

Sıçan iskelet kası iskemi-reperfüzyon modelinde iskemik ön koşullama ve N-asetilsistein: Antioksidan tedavi iskemik ön koşullamayı etkiliyor mu?

Ischemic preconditioning and N-acetylcysteine in a rat model of skeletal muscle ischemia-reperfusion: does antioxidant therapy have an impact on ischemic preconditioning?

Uğur Gürcün,¹ Tünay Kurtoğlu,¹ Berent Dişçigil,¹ Erdem Özkısacık,¹ Mehmet Boğa,¹ Çiğdem Yenisey²

¹Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Kalp ve Damar Cerrahisi Anabilim Dalı, Aydın, Türkiye;

²Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, Aydın, Türkiye

Amaç: Bu çalışmada iskemik ön koşullamanın (İÖK) ve N-asetilsisteinin (NAC) iskemi-reperfüzyon (İ/R) hasarı üzerine olan etkileri ve İÖK ile eş zamanlı olarak reaktif oksijen radikallerinin (ROR) tutucusu bir ajan olan NAC verilmesinin etkileri araştırıldı.

Çalışma planı: Yirmi sekiz adet 230-255 gr Sprague-Dawley cinsi erkek sıçan, her grupta yedi sıçan olacak ve biri kontrol grubu olacak şekilde, dört gruba ayrıldı. Kontrol grubundaki sıçanlarda 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. İÖK+NAC grubunda, İÖK sırasında aynı dozda ve eşit sürede NAC uygulandı. Tüm gruplarda reperfüzyon süresinin sonunda doku örnekleri alınarak, sıçanlar sakrifiye edildi.

Bulgular: Tüm çalışma gruplarında miyeloperoksidaz (MPO) ve malondialdehit (MDA) düzeyleri kontrol grubuna göre düşük bulundu. İndirgenmiş glutatyon (GSH) düzeyinin NAC grubunda diğer gruplardan yüksek olduğu saptandı. Çalışılan parametreler açısından İÖK ile İÖK+NAC grupları arasında anlamlı bir fark bulunmadı. Ancak İÖK grubunda MDA ve MPO düzeyinin daha düşük, GSH düzeyinin daha yüksek olduğu görüldü.

Sonuç: Deneysel İ/R hasarı modelinde İÖK ve NAC, sıçan iskelet kasındaki doku hasarlanmasını azaltmaktadır. İÖK sırasında ROR tutucu NAC verilmesi, İÖK'nin koruyucu etkisini tamamen ortadan kaldırmamakla birlikte bu etkide kısmi bir azalmaya neden olmuştur. Bu bulgu iskelet kasındaki İÖK oluşumunda ROR dışında bir takım mekanizmaların da etkisi olabileceğini düşündürmektedir.

Anahtar sözcükler: İskemi-reperfüzyon; iskemik ön koşullama; N-asetilsistein; reaktif oksijen radikalleri.

Background: This study aims to investigate the effects of ischemic preconditioning (IPC) and N-acetylcysteine (NAC) on ischemia-reperfusion (I/R) injury and the impact of simultaneous NAC administration, a reactive oxygen species (ROS) scavenger, with IPC.

Methods: Twenty-eight male Sprague-Dawley type rats (230-255 g) were randomly assigned to either of four groups each containing seven rats, including a control group. Rats in the control group underwent ischemia of the lower limbs through occlusion of infrarenal abdominal aorta for 120 min, followed by reperfusion for 50 minute. In the IPC group, three cycles of 10 min ischemia, followed by 10 min reperfusion was formed preceding I/R. NAC group rats received an intravenous bolus of NAC (20 mg/kg) at the termination of ischemia and a maintenance dose of 20 mg/kg/hr throughout the reperfusion period. In IPC+NAC group, an equal amount of NAC was given over an identical infusion time during IPC. Tissue samples were obtained at the end of reperfusion then rats were sacrificed.

Results: Malondialdehyde (MDA) and myeloperoxidase (MPO) levels were measured to be lower in all study groups, compared to the control group. Reduced glutathione (GSH) level was higher in NAC group than the remaining groups. No significant difference in parameters studied between IPC and IPC+NAC group. However, MDA and MPO levels were found to be lower and GSH level was higher in IPC group.

Conclusion: In the experimental model of I/R injury, both IPC and NAC attenuated tissue injury in rat skeletal muscle. Simultaneous administration of ROS scavenger NAC with IPC did not completely block the protective effect of IPC, however resulted in a partial reduction. This finding suggested that several mechanisms other than ROS might be involved in the process of skeletal muscle IPC.

Key words: Ischemia-reperfusion; ischemic preconditioning; N-acetylcysteine; reactive oxygen species.



Available online at
www.tgkdc.dergisi.org
doi: 10.5606/tgkdc.dergisi.2012.167
QR (Quick Response) Code

Geliş tarihi: 24 Mart 2012 Kabul tarihi: 29 Nisan 2012

Yazışma adresi: Dr. Tünay Kurtoğlu, Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Kalp ve Damar Cerrahisi Anabilim Dalı, 09100 Aydın, Türkiye.

Tel: 0256 - 444 12 56 e-posta: drtunaykurtoğlu@yahoo.com

Vasküler cerrahide tedavi yöntemlerindeki gelişmelere rağmen, iskelet kasındaki iskemi-reperfüzyon (İ/R) hasarlanması mortalite ve morbiditeyi artıran bir sorun olarak önemini korumaktadır. İskemiye bağlı doku hasarının büyük bölümünün reperfüzyon periyodunda olduğu ve reaktif oksijen radikallerinin (ROR) bu süreçte önemli rol oynadığı bilinmektedir.^[1] İskemik dokunun kütlesi çok geniş olduğunda, reperfüzyon yalnızca lokal doku hasarı değil, uzak organ hasarına da neden olabilmekte; akut iskemik bir ekstremiteye kan akımının yeniden sunulması multipl organ disfonksiyonu veya ölüm ile sonuçlanabilmektedir.^[2-4]

İskemik ön koşullama (İÖK), bir dokunun kısa süreli iskemi-reperfüzyon periyodlarına maruz bırakılarak daha sonraki şiddetli İ/R hasarına karşı bu dokuda koruma sağlanması olarak tanımlanmaktadır.^[5] İskemik ön koşullamada rol oynayan endojen mediyatörler ve tetikleyiciler üzerinde son dönemlerde yoğun olarak çalışılmakta, özellikle kalp dokusundaki İÖK sürecinde ROR'nin rolü ön plana çıkmaktadır.^[5-7] İskelet kasındaki İÖK sürecinde ise birçok farklı mekanizmanın etkin olduğu bildirilmekle^[8-10] beraber ROR'nin oynadığı rol açık değildir.

Mukolitik bir ajan olan N-asetilsistein (NAC) düşük molekül ağırlıklı, thiol grubu içeren bir bileşiktir. N-asetilsistein'in deasetilasyonu ile açığa çıkan sistein birçok hücrede yüksek konsantrasyonda bulunan ve glutatyonun öncü maddesi olan bir tripeptiddir. Oksidatif strese karşı en önemli savunma mekanizmalarından birisi sistein, glutamin ve glisin aminoasitlerinden üretilen ve yaşayan tüm hücrelerde bulunan glutatyon (GSH)'dur. İndirgenmiş GSH, direkt ya da GSH peroksidaz katalizi yolu ile ortamdaki ROR'yi tutmaktadır.^[11,12] N-asetilsistein İ/R hasarlanmasında tüketilen hücre içi GSH rezervini artırarak koruyucu etki göstermektedir.^[12,13] Buna ek olarak NAC'nin nitrik oksit (NO) üretimini,^[14] naklini ve depolanmasını artırdığı^[15] ve böylece endotel hasarını da azalttığı bildirilmiştir.^[16]

Bu çalışmada, sıçan iskelet kası İ/R modelinde İÖK ve NAC'nin etkilerinin, doku malondialdehit (MDA), Miyeloperoksidaz (MPO) ve GSH ölçümleri ile değerlendirilmesi amaçlandı. Bunun yanı sıra İÖK sırasında ROR tutucusu bir ajan olan NAC verilerek, antioksidan tedavinin iskelet kasındaki İÖK süreci üzerine olan etkisi araştırıldı.

GEREÇ VE YÖNTEMLER

Deneyde Adnan Menderes Üniversitesi Temel Tıp Bilimleri Deney Hayvanları Laboratuvarından elde edilen 28 adet 230-255 gr Sprague-Dawley cinsi erkek sıçan kullanıldı. Çalışma Adnan Menderes Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Komitesi tarafından onaylandı.

Tüm hayvanlar 22 °C oda sıcaklığında kafeste tutularak standart kemirgen besini ile beslendi ve suya serbest erişimleri sağlandı. Anestezi indüksiyonunda 100 mg/kg intraperitoneal ketamin hidroklorür (Ketalar, Parke-Davis, USA) ve idame için 50 mg/kg ek doz uygulandı. Cerrahi hazırlık ve çalışma süresince hayvanların vücut ısısının 36-37.5 °C'de tutulması amacı ile ısıtıcı lamba kullanıldı.

N-asetilsistein infüzyonu ve sıvı resüsitasyonu için internal juguler ven polietilen PE-50 tubing kateter (Becton, Dickinson and Company, USA) ile kanüle edildi. Deney boyunca tüm gruplara sıvı resüsitasyonu amacı ile 10 ml/kg dozunda %0.9 sodyum klorür (NaCl) verildi. N-asetilsistein infüzyonu için %10'luk solüsyon ihtiva eden Asist ampul (Hüsnü Arsan İlaçları AŞ, İstanbul, Türkiye) kullanıldı. N-asetilsistein 20 mg/kg dozunda, %0.9 NaCl çözeltisi içinde ve toplam hacim 10 ml/kg olacak şekilde hazırlandı. Bolus için 20 mg/kg dozunda NAC dilüe edilmeden verildi. Sıvı ve ilaç infüzyonları için Braun 8871 Compact Perfüzör ve Braun Perfüzör enjektörü (Braun, Melsungen AG, Almanya) kullanıldı.

Median laparotomi yapılarak infrarenal abdominal aort eksplore edildi. Abdominal aort klempajı için Vasco-Statt (REF 1001-535) vasküler klemp (Scanlan International, Inc. USA & Canada) kullanıldı. Deneyin sonunda tüm gruplarda sıçanların sol gastroknemius kaslarından doku örnekleri alındı ve sıçanlar dekapitasyon ile sakrifiye edildi.

Deneyel çalışma yöntemi

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

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

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

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

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

Verilerin toplanması

Doku örnekleri, proteaz inhibitörü olan 0.2 μ M phenylmethanesulphonyl fluoride (PMSF) ve 1 mM ethylenediamin tetra acetic acid (EDTA) içeren 50 mM fosfat tamponunda (pH 7.4; 1/10 g/ml) olacak şekilde 4 °C'de homojenize edildi. Homojenatlar, miyeloperoksidaz (MPO) için örnek ayrıldıktan sonra, 10.000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi ve üstteki supernatant eşit olarak ependorflara ayrılarak diğer parametrelerin bakılabilmesi için -80 °C'de donduruldu.

Malondialdehit ölçüm yöntemi: Lipid peroksidasyonunun göstergesi olarak, doku MDA düzeylerinin saptanması Ohkawa ve ark.nın^[17] yöntemine göre yapıldı. Yüzde 0.67'lik tiyobarbitürik asit (2-Thiobarbitürik asit; TBA) çözeltisi TBA ile MDA'nın reaksiyona girmesinden sonra reaksiyon ürünü N-butanol ile ekstrakte edildi. Malondialdehit standardı olarak, malonaldehit bis-(dimetil aetal) kullanılarak, 1-40 nM'lik standartlar hazırlandı. Örneklerdeki absorbanslar spektrofotometrede, 540 nm'de mikroplate okuyucusunda okundu ve hesaplar otomatik olarak çizilen standart eğriden hesaplandı. Sonuçlar nmol/g protein olarak verildi.

Glutasyon ölçüm yöntemi: Dokuda GSH, Beutler ve ark.nın^[18] yöntemine göre ölçüldü. Çöktürme (precipite) edici solüsyon; metafosforik asit, disodyum EDTA ve NaCl kullanılarak hazırlandı. Disodyum fosfat solüsyonu; disodyum hidrojen fosfat (Na₂HPO₄)

ile hazırlandı. DTNB solüsyonu; [5.5'-Dithio-bis (2-nitrobenzoic acid)] ve sodyum sitrat ile hazırlandı. Glutasyon standardı; (indirgenmiş glutasyon) kullanılarak 1-60 mg/dl'lik standartlar olarak hazırlandı. Standartlar ve örneklerin spektrofotometrede 412 nm'de absorbansları okutuldu. Ayrıca örnek yerine aynı miktar saf su kullanılarak (kör örnek) absorbanslar kaydedildi. Bu sonuç örnek ve standartlardan çıkartılarak elde edilen değerler kullanıldı ve GSH hesaplandı. Sonuçlar μ g/mg protein olarak verildi.

Miyeloperoksidaz ölçüm yöntemi: Dokuda nötrofil ve monosit aktivasyonunun göstergesi olarak, MPO aktivitesi Suzuki ve ark.nın^[19] yöntemine göre saptandı. Yöntem sentetik bir substrat olan 3,3',5,5'-tetramethyl benzidine (TMB)'in MPO yolu ile yıkılımının ölçülmesine dayanmaktadır. Belli miktardaki doku homojenatı 7.000 rpm 5 dakika santrifüj edildi. Üstteki kısım atıldı ve alttaki kalan doku kısmı deterjanlı tampon ile çözüldü (160 mM potassium phosphate buffer, pH 5.4, 1% hexadecyltrimethylammonium bromide, HETAP). Reaksiyon H₂O₂'nin 37 °C'de reaksiyon karışımına eklenmesi yolu ile başlatıldı. Miyeloperoksidazın katalizlediği reaksiyonda TMB oksidasyona uğramakta olup, reaksiyon sırasında absorbans artışı 655 nm'de 15 saniye ölçülmekte ve bir dakikadaki MPO aktivitesi hesaplanmaktadır. Miyeloperoksidaz aktivitesi U/g yaş doku olarak verildi.

İstatistiksel yöntem

Verilerin istatistiksel analizi için Windows Statistical Package for Social Sciences (SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA) 14.0 versiyon istatistik paket programı kullanıldı. Grupların karşılaştırılması Mann-Whitney U testi ile yapıldı, *p* değerinin 0.05'den küçük olması istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Parametreler ortalama değer \pm standart hata olarak verildi.

BULGULAR

Kontrol ve çalışma gruplarına ait doku MDA, MPO ve GSH düzeyleri Tablo 1'de verilmiştir. Malondialdehit ve MPO değerleri kontrol grubunda, çalışma gruplarına oranla daha yüksek bulundu. Tüm çalışma gruplarında MPO düzeylerinin kontrol grubuna göre istatistiksel olarak belirgin ölçüde düşük olduğu (*p*<0.05) tespit edildi (Şekil 1). Malondialdehit düzeyleri, kontrol grubuna göre NAC ve İÖK gruplarında anlamlı oranda düşük bulundu(*p*<0.05), bu düzey İÖK+NAC grubunda daha düşük olmakla birlikte aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (Şekil 2). Glutasyon düzeyi kontrol grubunda tüm çalışma gruplarından düşük idi. NAC grubunda GSH düzeyi hem kontrol hem de İÖK+NAC grubuna göre anlamlı ölçüde yüksek (*p*<0.05) bulundu (Şekil 3).

Tablo 1. Doku malondialdehit, miyeloperoksidaz ve indirgenmiş glutatyon düzeyleri

Gruplar	MDA (nmol/g protein)	MPO (U/g yaş doku)	GSH (μ g/mg protein)
Kontrol	709.27 \pm 79.0	631.16 \pm 181.9	28.13 \pm 1.5
NAC	401.31 \pm 44.8	243.47 \pm 124.6	37.24 \pm 1.4
İÖK	476.43 \pm 26.3	66.07 \pm 20.8	33.04 \pm 2.6
İÖK + NAC	498.70 \pm 71.2	109.50 \pm 26.6	29.19 \pm 0.7

MDA: Malondialdehit; MPO: Miyeloperoksidaz; GSH: İndirgenmiş glutatyon; NAC: Mukolitik bir ajan olan N-asetilsistein; İÖK: İskemik ön koşullama.

İskemik ön koşullama ile İÖK+NAC grupları arasında, çalışılan hiçbir parametre açısından istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edilmedi. Benzer şekilde NAC grubu ile İÖK grubu karşılaştırıldığında da çalışılan parametreler açısından anlamlı bir farklılık bulunmadı.

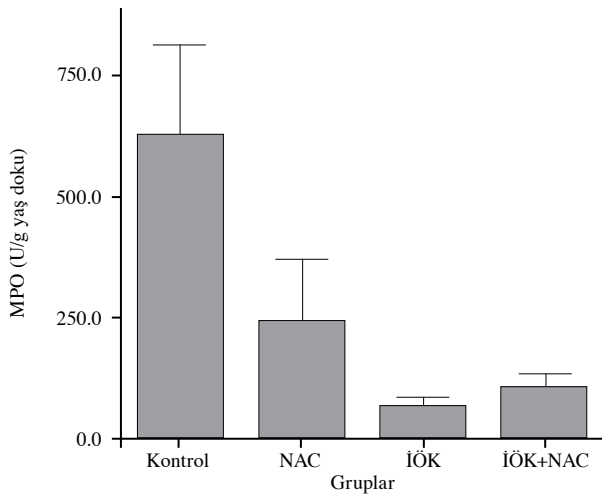
TARTIŞMA

İskelet kasındaki İ/R hasarı, damar cerrahisi ve uzun süreli turnike kullanımı gerektiren ortopedik ameliyatlarda karşımıza çıkabilecek önemli bir klinik sorundur. Bu hasarı azaltmak amacı ile çeşitli farmakolojik ajanlar, hipotermi, hemodilüsyon ile mikrosirkülasyonun iyileştirilmesi, kontrollü reperfüzyon gibi birçok yöntem araştırılmıştır. İskemik ön koşullama da normotermik global iskemide iskelet kası hasarını azaltmanın kullanışlı bir yöntemi olarak ilgi çekmektedir.^[4]

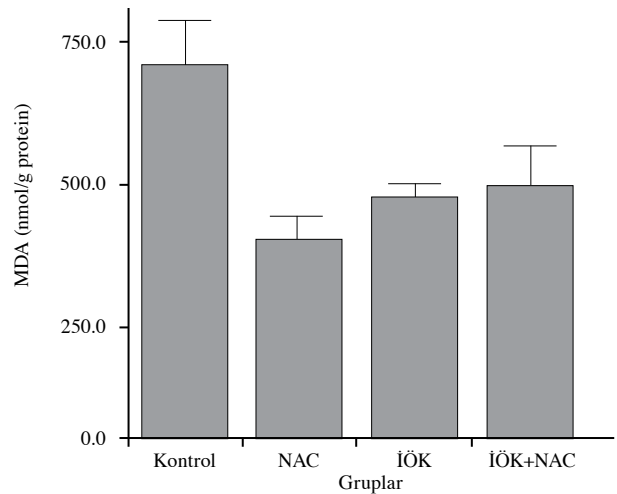
İskemik ön koşullamanın iskelet kasındaki koruyucu etkisi ilk olarak 1992'de Mounsey ve ark.^[20] tarafından gösterilmiştir. Çeşitli deneysel modellerde iskelet kasındaki İÖK'nin; İ/R hasarı ile ortaya çıkan mikrovasküler disfonksiyonu, vazospazmı ve kapiller no-reflow fenomenini azalttığı, doku oksijenasyonunu ise artırdığı bildirilmiştir.^[3-5] Bunun yanında iskelet kasındaki post-

iskemik kontraktilite bozukluğunu azaltan faydalı etkileri olduğu, inflamatuvar reaksiyonu ve lökosit aracılı inflamasyon yanıtını azalttığı da gösterilmiştir.^[3,21-23]

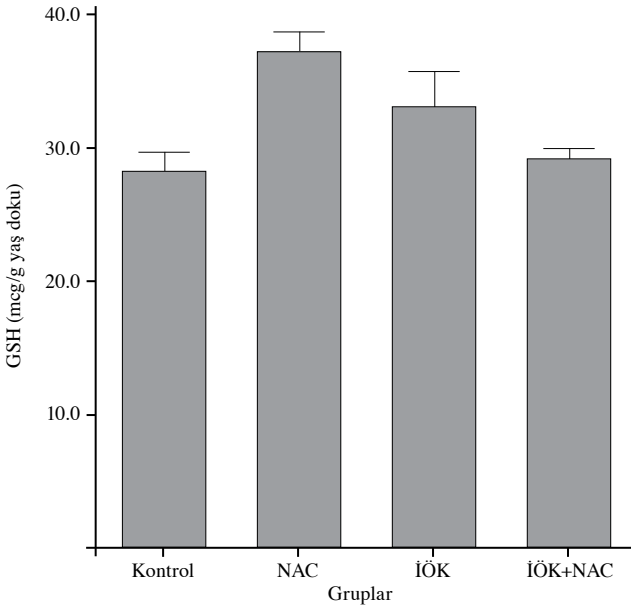
Reaktif oksijen radikalleri, İ/R hasarının patogenezinde temel bir rol oynamaktadır. Paradoksal olarak ROR'nin İÖK'yi ortaya çıkaran uyarının oluşmasında da görev aldıkları bilinmektedir.^[24] Özellikle miyokardiyal İÖK süreci için ROR'nin büyük önemi olduğu ve bu etkiye mitokondriyal potasyum ATP (mitoKATP) kanallarının aracılık ettiği düşünülmektedir.^[5,25] Reaktif oksijen radikallerinin İÖK uyarısını oluşturan mekanizmadaki etkileri ve bu kompleks mekanizmanın hangi aşamasında rol oynadıkları ilgi çekici bir konudur. Bu konu, içlerinde NAC'nin de bulunduğu bir dizi ROR tutucu ajanın İÖK sırasında kullanılması ile aydınlatılmaya çalışılmıştır. Genellikle miyokardiyal İÖK modellerinde yapılan bu çalışmaların çoğunda, ROR tutucularının ön koşullamanın faydalı etkilerini bloke ettiği görülmüştür.^[26-29] Bununla birlikte NAC ve diğer ROR tutucularının, miyokardiyal İÖK üzerindeki etkisine dair farklı yönde sonuçlar bildirilen çalışmalar da mevcuttur. N-asetilsistein'in, İÖK'yi bloke eden klasik dozundan daha yüksek dozlarda kullanımı ile İÖK'nin erken fazının inhibe olmadığı gözlemlenmiştir.^[30] Tavşan kalbinde, antioksidan özellikleri bulu-



Şekil 1. Doku miyeloperoksidaz düzeylerinin gruplara göre dağılımını gösteren grafik. MPO: Miyeloperoksidaz; NAC: N-asetilsistein; İÖK: İskemik ön koşullama; İÖK+NAC: İskemik ön koşullama ile eş zamanlı N-asetilsistein.



Şekil 2. Doku malondialdehit düzeylerinin gruplara göre dağılımını gösteren grafik. MDA:Malondialdehit; NAC: N-asetilsistein; İÖK: İskemik ön koşullama; İÖK+NAC: İskemik ön koşullama ile eş zamanlı N-asetilsistein.



Şekil 3. Doku indirgenmiş glutasyon düzeylerinin gruplara göre dağılımını gösteren grafik. GSH: İndirgenmiş glutasyon; NAC: N-asetilsistein; İÖK: İskemik ön koşullama; İÖK+NAC: İskemik ön koşullama ile eş zamanlı N-asetilsistein.

nan Melatonin ve NAC'nin, İÖK'nin koruyucu etkisini engellemediği tespit edilmiştir.^[31] Yine tavşanlarda deneysel olarak oluşturulan İÖK sırasında antioksidan enzim verilmesi ön koşullamanın faydalı etkisini ortadan kaldırmamıştır.^[32] Bu sonuçlar İÖK'nin oluşumunda farklı mekanizmaların etkili olması ile açıklanabilir.

Miyokard dokusuna yönelik bu denli geniş çaplı araştırmalara karşın, iskelet kasındaki İÖK'de ROR'nin rolleri ve ROR tutucu ajan kullanımının İÖK sürecini ne şekilde etkilediği konusunda yeterince veri yoktur. Biz bu çalışmada iskelet kasında İÖK ile birlikte NAC kullanarak, ROR tutucu tedavinin iskelet kasındaki İÖK süreci üzerine olan etkisini araştırmayı amaçladık. Çalışmamızda doku MDA ve MPO düzeyleri, İÖK ve NAC gruplarında kontrol grubuna göre anlamlı derecede düşük bulundu. Bu bulgu sıçan iskelet kası İ/R hasarı modelinde, İÖK'nin ve NAC'nin kullanımının doku hasarını azalttığını düşündürdü. İskemik ön koşullama sırasında NAC verildiğinde, iskemi sonucu oluşan MPO seviyesindeki artışın baskılandığı, ancak MDA seviyesindeki artışın görece daha az etkilendiği saptandı. Bununla birlikte İÖK ve İÖK+NAC grupları arasında, bahsedilen parametrelerin düzeyleri açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık tespit edilmedi. Bu bulgu İÖK'de ROR dışında farklı mekanizmaların da tetikleyici rol oynaması ile ilgili olabilir. İskemik ön koşullamada ortaya çıkan Adenozin ve NO gibi çeşitli vazodilatörler, MitoKATP kanallarının açılması ve ROR üretiminden bağımsız

olarak çalışmakta ve protein kinaz-C'yi de içeren bir dizi hücre içi sinyal molekülü ve transkripsiyon faktörünü aktive etmektedir.^[33] Adenozin ile oluşturulan ön koşullamada, miyokardiyal infarkt sahasında azalma şeklinde gözlenen yararlı etkinin ROR tutucularının eklenmesi ile değişmediği bildirilmiştir.^[34,35] Sıçan ekstremite iskemisi modelinde, gerek İÖK gerekse de adenozin ile oluşturulan ön koşullama, ekstremite kas fonksiyonlarında düzelme ile sonuçlanmış ancak MitoKATP kanal açıcısı bir ajan olan diazoksit ile bu etki gözlenmemiştir.^[36]

Nitrik oksit in iskemik ön koşullamanın oluşması için gerekli eşik seviyesini azalttığı bildirilmiştir.^[37] NAC'nin NO üretimini artırabilmesi nedeni ile antioksidan etkisine rağmen İÖK oluşumunu kolaylaştırabileceği öne sürülmüştür.^[30] Bu çalışmada NO düzeyi ölçülmemiş olmakla birlikte, İÖK ile birlikte NAC verilen grupta iskelet kasını İ/R hasarından koruyucu etkinin belirgin olarak ortadan kalkmamasını açıklayan faktörlerden biri de bu olabilir.

Doku GSH seviyesinin NAC grubunda diğer gruplardan yüksek bulunmasının GSH rezervinin artması ile ilişkili olduğu sanılmaktadır. İskemi-reperfüzyon sonrasında GSH seviyesinin, İÖK grubunda İÖK+NAC grubuna göre -istatistiksel olarak anlamlı olmamakla birlikte- daha yüksek bulunması, antioksidan kapasitenin daha iyi korunduğunu, dolayısıyla oksidatif stresin şiddetinin daha düşük olduğunu düşündürmektedir.

Elde edilen bulgular, İÖK'nin iskelet kasını İ/R hasarından koruyucu etkilerinin antioksidan NAC kullanımı ile kısmen engellenmiş olmakla birlikte, tamamen bloke olmadığına işaret etmektedir. Bu sonuç iskelet kasında İÖK'yi oluşturan uyarının ortaya çıkmasında, ROR'den bağımsız olarak etki gösteren mediyatörlerin rol oynaması ile ilişkili olabilir. Bu durumu açıklayabilecek bir diğer etken de NAC'nin İÖK'nin oluşumu sürecinde farklı mekanizmalar üzerinden birbirine zıt etkiler gösterebilme potansiyeline sahip olmasıdır. Sonuç olarak, iskelet kasındaki İÖK'nin etki mekanizmalarının aydınlatılması ve klinikte kullanım olanaklarının belirlenebilmesi için ileri çalışmalara gereksinim vardır.

Çıkar çakışması beyanı

Yazarlar bu yazının hazırlanması ve yayınlanması aşamasında herhangi bir çıkar çakışması olmadığını beyan etmişlerdir.

Finansman

Yazarlar bu yazının araştırma ve yazarlık sürecinde herhangi bir finansal destek almadıklarını beyan etmişlerdir.

KAYNAKLAR

1. Koksall C, Bozkurt AK, Cangel U, Ustundag N, Konukoglu D, Musellim B, et al. Attenuation of ischemia/reperfusion injury by N-acetylcysteine in a rat hind limb model. *J Surg Res* 2003;111:236-9.
2. 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;55:241-5.
3. 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.
4. Sayan H, Babül A, Ugurlu B. Effects of nitric oxide donor and inhibitor on prostaglandin E2-like activity, malondialdehyde and reduced glutathione levels after skeletal muscle ischemia-reperfusion. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2001;65:179-83.
5. Facundo HT, Carreira RS, de Paula JG, Santos CC, Ferranti R, Laurindo FR, et al. Ischemic preconditioning requires increases in reactive oxygen release independent of mitochondrial K⁺ channel activity. *Free Radic Biol Med* 2006;40:469-79.
6. Zhang DX, Chen YF, Campbell WB, Zou AP, Gross GJ, Li PL. Characteristics and superoxide-induced activation of reconstituted myocardial mitochondrial ATP-sensitive potassium channels. *Circ Res* 2001;89:1177-83.
7. Lebuffe G, Schumacker PT, Shao ZH, Anderson T, Iwase H, Vanden Hoek TL. ROS and NO trigger early preconditioning: relationship to mitochondrial KATP channel. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003;284:H299-308.
8. Gürke L, Mattei A, Chaloupka K, Marx A, Sutter PM, Stierli P, et al. Mechanisms of ischemic preconditioning in skeletal muscle. *J Surg Res* 2000;94:18-27.
9. Badhwar A, Bihari A, Dungey AA, Scott JR, Albion CD, Forbes TL, et al. Protective mechanisms during ischemic tolerance in skeletal muscle. *Free Radic Biol Med* 2004;36:371-9.
10. Bushell AJ, Klenerman L, Davies H, Grierson I, McArdle A, Jackson MJ. Ischaemic preconditioning of skeletal muscle 2. Investigation of the potential mechanisms involved. *J Bone Joint Surg [Br]* 2002;84:1189-93.
11. Cuzzocrea S, Mazzon E, Costantino G, Serraino I, De Sarro A, Caputi AP. Effects of n-acetylcysteine in a rat model of ischemia and reperfusion injury. *Cardiovasc Res* 2000;47:537-48.
12. Kahir 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.
13. Börjesson A, Wang X, Sun Z, Wallén R, Deng X, Johansson E, et al. Effects of N-acetylcysteine on pulmonary macrophage activity after intestinal ischemia and reperfusion in rats / with invited commentaries. *Dig Surg* 2000;17:379-87.
14. 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.
15. Singh RJ, Hogg N, Joseph J, Kalyanaraman B. Mechanism of nitric oxide release from S-nitrosothiols. *J Biol Chem* 1996;271:18596-603.
16. 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.
17. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 1979;95:351-8.
18. Beutler E, Duron O, Kelly BM. Improved method for the determination of blood glutathione. *J Lab Clin Med* 1963;51:882-8.
19. Suzuki K, Ota H, Sasagawa S, Sakatani T, Fujikura T. Assay method for myeloperoxidase in human polymorphonuclear leukocytes. *Anal Biochem* 1983;132:345-52.
20. Mounsey RA, Pang CY, Forrest C. Preconditioning: a new technique for improved muscle flap survival. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1992;107:549-52.
21. Pasupathy S, Homer-Vanniasinkam S. Surgical implications of ischemic preconditioning. *Arch Surg* 2005;140:405-9.
22. 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.
23. Zhang F, Oswald T, Holt J, Gerzenshtein J, Lei MP, Lineaweaver WC. Regulation of inducible nitric oxide synthase in ischemic preconditioning of muscle flap in a rat model. *Ann Plast Surg* 2004;52:609-13.
24. Dhalla NS, Elmoselhi AB, Hata T, Makino N. Status of myocardial antioxidants in ischemia-reperfusion injury. *Cardiovasc Res* 2000;47:446-56.
25. Zhang DX, Chen YF, Campbell WB, Zou AP, Gross GJ, Li PL. Characteristics and superoxide-induced activation of reconstituted myocardial mitochondrial ATP-sensitive potassium channels. *Circ Res* 2001;89:1177-83.
26. Tritto I, D'Andrea D, Eramo N, Scognamiglio A, De Simone C, Violante A, et al. Oxygen radicals can induce preconditioning in rabbit hearts. *Circ Res* 1997;80:743-8.
27. Chen W, Gabel S, Steenbergen C, Murphy E. A redox-based mechanism for cardioprotection induced by ischemic preconditioning in perfused rat heart. *Circ Res* 1995;77:424-9.
28. Khanna G, Diwan V, Singh M, Singh N, Jaggi AS. Reduction of ischemic, pharmacological and remote preconditioning effects by an antioxidant N-acetyl cysteine pretreatment in isolated rat heart. *Yakugaku Zasshi* 2008;128:469-77.
29. Matejčková J, Kucharská J, Pintérová M, Pancza D, Ravingerová T. Protection against ischemia-induced ventricular arrhythmias and myocardial dysfunction conferred by preconditioning in the rat heart: involvement of mitochondrial K(ATP) channels and reactive oxygen species. *Physiol Res* 2009;58:9-19.
30. Oliveira DM, Gomes ES, Mussivand T, Fiorelli AI, Gomes OM. Effects of n-acetylcysteine on ischemic preconditioning: study in isolated rat hearts. *Rev Bras Cir Cardiovasc* 2009;24:23-30. [Abstract]
31. Andreadou I, Iliodromitis EK, Mikros E, Bofilis E, Zoga A, Constantinou M, et al. Melatonin does not prevent the

- protection of ischemic preconditioning in vivo despite its antioxidant effect against oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 2004;37:500-10.
32. Iwamoto T, Miura T, Adachi T, Noto T, Ogawa T, Tsuchida A, et al. Myocardial infarct size-limiting effect of ischemic preconditioning was not attenuated by oxygen free-radical scavengers in the rabbit. *Circulation* 1991;83:1015-22.
 33. Wang WZ. Investigation of reperfusion injury and ischemic preconditioning in microsurgery. *Microsurgery* 2009;29:72-9.
 34. Cohen MV, Yang XM, Liu GS, Heusch G, Downey JM. Acetylcholine, bradykinin, opioids, and phenylephrine, but not adenosine, trigger preconditioning by generating free radicals and opening mitochondrial K(ATP) channels. *Circ Res* 2001;89:273-8.
 35. Liu GS, Thornton J, Van Winkle DM, Stanley AW, Olsson RA, Downey JM. Protection against infarction afforded by preconditioning is mediated by A1 adenosine receptors in rabbit heart. *Circulation* 1991;84:350-6.
 36. Wang QL, Wang G, Wang HM, Pei GX. Effect of pretreatment with adenosine, diazoxide or ischemic preconditioning on ischemia- reperfusion injury in the limbs of rats. *Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao* 2002;22:617-9.
 37. Bell RM, Yellon DM. The contribution of endothelial nitric oxide synthase to early ischaemic preconditioning: the lowering of the preconditioning threshold. An investigation in eNOS knockout mice. *Cardiovasc Res* 2001;52:274-80.