiştir (26).

Turnikenin oluşturduğu metabolik değişiklikler, basınçtan çok turnike süresinin uzunluğu ile ilişkilidir (24).

Bir, iki saatlik iskemiden sonra turnike deflasyonu ile arteriyel plazma K^+ ve laktat konsantrasyonlarında orta dereceli bir artış izlenir. Laktat anaerobik metabolizma son ürünüdür. Doku hipoksisi, hematolojik, solunumsal ve hücresel disfonksiyon laktat üretimini arttırır (2,24).

Deflasyonun 2. dk' sinde oksijen tüketimi, CO_2 üretimi artar. Sekiz dk içinde deflasyon öncesi değerine döner. Karbondioksit üretimindeki artış, O_2 tüketiminin 3 katıdır. İskemik ekstremitede laktat ve CO_2 artışı, maksimum 4. dk' de olmak üzere arteriyel pH 'de geçici azalmaya neden olur. Tüm bu metabolik değişiklikler 10-30 dk' de normale döner. Venöz O_2 saturasyonu %20 oranında düşerken, pulmoner şant oluşmadıkça arteriyel O_2 saturasyonunda azalma nadir görülür (2,24,25,27).

İskemi sırasında oluşan süperoksit radikallerin endotelyal zedelenmeye neden olması ve kompresyonun oluşturduğu direkt mikrovasküler zedelenme, turnike deflasyonunun ardından mikrovasküler permeabilite artışına yol açar. İskemi, ödem ve mikrovasküler konjesyonun oluşturduğu etkiler " post-turnike sendromu " olarak adlandırılır. Bu sendrom, ekstremitede paralizi olmaksızın katılık, solukluk, güçsüzlük ve hissizlik ile karakterlidir (2).

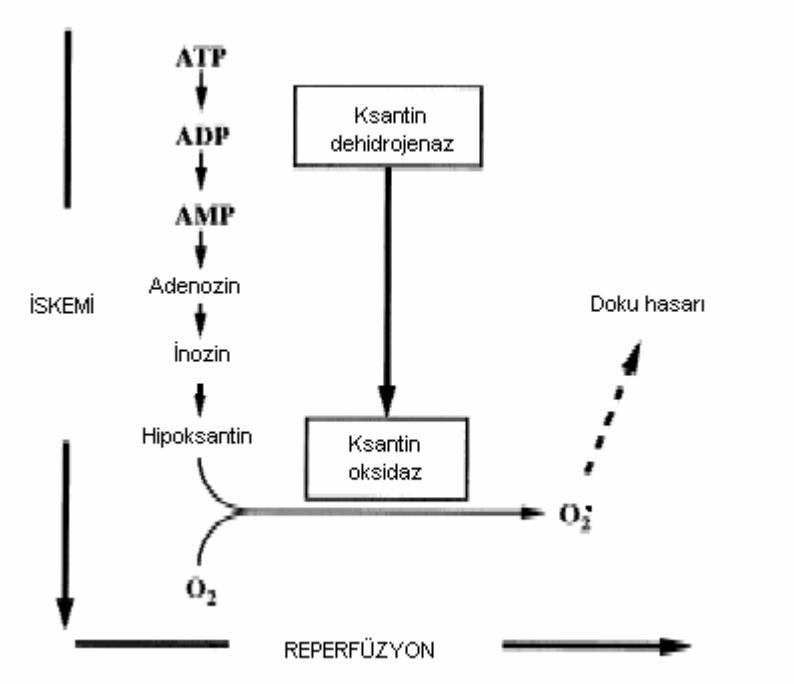
Hayvan çalışmalarında 200 veya 350 mmHg inflasyon basıncında, 2 saatten sonra turnike altında kalan, 4 saatten sonra ise turnike distalinde kalan kas dokusunda histolojik değişikliklerin oluştuğu gösterilmiştir (2).

Arteriyel hasar, cilt hasarı ekstremite cerrahisinin sık olmayan bir komplikasyonudur (2).

II-İSKEMİ-REPERFÜZYON

İskemi, organ veya doku kan akımındaki yetersizliğe bağlı olarak gelişen geriye dönüşümlü veya dönüşümsüz hücre/doku zedelenmesine neden olmaktadır. Geri dönüşsüz hücre hasarını önleyebilmek için organ veya dokuya yeniden kan akımının sağlanması gerekmektedir. Ancak reperfüzyonun gerçekleşmesi, iskemik dokularda iskeminin organ veya dokuda oluşturduğu hasardan daha fazla hasara yol açabilmektedir. Buna reperfüzyon hasarı veya *no-reflow fenomeni* denir (28).

İskemi sonrasında hücrelerde metabolik ve yapısal değişiklikler oluşmaktadır. Bunlardan ilki, iskeminin hücrede oksidatif fosforilasyonu bozarak hücre içi adenozin trifosfat (ATP) ve fosfokreatin sentezinde azalmaya yol açmasıdır. Bu durum hücre membranının ATP' ye bağımlı iyonik pompa fonksiyonunu bozarak hücreye daha fazla kalsiyum (Ca^{++}), sodyum (Na^{+}) ve su girmesi ile sonuçlanmaktadır. İskemi sırasında adenin nükleotitinin yıkımı da artmaktadır. Bu durum reaktif oksijen ürünlerinin (ROÜ) prekürsörü hipoksantin'in hücre içi birikimini artırmaktadır. İskemi sonrasında o bölgedeki kan akımının yeniden sağlanması (reperfüzyon) ve hücre içine moleküler oksijenin (O_2) yeniden sunulması ile birlikte ROÜ türevleri hızla oluşmaktadır (Şekil 1). İskemi aynı zamanda endotel hücrelerinde bazı proinflamatuvar ürünlerin (lökosit adezyon molekülü, sitokinler vb) ve biyoaktif bileşiklerin (endotelin, tromboksan A_2 vb) sentezini artırırken, bazı koruyucu enzimlerin (nitrik oksit sentaz {NOS}, siklooksijenaz-2 {COX-2}) ve bu enzimlerin ürünlerinin (nitrik oksit {NO}, prostasiklin) ekspresyon ve sentezini baskılamaktadır (29,30).



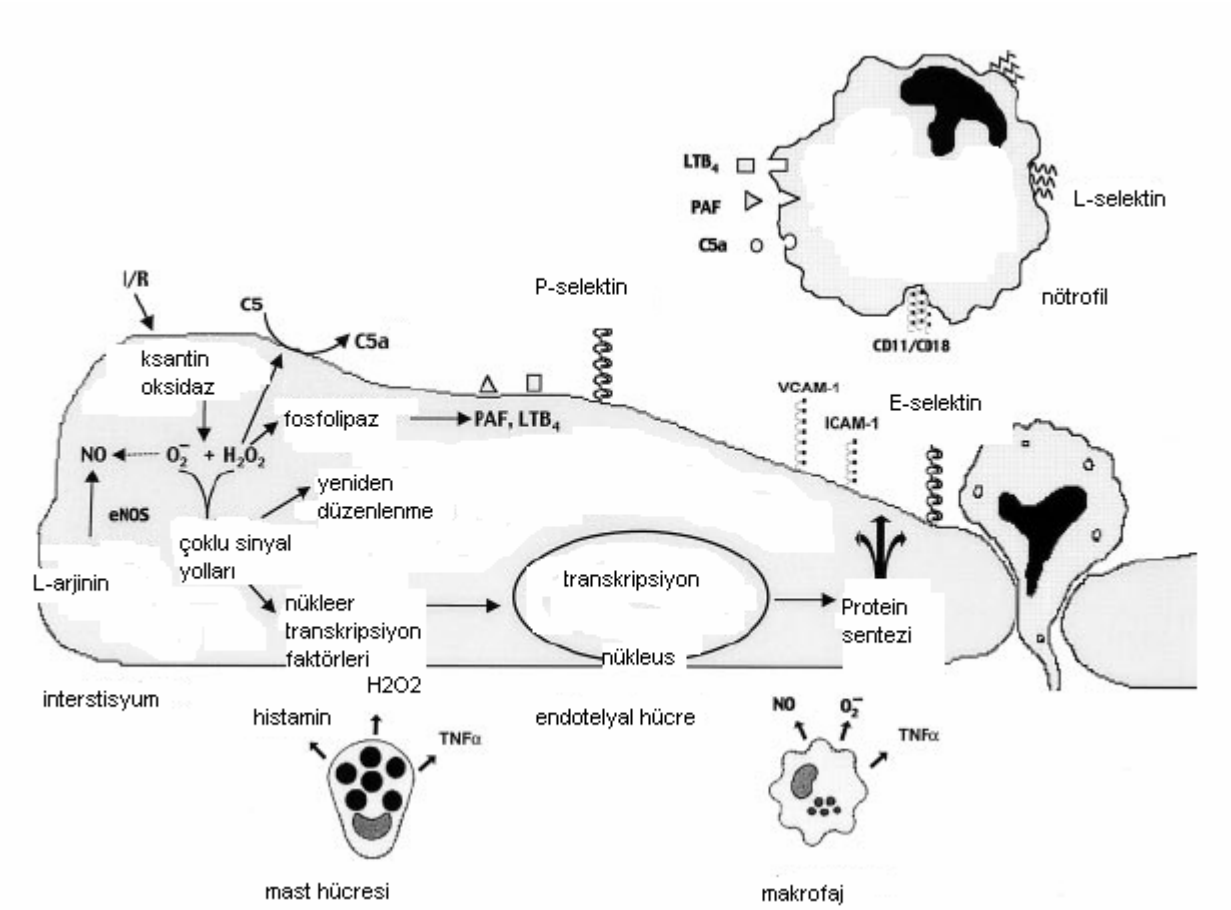
Şekil 1: Süperoksit radikali oluşumu (29)

İskemi reperfüzyon hasarının mekanizmaları arasında doku iskemisi sonrasında ATP düzeylerinde saatler süren azalma, iskemi ve ardından gelen reperfüzyon süresince proinflamatuvar hücrelerden (nötrofil ve mast hücreleri) kaynaklanan süperoksit serbest radikallerin direk hücresel toksik etkileri yer alır. Bunun dışında hücresel ve mikrovasküler hasar, reperfüzyon periyodu süresince yetersiz doku perfüzyonuyla sonuçlanan endotel hasarı ve trombosit tıkacı ile mikrovasküler disfonksiyon, reperfüzyon hasarı ile Ca^{++} aşırı yükü de sayılabilir (31).

İskemi-reperfüzyonun yol açtığı mikrovasküler hasar için nötrofil ve endoteliyal hücre ilişkisi gerekmektedir (Şekil 2). İskemi sırasında ve daha ağırlıklı olarak bunu takip eden reperfüzyon döneminde postkapiller venüllerde endotele artmış nötrofil adezyonu görülür ki, bunun İR' ye bağlı barsak disfonksiyonunda önemli rolü vardır. Platelet aktive edici faktör (PAF), Tümör nekroz faktör alfa (TNF-α), Lökotrien B_4 (LTB_4) ve ROÜ' nün bu durumun en olası kimyasal aracıları olduğu ileri sürülmektedir (30,32).

Komplemanların ardışık aktivasyonu, anaflatoksin C3a ve C5a' nın üretimine yol açar. Nötrofiller üzerindeki etkileri ise kemotaksis, endotele adezyonun artışı, ROÜ üretim ve salınmasını sağlamaktır (30).

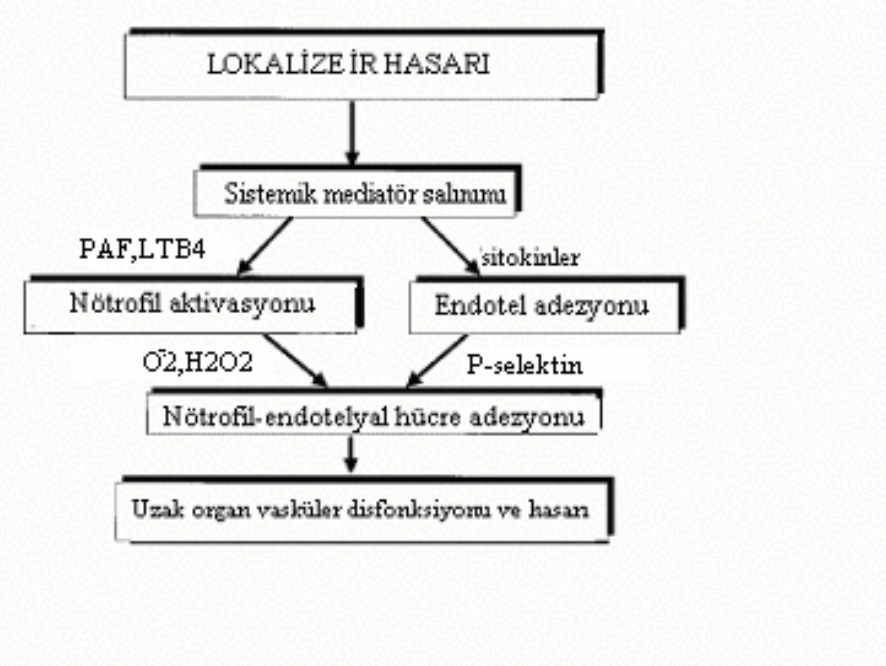
Lökotrienler, İR boyunca endotelyal disfonksiyonda önemli rol oynayan ve lipooksijenaz yoluyla oluşan araşidonik asit metabolitleridir. Lökotrien B_4 nötrofil yüzeyindeki spesifik reseptörlere bağlanır. Adhezyon moleküllerinin aktivasyonunu, endotelyal hücrelere yapışmayı, serbest O_2 radikallerinin ve proteazların üretimini sağlar (33).



Şekil 2: İR sonrası hücrede gözlenen inflamatuvar yanıtı açıklayan mekanizmalar (30). NO: Nitrik oksit, H_2O_2: Hidrojen peroksit, PAF: Platelet aktive edici faktör, LTB_4: Lökotrien B_4, TNF- α: Tümör nekroz faktör α, İCAM-1: İntrasellüler adezyon molekülü-1

Serbest radikallerin hücrede başlattığı en önemli ve zararlı etki lipid peroksidasyonudur (LP). Çoklu doymamış yağ asitlerinin serbest radikaller ile oksidasyonu LP olarak tanımlanır. Lipid peroksidasyonu biyolojik membranlarda akıcılığın kaybına, membran potansiyelinde azalmaya, hidrojen ve diğer iyonlara karşı geçirgenliğin artışı neticesinde hücre hasarına ve içeriğinin serbestleşmesine neden olur (34). Ek olarak LP' nin son ürünlerinden biri olan malondialdehit (MDA) membran bileşenlerinin polimerizasyonuna ve çapraz bağ yapmalarına yol açar. Bu da, hücre yüzeyinin durumunu, enzim aktivitesini, iyon transportunu etkileyebilir (35).

İskemi reperfüzyon sonrası oluşan hasar diğer organları da etkileyebilir. İskemi reperfüzyonun uzak organ etkileri sıklıkla akciğer ve kardiyovasküler sistemde görülmektedir. Uzak organ İR hasarı mekanizması şekil 3' de gösterilmiştir (30)



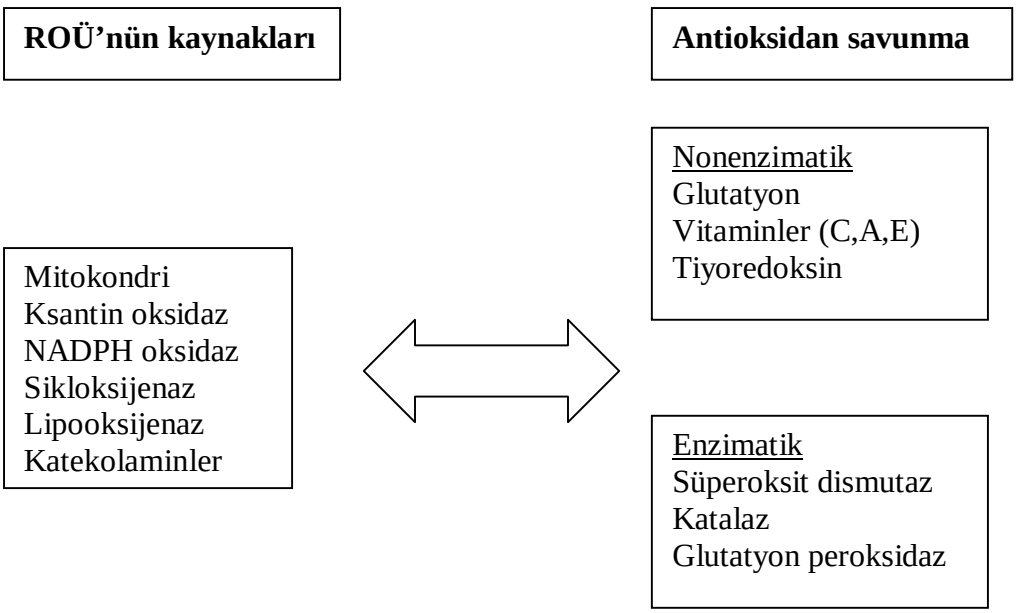
Şekil 3: İskemi reperfüzyon hasarı sonrası uzak organ hasarı oluşumu (30).
PAF: Trombosit aktive edici faktör,LTB_4 : Lökotrien B_4 , O_2^- ,H_2O_2: O_2 radikalleri

III-SERBEST OKSİJEN RADİKALLERİ

Serbest radikal yörüngesinde bir veya daha fazla çiftleşmemiş elektron içerir. Önemli serbest radikallerin çoğu oksijen kaynaklıdır. Bunların çoğu hidrojen peroksit (H_2O_2) ve peroksinitrit ($ONOO^-$) gibi önemli ara ürünlere sahiptir (5).

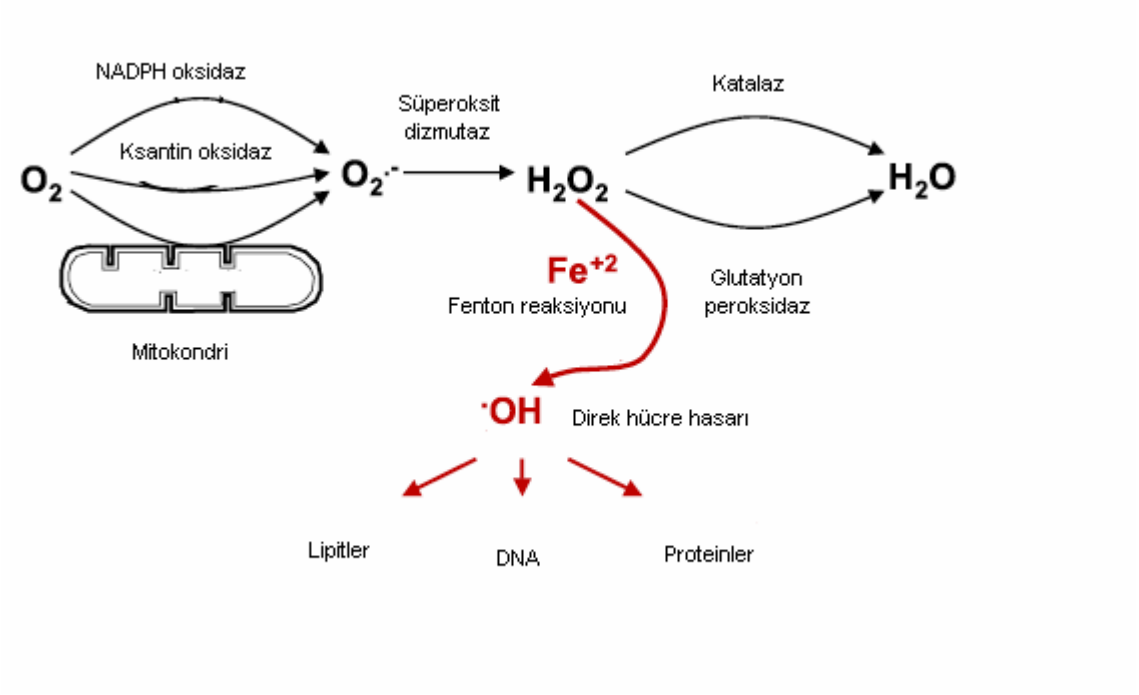
Reaktif oksijen ürünleri' nin kaynağı

Serbest radikallerin kaynakları, mitokondriyal elektron transport zinciri, enzimler (ksantin oksidaz, NADPH oksidaz, lipoksijenaz/siklooksijenaz ve nitrikoksit sentaz) ve katekolaminlerdir. İskemi reperfüzyon gibi patolojik durumlarda antioksidan savunma ile ROÜ formasyonu azaltılabilir. Kardiyomiyozitlerde major endojen antioksidanlar süperoksit dismütaz, katalaz, glutatyon peroksidaz, glutatyon, koenzim Q10 (Ubiquinone), vitamin C, A ve E' dir (5) (Şekil 4).



Şekil 4: ROÜ' nün kaynakları ve antioksidan savunma (5)

Süperoksit ($O2^-$) radikalinden süperoksit dismutaz ile hidrojen peroksit (H_2O_2) oluşur. Hidrojen peroksit, katalaz ve glutatyon peroksidaz ile H_2O ve O_2' ye indirgenir. Alternatif olarak Fenton Reaksiyonu ile hidroksil radikali (OH.) üretilir. Hidroksil hemen hemen tüm biyomoleküllerle reaksiyona giren bir reaktif radikaldir (36) (Şekil 5).



Şekil5: Reaktif oksijen ürünleri metabolizması (36)

Kalpte ROÜ' nün zararlı etkileri

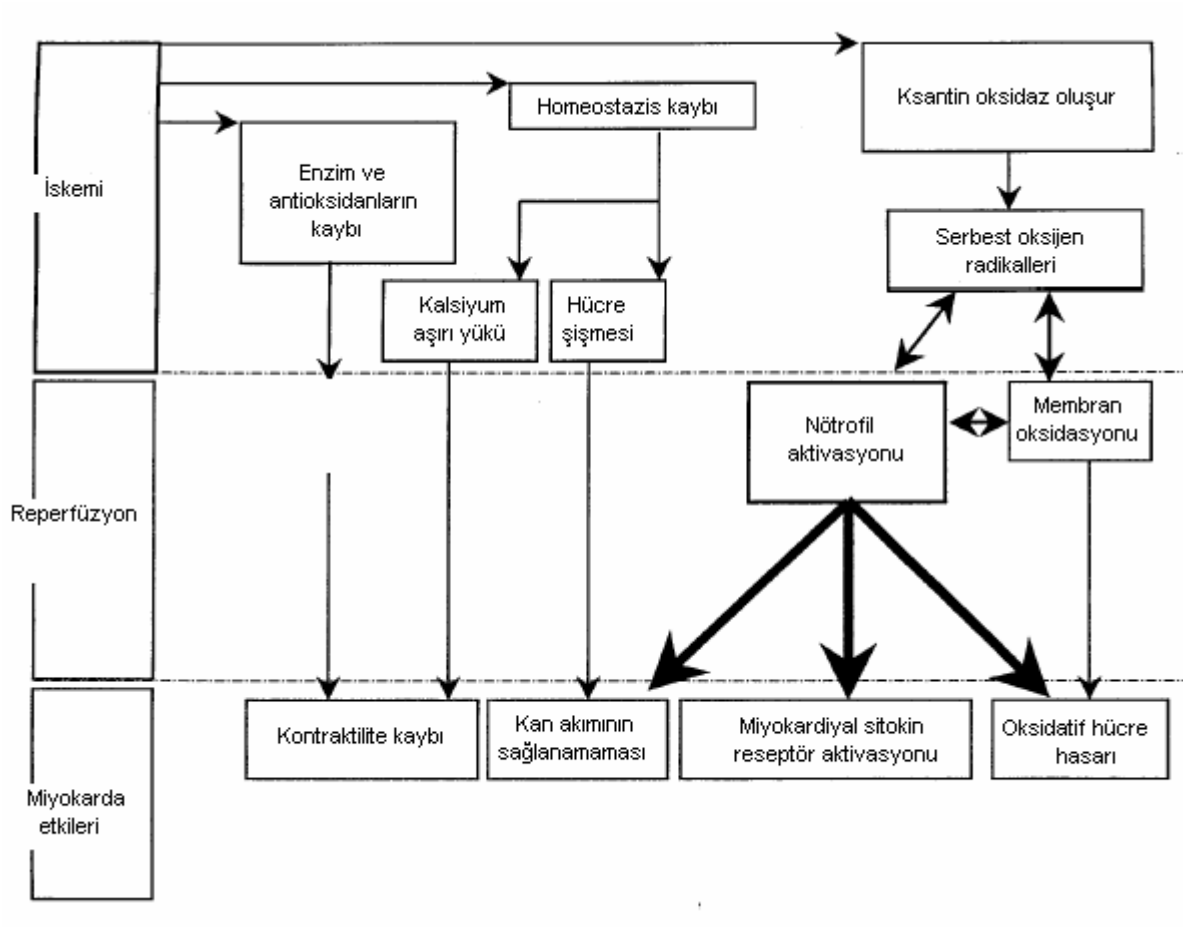
Serbest radikaller biyolojik etkilerini lipid, protein ve DNA' dan bir elektron alarak ortaya koyar. Lipid peroksidasyonu etkilerini hücre membranında gösterir (5,34). Reaktif oksijen ürünleri, postiskemik miyokardiyal sersemlik (stunning), nekroz, programlı hücre ölümü (apoptozis) ve vasküler disfonksiyon patogenezinde rol oynamaktadır. Miyokardiyal sersemlik geri dönüşümlü, saatler veya günler sürebilen kontraktil disfonksiyondur. Kardiyopulmoner by-pass sonrası rapor edilmiştir (5).

İskemi-reperfüzyon sonrası hücre ölümü, ROÜ aracılı şiddetli LP' nin yol açtığı miyokardiyal nekroza ve indüklenen apopitozis' e bağlı olarak ortaya çıkar (37).

İskemi sonrası reperfüzyon süresince morbiditenin önemli bir nedeni disritmilerdir. Reaktif oksijen ürünleri' nin disritmilere katkıda bulunan direkt elektrofizyolojik etkileri gösterilmiştir (38). Akut miyokard infarktüsü (AMİ) sonrası disritmilere neden olan ROÜ' nün önemli bir kaynağı nötrofiller olup nötrofil aktivasyonu ile disritmi insidansının korelasyon gösterdiği bildirilmiştir (39).

Miyokardın ROÜ' ne kronik maruziyeti sonucu kalp yetmezliğinin geliştiği ve ilerlediği ileri sürülmüştür (40). Hayvan modellerinde kalp yetmezliği gelişiminde aşırı ROÜ ve yetersiz antioksidan savunma rapor edilmiştir (41). Kontraktil yetmezliğin mekanizması multifaktöriyeldir. Örneğin, sarkolemmal Ca^{++} girişi kronik oksidatif stres altında bozulmaktadır (42). Ayrıca postiskemik kalp yetmezliğine kardiyak mitokondriyal DNA' nın oksidatif hasarının yol açtığı bildirilmiştir (43).

İskemi 3 önemli patolojik sürece katkıda bulunur: 1) İntrasellüler enzimlerin kaybı 2) Homeostatik mekanizmaların kaybı ve 3) Ksantin dehidrojenazın ksantin oksidaza çevrilmesi (33) (Şekil 6).



Şekil 6: İR sırasında miyokardda meydana gelen olaylar (33)

Reperfüzyon hasarının 3 ana komponenti vardır; miyokardiyal sersemlik, reperfüzyon aritmileri ve letal miyosit hasarına bağlı erken yüksek mortalite. İskemi reperfüzyon hasarının miyokarda etkileri Tablo 1' de gösterilmiştir (29).

Tablo 1:İskemi reperfüzyon hasarının miyokarda etkileri (29)

Klinik özellikler	Kasılma gücünde azalma Reperfüzyon aritmileri
Deneysel özellikler	Antioksidan kapasitede azalma Endotel hasarı Vasküler ve mikrovasküler hasar Nötrofil sekestrasyonu Sitokin serbestleşmesi Albumin permeabilitesi Hücre şişmesi
Biyokimyasal özellikler	Lipid peroksidasyonu Kalsiyum aşırı yükü

IV- İSKEMİK ÖNKOŞULLAMA

Hücre veya dokuların kısa süreli İR periyotlarına maruz kalması ve sonrasında uzun süreli iskemi ile oluşan doku hasarının belirgin azalması olayı İÖK olarak tanımlanmıştır (30). İskemik önkoşullama ilk kez 1986 yılında Murry ve ark. ları tarafından köpek miyokardında gösterilmiştir. Kalpte 40 dk' lık tek bir iskemiyi takiben ciddi bir ATP düşüşü ve hücre ölümü izlenirken 4 kez tekrarlanan 10 dk' lık İR döngüsünün hasarı azalttığı belirlenmiştir (7).

Miyokard iskemisinde, İÖK' nın etki mekanizmalarından birinin A_1 reseptör aktivasyonuyla birlikte adenozin üretiminin artması olduğu deneysel olarak gösterilmiştir (44,45). Potent bir vazodilatör olan adenozin, endotelyal hücrelerde NO sentezini artırırken (46), lökosit adezyonunu, serbest radikalleri inhibe ederken, adezyon moleküllerinin ortaya çıkmasını da engeller (47,48).

Nitrik oksit' in kalbi reperfüzyon hasarından koruduğu ya da İÖK' nın geç fazında infarktüs veya sersemleme'ye karşı korumada önemli rol oynadığı deneysel olarak saptanmıştır (8,9,49). İskemik önkoşullamanın köpek kalbinde oluşturduğu antiaritmik etkisinin NO sentaz (NOS) enzim inhibitörü nitro-L-arjinin-metil esteri (L-NAME) uygulaması ile azaldığı gösterilmiştir (50).

Artmış adenozin ve NO üretimi, miyokardiyal korumada önemli role sahip protein kinaz C (PKC)' nin translokasyon ve aktivasyonuna da neden olmaktadır (10,51). Protein kinaz C ve NO' nun ATP' ye bağımlı K^+ kanallarını (K^+ATP) aktive ettiği gösterilmiştir (52,53,54). Bu kanallar sarkolemmal ve mitokondrial olmak üzere iki tiptir. İskemi veya sonrasında sarkolemmal K^+ATP kanalları' nın aktivasyonunun kalp kasında aksiyon potansiyeli süresinde kısalma ile birlikte hücre içine Ca^{++} girişinde ve intraselüler Ca^{++} aşırı yüklenmesinde azalmaya neden olduğu bildirilmiştir (55). Ancak kalpteki koruyucu fonksiyonun genel olarak mitokondrideki Ca^{++} aşırı yüklenmesini önleyen mitokondriyal K^+ ATP kanalları üzerinden olduğu görüşü ağırlık kazanmaktadır (53,54,56,57).

Protein kinaz C' nin aynı zamanda tirozin kinaz, mitojenle aktive olan kinazlar (MAP-kinazlar) ve indüklenebilen NO sentaz (iNOS) yolakları üzerinden de sarkolemmal ve mitokondriyal K^+ATP kanallarının geç dönemde açılmasına neden olduğu da öne sürülmüştür (11).

Kısa süreli miyokardiyal iskemiye yanıt olarak bradikinin salıverilmesinde artış olduğu bildirilmiştir (58). Bradikinin'in endotel hücreleri üzerindeki B_2 reseptörler aracılığı ile İR sırasında oluşan aritmilere karşı koruyucu etki oluşturduğu düşünülmektedir (59). Ancak bu korumanın B_1 reseptörü aracılığıyla olduğunu gösteren çalışmalar da vardır (60). Sıçan ve tavşan

kalbinde düşük dozda lipopolisakkarit, endotoksin, monofosforil lipid A (MLA) önişlemi ile erken ve geç dönem koruma sağlandığı bildirilmiştir (61, 62).

Akciğer (17,20), karaciğer (47,63), kas (64,65), medulla spinalis (66), beyin (18,67) ve barsaklarda (16) da direkt ve uzak İÖK araştırılmış ve yararlı etkileri gösterilmiştir. İskemik önkoşullama' nın mekanizmasında adenozin (4,47,63,68), adenozin reseptörleri (44,45,68), NO (9,11,47,49,63,68), ısı şok proteinleri (3,47,68), PKC (10,47,51,53,68) ve mitokondriyal K^+ATP kanalları (18,53,54,55,57,68) sorumlu tutulmaktadır.

UZAK İSKEMİK ÖNKOŞULLAMA

İlk kez Przyklenk ve ark (12) tarafından tanımlanan Uzak İÖK, bir organa uygulanan İR epizodlarının başka bir organda iskemiye karşı dayanıklılık sağlamasıdır. Çalışmacılar, köpek kalbinde sirkumfleks arterin geçici iskemisinin sonradan gelen sol ön inen arterin tam iskemisinin öldürücü etkisini azalttığını bildirmişlerdir.

Cheung ve ark (69) kardiyak cerrahi geçiren çocuklarda, alt ekstremiteye uygulanan İÖK' nin (4 döngü 5' er dk' lık) miyokard fonksiyonuna etkilerini araştırmışlar ve uzak İÖK grubunda miyokard fonksiyonunun daha iyi, miyokard hasarının ise daha az olduğunu bulmuşlardır.

Kharbanda ve ark (70) kısa periyotlarla ekstremite iskemisinin miyokard enfarkt alanını azalttığını göstermişlerdir.

Shimizu ve ark (71) domuzlarda alt ekstremiteye 4 kez 5' er dakikalık İÖK uygulamışlar ve koroner direncin azaldığını, koroner akımın arttığını bildirmişlerdir.

Zhou ve ark (72) 18 erkek gönüllüde yaptıkları bir çalışmada uzak İÖK ile sol ön inen koroner arterin akım paternini Doppler ile değerlendirmişler ve uzak İÖK' nin erken reperfüzyon sürecinde hiperemi ile diyastolik akım hızını artırdığını bildirmişlerdir.

Zhang ve ark (73) uzak İÖK ile indüklenen kardiyoproteksiyonda kardiyak kappa-opioid reseptör aktivasyonunun rolü olduğunu bildirmişlerdir.

Loukogeorgakis ve ark (74) uzak İÖK' nin, insanlarda endotel hücre hasarına karşı erken ve geç olarak iki fazda koruduğunu ve ikisinde de nöronal aracılı mekanizmaların rol oynadığını bildirmişlerdir.

Chen ve ark (21) deneysel çalışmalarında akut uzak İÖK' nin mekanizmasında NO' nun önemli rol oynadığını belirtmişlerdir.

Uzak iskemik önkoşullamanın opioid duyarlı mekanizma ile miyokardı koruduğunun araştırıldığı bir çalışmada, mezenter artere uygulanan İÖK' nin miyokard enfarkt alanını azalttığı ve bunun naloksan ile önlendiği saptanmıştır (22).

Renal arter İÖK ile miyokarddaki koruyucu etkinin araştırıldığı bir çalışmada oluşan koruyucu etkinin adenozin reseptör antagonisti ile ortadan kalktığı bulunmuştur (75).

Konstantinov ve ark (76) uzak İÖK ile lökositlerde proinflamatuvar gen transkripsiyonunun baskılandığını saptamışlardır.

Kanoria ve ark (77) tavşanlarda yaptıkları çalışmada üç siklus halinde ekstremiteye uygulanan İÖK' nin karaciğerdeki İR hasarını azalttığını göstermişlerdir.

Şahin ve ark. karaciğer İR modelinde alt ekstremiteye uygulanan Uzak İÖK' nin, direkt İÖK' ye oranla karaciğer reperfüzyon hasarını daha etkili olarak azalttığını saptamışlardır (78).

GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışma; DEÜTF Deney Hayvanı Araştırmaları Etik Kurulu izni alındıktan sonra, 28 adet erişkin erkek Wistar-Albino rat (250–300 gr) kullanılarak DEÜ Multidisipliner Deney Hayvanları Laboratuarı' nda gerçekleştirildi. Deney hayvanları, çalışma başlangıcına kadar adaptasyonlarının sağlanması için 12 saat aydınlık-12 saat karanlık ortamda tutuldu, standart yiyecek ve suyla beslendi.

Cerrahi işlemden 12 saat önce sadece su içmelerine izin verildi. Anestezi, fentanil (Fentanyl Citrate, Janssen Pharmaceuticals, UK) 0.05mg,ml^{-1}, midazolam (Dormicum, Roche, France) 5mg,ml^{-1} ve distile su 1:1:1 hacim oranlarında; 1.8ml,kg^{-1} intraperitoneal uygulanarak sağlandı, gereksinime göre doz tekrarlandı (13). Denekler biyokimyasal tetkikler için total kan hacimleri toplandığında sakrifiye oldular.

Deney grupları ve protokol

Dört grup oluşturuldu.

Grup 1 (sham, n=7): Toplam çalışma süresi kadar anestezi uygulandı, herhangi bir işlem gerçekleştirilmedi.

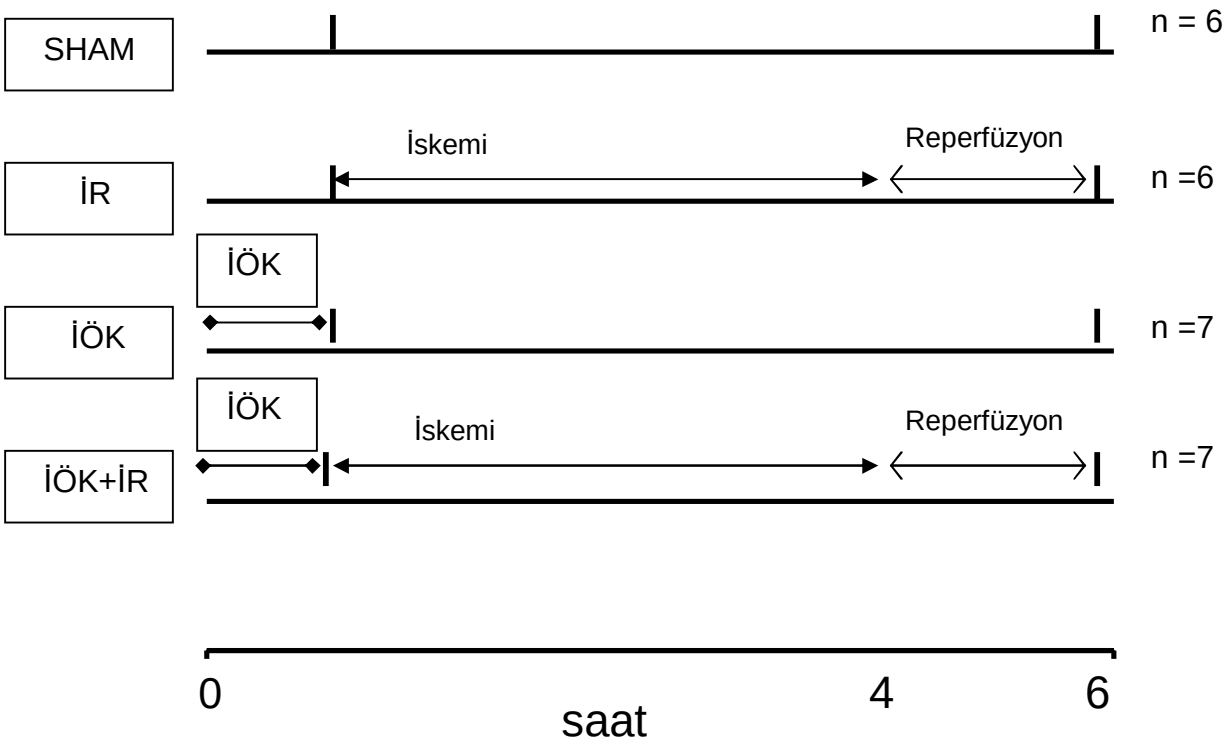
Grup 2 (İskemi-reperfüzyon, İR, n=7): Anestezi sonrası sol arka bacağa 4 saatlik iskemiyi takiben 2 saat reperfüzyon uygulandı.

Grup 3 (İskemik önkoşullama, İÖK, n=7): Sol arka bacağa 3 döngü halinde, 10 dk iskemi ve 10 dk reperfüzyon uygulandı.

Grup 4 (İskemik önkoşullama ve iskemi reperfüzyon, İÖK+İR, n=7): Sol arka bacağa 3 döngü 10 dk iskemi ve 10 dk reperfüzyonu takiben 4 saat iskemi, 2 saat reperfüzyon uygulandı.

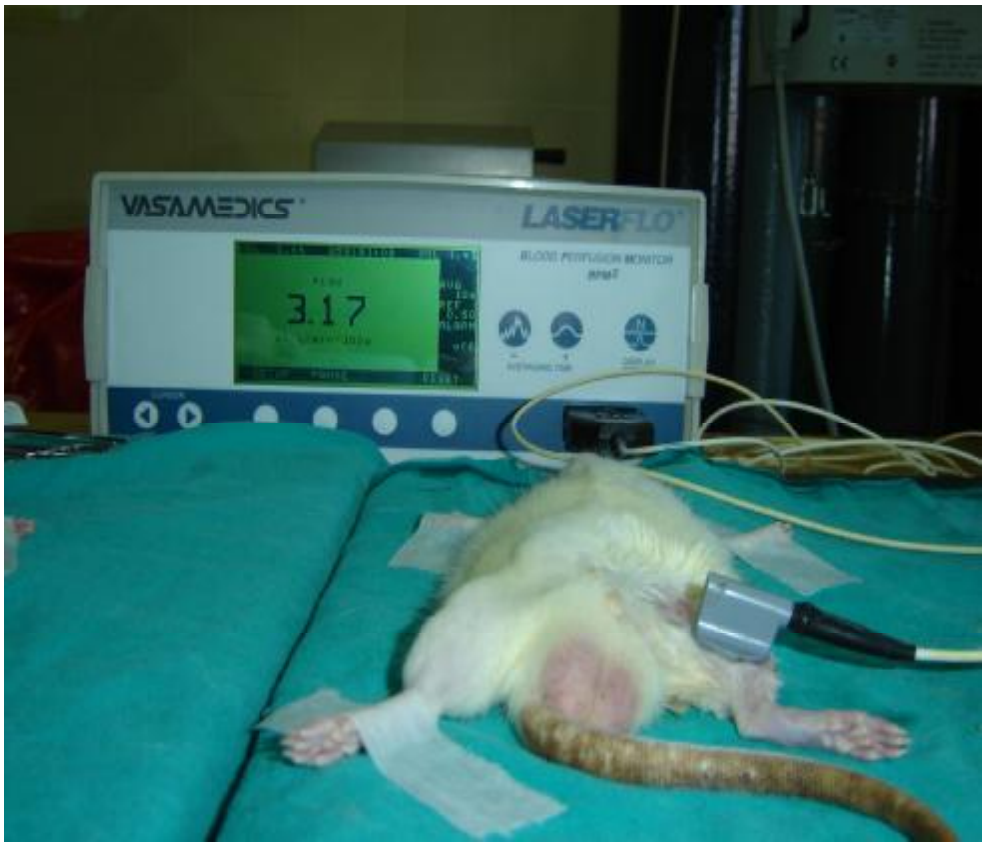
Tüm gruplarda toplam çalışma süreleri eşit tutuldu, kan ve doku örnekleri çalışma sonunda alındı.

ÇALIŞMA PROTOKOLÜ ŞEMASI



Uzak iskemik önkoşullama yöntemi

Deneklere anestezi uygulaması sonrasında, sol arka bacak kasık bölgesinden elastik bandaj (bir cm eninde ve 30 cm boyunda) ile çepeçevre basınç uygulandı, üç döngü halinde 10 dk iskemiyi takiben 10 dk reperfüzyona izin verildi (79). Kan akımının kesilmesi lazer akımölçer (Laser Flo BPM2, Vasamedic, USA) ile doğrulandı (Resim 1,2).



Resim 1: Ratta sol alt ekstremite kan akımının lazer akımölçerle gösterilmesi



Resim 2: Ratta sol alt ekstremite kan akımı kesilmesinin lazer akımölçerle gösterilmesi

Deneklerin vücut sıcaklıklarını 36.8-37.5 C° arasında tutmak amacıyla çalışma süresince operasyon masası ısıtıldı, ortam sıcaklığı sabit tutuldu.

Çalışma sonunda, anestezi altındaki ratların sağ atriumundan enjektör ile kan örneği alındı ve daha sonra kalp çıkarıldı, doku örnekleri sıvı nitrojende dondurularak -80 derecede depolandı. Kalp dokusunda MDA düzeyleri *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC) ve patolojik olarak kalp histolojik hasar düzeyi değerlendirildi.

Kalp dokusunda HPLC yöntemi ile MDA ölçümü

Doku homojenizatı hazırlamak için alınan kalp dokusu % 0.9' luk NaCl ile yıkanıp, kurulandı. Yüz mg doku örneği 900 µL %1.15 KCl de homojenize edildi. Santrifüj sonrası 2.8 mmol/L BHT, %8,1 SDS, 8 g/L TBA + Asetik asit karışımı ile

işlemlenen örnekler 95 °C'de 1 saat bekletilip buz üzerinde soğutuldu. Ortama butanol: piridin (15:1) eklendi,1 dk vortekslenerek karıştırıldı. Renkli üst (organik) faz küçük tüplere alındı ve 10,000 rpm'de 5-10 dakika santrifüj edildi. 150–4,6 mm, C18 100–5 (Macherey-Nagel) özelliklere sahip kolon kullanıldı. Mobil faz için: KH_2PO_4, 0,6805g/500 mL %30 metanol (0,01M) , K_2HPO_4, 0,8709g/500 mL %30 metanol (0,01M) içerecek biçimde hazırlandı. Mobil fazın akış hızı 0,8 mL/ dk, enjeksiyon hacmi 5µL, kolon fırını sıcaklığı 30 °C olacak şekilde hazırlandı. Floresan detektörün eksitasyon dalga boyu 515 nm, emisyon dalga boyu ise 553 nm olarak ayarlandı. Sonuçlar daha önce çalışılan standartlara göre değerlendirildi.

Kalp dokusunun histopatolojik değerlendirilmesi

Kalp örnekleri Bozyaka Eğitim ve Araştırma Hastanesi Patoloji Laboratuvarı' nda incelendi. Ratlardan alınan kalp dokusuna ait örnekler %10'luk formaldehid ile tespit edilerek parafin bloklar hazırlandı. Bloklardan elde edilen 3-4 mikronluk kesitler hematoksilen eozin ile boyandı.

Örnekler interstisyel ödem, myokardial hücre şişmesi, doku içine kanama, nüve kaybı-silikleşmesi, nüve piknozu, kontraksiyon bant nekrozu, kros sitriasyon kaybı, kas fibrillerinde dalgalanma, nötrofil infiltrasyonu, yoğun eozinofilik sitoplazma, kas fibrillerinde ayrılma, nekroz, hücrelerde vakuolar değişiklikler açısından incelendi. Değerlendirmede Bozyaka Eğitim ve Araştırma Hastanesi Patoloji AD tarafından geliştirilen Kalp Histolojik Hasar Skoru (KHHS) kullanıldı. KHHS da 0; hasar yok ya da minimal hasar, 1; hafif hasar, 2; orta hasar, 3; şiddetli hasar şeklinde derecelendirildi.

İstatistik: Gruplar arası farklılık araştırması Kruskal-Wallis, ikili grup karşılaştırmaları için Mann-Whitney U testleri kullanıldı, $p < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

BULGULAR

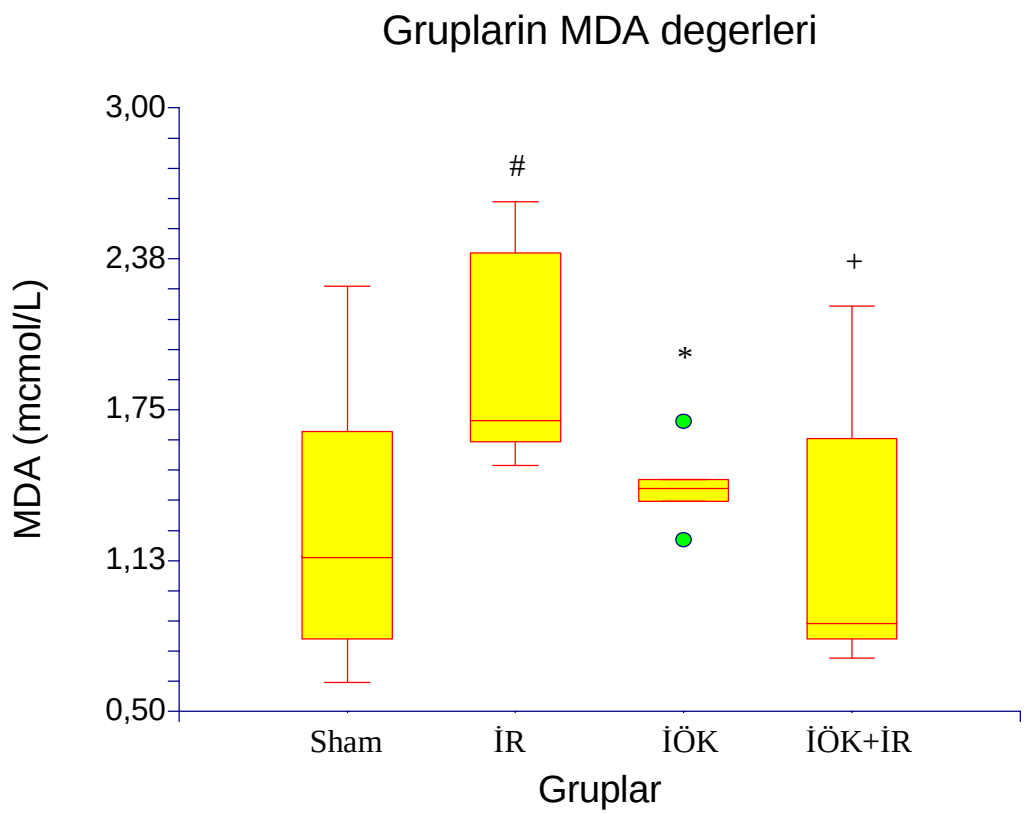
DEÜTF Deney Hayvanı Laboratuvarı' nda yapılan çalışmaya toplam 28 rat dahil edildi. Sham ve İR grubunda ölen iki rat çalışma dışı bırakıldı, 26 denek protokolü tamamladı.

MDA

Sham grubu ile İR grubu karşılaştırıldığında MDA değerleri anlamlı farklıyken (p=0,026), İÖK ve İÖK+İR grupları sham ile kıyaslandığında farklılık saptanmadı (p<0,05). İR grubunun miyokard MDA değerleri İÖK ve İÖK+İR gruplarından anlamlı olarak yüksek bulundu (p=0,008, p=0,022).

Tablo 2: Çalışma gruplarının miyokard Malondialdehit değerleri (median, minimum-maksimum)

GRUPLAR	**MDA ($\mu mol\ L^{-1}$) Median (Min.-Maks.)**
Sham (n: 6)	1,145 (0,62-2,26)
İR (n:6)	1,71 (1,52-2,61)
İÖK (n:7)	1,43 (1,21-1,70)
İÖK+İR (n:7)	0,87 (0,72-2,18)

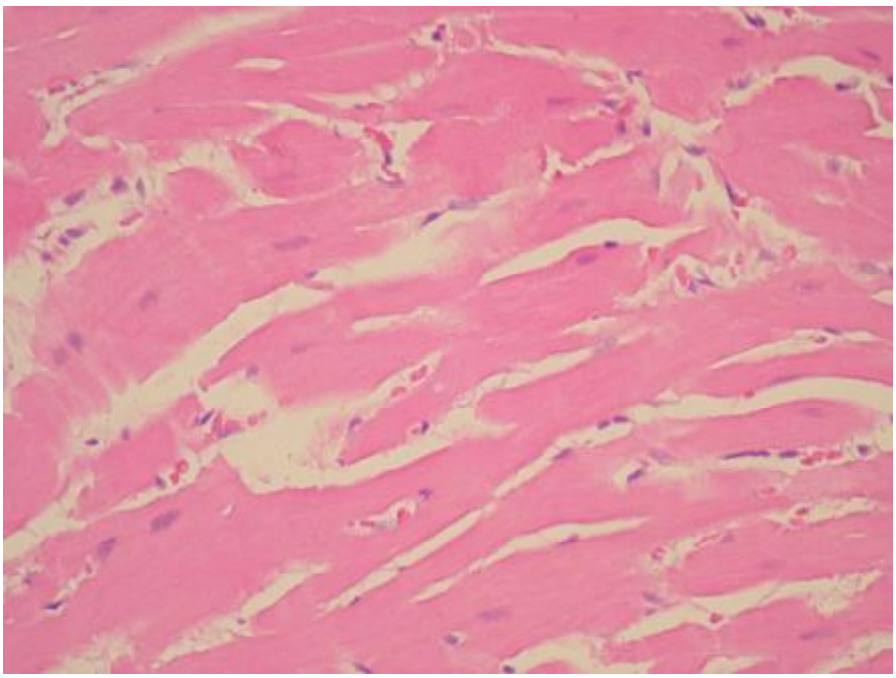


Grafik 1: Grupların MDA değerlerinin dağılımı

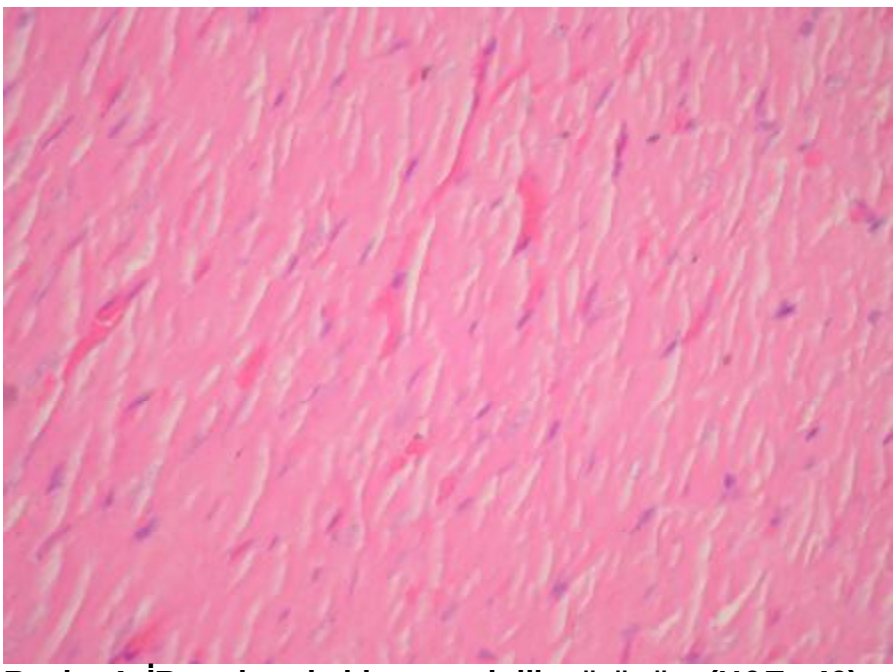
# p<0.05 İR grubu sham grubu ile karşılaştırıldığında
* p<0.05 İÖK grubu İR grubu ile karşılaştırıldığında
+ p<0.05 İÖK+ İR grubu İR grubu ile karşılaştırıldığında

Kalp Histopatolojik Hasar Değerlendirmesi

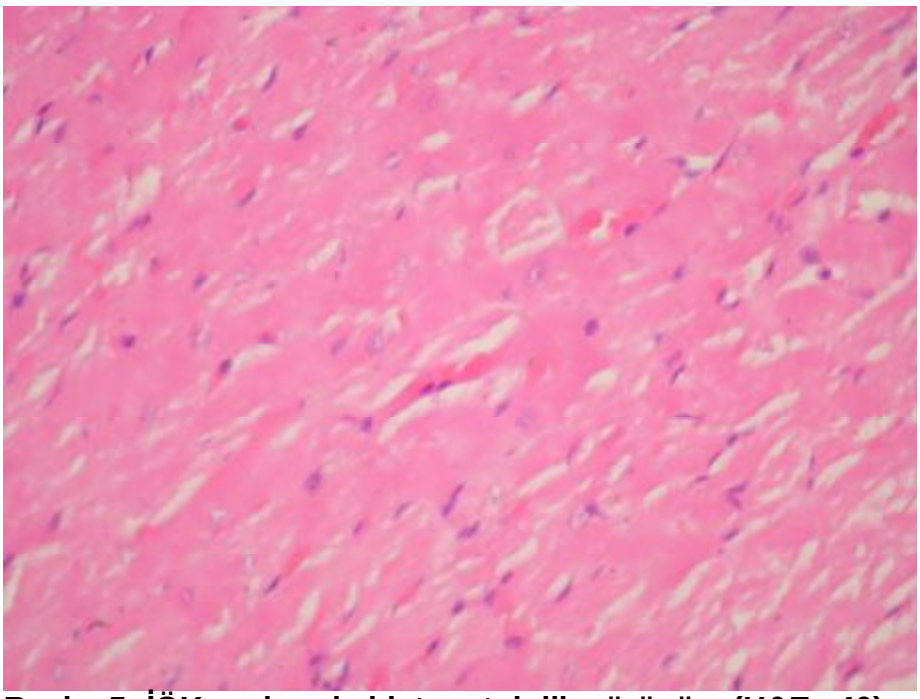
Grupların mikroskopik incelemeleri (Olympus BX50 Olympus optical Co. Ltd. Japan) sonucunda, sham grubu ile diğer gruplar arasında histopatolojik olarak bir fark olmadığı, tüm grupların hasar derecelendirmesinin 0 olduğu saptandı. Gruplara ait resimler (Olympus corporation digital camera model no: C-5060 wide zoom, Japan) sırasıyla Resim 3, 4, 5 ve 6' da gösterilmiştir.



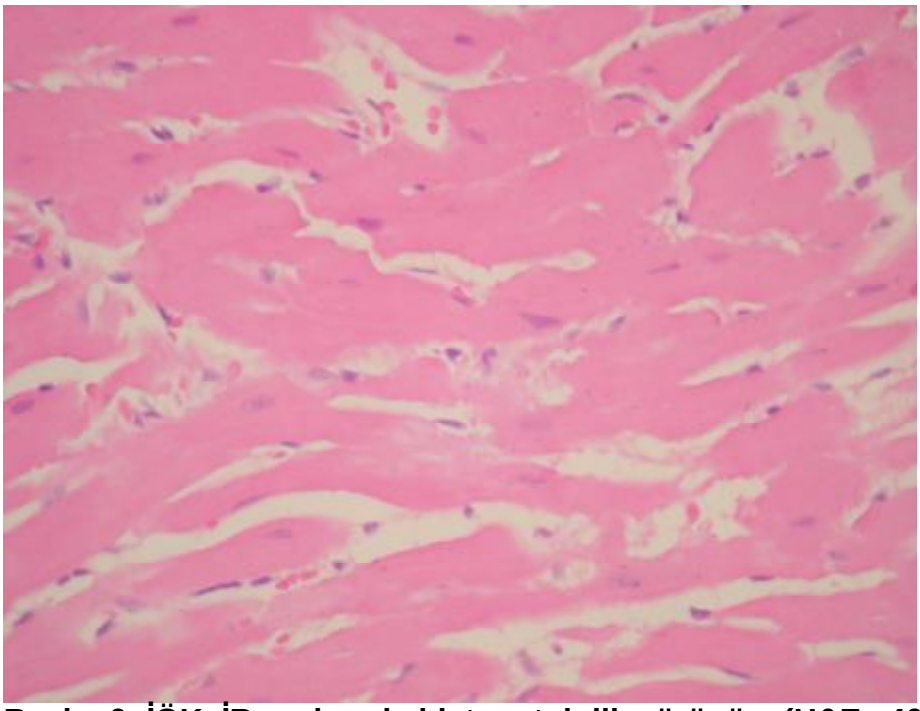
Resim 3: Sham grubunda histopatolojik görünüm (H&E x40)



Resim 4: İR grubunda histopatolojik görünüm (H&E x40)



Resim 5: İÖK grubunda histopatolojik görünüm (H&E x40)



Resim 6: İÖK+İR grubunda histopatolojik görünüm (H&E x40)

TARTIŞMA

Direkt iskemi oluşturmaksızın, uzak İR ve uzak İÖK'nın miyokard üzerine etkilerinin araştırıldığı bu çalışmada, tek taraflı alt ekstremite İR' sinin miyokardda lipid peroksidasyonuna neden olduğu ve uzak İÖK'nın bu etkiyi azalttığı saptandı.

Koroner arter hastalığı, koroner arter greftleme, trombolitik tedavi, balon anjiyoplasti, tıkayıcı arteriyel hastalıklar, inme, miyokütanöz doku transferi, reimplantasyon ve turnike uygulamaları gibi klinik durumlarda İR hasarı en sık izlenen hücre yaralanması tipidir (80).

İskemi ile intrasellüler enzim, antioksidanlar ve homeostatik mekanizmaların kayba uğradığı bilinmektedir (33). Hasarda en önemli mekanizma proinflamatuvar hücrelerden kaynaklanan ROÜ' nün direkt toksik etkisidir (31). Serbest radikaller etkisini hücre membranında gösteren LP' yi başlatır (5,34). Kardiyomiyozitlerde süperoksit dismütaz, katalaz, glutatyon peroksidaz, glutatyon, koenzim Q10 (ubikuinon) gibi endojen antioksidan savunma sistemleri devreye girer (5). Sonuçta, miyokardiyal sersemlik (5,29), nekroz (5,29), apopitozis (5), vasküler disfonksiyon (5), disritmi (29,38,39) ve kalp yetmezliği (40,43) ortaya çıkabilir.

İskemi reperfüzyon hasarı sonucu oluşan kontraktil yetmezlikle karekterize miyokardiyal sersemlik geçici bir durum olmakla beraber inotropik ilaç ve mekanik dolaşım desteği gerektirebilir (28).

İstemli oluşturulan bir İR modeli olan turnike uygulaması, sağlıklı kişilerde minimal hemodinamik değişikliklere neden olmakla birlikte bazı hastaların artmış komplikasyon riskine sahip olduğu bilinmektedir. Örneğin, morbid obezlerde turnike kafı uyumsuzluğu nedeniyle periferik sinir hasarı, uzamış immobilizasyon ile pulmoner emboli, sol ventrikül disfonksiyonunda kalp yetmezliği, önceden periferik vasküler cerrahi geçirenlerde arteriyel tıkanıklığa eğilim artar (2).

Bilgen ve ark (81) tek taraflı total diz protezi operasyonlarında turnike etkisinin irdelendiği klinik araştırmalarında, turnikenin total kanama miktarını artırdığını,

postoperatif rehabilitasyonu geciktirdiğini ve komplikasyon oranının turnike kullanılmayan olgulara göre yüksek olduğunu bildirmişlerdir.

Lynch ve ark (82) tek seansta bilateral total diz protezi yapılan hastalarda, unilateral uygulananlara oranla kardiyovasküler komplikasyonların 4, akut deliryum tablosunun 3 ve serebrovasküler olayların 2.5 kat fazla görüldüğünü saptamışlardır. Bu sonuç olgularda uzun İR süresinin çoklu sistem hasarı oluşturduğunu belgelemektedir.

Deneysel araştırmalarla etki mekanizması araştırılan İR' de en çok öne çıkan olaylardan biri LP' dir. Serbest radikallerin hücrede başlattığı en zararlı etkilerden LP' nin son ürünlerinden olan MDA, membran bileşenlerinin polimerizasyonuna ve çapraz bağ yapmasına neden olur (35). Miyokard iskemisinde fosfolipaz A2 ve fosfolipidlerden araşidonik asit üretiminin arttığı öne sürülmektedir. Starkopf ve ark. (83) izole kalp dokusunda gerçekleştirdikleri araştırmalarında, fosfolipaz A2 ve lipooksijenaz derivesi lipidin İÖK' da sekonder aracılar olduğuna dair kanıtlar elde etmişlerdir. Buna karşın Adachi ve ark (84) farelerde 3 saat tek taraflı alt ekstremite iskemisi ve 1 saat reperfüzyon sonrası çeşitli organlarda LP' yi değerlendirmişler, böbrek ve karaciğerde LP gösterilirken kalbin etkilenmediğini öne sürmüşlerdir.

Miyokard İR hasar mekanizmalarının, ksantin oksidaz, nötrofil, mitokondriyal elektron transport zinciri, araşidonik asid ürünleri, Ca^{+} dengesinde bozulma ve katekolaminler olduğu bilinmektedir (29). Miyokarda direkt uygulanan İR sonrasında kalp yetmezliği gelişiminde artmış ROÜ, LP ve azalmış antioksidanların rolü vardır (41). Uzak İR' de; ROÜ ve LP' nin, miyokardda önce hipertrofi, ardından kalp yetmezliği gelişiminde rol oynadığı ileri sürülmektedir (40). Kas İR' sinin akciğerde benzer şekilde yaralanmaya neden olduğu bildirilmiştir. Duru ve ark (85) ratlarda 3 saat bilateral alt ekstremite iskemisi ve 2 saat reperfüzyonu sonrasında, Olguner ve ark. (20) tek taraflı alt ekstremite İR' sini (4 saat iskemi, 2 saat reperfüzyon) takiben akciğerde LP' yi ve histolojik hasarı göstermişlerdir.

İskemi reperfüzyon hasarının azaltılması veya engellenmesine yönelik yaklaşımlar değişik girişim ve medikasyon çabalarından oluşur. Antioksidan tedavi (süperoksit dismütaz, N-asetil sistein, allopurinol, katalaz, vitamin-E, thiol, mannitol), Ca^{+} antagonistleri, anjiyotensin-dönüştürücü enzim inhibitörleri, antikompleman

tedavi, lökosit filtrasyonu, antisitokin veya antilökosit adezyon molekülü, endotelin reseptör antagonistleri, PAF antagonistleri, LTB_4 antagonistleri ilaç uygulamalarıyken, kontrollü reperfüzyon, akut aralıklı hipoksi (86) ve İÖK uygulama yöntemlerindendir (28,29).

Murry ve ark. (7) tarafından 20 yıl önce miyokardda tanımlanan İÖK, güncelliğini sürdüren ve bazı uygulamalarla kliniğe girmiş bir yöntem olma özelliğini devam ettirmektedir. Direkt veya Przyklenk ve ark (12) tarafından tanımlandığı gibi uzak olarak uygulanabilir.

Kalp ile ilgili çalışmalarda İÖK, direkt kalbe (6,7) veya vücudun başka bir yerinde, örneğin mezenter arterde (22), turnike ile alt ekstremitede (21), uygulanarak etkinliliği gösterilmiştir. İskemik önkoşullama mekanizmasında adenozin (4,47,63,68), adenozin reseptörleri (44,45,68,75), NO (9,11,47,49,63), ısı şok proteinleri (3,47), PKC (10,47,51,53) ve mitokondriyal K^+ATP kanalları (18,53-55,57); uzak İÖK mekanizmasında da yine adenozin (75), NO (21), opioid reseptör aktivasyonu (22,73), K^+ATP kanallarının (55) rol oynadığı ileri sürülmektedir.

Direkt miyokard İÖK' sını araştıran Laurikka ve ark (6) yaptıkları klinik çalışmada sol ön inen koroner artere by-pass öncesi 2 kez 2 dk oklüzyon ve 3 dk reperfüzyonunun miyokardiyal performansı artırdığını göstermişlerdir. Büyükateş ve ark (87) klinik çalışmalarında by-pass öncesi 2 kez İÖK ile daha fazla NO üretimi, daha az miyokardiyal iskemi ve kalbin fonksiyonel toparlanmasının daha iyi olduğunu bildirmişlerdir. Aynı araştırmacılar İÖK grubunda plazma MDA düzeylerini anlamlı olarak düşük bulmuştur. Çalışmamızda İR grubundaki MDA değerlerinin *sham* grubuna oranla yüksek bulunması tek taraflı alt ekstremite İR' sinin miyokardda LP' ye yol açtığını göstermiştir. Bu sonuç literatür ile uyumlu olmakla beraber miyokardda direkt iskemi oluşturmaksızın elde edildiği için ayrıca önemli gözükmektedir. İR grubundaki MDA değerlerinin İÖK ve İÖK+İR gruplarına oranla anlamlı yüksek bulunması, uyguladığımız uzak İÖK'nın miyokardiyal LP'yi azalttığı yönünde yorumlanmıştır. Malondialdehit düzeyleri genellikle spektrofotometrik olarak ölçülür (87). Çalışmamızda HPLC yönteminin kullanılması hassas sonuçlar elde etmemize katkıda bulunmuş olabilir.

Uzak İÖK için femoral arter oklüzyonu gibi invaziv yöntemler olmakla birlikte turnike gibi kliniğe uygun noninvaziv yöntemler alternatif olarak gösterilmektedir (88). Döngü sayısının İÖK' de etkinliğin önemli bir parçası olduğu belirtilerek, Saita ve ark. tarafından üç kez ve 10 dk iskemi, 10 dk reperfüzyonun en uygun yöntem olduğu bildirilmiştir (65). Bu nedenle çalışmamızda noninvaziv turnike seçeneği ile 3 döngü 10' ar dk.lık İR periyodları seçilmiştir.

Cheung ve ark (69) kardiyak cerrahi geçiren çocuklarda, alt ekstremiteye turnike ile uyguladıkları uzak İÖK grubunda (4 döngü 5 dk' lık) miyokard fonksiyonunun daha iyi, miyokard hasarının ise daha az olduğunu bulmuşlardır. Kharbanda ve ark (70) ve Andreka ve ark (89) ekstremiteye, Patel ve ark (22) mezenter artere uyguladıkları uzak İÖK' nin miyokard enfarkt alanını azalttığını göstermişlerdir. Yine Kharbanda ve ark (90) deneysel çalışmalarında alt ekstremite uzak İÖK' nin kardiyopulmoner by-pass' ın neden olduğu doku hasarından koruduğunu göstermişlerdir. Bir deneysel araştırmada alt ekstremiteye 4 kez 5 dakikalık İÖK uygulamışlar ve iskemi sonrası koroner direncin azaldığını, koroner akımın arttığını bildirmişlerdir (71). Zhou ve ark (72) klinik çalışmalarında İÖK sonrası sol ön inen koroner arterin akım paternini Doppler ile değerlendirmişler ve uzak İÖK'nın erken reperfüzyon sürecinde hiperemi ile diyastolik akım hızını artırdığını bildirmişlerdir. Tüm bu çalışmalarda miyokarda direkt iskemi uygulanmış, direkt veya uzak İÖK'nın olumlu etkileri irdelenmiştir. Ulaşabildiğimiz kaynaklara göre miyokardda direkt iskemi oluşturulmadan uzak İR ve İÖK' nın lipid peroksidasyonu üzerine etkilerini sorgulayan başka makaleye ulaşamamamız, çalışmamızın ilk deneysel araştırma olabileceğini telkin etmektedir.

İskemi reperfüzyon hasarını oluşturan faktörlerden biri de nötrofil akümülasyonu ve infiltrasyonudur. Barry ve ark (91) deneysel aort İR' sinde miyeloperoksidaz (MPO) aktivitesini ölçerek nötrofil sekestrasyonunu değerlendirmişler, akciğer ve interkostal kaslarda artmış MPO düzeyleri saptarken karaciğer, böbrek ve kalp düzeylerinin etkilenmediğini bulmuşlardır. İskemide kalp kasında 0-30 dk. da kas fibrillerinde dalgalanma, 4-12 saatte koagülasyon nekrozu, ödem, hemoraji ve nötrofilik infiltrasyon, 18-24 saatte, nüve piknozu, keskin eozinofilik sitoplazma, marjinal kontraksiyon band nekrozu, 24-72 saatte ise total koagülasyon nekrozu, sitriasyon ve nüve kaybı, yoğun nötrofil infiltrasyonu

izlenmektedir (92). Miyokardda İR'nin neden olduğu histopatolojik değişiklikler oldukça geç izlenmektedir. Çalışma gruplarımızın hiçbirinde patolojik bulgu saptanamaması, reperfüzyon süresinin 2 saat olarak belirlenmesiyle olası hücresel değişikliklerin görülmesini engellediğini düşündürmüştür. Ayrıca miyokard nötrofil infiltrasyonunun infarkt bölgelerinin büyüklüğü ile korele olduğu bildirilmesi (93) ve direkt iskemi oluşturmamamız da beklenen değişikliklerin izlenemeyişinde etken olabilir. Reperfüzyon süresi uzatılarak oluşturulacak farklı bir protokolle nötrofil akümülasyonu araştırılabilir.

Milei ve ark. (94) 2007 de yayımladıkları 24 hastayı içeren serilerinde koroner by-pass sırasında ciddi oksidatif stres oluştuğunu ancak miyokardın elektron mikroskobik görüntülerinde majör yapısal değişiklik izlenmediğini rapor etmişlerdir. Çalışmamızda histopatolojik olarak değişiklik saptanmama nedeni miyokardın dirençli bir doku olmasından da kaynaklanabilir.

Sonuç olarak bu çalışma ile tek taraflı alt ekstremite İR' sinin miyokarda LP'ye neden olduğu ve bu etkinin uzak İÖK ile azaltılabildiği saptanmıştır. Çalışmanın sınırlamaları teknik yetersizlikler nedeniyle nötrofil infiltrasyonu göstergesi olan MPO aktivitesi ve miyokard spesifik enzimlerinin değerlendirilememesidir.

Araştırmanın sağlıklı ratlarda gerçekleştirilmesi nedeniyle; klinikte daha çok karşılaşılan koroner arter hastalığı, ateroskleroz, diyabet, hipertansiyon, hiperkolesteremi gibi yandaş sorunların mevcudiyetinde, turnike altında gerçekleştirilen operasyonları taklit eden deneysel koşullarda uzak İÖK' nin olası etkileri araştırılabilir. Yüksek riskli, geriyatrik ve turnike ile elektif ekstremite cerrahisi geçirecek hastalarda, İÖK' nin perioperatif kalp yetmezliği, disritmi gibi sorunlardan koruyabilecek noninvaziv bir yöntem olarak benimsenebileceği ön görülmüştür.

SONUÇ ve ÖNERİLER

- Bu çalışmada, uzak İR, direkt iskemi oluşturulmamış sağlıklı miyokardda LP' ye yol açmıştır.
- Tek taraflı alt ekstremiteye uygulanan İÖK, LP' yi azaltmıştır.
- İÖK+İR grubundaki MDA değerleri sham grubundan daha düşük bulundu. Bize daha ileri araştırma olanakları sağlayabilir.
- MPO ve miyokard spesifik enzimlerle desteklenecek çalışmalar daha özgül sonuç verebilir.
- Kliniğe uyarlanabilmesi için yandaş sorunlu rat modellerinde de tekrarlanması uygun olabilir.

KAYNAKLAR

1. Mathru M, Dries DJ, Barnes L, Herbert ME, et al. Tourniquet-induced exsanguination in patients requiring lower limb surgery. An ischemia-reperfusion model of oxidant and antioxidant metabolism. *Anesthesiology 1996; 84: 14-22*

2. Kam PCA, Kavanagh R, Yoong FF, Kavanaugh R. The arterial tourniquet: pathophysiological consequences and anaesthetic implications. *Anaesthesia 2001; 56: 534-45*

3. Seekamp A, Jochum M, Ziegler M, van Griensven M, et al. Cytokines and adhesion molecules in elective and accidental trauma-related ischemia/reperfusion. *J Trauma 1998;44:874-82*

4. Yassin MMI, Harkin DW, Barros D'Sa AAB, Halliday MI, et al. Lower limb ischemia-reerfusion injury triggers a systemic inflammatory response and multiple organ dysfunction. *World J Surg 2002;26:115-121*

5. Kevin LG, Novalija E, Stowe DF. Reactive oxygen species as mediators of cardiac injury and protection: The relevance to anesthesia practice. *Anesth.Anal 2005;101:1275 –87*

6. Laurikka J, Zhong-Kai W, Lisalo P, Kaukinen L, et al. Regional Ischemic Preconditioning Enhances Myocardial Performance in Off-Pump Coronary Artery Bypass Grafting. *Chest 2002;121;1183-1189*

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

8. Bolli R, Manchikalapudi S, Tang XL, Takano H, et al. The protective effect of late preconditioning against myocardial stunning in conscious rabbits is mediated by nitric oxide synthase: evidence that nitric oxide acts both as a trigger and as a mediator of the late phase of ischemic preconditioning. *Circ. Res.1997;81:1094-1107*

9. Takano H, Tang XL, Qui Y, Guo Y, et al. Nitric oxide donors induce late preconditioning against myocardial stunning and infarction in conscious rabbits via an antioxidant-sensitive mechanism. *Circ. Res. 1998;83:73-84*

10. Ping P, Takano H, Zhang J, Tang XL. Isoform-selective activation of protein kinase C by nitric oxide in the heart of conscious rabbits: a signaling mechanism for both nitric oxide-induced and ischemia-induced preconditioning. *Circ Res. 1999;84:587-604*

11. Qiu Y, Rizvi A, Tang XL, Manchikalapudi S, et al. Nitric oxide triggers late preconditioning against myocardial infarction in conscious rabbits. *Am J Physiol. 1997;273:H2931-2936*

12. Przyklenk K, Bauer B, Ovize M, Kloner RA, et al. Regional ischemic preconditioning' protects remote virgin myocardium from subsequent sustained coronary occlusion. *Circulation 1993;87:893–9. 103:1624 –30*

13. Papanastasiou S, Estdale SE, Homer-Vanniasinkam S, Mathie RT. Protective effect of preconditioning and adenosine pretreatment in experimental skeletal muscle reperfusion injury. *Br J Surg 1999;86:916-22*

14. Islam CF, Mathie RT, Dinneen MD, Kiely EA, et al. Ischaemia-reperfusion injury in the rat kidney: the effect of preconditioning. *Br J Urol 1997;79:842-7*

15. Soncul H, Oz E, Kalaycioglu S. Role of ischemic preconditioning on ischemia-reperfusion injury of the lung. *Chest 1999;115:1672-7*

16. Davıs JM, Gute DC, Jones S, Krsmanovıc A, et al. Ischemic preconditioning prevents postischemic P-selectin expression in the rat small intestine. *Am J Physiol 1999;277:H2476–H2481*

17. Peralta C, Prats N, Xaus C, Gelpi E, et al. Protective effect of liver ischemic preconditioning on liver and lung injury induced by hepatic ischemia-reperfusion in the rat. *Hepatology 1999;30:1481–1489*

18. Heurteaux C, Lauritzen I, Widmann C, Lazdunski M. Essential role of adenosine, adenosine Al receptors, and ATP-sensitive K+ channels in cerebral ischemic preconditioning (forebrain ischemia/gene expression). *Proc Natl Acad Sci USA 1995;92:4666–4670*

19. Kharbanda RK, Peters M, Walton B, Kattenhorn M, et al. Ischemic preconditioning prevents endothelial injury and systemic neutrophil activation during ischemia-reperfusion in humans in vivo. *Circulation 2001;103:1624-30*

20. Olguner C, Koca U, Kar A, Karci A ve ark. Ischemic preconditioning attenuates the lipid peroxidation and remote lung injury in the rat model of unilateral lower limb ischemia reperfusion. *Acta Anaesthesiol Scand 2006;50:150–155*

21. Chen X, Wu B, Wang J, Bai T. Mechanism of the protective effects of noninvasive limbs preconditioning on myocardial ischemia-reperfusion injury. *Chin Med J 2005;118(20):1723-1727*

22. Patel HH, Moore J, Hsu AK, 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*

23. Yassin MM, Barros D'Sa AA, Parks G, Abdulkadir AS, et al. Mortality following lower limb ischemia-reperfusion: a systemic inflammatory response? *World J Surg 1996;20:961-6*

24. Girardis M, Milesi S, Donato S, Raffaelli M, et al. The hemodinamic and metabolic effect of tourniquet application during knee surgery. *Anesth Analg 2000;91:727-31*

25. Sharrock NE, Savarese JJ. Anesthesia for orthopedic surgery. *Miller RD, ed. Anesthesia.5th ed. New York: Churchill Livingston 2000;2130-36*

26. Pollak AN, Battistella F, Pettey J, Olson S, et al. Reamed femoral nailing in patients with multible injuries: adverse effects of tourniquet use. *Clin Orthop 1997; 339:41-46*

27. Takahashi S, Mizutani T, Sato S. Changes in oxygen consumption and carbon dioxide elimination after tourniquet release in patients breathing spontaneously under epidural anesthesia. *Anesth Analg 1998;86:90-4*

28. Collard, CD, Gelman S. Pathophysiology, Clinical Manifestations and Prevention of Ischemia-Reperfusion Injury. *Anesthesiology 2001;94:1133-1138*

29. Maxwell S, Lip G. Reperfusion injury: a review of the pathophysiology,clinical manifestations and therapeutic options. *Int. J. Cardiol. 1997;58: 95-117*

30. Carden D. Granger N. Pathophysiology of ischemia-reperfusion injury. *J.Pathol. 2000;190:255-66*

31. Vinod N. K, Rupinder SM, Murugesan C, Muralidhar K. Myocardıal ıschaemıc pre-condıtıonıng. *Indian J. Anaesth. 2004;48:(2)93-99*

32. Sun Z, Wang X, Lasson A, Bojesson A, et al. Effects of inhibition of PAF, ICAM-1 and PECAM-1 on gut barrier failure caused by intestinal ischemia and reperfusion. *Scand J Gastroenterol 2001, 36;1: 55-65*

33. Vermeiren GLJ, Claeys MJ, Bockstaele DV, Grobben B, et al. Reperfusion injury after focal myocardial ischaemia: polymorphonuclear leukocyte activation and its clinical implications. *Resuscitation 2000;45;35–61*

34. Kahraman S, Kılınç K, Dal D, Erdem K. Propofol attenuates formation of lipid peroxides in tourniquet-induced ischemia-reperfusion injury. *BJA 1997;78:279-281*

35. Girotti AW. Lipid hydroperoxide generation, turnover, and effector action in biological systems. *J Lipid Res. 2000; 39:1529-1542.*

36. Becker LB. New concepts in reactive oxygen species and cardiovascular reperfusion physiology. *Cardiovascular Research 2004;61:461-470*

37. Maulik N, Yoshida T, Das DK. Oxidative stress developed during the reperfusion of ischemic myocardium induces apoptosis. *Free Radic Biol Med 1998;24:869 –75.*

38. Aiello EA, Jabr RI, Cole WC. Arrhythmia and Delayed Recovery of Cardiac Action Potential During Reperfusion After Ischemia Role Of Oxygen Radical–Induced No-Reflow Phenomenon. *Circulation Research.* 1995;77:153-162

39. Gary F. Baxter. The neutrophil as a mediator of myocardial ischemia-reperfusion injury: time to move on. *Basic Res Cardiol 2002; 97: 268 – 275*

40. Dhalla AK, Hill MF, Singal PK. Role of oxidative stress in transition of hypertrophy to heart failure. *J Am Coll Cardiol 1996;28:506 –14.*

41. Hill MF, Singal PK. Right and left myocardial antioxidant responses during heart failure subsequent to myocardial infarction. *Circulation 1997;96:2414 –20*

42. Kim SY, Kim SJ, Kim BJ, Rah SY, et al. Doxorubicin-induced reactive oxygen species generation and intracellular Ca2+ increase are reciprocally modulated in rat Cardiomyocytes. *Experimental and Molecular Medicine. 2006; 38, No. 5, 535-545*

43. Ide T, Tsutsui H, Hayashidani S, Kang D. Mitochondrial DNA damage and dysfunction associated with oxidative stress in failing hearts after myocardial infarction. *Circ Res 2001;88: 529–35*

44. Kristo G, Yoshimura Y, Keith BJ, Stevens RM, et al. Adenosine A1/A2a receptor agonist AMP-579 induces acute and delayed preconditioning against in vivo myocardial stunning. *Am J Physiol Heart Circ Physiol 2004;287:2746–2753*

45. Zhao T, Xi L, Chelliah J, Levasseur JE, et al. Inducible Nitric Oxide Synthase Mediates Delayed Myocardial Protection Induced by Activation of Adenosine A1 Receptors : Evidence From Gene-Knockout Mice. *Circulation 2000;102;902-907*

46. Peralta C, Hotter G, Closa D, Gelpí E, et al. Protective effect of preconditioning on the injury associated to hepatic ischemia reperfusion in the rat: role of nitric oxide and adenosine. *Hepatology 1997;25:934–937*

47. Koti RS, Seifalian AM, Davidson BR. Protection of the liver by ischemic preconditioning: a review of mechanisms and clinical applications. *Dig Surg 2003;20:383–396*

48. Howell JG, Zibari GB, Brown MF, Burney DL, et al. Both ischemic and pharmacological preconditioning decrease hepatic leukocyte/endothelial cell interactions. *Transplantation 2000;69:300–306*

49. Bolli R, Dawn B, Tang XL, Qiu Y, et al. The nitric oxide hypothesis of late preconditioning. *Basic. Res. Cardiol. 1998;93:325-338*

50. Vegh A, Szekeres L, Parrat JR. Preconditioning of the ischemic myocardium; involment of the L-arginine nitric oxide pathway. *Br. J. Pharmacol. 1992;107:648-652*

51. Banerjee S, Tang XL, Qiu Y, Takano H. Nitroglycerin induces late preconditioning against myocardial stunning via PKCdependent pathway. *Am J Physiol. 1999;277:H2488-2494*

52. Miyoshi H, Nakaya Y, Moritoki H. Nonendothelial-derived nitric oxide activates the ATP-sensitive K+ channel of vascular smooth muscle cells. *FEBS Lett. 1994; 345:47-49*

53. Takashi E, Wang Y, Ashraf M. Activation of mitochondrial K+ ATP channel elicits late preconditioning against myocardial infarction via protein kinase C signaling pathway. *Circ Res. 1999;85:1146-1153, 851*

54. Sasaki N, Sato T, Ohler A, O'Rourke B, et al. Activation of mitochondrial ATP-dependent potassium channels by nitric oxide. *Circulation, 2000;101:439-445*

55. Gross GJ, Fryer RM. Sarcolemmal versus mitochondrial ATP-sensitive K+ channels and myocardial preconditioning. *Circ Res. 1999;84:973-979*

56. Garlid KD, Paucek P, Yarov-Yarovoy V, Murray HN, et al. Cardioprotective effect of diazoxide and its interaction with mitochondrial ATP-sensitive K+ channels. Possible mechanism of cardioprotection. *Circ Res. 1997;81:1072-1082*

57. Baines CP, Liu GS, Birincioglu M, Critz SD, et al. Ischemic preconditioning depends on interaction between mitochondrial K+ ATP channels and actin cytoskeleton. *Am J Physiol. 1999;276:H1361-1368*

58. Parratt JR, Vegh A. Delayed protection against ventricular arrhythmias by cardiac pacing*. Heart.1997;78(5):423-5*

59. Kaszala K, Vegh A, Papp JG, Parratt JR. Modification by bradykinin B2 receptor blockade of protection by pacing againts ischemia-induced arrhythmias. *Eur J Pharmacol. 1997;328:51-60*

60. Bouchard JF, Chouinard J, Lamontagne D. Role of kinins in the endothelial protective effect of ischaemic preconditioning. *Br J Pharmacol. 1998;123:413-420*

61. Zacharowski K, Otto M, Hafner G, Chatterjee PK, et al. Endotoxin induces a second window of protection in the rat heart as determined by using p-nitro-blue tetrazolium staining, cardiac troponin T release, and histology. *Arterioscler Thromb Vasc Biol. 1999;19:2276-2280*

62. Agnes V, Katalin G, Rastegar MA, Julius GP, et al. Delayed protection against ventricular arrhythmias by monophosphoryl lipid-A in a canine model of ischaemia and reperfusion. *European Journal of Pharmacology. 1999;382:81–90*

63. Peralta C, Hotter G, Closa D, Gelpi E, et al. Protective effect of preconditioning on the injury associated to hepatic ischemia reperfusion in the rat: role of nitric oxide and adenosine. *Hepatology 1997;25:934–937*

64. Addison PD, Neligan PC, Ashrafpour H, Khan A, et al. Noninvasive remote ischemic preconditioning for global protection of skeletal muscle against infarction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol 2003;285:H1435–H1443*

65. 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? *Br J Plast Surg 2002;55:241-245*

66. Gurcun U, Discigil B, Boga M, Ozkisacik E ve ark. Is remote preconditioning as effective as direct ischemic preconditioning in preventing spinal cord ischemic injury? *J Surg Res 2006;135:1-9*

67. Dave KR, Saul I, Prado R, Busto R, et al. Remote organ ischemic preconditioning protect brain from ischemic damage following asphyxial cardiac arrest. *Neuroscience Letters 2006;404:170–175*

68. Kalikiri PC, Sachan R, Sachan GS. Ischaemic and Anaesthetic Preconditioning of the Heart: An Insight into the Concepts and Mechanisms. *JIACM 2005; 6(1):45-7*

69. Cheung MMH, Kharbanda RK, Konstantinov IE, Shimizu M, et al. Randomized controlled trial of the effects of remote ischemic preconditioning on children undergoing cardiac surgery. First clinical application in humans. *J Am Coll Cardiol 2006;*47:2277– 2282

70. Kharbanda RK, Mortensen UM, White PA, Kristiansen SB, et al. Transient limb ischemia induces remote ischemic preconditioning in vivo. *Circulation 2002;106:2881–2883*

71. Shimizu M, Konstantinov IE, Kharbanda RK, Cheung MH, et al. Effects of intermittent lower limb ischaemia on coronary blood flow and coronary resistance in pigs. *Acta Physiol (Oxf). 2007 Jun;190(2):103-9*

72. Zhou K, Yang B, Zhou XM, Tan CM, et al. Effects of remote ischemic preconditioning on the flow pattern of the left anterior descending coronary artery in normal subjects*. Int J Cardiol 2007 Mar 12;(Letter to the editor)*

73. Zhang SZ, Wang NF, Xu J, Gao Q, et al. Kappa-opioid receptors mediate cardioprotection by remote preconditioning. *Anesthesiology 2006 Sep;105(3):550-6*

74. Loukogeorgakis SP, Panagiotidou AT, Broadhead MW, Donald A, et al. Remote ischemic preconditioning provides early and late protection against endothelial ischemia-reperfusion injury in humans: role of the autonomic nervous system. *J Am Coll Cardiol. 2005; 2;46(3):450-6*

75. Takaoka A, Nakae I, Mitsunami K, Yabe T, 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*

76. Konstantinov IE, Arab S, Kharbanda RK, Li J, et al. The remote ischemic preconditioning stimulus modifies inflammatory gene expression in humans. *Physiological Genomics* 2004;19:143-150

77. Kanoria S**,** Jalan R, Davies NA, Seifalian AM, et al. Remote ischaemic preconditioning of the hind limb reduces experimental liver warm ischaemia-reperfusion injury. *Br J Surg.2006; 93(6):762-8*

78. Şahin E. Karaciğerin reperfüzyon hasarında uzak iskemik önkoşullama ve direkt iskemik önkoşullamanın etkinliği. Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi. Uzmanlık Tezi. 2007; 31

79. Strock PE, Majno G. Vascular responses to experimental tourniquet ischemia. *Surg Gynecol Obstet 1969;129:309-18*

80. Atahan E, Ergun Y, Kurutas EB, Cetinus E ve ark. Ischemia-Reperfusion Injury in Rat Skeletal Muscle is Attenuated by Zinc Aspartate. *Journal of Surgical Research. 2007:137;109–116*

81. Bilgen ÖF, Yılmaz Y. The effect of tourniquet use in total knee prothesis. *Acta Orthop.Traumatol.Turc 2001;35:390-394*

82. Lynch N, Trousdale RT, Ilstrup DM. Complications After Concomitant Bilateral Total Knee Arthroplasty in Elderly Patients. *Mayo Clinic Proceedings. 1997;72(9):799-805*

83. Starkopf J, Andreasen TV, Bugge E, Ytrehus K. Lipid peroxidation, arachidonic acid and products of the lipoxygenase pathway in ischaemic preconditioning of rat heart. *Cardiovasc Res.1998;37(1):66-75*

84. Adachi J, Kurisaki E, Kudo R, Nakagawa K. Enhanced lipid peroxidation in tourniquet-release mice. *Clin Chim Acta2006;371(1-2):79-84*

85. Duru S, Koca U, Öztekin S, Olguner Ç ve ark. Antithrombin III pretreatment reduces neutrophil recruitment into the lung and skeletal muscle tissues in the rat model of bilateral lower limb ischemia and reperfusion: a pilot study. *Acta Anaesthesiol Scand 2005; 49:1142—1148*

86. Park AM, Nagase H, Vinod Kumar S, Suzuki YJ. Acute intermittent hypoxia activates myocardial cell survival signaling. *Am J Physiol Heart Circ Physiol 2007;292(2):H751-7*

87. Büyükateş M, Kalaycıoğlu S, Öz E, Soncul H. Effects of Ischemic Preconditioning in Human Heart. *J Card Surg 2005;20:241-245*

88. Küntscher MV, Kastell T, Sauerbier M, Nobiling R, et al. Acute remote ischemic preconditioning on a rat cremasteric muscle flap model. *Microsurgery 2002;22:221–226*

89. Andreka G, Vertesaljai M, Szantho G, Font G, et al. Remote ischaemic postconditioning protects the heart during acute myocardial infarction in pigs. *Heart 2007;93:749–752*

90. Kharbanda RK, Li J, Konstantinov IE, Cheung MMH, et al. Remote ischaemic preconditioning protects against cardiopulmonary bypass-induced tissue injury: a preclinical study. *Heart 2006;92:1506–1511*

91. Barry MC, Kelly CJ, Abdih H, Watson RWG, et al. Differential Effects of Lower Limb Revascularisation on Organ Injury and the Role of the Amino Acid Taurine. *Eur J Vasc Endovasc Surg.1997;13:193-201*

92. Vinay K, Abul K.A, Nelson F. Cellular Adaptations, Cell Injury, and Cell Death. Robbins and Cotran. Pathologic Basis of Disease. 7th Edition Saunders. United States of America 2004 Chapter1;24-25

93. Kohtani T, Abeb Y, Satoa M, Miyauchia K, et al. Protective Effects of Anti-Neutrophil Antibody against Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury in Rats. *Eur Surg Res 2002;34:313–320*

94. Milei J, Forcada P, Fraga CG, Grana DR, et al. Relationship between oxidative stress, lipid peroxidation, and ultrastructural damage in patients with coronary artery disease undergoing cardioplegic arrest/reperfusion. *Cardiovascular Research 2007;73:710–719*

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ DENEY HAYVANI ARASTIRMALARI ETİK KURULU

35340, İnciraltı, İzmir-232 2777777-2254
http:// tip.deu.edu.tr /etik /deneyetik/

Sayı : 71
Tarih : 24/07/2006
Toplantı No : 07/14/2006
Toplantı Tarihi : 21/07/2006

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSITESI TIP FAKÜLTESI DEKANLIĞINA,

Anesteziyoloji ve Reanimasyon Anabilim Dalı tıpta uzmanlık öğrencisi Dr.Ömer ŞAHİN'ın sorumlu olduğu; 65 protokol nolu **"Tek taraflı alt ekstremite rat iskemi perfüzyon modelinde uzak iskemik önkoşullamanın miyokardiyuma etkileri"** isimli projenin uygulanmasında etik açıdan sakınca yoktur.

Bilgilerinizi ve gereğini arz ederim.

Prof. Dr. Mustafa OLGUNER
Deney Hayvanı Araştırmaları
Etik Kurulu Başkanı