

## Sıçan iskemi-reperfüzyon modelinde iskemik önkoşullamanın miyokardiyal apoptoza etkisi

*The effect of ischemic preconditioning on myocardial apoptosis:  
a rat ischemia-reperfusion model*

Mehmet Adnan Celkan,<sup>1</sup> Sevgi Çavdar,<sup>2</sup> Cahit Bağcı,<sup>2</sup> İbrahim Sarı,<sup>3</sup> Hakkı Kazaz,<sup>1</sup> Haşim Üstünsoy<sup>1</sup>

Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi, <sup>1</sup>Kalp ve Damar Cerrahisi Anabilim Dalı, <sup>2</sup>Fizyoloji Anabilim Dalı, <sup>3</sup>Patoloji Anabilim Dalı, Gaziantep

**Amaç:** İskemik hücrel hasarlanmayı önlemek veya azaltmak için geliştirilen yaklaşımlardan biri iskemik önkoşullama. Bu sıçan modelinde iskemik önkoşullamanın miyokardiyal apoptoz üzerine etkisi araştırıldı.

**Çalışma planı:** Çalışmada 30 adet Wistar cinsi erkek sıçan kullanıldı. Sıçanlara sol torakotomi yapıldıktan sonra kalp serbestleştirildi. Kontrol grubundaki 10 sıçana ek bir işlem uygulanmadı. İskemi grubundaki 10 sıçana sol ana koroner arterde 30 dakika oklüzyon (iskemi), arkasından 120 dakika reperfüzyon uygulandı. Önkoşullama grubundaki 10 sıçana ise bu işlemler öncesinde 5 dakika iskemi, 5 dakika reperfüzyon uygulandı. Deneyler sonrasında kalpler çıkarılarak, hazırlanan kesitlerde bcl-2 immünohistokimyasal boyama yöntemiyle bcl-2 indeksi belirlendi.

**Bulgular:** bcl-2 immünohistokimyasal boyama yöntemiyle, infarkt alanındaki apoptotik hücre oranı iskemik önkoşullama yapılan grupta  $40 \pm 4.27\%$ , önkoşullama olmaksızın sadece iskemi ve reperfüzyon yapılan grupta  $65 \pm 4.11\%$ , kontrol grubunda  $2 \pm 0.66\%$  bulundu. Önkoşullama yapılan grupta, yapılmayan gruba göre apoptotik hücre sayısı anlamlı derecede azdı ( $p < 0.001$ ). En az sayıda apoptotik hücre kontrol grubunda saptandı ( $p < 0.001$ ).

**Sonuç:** Bulgularımız iskemik önkoşullamanın miyokardiyal apoptoz oluşumunu azalttığını göstermektedir.

**Anahtar sözcükler:** Programlanmış hücre ölümü; iskemik önkoşullama, miyokardiyal; miyokard reperfüzyon hasarı; sıçan.

**Background:** One of the approaches developed to prevent or reduce ischemic cell damage is ischemic preconditioning. In this rat model, we investigated the effect of ischemic preconditioning on myocardial apoptosis.

**Methods:** Thirty male Wistar rats were used. Following a left thoracotomy, the heart was exposed and isolated in all the rats. Ten control rats remained untreated. In 10 rats (ischemia group), the left main coronary artery was occluded for 30 min and reperfused for 120 min. The remaining 10 rats (preconditioning group) underwent 5 min of occlusion and 5 min of reperfusion before 30 min occlusion and 120 min reperfusion. At the end of the experiments, the hearts were removed and assayed for immunohistochemical staining for bcl-2 expression.

**Results:** By immunohistochemical staining for bcl-2, the percentage of apoptotic cells was found as  $40 \pm 4.27\%$  in the preconditioning group,  $65 \pm 4.11\%$  in the ischemia group without preconditioning, and  $2 \pm 0.66\%$  in the control group. Compared to the ischemia group, the number of apoptotic cells was significantly lower in the preconditioning group ( $p < 0.001$ ). The lowest number of apoptotic cells was found in the control group ( $p < 0.001$ ).

**Conclusion:** Our results show that ischemic preconditioning reduces myocardial apoptosis.

**Key words:** Apoptosis; ischemic preconditioning, myocardial; myocardial reperfusion injury; rats.

İskemik önkoşullama, tek veya tekrarlayan kısa süreli iskemi periyotlarının, daha sonraki uzun süreli iskemi sırasında, hücreyi infarkt ve nekroz oluşumuna karşı koruyan adaptif bir mekanizmadır.<sup>[1]</sup> İskemik önkoşullamanın başlıca etkileri, infarkt ölçüsünün azaltılması, endotelial fonksiyonun korunması ve miyo-

kardiyumdaki inflamatuvar yanıtın hafifletilmesi olarak sayılabilir.<sup>[2]</sup> İskemik önkoşullamanın farklı hayvan türlerinde infarkt boyutunu azalttığı kapsamlı şekilde gösterilmiş olmasına rağmen, programlanmış hücre ölümü (apoptosis) üzerindeki etkisi hakkında bilinen azdır.<sup>[3]</sup>

Geliş tarihi: 13 Kasım 2006 Kabul tarihi: 9 Aralık 2006

Yazışma adresi: Dr. Mehmet Adnan Celkan, Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi, Kalp ve Damar Cerrahisi Anabilim Dalı, 27070 Gaziantep.  
Tel: 0342 - 360 25 13 e-posta: celkan@superonline.com

İskemik önkoşullama yoluyla apoptozun azaltılmasında yer alan olası mekanizmaların anlaşılması, miyosit kaybının en aza indirilmesine ve bu şekilde hem nekrotik hem de apoptotik dokulardan oluşabilen toplam infarkt boyutunun düşürülmesine yardımcı olabilir.<sup>[4]</sup> Bu çalışmada, 30 dakikalık koroner oklüzyondan sonra, 120 dakikalık reperfüzyona maruz kalmış sıçanlarda, 5 dakika iskemi, 5 dakika reperfüzyon şeklindeki iskemik önkoşullamanın, miyokardiyal apoptotik hücre ölümünü nasıl etkilediği araştırıldı.

## GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmada, ağırlıkları 260-360 gr arasında değişen, 30 adet Wistar cinsi erkek sıçan kullanıldı. Sıçanlar Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Ünitesi'nden sağlandı ve 20-22 °C oda sıcaklığında, 12 saat aydınlık-12 saat karanlık ortamda bakıldı, standart özel sıçan yemi ve musluk suyu ile beslendi. Çalışma için Gaziantep Üniversitesi etik kurul onayı alındı ve çalışmanın tüm aşamalarında "Guide for the Care and Use of Laboratory Animals" (NIH Publication 86-23, 1985) kurallarına uyuldu.

**Deneye hazırlık.** Sodyum pentotal (50 mg/kg) ile intraperitoneal anestezi verilen sıçanlarda, önce trakeotomi yapıldı ve trakea yapay solunum için kanüle edildi. Hemen arkasından ventilasyon cihazıyla (SAR-830 Ventilator) 1.5 ml/100 gr hacimde ve 60 atm/dk hızda oda havası verildi (Şekil 1). Arteriyel kan basıncı ölçümü için sol karotis arter kanüle edilerek transdüser ile kan basıncı kaydedildi. Kanül, heparin içeren serum fizyolojik ile dolduruldu. Göğsün sol tarafına, sternumun 2 mm solundan, dördüncü interkostal aralıktan sol torakotomi yapıldı. Perikard sıyrılıp kalp serbestleştirildi. Göğsün sağ tarafı desteklenip kalp dışarı alındı ve 10 mm yuvarlak iğneli 6/0 ipek dikiş sol ana koroner arterin altından miyokard dokusunu hafifçe geçecek şekilde geçirildi. Bu işlemin ardından kalp göğüs kafesine tekrar yerleştirildi. Koroner oklüzyonu sağlamak için kalbe konulmuş dikiş ipliği 1 mm çap ve 1 cm boyunda plastik tüp içinden geçirildi. Bu iplik klemple sıkıştırılarak iskemi, gevşetilerek reperfüzyon uygulandı. Kalbin yeni duruma uyumu için 20 dakika beklendi.

Lambeth Conventions'da belirlenen değerlendirme ölçütleri<sup>[5]</sup> göz önüne alınarak, bu işlemlere bağlı herhangi bir aritmi görülmesi ya da ortalama kan basıncının oklüzyon öncesinde 70 mmHg'nin altına düşmesi halinde denek çalışma dışı bırakıldı. Stabilizasyon sağlandıktan sonra damar oklüde edilerek iskemi sağlandı.

Koroner oklüzyon, reperfüzyon öncesi ve sonrasında elektrokardiyografi (EKG) ve kan basıncı dijital kayıt sisteminde (Power Lab., ADI Instruments, Avustralya) kaydedildi. Sıçanların vücut ısıları deney boyunca takip edilerek 37 °C rektal vücut ısısı korundu.

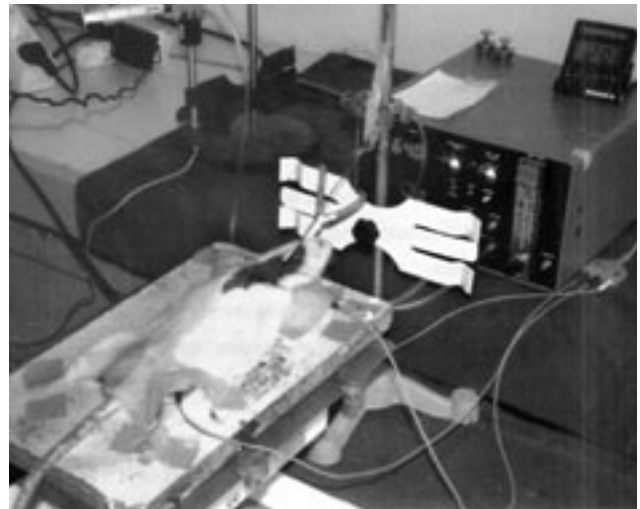
**Deney protokolü.** Çalışma üç grupta planlandı.

Grup 1'de (kontrol grubu, n=10), sadece göğüs boşluğu açılıp, başka hiçbir işlem yapılmadan kalp tekrar yerine konuldu. Deney süresi (iskemi kontrol grubuna göre 170 dakika) boyunca kan basıncı ve EKG kayıtları alındı. Grup 2'de (önkoşullama-preconditioning grubu, n=10), stabilizasyon dönemini takiben kalp 5 dakika iskemi ve 5 dakika reperfüzyon, sonrasında 30 dakika iskemi ve ardından da 120 dakika reperfüzyonda tutuldu. Grup 3'te ise (iskemi kontrol grubu, n=10) stabilizasyon dönemini takiben 30 dakika iskemi ve 120 dakika reperfüzyon uygulandı.

Yüz yirmi dakikalık reperfüzyon sürelerinin sonunda tüm gruplara ait sıçanlardan alınan intrakardiyak kan, heparinli tüplerde 5 dakika 3000 devirde santrifüj edilip serumları ayrıldı ve eksi 70 °C'de dondurucuda muhafaza edildi. Bu işlemten sonra çıkarılan kalpler %10'luk formaldehit çözeltisindeki tüplere kondu.

**Doku hazırlanması.** Kalpler %10 formalin solüsyonunda 24 saat fikse edildi. Çıplak gözle soluk alanlar şeklinde gözlenen miyokardiyal iskemik sahalardan 6-7 mm kalınlığında kesitler alındı. Kesitler otomatik takip makinesine alınarak alkol, ksilol ve parafin içerisinden geçirildi. Daha sonra kesitler parafin blok içerisine gömüldü. Parafin bloktan mikrotomla (Leica RM 2145) 5 mikron kalınlığında kesitler alınarak hematoksilin ve eozin ile boyandı.

**Boyasız kesitler ve deparafinizasyon:** İlk olarak hematoksilin-eozin boyalı preparatlar incelenerek uygun blok seçimi yapıldı ve mikrotomla 4 mikron kalınlığında boyasız kesit elde edildi. Tüm boyasız kesitler "polysine" kaplı adezivli lamlara alındıktan sonra 65 °C'de 15 dakika etüvde bekletilerek dokuların lamlara yapışması sağlandı. Daha sonra lamlar ksilolde yaklaşık 10 dakika bekletilerek deparafinizasyon işlemi gerçekleştirildi.



Şekil 1. Deney düzeneği.

**İmmünohistokimyasal boyama:** Primer antikor olarak bcl-2, Ab-1 (Cat: MS-123-P; Neomarker, Fremont, CA, ABD), boyama kiti olarak LSAB-2 HRP (Dako, Japonya), kromojen olarak DAB kullanıldı.

**Skorlama:** bcl-2 skorlamasında nükleer boyanma esas alındı. Nükleer boyanma olmaksızın nonspesifik sitoplazmik boyanma negatif olarak değerlendirildi. Işık mikroskobu ile 400 büyütme altında her olgu için boyanmanın en yoğun olduğu üç ayrı saha seçildi ve pozitif hücrelerin total hücrelere oranı yüzde (%) olarak ifade edilerek bcl-2 indeksi belirlendi.

**İstatistiksel analiz.** İstatistiksel analiz için SPSS Windows 10.0 programı kullanıldı. Gruplardaki ortalamalar arasındaki farkın karşılaştırılmasında tek yönlü varyans analizi kullanıldı. Grupların birbirleriyle olan anlamlılıklarında ise Tukey testi kullanıldı.  $P < 0.05$  olan değerler anlamlı kabul edildi.

## BULGULAR

bcl-2 immünohistokimyasal boyama yöntemiyle, infarkt alanındaki apoptotik hücre oranı iskemik önkoşullama yapılan grup 2'de  $40 \pm 4.27$  (Şekil 2a), önkoşullama yapılmayan, yani sadece iskemi ve reperfüzyon yapılan grup 3'te  $65 \pm 4.11$  (Şekil 2b), kontrol grubunda  $2 \pm 0.66$  bulundu (Şekil 2c). Önkoşullama yapılan grupta, yapılmayan gruba göre apoptotik hücre açısından anlamlı bir azalma olduğu görüldü ( $p < 0.001$ ). Kontrol grubu ile diğer iki grup arasında da apoptotik hücre açısından anlamlı farklılık vardı ( $p < 0.001$ ).

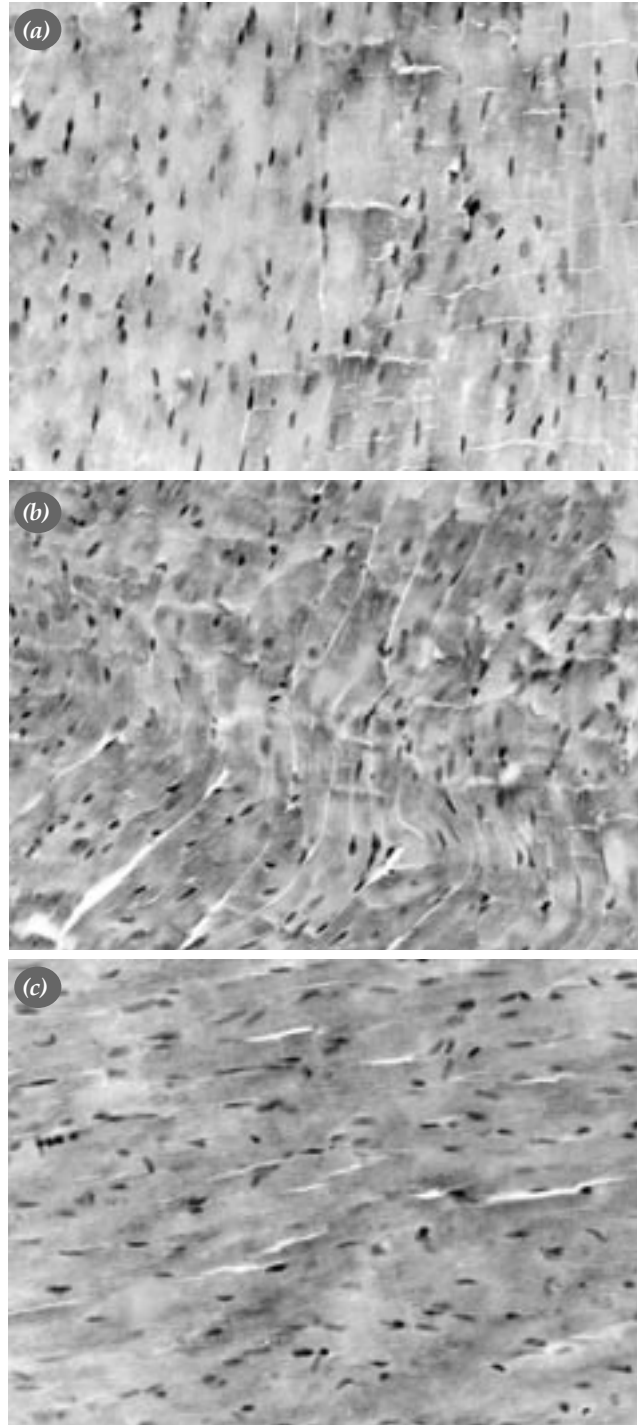
## TARTIŞMA

Miyokardın iskemik önkoşullaması ilk kez 1986 yılında Murry ve ark.<sup>[6]</sup> tarafından tanımlanmıştır. Bu çalışmada 40 dakikalık koroner oklüzyon öncesinde, her biri beşer dakikalık reperfüzyonlarla ayrılmış koroner iskemik periyotların nekroz gelişimini %75 oranında azalttığı gösterilmiştir.

Önkoşullama, nekrozun gelişmesi için gerekli süreyi uzatarak reperfüzyon ile daha fazla miyokardın kurtarılmasını sağlar. Önkoşullamanın fizyolojik temellerini oluşturan mekanizmalar, adenosin salınımı,<sup>[7]</sup>  $K_{ATP}$  kanallarının açılması<sup>[8]</sup> ve protein kinaz-C aktivasyonu<sup>[8]</sup> olarak belirlenmiştir. Adenosin, adenosin A1 ve A3 reseptörleri üzerinden kompleks bir sinyal zinciri ile önkoşullamayı başlatırken, pek çok substrat proteinini fosforilleyerek aktifleyebilen protein kinaz-C'nin etki mekanizması ise tam olarak bilinmemektedir.  $K_{ATP}$  kanal açıcıları ve protein kinaz-C aktivatörleri kullanılarak da farmakolojik mekanizmalar taklit edilmeye çalışılmıştır.<sup>[9]</sup> Bu koruyucu mekanizmanın, miyokardiyal nekroz oluşumunu sınırlamadaki etkinliği yanında, apoptozda da inhibisyon sağladığı bilinmektedir.<sup>[4]</sup> İskemik önkoşullama-

nın koruyucu etkisi koroner oklüzyon süresi uzarsa veya reperfüzyon gelişmezse ortadan kalkar.

İskemik önkoşullamanın farklı hayvan türlerinde infarkt boyutunu azalttığı kapsamlı bir şekilde gösterilmiş olmasına rağmen, programlı hücre ölümü, yani apoptoz üzerindeki etkisi hakkında bilgilerimiz sınırlıdır.<sup>[3]</sup> Bu



**Şekil 2.** Her bir gruptaki birer deneğe ait histopatolojik görüntüler: (a) Önkoşullama yapılan grup, (b) önkoşullamasız, sadece iskemi ve reperfüzyon yapılan grup, (c) kontrol grubu.

çalışmada, *in vivo* uyguladığımız deneysel protokolde, bcl-2 immünohistokimyasal boyama yöntemiyle, önkoşullama yapılan grupta apoptotik hücre ortalamasında anlamlı bir azalma olduğunu gördük.

Miyokardiyal iskeminin, çeşitli hayvan modellerinde ve insanda apoptoza neden olduğu ortaya konmuş olmasına rağmen,<sup>[10]</sup> artan kanıtlar apoptoz ekspresyonunun öncelikle reperfüzyon sırasında meydana geldiğini işaret etmektedir.<sup>[4]</sup> Ancak, apoptozun iskemi sırasında mı, yoksa reperfüzyon sırasında mı tetiklendiği hala tartışmalıdır.<sup>[4]</sup>

Piot ve ark.<sup>[3]</sup> *in vivo* sıçanda iskemi ve reperfüzyon sonrasında, önkoşullama yapılan kalplerde hem inter-nükleozomal DNA parçalanmasının hem de infarktüs boyutunun önemli ölçüde azaldığını göstermişlerdir. Wang ve ark.<sup>[11]</sup> 5 dakika iskemi, 5 dakika reperfüzyon ile önkoşullamadan sonra, 30 dakika iskemi ve 3 saatlik reperfüzyon sonrasında köpeklerde miyokardiyal apoptozun inhibe edildiğini göstermişlerdir. Bizim bulgularımız da bu çalışmalarla uyumludur.

Geniş bir anti-apoptotik proteinler grubundan oluşan bcl-2 ailesinin (bcl-2, bcl-x1, bcl-w, Bag-1 ve BI-1) ekspresyonu apoptozu önler ve geniş bir pro-apoptotik protein grubunun (Bax, Bak, Bad, Bid ve Bim) ekspresyonunu azaltır.<sup>[12]</sup> İskemik önkoşullamanın anti- ve pro-apoptotik protein ekspresyonu dengesini değiştirerek apoptozda azalma sağladığı gösterilmiştir.<sup>[4]</sup> Misao ve ark.<sup>[13]</sup> bcl-2 proteininin akut infarktüsli insan kalplerinin kurtarılmış miyositlerinde salgılandığını bildirmişlerdir; bu durum, bazı kalp hücrelerinin infarktüsün erken döneminde bcl-2 ekspresyonu sayesinde korunabileceğini düşündürmektedir. İnfarktüsli dokuları çevreleyen kurtarılmış miyositlerde bcl-2 protein ekspresyonu görülmesine karşın, infarktüsli bölgede Bax pro-apoptotik proteinin salgılanmasında belirgin artış olduğu bildirilmiştir.<sup>[4]</sup>

Schmitt ve ark.<sup>[14]</sup> açık kalp cerrahisi sonrası erken dönemde miyokardiyal apoptozda belirgin artış, kardiyak kontraktilitede azalma meydana geldiğini bildirmişlerdir. Ayrıca, apoptozisin ameliyat sonrası miyokardiyal *stunning*'de önemli bir mekanizma olabileceğini ve antiapoptotik ajanların kardiyoplejik solüsyonlarla beraber kullanılmasının miyokardiyal korumada ek yarar sağlayabileceğini ileri sürmüşlerdir. Jenkins ve ark.<sup>[15]</sup> ise, koroner bypass cerrahisi yapılan hastalarda iskemik önkoşullamanın troponin T seviyelerini azalttığını ve ATP depolarını koruduğunu göstermişlerdir. Wu ve ark.<sup>[16]</sup> ise açık kalp ameliyatı boyunca kardiyoplejik miyokardiyal iskeminin, kardiyomiyosit apoptozunda artışa yol açtığını bildirmişlerdir. Bununla birlikte, iskemik önkoşullamanın ameliyat öncesi ve sonrasında miyokardiyal apoptoz üzerinde anlamlı etkisi bulunmamış; ayrıca, iskemik önkoşullama ile ameliyat sonrası-

da daha düşük dereceli kardiyak disfonksiyon görülmesi apoptozdan bağımsız bulunmuştur.

İskemik önkoşullamanın miyokardiyal aksiyon potansiyeli ve refraktör periyot sürelerindeki heterojeniteyi azaltarak veya ileti zamanlarını değiştirerek re-entran aritmilerin gelişmesini önlediği düşünülmektedir.<sup>[17]</sup> Bu antiaritmik etkinin mekanizması tam olarak anlaşılmasına rağmen, ATP bağımlı K<sup>+</sup> ve Na<sup>+</sup> kanallarının eksitabilitesindeki değişimlerin antiaritmik etkinin hücresel temelini oluşturduğu tahmin edilmektedir.<sup>[18]</sup>

Sonuç olarak, iskemik önkoşullama yoluyla apoptozun azaltılmasında yer alan mekanizmaların anlaşılması, miyosit kaybının en aza indirilmesine ve bu şekilde hem nekrotik hem de apoptotik dokulardan oluşabilen toplam infarkt boyutunun düşürülmesine, ayrıca ventriküler aritmi sıklığının azaltılmasına yardımcı olabilir.

## KAYNAKLAR

1. Nakano A, Cohen MV, Downey JM. Ischemic preconditioning: from basic mechanisms to clinical applications. *Pharmacol Ther* 2000;86:263-75.
2. Tomai F, Crea F, Chiariello L, Gioffre PA. Ischemic preconditioning in humans: models, mediators, and clinical relevance. *Circulation* 1999;100:559-63.
3. Piot CA, Padmanaban D, Ursell PC, Sievers RE, Wolfe CL. Ischemic preconditioning decreases apoptosis in rat hearts *in vivo*. *Circulation* 1997;96:1598-604.
4. Zhao ZQ, Vinten-Johansen J. Myocardial apoptosis and ischemic preconditioning. *Cardiovasc Res* 2002;55:438-55.
5. Walker MJ, Curtis MJ, Hearse DJ, Campbell RW, Janse MJ, Yellon DM, et al. The Lambeth Conventions: guidelines for the study of arrhythmias in ischaemia infarction, and reperfusion. *Cardiovasc Res* 1988;22:447-55.
6. Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation* 1986;74:1124-36.
7. Seiler C, Billinger M. Adenosine-induced preconditioning of human myocardium? *Circulation* 1998;98:824-5.
8. Downey JM, Cohen MV. Preconditioning: what it is and how it works. *Dialogues* 1997;2:179-97.
9. Fryer RM, Eells JT, Hsu AK, Henry MM, Gross GJ. Ischemic preconditioning in rats: role of mitochondrial K(ATP) channel in preservation of mitochondrial function. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2000;278:H305-12.
10. Vakeva AP, Agah A, Rollins SA, Matis LA, Li L, Stahl GL. Myocardial infarction and apoptosis after myocardial ischemia and reperfusion: role of the terminal complement components and inhibition by anti-C5 therapy. *Circulation* 1998;97:2259-67.
11. Wang NP, Bufkin BL, Nakamura M, Zhao ZQ, Wilcox JN, Hewan-Lowe KO, et al. Ischemic preconditioning reduces neutrophil accumulation and myocardial apoptosis. *Ann Thorac Surg* 1999;67:1689-95.
12. Zhao ZQ, Nakamura M, Wang NP, Wilcox JN, Shearer S, Ronson RS, et al. Reperfusion induces myocardial apoptotic cell death. *Cardiovasc Res* 2000;45:651-60.

13. Misao J, Hayakawa Y, Ohno M, Kato S, Fujiwara T, Fujiwara H. Expression of bcl-2 protein, an inhibitor of apoptosis, and Bax, an accelerator of apoptosis, in ventricular myocytes of human hearts with myocardial infarction. *Circulation* 1996; 94:1506-12.
14. Schmitt JP, Schroder J, Schunkert H, Birnbaum DE, Aebert H. Role of apoptosis in myocardial stunning after open heart surgery. *Ann Thorac Surg* 2002;73:1229-35.
15. Jenkins DP, Pugsley WB, Alkhulaifi AM, Kemp M, Hooper J, Yellon DM. Ischaemic preconditioning reduces troponin T release in patients undergoing coronary artery bypass surgery. *Heart* 1997;77:314-8.
16. Wu ZK, Laurikka J, Saraste A, Kyto V, Pehkonen EJ, Savunen T, et al. Cardiomyocyte apoptosis and ischemic preconditioning in open heart operations. *Ann Thorac Surg* 2003; 76:528-34.
17. Okishige K, Yamashita K, Yoshinaga H, Azegami K, Satoh T, Goseki Y, et al. Electrophysiologic effects of ischemic preconditioning on QT dispersion during coronary angioplasty. *J Am Coll Cardiol* 1996;28:70-3.
18. Parratt J, Vegh A. Pronounced antiarrhythmic effects of ischemic preconditioning. *Cardioscience* 1994;5:9-18.