

# Miyokardiyal ve Renal İskemi/Reperfüzyon Zedelenmesi ve Deneysel Modelleri

## Myocardial and Renal Ischemia/Reperfusion Injury and Experimental Models: Review

Şefika Pınar ŞENOL,<sup>a</sup>  
Bahar TUNÇTAN<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Farmakoloji AD,  
Mersin Üniversitesi Eczacılık Fakültesi,  
Mersin

Geliş Tarihi/Received: 14.10.2015  
Kabul Tarihi/Accepted: 04.03.2016

Yazışma Adresi/Correspondence:  
Şefika Pınar ŞENOL  
Mersin Üniversitesi Eczacılık Fakültesi,  
Farmakoloji AD, Mersin,  
TÜRKİYE/TURKEY  
pnr.sn1@hotmail.com

**ÖZET** Doku iskemisi, miyokard infarktüsü ve inme gibi klinik durumlarda ya da damar cerrahisi ve organ transplantasyonunda komplikasyon olarak ortaya çıkabilen bir durumdur. Reperfüzyon, iskemiyeye maruz kalan dokunun yeniden kanlanarak oksijenlenmesidir. İskemi/reperfüzyon (I/R) zedelenmesi, kan akışının yeniden düzenlenmesiyle gelişen inflamatuvar tepkilerin bir sonucudur. Erken evrede glikoliz yoluyla laktat üretimi sonucu hücre içi pH değeri düşer. Hücreleri nekroza karşı koruyan bu düşüş, reperfüzyon sırasında normal pH değerine yükseldiğinde iskemik hücrelerin ölümünü hızlandırır. Orta evre ise oksidatif stres ile belirgindir. Oksidatif stres belli bir eşiği aşarsa hücresel işlev bozukluğu, geri döndürülemez zedelenme ve hücre ölümü gerçekleşir. Geç evrede, inflamatuvar hücreler ve adezyon molekülleri baskındır. Birçok inflamatuvar molekül tarafından uyarılan nötrofil etkinliği I/R süreci boyunca görülür. Miyokardiyal I/R zedelenmesi miyokardiyal sersemleme (stunning), reperfüzyon aritmileri, miyositlerde nekroz ile koroner endotelial ve mikrovasküler işlev bozukluğu gibi istenmeyen durumların ortaya çıkmasına yol açabilir. Deneysel olarak çalışılan konular miyokardiyal sersemleme, hibernasyon, reperfüzyon aritmileri ve ön koşul değildir. Akut renal yetmezlik (ARY) insanlarda yüksek mortalite ile ilişkili majör bir böbrek hastalığıdır. Kalp debisinin azalması, renal vasküler oklüzyon veya obstrüksiyon ile renal transplantasyon gibi durumların neden olduğu iskemik, ARY gelişmesine neden olabilir. Deneysel olarak çift taraflı (bilateral) ve tek taraflı (unilateral) renal I/R zedelenmesi oluşturulabilmektedir. Çift taraflı iskemik ARY modeli insandaki patolojik duruma çok daha uygun olmasından dolayı yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu çalışmada, ilaçların miyokardiyal veya renal I/R zedelenmesine bağlı olarak gelişen fizyopatolojik değişiklikler üzerindeki etkilerinin araştırılması amacıyla kullanılan deneysel modeller üzerinde durulmuştur.

**Anahtar Kelimeler:** İskemi; reperfüzyon hasarı; oksidatif stres; inflamasyon;  
miyokardiyal reperfüzyon hasarı; akut böbrek hasarı

**ABSTRACT** Tissue ischemia is a condition that can occur with clinical conditions like myocardial infarction and stroke or as a complication of vascular surgery and organ transplantation. Reperfusion is reoxygenation of tissue exposed to ischemia by restoration of blood flow. Ischemia/reperfusion (I/R) injury is a consequence of inflammatory reaction induced by modulating blood flow. Intracellular pH falls as a result of lactate production through glycolysis at early stage. The decrease protecting cells against necrosis accelerates ischemic cell death at normal pH value during reperfusion. Intermediate phase is characterized by oxidative stress. If oxidative stress exceeds a certain threshold, cellular dysfunction, irreversible injury, and cell death occurs. At the late stage, inflammatory cells and adhesion molecules are dominant. Neutrophil activity stimulated by many inflammatory molecules occurs during I/R. Myocardial I/R injury may lead to several undesirable conditions like myocardial stunning, reperfusion arrhythmias, myocyte necrosis, and endothelial and coronary microvascular dysfunction. The main issues studied experimentally are myocardial stunning, hibernation, reperfusion arrhythmias, and preconditioning. Decreased cardiac output, renal vascular occlusion or obstruction, and certain conditions like renal transplantation may arise ischemia leading to acute renal failure (ARF), a major renal disease associated with a high mortality rate in humans. Bilateral and unilateral renal I/R injury can be induced by experimentally. Bilateral ischemic ARF model is used more widely due to its suitability to the pathologic condition in humans. This review will focus on the experimental methods used to investigate effects of drugs on the physiopathological changes induced by myocardial or renal I/R injury.

**Key Words:** Ischemia; reperfusion injury; oxidative stress; inflammation;  
myocardial reperfusion injury; acute kidney injury

doi: 10.5336/pharmsci.2015-47990

Copyright © 2016 by Türkiye Klinikleri

**Türkiye Klinikleri J Pharm Sci 2016;5(2):93-109**

## İSKEMİ/REPERFÜZYON ZEDELENMESİ

Hipoksi, oksijenli solunumu aksatan genel bir hücre zedelenmesi ve ölüm nedenidir. Arteriyel ya da venöz kan akımı bozukluğuna bağlı olarak organ ve dokunun yetersiz kanlanmasına yol açan iskemi, hipoksiye neden olan başlıca etkindir. Doku iskemisi; miyokard infarktüsü ve inme gibi klinik durumlarda görülen, damar cerrahisi ve organ transplantasyonunda komplikasyon olarak ortaya çıkabilen patolojik bir durumdur. Bu noktada iskemik dokunun kan akımının yeniden sağlanması yoluyla oksijenlenmesi (reperfüzyon) son derece önemlidir. Ancak, özellikle uzun süreli bir iskemiden sonra gerçekleşen reperfüzyon paradoksal olarak doku zedelenmesine neden olmaktadır. Reperfüzyonun sözü edilen olumsuz etkisi, kan akışının yeniden düzenlenmesiyle indüklenen inflamatuvar tepkilerin bir sonucudur ve “İskemi/Reperfüzyon (İ/R) zedelenmesi” olarak adlandırılmaktadır.<sup>1</sup>

Kısa süreli iskemi sonrası reperfüzyon dokuda tam iyileşme sağlayabilirken, uzun süreli iskemi sonucu oluşan doku zedelenmesine ek olarak, reperfüzyon durumu daha da kötüleştirebilir.<sup>2</sup> İ/R zedelenmesi gelişim mekanizmaları açısından erken, orta ve geç olmak üzere üç evrede incelenmektedir. İskemiye bağlı oluşan zedelenme evrelerinin ne kadarlık bir iskemi süresine denk geldiği kullanılan İ/R zedelenmesi modeline bağlı olarak değişkenlik gösterebilmektedir. Erken, orta ve geç evrelerde gelişen olaylara aşağıda değinilmiştir.

**1. Erken Evre:** Erken evrede glikoliz yoluyla laktat üretimi sonucunda hücre içi pH değeri düşer. Hücrelerin nekroza karşı kendilerini korumalarını sağlayan bu düşüş, reperfüzyon sırasında normal pH değerine yükseldiğinde iskemik hücrelerin ölümünü hızlandırır. İskemi süresince, hücresel asidoz ve azalmış oksijen nedeni ile ksantin oksidaz (KO) dâhil tüm enzimlerin etkinliği azalır. Hücresel oksijen azlığı serbest radikal üretimini de sınırlar. Hücre zarında iyon taşıma mekanizmalarındaki bozukluk sonucu hücre içinde kalsiyum (Ca<sup>2+</sup>) ve sodyum (Na<sup>+</sup>) düzeyleri yükselir. Bu da ozmotik basıncı artırarak hücrelerin şişip yırtılmasına neden olur. Ek olarak, Ca<sup>2+</sup> artışı hücreyi nekroza, apoptoza ve otofajiye götürür.<sup>3-7</sup>

Şiddetli iskemi süresince adenosin trifosfat [*adenosine triphosphate*; (ATP)] kullanılarak adenosin difosfat [*adenosine diphosphate*; (ADP)]'a, ADP ise adenosin monofosfat [*adenosine monophosphate*; (AMP)]'a ve sonra sırasıyla adenosin, hipoksantin, ksantin ve inozin gibi pürin metabolitlerine yıkılır. Normal koşullarda hipoksantin ksantin dehidrojenaz ile ürik aside dönüştürülür.<sup>6</sup> Ksantin dehidrojenaz (KDH)-KO enzim sistemi hücrelerde bulunmaktadır ve normal koşullarda baskın olan KDH, iskemi süresince yerini KO'ya bırakır. İ/R süresince hipoksantin KO ile ürik aside oksitlenirken, oksijen süperoksit anyonuna dönüşür.<sup>6-8</sup>

**2. Orta Evre:** Bu evre, oksidanların antioksidanlara üstünlüğü sonucunda ortaya çıkan oksidatif stres ile belgindir. İskemi süresince hücre içinde hipoksantin birikir ve reperfüzyon ile reaktif oksijen türleri (ROT)'ne dönüşür. Oksidatif stres belli bir eşiği aşarsa hücresel işlev bozukluğu geri döndürülemez zedelenme ve ardından hücre ölümüne neden olur. Tüm hücreler ROT üretirler, ancak ana kaynakları başlıca mitokondrilerdir, bunu fagosit hücreler, nötrofiller ve monositler izler. Belirgin ROT kaynağı olmalarına karşın, nötrofiller reperfüzyon zedelenmesinde önemli bir rol oynamamaktadır. Monositler fagositoz uyarısıyla yüksek miktarda ROT üretirler. Etkinleştirilmiş Kupffer hücreleri ve nötrofiller tümör nekroz faktörü (TNF), interlökin [interleukin; (IL)]-1, nitrik oksit (NO), hipoklorik asit ve lökotrienleri oluştururlarken, inflamatuvar hücreler başlıca süperoksit üretirler. ROT hücre zarında lipit peroksidasyonuna yol açarak hücresel zedelenmeyi, lökosit etkinliğini, kemotaksisi, lökosit adezyon moleküllerinin artışı ve sitokin gen ekspresyonunu indüklerler.<sup>9</sup> Memelilerde lipit peroksidasyonu enzimatik, enzimatik olmayan radikal olmayan peroksidasyon ve enzimatik olmayan serbest radikal aracılıklı yollarla indüklenebilir.<sup>10</sup>

Serbest radikal, son yörüngesinde çiftleşmemiş elektron içeren moleküldür ve son derece reaktiftir. Oksijenden türeyen serbest radikaller “ROT” olarak adlandırılır ve süperoksit radikali ile hidroksil radikalini içerirler. Oksijen ile nitrojenin tepkimesi sonucunda ortaya çıkan serbest radikaller

reaktif nitrojen türleri (RNT)'dir ve NO ile peroksinitrit bu gruba dâhildir. Serbest radikaller memeli hücrelerinde sentezlenir, nikotinamid adenin dinükleotit fosfat [nicotinamide adenine dinucleotide phosphate; (NADP)] oksidaz ve KO ile katalizlenir. KO, oksidatif reperfüzyon zedelenmesi süresince ROT üretiminde önemli role sahiptir. Süperoksit, ayrıca mitokondrielerde respiratuar kompleks I ve III tarafından oksijenden redüksiyon yoluyla da üretilebilir. Ardından süperoksit dismutaz (SOD) aracılığıyla radikal olmayan hidrojen peroksit dönüştürülür. Hidrojen peroksit ise katalaz ve glutatyon peroksit [glutathione peroxidase; (GSH-PX)] ile suya dönüştürülür.<sup>8</sup> Aşırı süperoksit varlığında hidrojen peroksit, demir ve bakır katalizi ile oldukça reaktif olan hidroksil radikaline dönüşür.<sup>8,11-13</sup> Hidroksil radikali çok güçlü bir oksidandır ve hücre zarındaki lipitler, fosfolipitler ve kolesterol için önemli bir peroksidasyon başlatıcı moleküldür; ayrıca, çoklu doymamış yağ asitlerinin metilen yapısından hidrojen atomunu ayırır ve dienler, lipit hidroperoksit radikalleri (LOO<sup>•</sup>) ile lipit hidroperoksit (LOOH) üretir.<sup>14</sup> Bu maddeler de hücre zarı lipitlerinde lipit peroksidasyon zincir tepkimelerini tetiklerler. Memelilerde 120-150 farklı hidroperoksit oluşmaktadır.<sup>15</sup> ROT ve RNT serbest radikallerdir; çünkü sabit değildirler, yarılanma ömürleri kısadır ve etkileri yereldir. Ancak, lipit hidroperoksitler ve onların aldehitler gibi yıkım ürünleri daha uzun ömürlüdür, hücre içinde ve hücreler arasında taşınabilirler ve etkileri köken aldıkları noktadan daha geniş yayılım gösterir. Serbest radikaller ayrıca mitokondride respiratuar kompleks enzimleri aracılığıyla da üretilirler.<sup>14</sup>

Reperfüzyon süresince hücrel oksijen düzeylerinin artışı ve hücrel pH değerinin normale dönmesi, enzimatik etkinliklerin normale dönmesine ve aşırı miktarda süperoksit anyonları ile lipit peroksidasyonuna yol açar.<sup>6</sup> Serbest radikaller proteinlerin fragmantasyonuna ve modifikasyonuna yol açarak proteinleri proteolitik degradasyona götürür. Lipit peroksidasyon aldehit ürünleri ise proteinlere ve deoksiribonükleik asit (DNA)'lere kovalan biçimde bağlanarak onların işlevlerinde değişikliğe neden olurlar; ayrıca, orta evredeki birçok sitokin ve kemokin üretiminden sorumludur-

lar.<sup>16,17</sup> Örneğin; malondialdehit, 4-hidroksi-2-hekzenal ve akrolein gibi lipit hidroperoksitaz türevleri kaspaz yollarını etkinleştirerek apoptozu indüklerler, ayrıca proteinlerin proteazomal degradasyona duyarlılığını artırarak, hücre sinyali bozukluğuna neden olurlar ve proteinlerin tersiyer yapısına etkiyerek işlevlerini bozarlar, aldehitler DNA zedelenmesine neden olurlar ve ısı şok proteini (heat shock protein) 72'yi değiştirerek hücre koruyucu etkisini azaltırlar.<sup>14,17-19</sup> Dahası, hücre içi Ca<sup>2+</sup> artışı, hücrel pH değerinin normalleşmesi ve serbest radikallerin reperfüzyon süresince aşırı üretimi mitokondriyal permeabilite geçiş porları [*mitochondrial permeability transition pores*; (mPTPs)]'nın açık kalma süresini uzatarak mitokondri içeriğinin sitozole geçmesine ve mitokondriyal çöküşe neden olur; bu durum ise hücre canlılığının kaybolmasıyla sonuçlanır.<sup>4,20-23</sup> ROT, yüksek derişimdeki Ca<sup>2+</sup> ve oksidan kimyasallar mitokondriyal permeabilite geçişini [*mitochondrial permeability transition*; (MPT)]'yi indüklerken; magnezyum iyonu, düşük pH değeri ve siklosporin A engeller. Karaciğer, böbrek ve diğer hücrelerin hücre ölümüne karşı glisinin koruyucu etkisinin olduğu yapılan birçok hipoksi ve ATP tüketme modellerinde kanıtlanmıştır.<sup>16</sup> mPTP'lerin açılmasının; uzun süreli iskeminin ardından reperfüzyon dönemi süresince nekroz ve apoptoz yoluyla hücre ölümüne neden olan yaygın yol olduğuna inanılmaktadır.<sup>24,25</sup>

TNF- $\alpha$ , birçok hücre türünde çeşitli inflamatuvar ve immünomodülatör uyarılara yanıt olarak üretilebilen pleiotropik bir sitokindir. IL-1, nötrofillerde serbest radikal üretimini artırarak ROT miktarını artırır. IL-6, kültürü yapılan lenfositler, endotel hücreleri ve miyositlerden İ/R süresince salıverilmektedir. IL-6 tedavisinin kemirgenlerde oluşturulan orta derecedeki İ/R zedelenmesinde koruyucu etkisinin olduğu bildirilmiştir. NO, hücre zedelenmesinde başlıca mediyatör olarak ya da zararlı uyarılara karşı koruyucu rol üstlenen gaz yapıda bir moleküldür. İskemi süresince NO sentaz (NOS) için gerekli olan hücre içi NADP ve oksijen düzeyinin azalması sonucu NO üretimi azalır. Perfüzyon döneminde hücreye aşırı Ca<sup>2+</sup> girişi olur ve NO üretiminde patlama biçiminde artış olur. Bu-

nunla birlikte, NO artışı geçicidir; çünkü hipoksi nedeni ile endotel hücrelerde işlev bozukluğu ortaya çıkar. NO'nun reperfüzyon zedelenmesini azaltan TNF- $\alpha$ 'ya karşı direnç oluşturma ve endotelin inhibisyonu gibi yararlı etkileri, endotel hücrelerini zedeleyen nötrofiller tarafından azaltılır.<sup>9,26</sup>

**3. Geç Evre:** Geç evrede, inflamatuvar hücreler ve adezyon molekülleri baskındır. Nötrofil etkinliği birçok inflamatuvar molekül tarafından uyarılır ve İ/R dönemi süresince görülür. Nötrofil etkinliği özellikle endotelyuma adezyonu, transendotelial taşınma ile parankimal hücreye yapışmayı ve zedelenmeyi içerir. İ/R nötrofil ve endotelial hücre yüzeyindeki hücresele adezyon moleküllerini etkinleştirir. Hücresele adezyon molekülleri arasından başlıca P-selektin olmak üzere selektinler, nötrofillerin endotelial hücreler üzerindeki yuvarlanma (rolling) hareketinde ve adezyonunda rol alırlar. Reperfüzyondan 20 dk sonra düzeyleri doruk değere ulaşır. P-selektin, ayrıca trombosit sekestrasyonunda etkilidir. L-selektin P-selektine benzer özelliklidir. E-selektin ise nötrofillerin adezyonu, göçü ve toplanmasında rol oynar ve maksimum etkinliği reperfüzyondan beş saat sonra görülür.<sup>27</sup>

## MİYOKARDİYAL İSKEMİ/REPERFÜZYON ZEDELLENMESİ

Miyokardiyal İ/R zedelenmesi miyokardiyal sersemleme (stunng), reperfüzyon aritmileri ve miyositlerde nekroz ile koroner, endotelial ve mikrovasküler işlev bozukluğu gibi patogenezin ortaya çıkmasına yol açabilir.<sup>28</sup> Miyokardiyal sersemleme, ilk kez 1975 yılında Heyndrickx ve ark. tarafından köpeklerde kısa süreli koroner oklüzyonlar ile ilgili olarak tanımlanmıştır. Kısa süreli miyokardiyal iske mi dönemleri sonrası mekanik işlevin yeniden kazanılması ile zaman arasındaki ilişkinin araştırıldığı bu çalışmalarda, bölgesel elektrogramların saniyeler içinde normale dönmesine ve koroner akışın hızlıca yeniden sağlanmasına karşın, işlevsel düzensizliğin birkaç saat sürdüğü gözlenmiştir.<sup>29</sup> Miyokardiyal sersemleme, İ/R'ye bağlı geri dönüşümsüz zedelenme olmamasına ve reperfüzyonun tüm veya tüme yakın bir biçimde sürmesine karşın, kalpte oluşan uzamış

mekanik işlev bozukluğudur ve genellikle global iskemik ataklardan sonra gözlenir.<sup>30</sup> Ancak, kısa süreli iske miyi izleyen dönemlerde bile miyokardiyal sersemleme beklenmedik derecede uzun sürebilir. Örneğin; köpek kalbinde oluşturulan 15 dakikalık iske minin, 24 saatlik miyokardiyal sersemlemeye yol açtığı gözlenmiştir.<sup>31</sup> İskemik dönemi izleyen reperfüzyon dönemi ölümcül aritmilere zemin hazırlayabilir. Oluşan aritmiler genellikle idiyoventrikülerdir ve en fazla ventriküler taşikardi ve fibrilasyon gözlenir.<sup>32</sup> Kalp hücrelerinde nekroz gelişimi İ/R döneminde harekete geçen mekanizmaların ortak sonucudur. Bununla birlikte reperfüzyon döneminin ilk dakikalarında gelişen nekrozun başlıca nedeni kalp hücrelerinde gelişen kontraktürdür.<sup>33</sup> Miyokardiyal kontraktür, kalp kası hücrelerinin kasılmasını sağlayan aktin ve miyozin proteinleri arasında çapraz bağlanmanın geri dönüşümsüz olması durumunda ortaya çıkar. Reperfüzyonun erken dönemlerinde ortaya çıkan koroner endotelial işlev bozukluğunun, köpek ve kedi kalplerinde yapılan çalışmalarda 4-12 haftaya dek sürebildiği gösterilmiştir. Reperfüzyonun ilk 5 dk.sında endotelial işlev bozukluğuyla birlikte NO oluşumunda azalma, 20 dak.dan sonra ise lökosit varlığı gözlenebilir. Yalnızca iske mi uygulanan kalplerde koroner endotelial işlev bozukluğu iki ile üç saat kadar sürer ve dört-altı saat sonra herhangi bir histolojik bulgu gelişmez.<sup>34</sup> Koroner endotelial işlev bozukluğu sonucu vazodilatör yanıt azalır. Güçlü vazokonstrüktör etkileri bulunan endotelin-1 ile ROT oluşumu, koroner vazokonstrüksiyona yol açarak kan akımında azalmaya yol açar.<sup>35</sup> İ/R sonrası oluşan endotelial işlev bozukluğu, trombositlerin yol açtığı mikrovasküler tıkanıklık, ödem ve oksidatif zedelenme mikrovasküler işlev bozukluğuna yol açar. Mikrovasküler işlev bozukluğunun olduğu kalp bölgelerinde reperfüzyon döneminde kan akımı kısıtlanır ve hipoperfüze alanlar gözlenir.<sup>36</sup> Ek olarak, kalbin yeniden damarlanması ve sol ventrikül serbest durumunda oluşabilen rüptür, mikrovasküler işlev bozukluğu nedeni ile gözlenen olaylardır.<sup>37</sup>

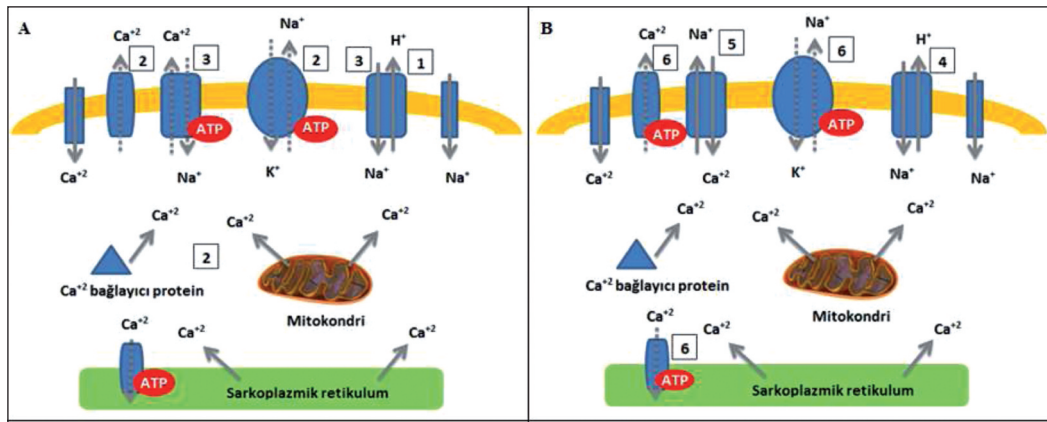
Miyokardiyal İ/R zedelenmesine neden olarak ortaya atılan ilk hipotez ATP tükenmesidir. Kardiyomiyositler mitokondrice zengindir. Kalpte ATP

sürekli yüksek miktarda tüketildiği için miyokardın bu gereksinimi yalnızca aerobik metabolizma ile karşılanabilir. Bu nedenle, kalp iskekiye maruz bırakıldığında koroner arteriyoller ve dirençli kılcallar bazal durumun üç-beş katı kan akışını artıracak düzeyde genişler. Ancak, anaerobik metabolik yolların yeterli olmaması oksijen yokluğunda miyokard içindeki ATP'nin kısa bir sürede tükenmesine ve miyokardiyumun iskekiye çok duyarlı olmasına neden olur.<sup>3</sup> İskemik miyokardiyum üzerine yapılan ilk çalışmalar, iskemiyin başlaması ile birkaç dakika içinde kasılabilirliğin bloke olduğunu ve ardından hücrelerin şişip hücre içi mikroyapıların rüptürünün 15-30 dk sonra başladığını göstermiştir.<sup>38</sup> Bu buluş, ATP tükenme hipotezinin hücre ölümünde ana neden olduğunu düşündürmüştür. ATP'de %90'lık bir azalma miyokardiyumda geri dönüşümsüz yapısal değişikliklere yol açar.<sup>38</sup> Bu nedenle, önceleri miyokarda ATP eklenmesi, iskemik miyokardiyal ölümlerin önlenmesinde etkili bir tedavi yöntemi olarak ortaya atılmıştır.<sup>38</sup> Hücre içindeki inorganik fosfat düzeyi, iskekiye başlar başlamaz artsa da, miyokardiyumda tam bir ATP tükenmesi 40-60 dk kadar sürmektedir.<sup>39</sup> Bu da hücre içindeki yüksek enerjili fosfatların hızlı bir biçimde tükendiğini düşündürmektedir. Bu nedenle hücre içi pH değerinin değişimi, bu ölümcül kaskadın bir tetikleyicisi olarak düşünülmüştür.<sup>3,39</sup> İskemik miyokardiyumda anaerobik glikoliz baskındır ve anaerobik glikoliz

hücre içi pH değerinin hızlı bir biçimde düşmesine ve troponin C'nin fosfofruktokinaz ile  $Ca^{2+}$ 'ye duyarlılığının azalmasına neden olur. Birkaç dakika içinde bu düşüş kalbin durmasına ve hücresel şişmeye yol açar. pH değerindeki bu düşmeyi tamponlamak amacıyla aşırı  $H^+$ ,  $Na^+/H^+$ -değiş tokuş sistemi ile hücre dışına geçerken, hücre içinde  $Na^+$  artışına neden olur. Bu sırada, hücre içi ATP tükenmesi  $Na^+/K^+$ -ATPaz'lar ile ATP'ye bağımlı  $Ca^{2+}$  geri alımını sağlayan ATPaz'ların etkisizleşmesine ve hücre içinde aşırı  $Ca^{2+}$  birikmesine yol açar. Benzer sonuçlar in vivo çalışmalarla da elde edilmiştir (Şekil 1 a, b).<sup>3</sup>

15 ddk daha uzun süren iskekiye, hücre içi yapıları etkilerken, 5 dk içinde yeniden oksijenlenme sağlanırsa geri dönüşümsüz hücresel zedelenmeden kaçınılabılır.<sup>40</sup> Ani reperfüzyon ya da yeniden oksijenlenme glukoz ya da serbest yağ asitleri gibi ATP üretimi için gereken substratların hızlı onarımını ve hücre dışı pH değerinin normale dönmesini sağlar. Gerçekten, tüm bu etkenler iskemik hücresel zedelenmenin önlenmesi için kaçınılmazdır; ancak, bunlar reperfüzyon zedelenmesine de yol açabilir.<sup>41</sup>

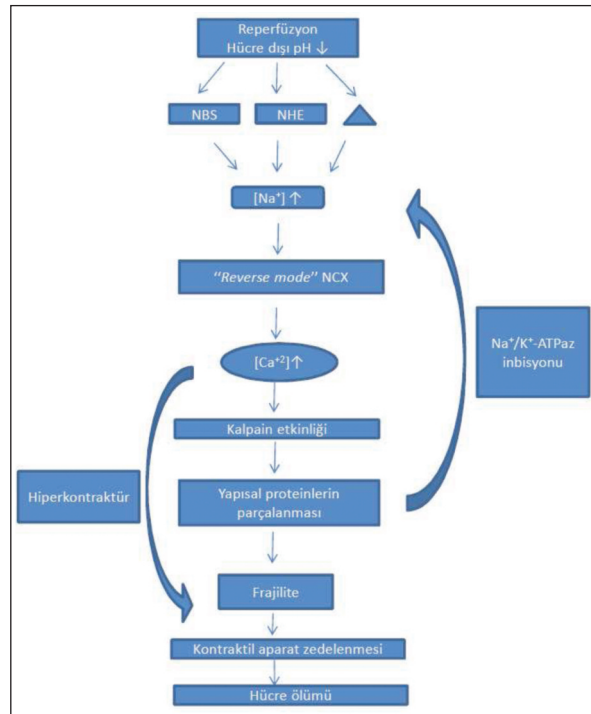
Reperfüzyon ile hücre dışı pH değerinin hızla normale dönmesi, hücre zarından ivedilikle aşırı  $H^+$  geçişine ve  $Na^+/H^+$ -değiş tokuş sistemi ile hücre içinde  $Na^+$  birikmesine neden olur. Bu fizyolojik olmayan gradyan ani olarak çalışan  $Na^+/Ca^{2+}$ -değiş



**ŞEKİL 1:** a) İskekiye süresince iyon değişimi. (1) pH değerinin düşüşüne bağlı  $H^+$ 'nin hücre dışına çıkışı, (2) ATP kaybına bağlı etkisizleşme, (3) Hücre dışı pH değerinin düşüşüne ve hücre içi  $Na^+$  birikimine bağlı  $Na^+/Ca^{2+}$  değiş tokuşunun azaltılması. b) Reperfüzyonda iyon değişimi. (4) Hücre dışı pH değerinin hızla düzenlenmesine bağlı zorlu  $H^+$  ekskresyonu, (5) Birikmiş  $Na^+$  ve  $Ca^{2+}$ 'ün "reverse mode" ekskresyonu, (6) ATP sentezinin düzelmesinin ardından  $Ca^{2+}$  reeksksiyonu. ATP; adenosine triphosphate;  $Ca^{2+}$ , kalsiyum iyonu;  $H^+$ , hidrojen iyonu;  $K^+$ , potasyum iyonu;  $Na^+$ ; sodyum iyonu.

tokuş sistemini ters moda dönüştürerek hücre içinde  $Ca^{2+}$  birikmesine neden olur.<sup>42</sup> Aynı anda, hücre içi pH değerinin hızla normale dönmesi, lizozomal olmayan  $Ca^{2+}$ 'a bağımlı bir proteaz olan kalpainin etkisinin düşük pH değerine bağlı inhibisyonunu tersine döndürerek ve mitokondriyal permeabilite değişimini geri çevirerek reperfüzyonun erken döneminde miyokardiyal zedelenmeyi hızlandırır.<sup>43</sup> Miyokardiyal sitozol ve mitokondride  $Ca^{2+}$  birikimi kalpainleri etkinleştirir ve kalpainlerin etkinleşmesi ile kontraktıl aparat zedelenir. Kalpain, miyosit ve mitokondrideki yapısal ve işlevsel proteinleri parçalayarak enerji üretimini aksatır.<sup>44</sup> Birçok deneysel çalışmada kalpain sisteminin miyokard infarktüsü, reperfüzyon ve iskemi sonrası yapısal yeniden modellemede rolü olduğu kanıtlanmıştır. Kalpain narin hücresel yapılanmaya ve bant nekrozu gelişmesiyle sonuçlanan hiperkontraktüre (aşırı daralmaya bağlı olarak kas liflerinin mekanik yırtılması), apoptozun başlamasına ve mitokondriyal porun açılmasına neden olur (Şekil 2).<sup>3,45</sup>

Miyokardiyal zedelenme aynı zamanda yenido oksijenlenme sonucu  $Ca^{2+}$ 'ye duyarlı proteazlara ek olarak, miyokard içi respiratuar zincir ve ektopik KO etkinleştirildiğinde gerçekleşir. Bu etkinleşme aerobik metabolizmada ani düzelmeye neden olur ve başta süperoksit radikali olmak üzere ROT birikimi olur. Fizyolojik koşullarda süperoksit, SOD ile hidrojen peroksit'e dönüştürülür. Hidrojen peroksit ise katalaz ve GSH-PX ile suya dönüştürülür. Aşırı süperoksit varlığında hidrojen peroksit, demir ve bakır katalizi ile oldukça reaktif bir molekül olan hidroksil radikaline dönüşür. Hidroksil radikali dayanıklı değildir, hücresel yapılarda, enzimlerde ya da hücre zarındaki kanal proteinlerinde zedelenmeye neden olur.<sup>46</sup> Bu olaylar sonucunda hücreler reperfüzyon başlar başlamaz inflamatuvar kaskadın etkinleşmesi ve sitokinler ile katekolaminler gibi biyoaktif moleküllerin salıverilmesi ile hücresel ölüme ya da miyokardiyal kasılma işlev bozukluğuna daha duyarlı duruma gelir.<sup>47</sup> Dahası, hücre içi  $Ca^{2+}$  ve ROT,



**ŞEKİL 2:** Reperfüzyon süresince kalpain etkinliğinin hızlı hücre ölümüne katkıda bulunduğu düşünülen olası mekanizmalar. [ $Ca^{2+}$ ], Hücre içi kalsiyum iyonu derişimi;  $Ca^{2+}$ , kalsiyum iyonu;  $Na^+/K^+-ATPaz$ , sodyum potasyum ATPaz; [ $Na^+$ ], hücre içi sodyum iyonu derişimi; NBS: sodyum/bikarbonat birlikte taşıyıcısı (sodium/bicarbonate cotransporter); NCX: sodyum/kalsiyum değiş tokuş sistemi (sodium/calcium exchanger system); NHE: sodyum/hidrojen değiş tokuş sistemi (sodium/hydrogen exchanger system); ▲: sodyum birikimine neden olan başka mekanizmalar.

“gap junction”lar aracılığıyla yakın hücrelere yayılıp, zedelenmenin yaygınlaşmasına neden olabilir.<sup>45</sup> Sonuç olarak, reperfüzyondan 30-60 dk sonra,  $Ca^{+2}$ 'nin aşamalı olarak ekskresyonu ve sarkoplazmik retiküluma ATP'ye bağımlı  $Ca^{+2}$  alınmasıyla hücre homeostazı sağlanır. Bu İ/R süreci, hücre içi  $Ca^{+2}$  düzeyinde iki pike neden olur. İlk pik iskemik başlangıcından 15-60 dk sonra, ikincisi ise reperfüzyonun ilk 30 dk içinde görülür.<sup>48</sup>

### MİYOKARDİYAL İSKEMİ/REPERFÜZYON MODELLERİ

Miyokardiyal İ/R zedelenmesi vasküler bozukluk, aritmi ve miyokardiyal sersemleme ile infarkt alanının genişlemesi gibi patolojilerle sonuçlanan bir sendrom olarak kabul edilebilir.<sup>49</sup> İ/R sonucu ortaya çıkan miyokardiyal sersemlemeden nekroza dek giden zedelenmeyi incelemek için değişik deneysel düzenekler kullanılmaktadır. Deneysel olarak çalışılan konular ise miyokardiyal sersemleme, hibernasyon (kronik kontraktıl işlev bozukluğu), reperfüzyon aritmileri ve ön koşullamadır.<sup>50,51</sup> Miyokardiyal sersemleme ve ön koşullama laboratuvar tabanlı buluşlar olup, sonradan kliniğe uyarlanmışlardır. Hibernasyon ise klinik bir olgudur. Hibernasyonun klinik önemi, kronik kan akımı azalması durumunda aerobik metabolizmanın iyileştirilmesine bağlı olarak miyokardiyumun canlılığını korumasıdır.<sup>52</sup> Hibernasyonda en güçlü sorunu infarktüse neden olmayan azaltılmış akış durumunu sağlayabilmektir.<sup>53</sup> Temel düzeyde çalışma yapıp kanıtlamada güçlükler vardır, ayrıca uygun hayvan modelleri bulunmamaktadır.

### MİYOKARDİYAL SERSEMLEME

Miyokardiyal sersemlemenin deneysel incelenmesinde çeşitli yöntemler kullanılmaktadır. Bu yöntemler bölgesel ya da global iskemik oluşturulmasına göre ikiye ayrılmaktadır. Global iskemik sonucu miyokardiyal sersemleme in vitro izole kalp preparatı ya da in vivo kardiyoplejik durdurma (arrest) yöntemi ile taklit edilebilir. Bölgesel iskemik oluşturulan modeller ise üç türdür: “Klasik miyokardiyal sersemleme” adı verilen ilk model tümüyle geri dönüşümlü olup, tek bir iskemik dönem sonrası oluşturulur. Deneysel çalışmalarda en çok kullanılan ve ilk tanımlanan modeldir.<sup>54,55</sup> Bu yöntemde,

köpekte 20 dk koroner oklüzyon herhangi bir miyokardiyal nekroza yol açmazken, reperfüzyonla birlikte miyokardiyumun kasılma performansının eski durumuna dönüşü birkaç saat gecikmektedir.<sup>56</sup> İkincisi, çoklu iskemik dönemler sonrası oluşturulan tümüyle geri dönüşümlü miyokardiyal sersemlemedir. Bu yöntemde, yinelenen 5 dk koroner oklüzyonlar sistolik işlevi baskılamakta ve geri dönüşümsüz zedelenme olmaksızın uzamış kontraktıl bozukluğa yol açmaktadır.<sup>57</sup> Üçüncüsü ise kısmen geri dönüşümsüz tek iskemik dönem sonrası oluşturulan miyokardiyal sersemleme modelidir. Yapılan bir çalışmada, köpeklerde 20 dk çok, üç saatten az süre koroner oklüzyon uygulanmasının ardından reperfüzyon uygulanması ile subepikardiyal dokunun canlı kalmasına karşın, riskli bölgedeki subendokardiyal bölümün yoğun biçimde infarktılı olduğu gözlenmiştir.<sup>56</sup> Reperfüzyon ile kurtarılan subepikardiyal dokunun kontraktıl işlevini geri kazanması için günler ya da haftalar gerekebilmektedir.<sup>58</sup> Böylece, akut miyokardiyal infarktüs boyunca erken reperfüzyon infarktüsülü subendokardiyum ve sersemlemiş subepikardiyum karışımı ile sonuçlanmaktadır. Bu yöntem ile kliniğe uyarlanabilecek önemli sonuçlar alınabilmesine karşın, metodolojik sorunların çokluğu nedeni ile yaygın olarak kullanılamamaktadır. Bunlara ek olarak, miyokardiyal oksijen gereksinimini artırarak da miyokardiyal sersemleme modeli oluşturulabilir.<sup>54</sup>

### REPERFÜZYON ARİTMİLERİ

Reperfüzyon aritmileri, deneysel olarak mekanik yolla oluşturulan aritmi yöntemleri başlığı altında değerlendirilmektedir. Antiaritmik ilaçların fibrilasyon üzerindeki etkilerini ölçmek için önceleri izole perfüze kalpte koroner arter oklüzyonu ve reperfüzyonu yöntemi sıklıkla kullanılmıştır.<sup>59</sup> Sonraları ise Clark ve ark. tarafından anestezi edilmiş sıçanlarda koroner arter ligasyonunun infarkt büyüklüğünü belirlemek ve deneysel ritim bozukluklarını ölçmek için uygun bir yöntem olarak önerilmesinin ardından, in vitro ve in vivo İ/R yöntemleri ile aritmilerin patofizyolojisi ve tedavisine yönelik yapılan çalışmaların önü açılmıştır.<sup>60</sup> Örneğin; Harris ve ark., sıçanlarda koroner arter ligasyonu nedeni ile ortaya çıkan aritmilerin şiddeti üzerine hipotermi, soğuk ve izole stresin etkisini

çalışmışlardır.<sup>61</sup> Bernier ve ark. ise izole perfüze sıçan kalbinde reperfüzyon ile indüklenen aritmi modelinde miyokardiyal infarktüs ve ventriküler aritmilere neden olan oksijen türevi serbest radikalleri araştırmışlardır.<sup>62</sup>

## ÖN KOŞULLAMA

Ön koşullama ilk kez Murry ve ark. tarafından tanımlanmıştır.<sup>63</sup> Köpeklerde, 40 dk iskemi öncesi dört kez koroner tıkaama yoluyla 5 dk iskemi ve 5 dk reperfüzyon ile yapılan ön koşullamanın, ön koşullama yapılmayan kalpler ile karşılaştırıldığında reperfüzyon sonrası miyokarddaki infarktüs boyutunda %75 azalma sağladığı görülmüştür. Ön koşullamanın keşfinden sonra Zhao ve ark. tarafından köpek kalbi modelinde yapılan bir çalışmada, 60 dk koroner oklüzyon ile oluşturulan iskemi ve üç kez 30 sn reperfüzyonun ardından otuzar saniye oklüzyon döneminin, bu protokolün yapılmadığı kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, üç saatlik bir reperfüzyon sonrası infarkt boyutunun %40 oranında azaldığı görülmüş ve bu durum "art koşullama" olarak adlandırılmıştır.<sup>64</sup> Art koşullamanın sağladığı korumanın niceliği ön koşullama protokolüne benzerdir. İşlemin reperfüzyondan 1 dakika bile gecikmesi koruyucu etkilerinin tümüyle kaybına neden olmasına yeteceğinden, art koşullamanın zamanlaması son derece önemlidir. Art koşullama, reperfüzyonun erken dönemi boyunca salıverilen serbest radikallerdeki belirgin azalma ile ilişkilidir ve bu dönem boyunca hücresel zedelenmenin azalmasına katkıda bulunduğu düşünülmektedir.<sup>65</sup> Yapılan çalışmalarda elektif kalp ameliyatı sırasında ya da akut miyokard infarktüsü sonrası koroner anjiyoplasti boyunca koşullamanın olumlu etkisi görülmüştür.<sup>66-69</sup> Dolayısıyla, hem ön hem de art koşullamanın klinik yararları olabileceği öngörülebilir. Öte yandan, fizyolojik bir koruma mekanizması olarak da rol oynayabilen İ/R ön ve art koşullamaya bağlı olarak yeterli bir korumanın sağlanamadığını bildiren çalışmalar bulunmaktadır.<sup>70</sup>

Akut miyokard infarktüsünün klinik önemi göze alındığında, bu durumu taklit eden hayvan modelleri kullanarak patogeneze ve tedavi etkinliklerini araştırmak önem taşımaktadır.<sup>71</sup> Bu amaçla

sıçan ve fareler, barınma, yetiştirme ve kullanım kolaylığı açısından en çok yeğlenen deney hayvanlarıdır. Geçmişten günümüze dek yapılan araştırmalarda Sprague-Dawley, Wistar, Fisher ve Lewis gibi sıçan türleri kullanılmıştır. İ/R'yi hedefleyen kardiyoprotektif mekanizmaların çalışılmasında kullanılan ex vivo, in vivo ve in vitro yöntemler aşağıda ayrıntılı bir biçimde açıklanmıştır.<sup>72-75</sup>

## Ex Vivo Yöntemler

### İzole perfüze kalp yöntemi (Langendorff preparatı)

1987 yılında Alman fizyolog Oscar Langendorff tarafından geliştirilen ve aynı adla bilinen bu yöntem ile; kalbi iskemi ve diğer durumlardan koruyan yeni terapötiklerden tek bir genin değiştirilmesinin kalp fizyolojisi üzerindeki etkisine dek miyokardiyal fizyoloji, moleküler biyoloji ve farmakoloji alanında hâlen birçok çalışma yapılmaktadır.<sup>74</sup>

Yöntem, geçen yüzyıl içinde birçok değişikliğe uğramış olmasına karşın, genel prensipler bugün hâlâ aynıdır. Temelinde sistemik damarlardan izole edilmiş, vücuttan uzaklaştırılmış ve plazma ya da kan benzeri bir çözelti ile perfüze edilen kalp preparatı bulunmaktadır. Aort tabanında basınç altında koroner arterleri besleyen bir açıklık bulunmaktadır. İzole kalp aorttan fizyolojik çözelti gönderilen bölüme bir tüp aracılığıyla bağlanır. Klasik Langendorff yönteminde perfüzyon çözeltisi aorta sabit hidrostatik basınç ya da sabit hızla geriye doğru (retrograd) olarak verilir. Bu yöntemle perfüzyon çözeltisi normal ventriküler yolla dolaşmamaktadır.<sup>75</sup>

Bu yöntemde, anestezi altındaki sıçanlara trakea kanülasyonu ile yapay solunum sağlandıktan sonra kalp hızlıca çıkarılır ve aorttan kanüle edilerek 1 dk süre aşılmadan Langendorff sistemine yerleştirilir. Kalpler burada normal aerobik perfüzyon çalışmalarında kullanılan %5 CO<sub>2</sub> ve dengeli oksijen içeren gaz karışımı ile havalandırılan 37°C sıcaklıktaki oksijenlenmiş çözelti ile perfüze edilir.<sup>76</sup> Kasılma işlevinin ve düzenli kalp ritminin stabilizasyonu için 5-10 dk beklenir. Süre bitiminde kalbin kasılma işlevini ölçmek için, ventrikül içine basınç transduserine bağlı balon ya da pulmoner vene giden



açıklıklardan biriyle sol atriyum kanüle edilip perfü-  
zat akışının aorttan sol atriyuma çevrilerek çalışan  
kalp modeli ile çalışmaya devam edilebilir.<sup>77</sup>

### Çalışan kalp modeli

Çalışan kalp modeli in vivo durumları daha iyi tak-  
lit eder. En önemli avantajı ise perfü-  
zat akışının, in situ kan akışına benzemesidir.<sup>75</sup> Neely ve ark. tara-  
fından 1973 yılında geliştirilen bu modelde kalp sı-  
vıyı normal sol ventriküler dolaşım yoluyla  
pompalamaktadır. Perfüze edilen sıvı kanüle edi-  
len sol atriyumdan kalbe girer, sol ventrikülden ge-  
çerek aorttan çıkar.<sup>78</sup>

### Ex Vivo Modellerin Avantajları ve Sınırlamaları

İzole perfüze kalp modeli, kalp korunmasının iyi-  
leştirilmesini sağlayacak ve greftte İ/R zedelenme-  
sini azaltacak girişimlerin değerlendirilmesi için  
çok kullanışlıdır. Ancak, yöntemin iyi eğitilmiş ki-  
şilerce uygulanması gerekir. İzole kalp preparatı-  
nın potansiyel bir dezavantajı bilinmelidir: Kalp  
ezilme ve yaralanmalara karşı savunmasız oldu-  
ğundan, preparat belirli bir ölçüde beceri gerektirir.  
İzolasyon ve enstrümantasyon sırasında farkında  
olunmadan kalbin akımsız kalması “ön koşullama”  
olarak bilinen tablonun ortaya çıkmasına neden  
olabilir. Perfü-  
zatın aorta retrograd yöntemle veril-  
mesi (çok yüksek perfüzyon basıncında) aort ka-  
pağı yetersizliğine yol açabilir ve böylece tüm  
perfü-  
zat koroner dolaşıma geçemeyebilir. Krista-  
loid tamponu kullanıldığında, koroner akışkanlık  
oranı oksijenli tam kan veya kırmızı kan hücresi  
bakımından zenginleştirilmiş çözeltiler ile karşı-  
laştırıldığında çok daha yüksektir. Kristaloid tam-  
ponun farklı bir bileşeni ve daha yüksek akış  
oranları, koroner arter endotelyumu boyunca kan  
akış gerilimini (shear stress) değiştirebilir. Kolloidal  
ozmotik basıncın eksikliği kalpte doku ödemeine yol  
açabilir.<sup>79</sup>

Çalışan kalp modeli ile ventrikül işlevlerini in  
vivo koşullara daha yakın olarak ölçmek ve değer-  
lendirmek olasıdır. Bu modelle yinelenebilir so-  
nuçlar alınabilir. Kalbin kasılma gücü, kalp hızı,  
koroner damar işlevi, miyokardiyal metabolizma,  
morfoloji ve elektriksel etkinliği gibi fizyolojik,  
morfolojik, biyokimyasal ve farmakolojik paramet-

releri tek bir preparat ile değerlendirmeye olanak  
tanır. Kalp sağlam olduğundan, uygun koşullarda  
(oksijenasyon, perfüzyon sıvısı ve sıcaklık açısın-  
dan) kendiliğinden otomatisiteye dayalı atmaktadı-  
r. Kalp organizmadan izole olmasına karşın,  
yöntem normal fizyolojiye yakındır. Ek olarak  
izole preparat, sistemik dolaşım, santral ve otonom  
sinir sistemi, kalp işlevi üzerine etkili kalp para-  
metrelerine ilaçların potansiyel doğrudan etkilerini  
maskeleyebilecek çevresel etkileri ortadan kaldırdığı  
için bir avantaj olarak kabul edilebilir. İskemi  
ve aritmi gelişmesine anında olanak verir. Bu yön-  
temin farklı derecelerde anoksi ve hipoksi oluş-  
turma kolaylığı sağlaması, in vivo koşullarda  
normal bir deney hayvanının yaşaması için tehdit  
olabilecek patolojik durumların çalışmalarında  
önem kazanmaktadır. İzole kalp preparatı aritmi-  
lerin altında yatan mekanizmaların çalışılması için  
idealdir; çünkü elektrokardiyogram (EKG) kaydına  
ve iletim yollarını duyarlı biçimde haritalamaya  
izin verir. Model, aynı zamanda türlü ilaç dozları-  
nın etkileri arasındaki farkı çalışmak için de çok  
kullanışlıdır. İlaç derişimi kontrol edilebilir oldu-  
ğundan, yöntem derişim-yanıt ilişkisini duyarlı bi-  
çimde belirlemeye izin verir. Ayrıca, test  
moleküllerinin kardiyotoksik etkilerini değerlen-  
dirmeye elverişlidir.<sup>80</sup>

### In Vivo Sistemler

Farklı hayvanlarda değişik yöntemler kullanılarak  
miyokardiyal infarktüs modelleri oluşturulabilir:  
Termal (cryoinjury), farmakolojik (izoproterenol),  
mikroembolizasyon, tromboz indüksiyonu, koteri-  
zasyon ve en yaygın kullanılan cerrahi bağlamadır.<sup>81-86</sup>

### Sıçan miyokardiyal İSKEMİ/REPERFÜZYON modeli

Günümüze dek en yaygın kullanılan yöntem sol ön  
inen koroner arter [*left anterior descending coro-  
nary artery*; (LAD)]'ın cerrahi bağlanmasıdır.<sup>86</sup>  
Yaklaşık 50 yıl kadar önce tanımlanmış olan bu  
yöntem, 1980'li yıllarda histolojik ve işlevsel açı-  
dan karakterize edilmiştir.<sup>87</sup> Daha yakın zamanda,  
aynı damarın geçici olarak tıkanması ile oluşturulan  
İ/R zedelenmesi yöntemi kullanılmıştır. Geçici  
oklüzyon genellikle 30 dk sağlanırken, ön koşul-

lama çalışmalarında 5 dk gibi daha kısa sürelerde gerçekleştirilebilmektedir. Her iki yöntem de anestezi, cerrahi girişim yöntemi, süreç ve histolojik incelemeler açısından benzer yaklaşımları gerektirir.<sup>88-89</sup>

İ/R zedelenmesine neden olan geçici ligasyon modeli uygulanan tedavinin kalp hızı ve sol ventrikül diastol sonu basıncı gibi parametreler üzerindeki etkinliğinin incelenmesi, tam ligasyon ile oluşturulan miyokardiyal infarktüs modeli miyokardiyal infarktüs sonrası ortaya çıkan mikrovasküler işlev bozuklukları ve sonucunda gelişen sol ventrikülün yeniden biçimlenmesi gibi patolojik durumların değerlendirilmesi amacıyla kullanılır. Geçici ligasyon ile iskemi süresi 5-30 dk arasında değişmektedir. 5 dk iskemi ve 5 dk reperfüzyon modelinin uygulandığı çalışmalarda daha çok miyokardiyal aritmiler ve yaşam süresi incelemeleri yapılırken, 30 dk iskemi ve üç saat reperfüzyon modelinde miyokardiyal dokudaki nekroz belirledebilmektedir. Kısa süreli iskemiler ayrıca ön koşullama modellerinde de uygulanmaktadır. Genel olarak her iki modelde de anestezi, cerrahi işlemler, izlem ve histolojik çalışmalar benzerdir. Sıçan miyokardiyal İ/R modeli oluşturma yöntemi aşağıda verilmiştir.<sup>75,83,86,89,90</sup>

- Sıçanlar anestezi edildikten sonra sol juguler ven (madde enjeksiyonu için) ve sol karotid arter (kan basıncı ölçümü için) içleri heparinli fizyolojik tuzlu su çözeltisi dolu olan tüpler ile kanüle edilir.

- EKG kaydı için deri altına EKG elektrotları ve vücut sıcaklığını ölçmek için rektuma sıcaklık probu yerleştirilir.

- Trakea kanülasyonu sonrası sol dört ve beşinci kaburgalar arasından toraks boşluğu açılır ve sıçan hemen yapay solunum pompasına bağlanarak pCO<sub>2</sub>, pO<sub>2</sub> ve pH değerleri normal düzeylerde tutulacak biçimde pozitif basınçlı yapay solunum uygulanmaya başlanır.

- Keskin bir pens ile perikardiyum sıyrıldıktan sonra, kalp kaburgalara yapılan hafif bir basınçla göğüs kafesinden dışarı doğru çekilerek sol ana koroner arterin altından atravmatik yuvarlak iğne yardımıyla iplik geçirilir ve kalp göğüs kafesi içine yavaşça geri yerleştirilir.

- Hazırlık ve deney süresince EKG, kan basıncı, kalp hızı ve vücut sıcaklığı verileri kaydedilir.

- Hayvanlar deney süresince vücut sıcaklıkları 37±0,2°C olacak biçimde ısıtıcı bir platform üzerinde tutulmalıdır.

- Kalp, göğüs kafesi içine geri yerleştirildikten sonra 20 dk stabilizasyon için beklenir.

- Oklüzyon öncesi kan basıncı 60 mmHg'nın altına düşen hayvanlar deney dışında bırakılmıdır.

- Yirmi dk stabilizasyon döneminin sonunda damarın altından geçirilmiş ipliğin her iki ucu bir plastik boru içinden geçirilir ve bir klemp yardımıyla sıkıştırılarak damarın oklüzyonu sağlanır.

- Deney sonunda kalpler hızlıca yerlerinden çıkarılarak Langerdorff düzeneğine asılır ve arterlerin içinde kalan kanın uzaklaştırılması için aorta yerleştirilen bir kanül aracılığıyla serum fizyolojik ile perfüze edilir.

Deney İ/R güvenilir bir biçimde dikiş yapıldıktan ve LAD serbest bırakıldıktan sonra anestezi edilmemiş sıçanlarla da yapılabilir. Girişim süresince ölümler kalıcı ligasyon ile %10-50 arasında değişmekte iken, geçici ligasyonda çok daha azdır. Kalbe olabildiğince az derecede dokunulması, girişim öncesi yerel anestetik kullanılması, girişim sonrası oksijen uygulanması, sistemik analjezi ve göğsün kapatılması öncesindeki tidal hacmin artışı mortaliteyi sınırlayarak sağkalımı artırabilmektedir. İnfarkt büyüklüğü %40'tan fazla olan tam koroner oklüzyon uygulanmış sıçanlarda üç-altı hafta sonra kalp yetmezliği geliştiğine ilişkin klinik kanıtlar elde edilmiştir.<sup>91</sup> Sıçan ve fare modellerini, köpek, tavşan ve domuz gibi deney hayvanlarında oluşturulanlardan ayıran önemli bir anatomik fark da interventriküler septumun kan kaynağı olmasıdır. Septal dal LAD köküne çok yakın olduğundan LAD oklüzyonu seyrek olarak septal duvarın infarksiyonu ile sonuçlanır.<sup>90</sup>

#### Fare miyokardiyal İskemi/Reperfüzyon modelleri

Fare, kardiyovasküler fizyoloji ve tıp alanında en çok yeğlenen modeldir. Bunun nedeni, daha büyük hayvanların maliyetinden öte "knockout model"

üretebilmenin kolaylığıdır. Fare sıçandan 10 kat daha küçük olmasına karşın, buna uygun optik ve mikrocerrahi ekipmanlarla cerrahi işlemler mortallite ve morbidite açısından sıçan modellerine benzer biçimde uygulanabilir ve yinelenbilir duruma getirilmiştir.<sup>72</sup> Cerrahi yöntem sıçan modellerine benzerdir.<sup>86</sup> Kabul edilebilir mortalite oranlarını korurken hemodinamik değişiklikleri üretmek için yeterli infarkt boyutlarına neden olacak ligasyonun optimal yerleşimi atriyoventriküler kavşağın 0,3 mm aşağısıdır.<sup>86</sup> İnfarktın sonuçları ağırlıklı olarak sıçanda sol ventrikül serbest duvarını etkilerken farede sol ventrikülün anteroapikal duvarını etkiler.<sup>92</sup> Fare İ/R kapalı göğüs modelleri de cerrahi kaynaklı inflamasyonu en aza indirmek için geliştirilmiştir.<sup>93,94</sup> Sıçanlardaki gibi İ/R kontraksiyon bant nekrozuna, polimorfonükleer lökosit venül marjinasyonuna ve reperfüzyon sonrası bir, dört ve yirmi dördüncü saatlerde infiltrasyona neden olmaktadır.<sup>95</sup> Sıçan ve farede LAD'nin tam ligasyonunun ardından sol ventrikül işlev bozukluğu ile birlikte IL-6 ve dönüştürücü büyüme faktörü- $\beta$  gibi büyüme faktörleri ve kemokinlerin ekspresyonu artmaktadır. Ancak, farelerin tersine sıçanlarda daha az derecede olmak üzere erken ve kısa süreli TNF- $\alpha$  ekspresyonu artmaktadır; farelerde hem infarkt olan hem de olmayan bölgelerde daha yoğun bir ekspresyon görülmektedir.<sup>96,97</sup>

### Kronik miyokardiyal iskemik modeli

Kronik miyokardiyal iskemik modellerinde koroner arterin sabit ve tam tıkalı olmayan stenozu sağlanır. Tam tıkanmanın uygulandığı modellerden farklılık göstermektedir. Bu model histolojik ve patolojik değişikliklerin incelenmesi amacıyla geliştirilmiştir. İnsanda çok sayıda fibrotik alanlar başlangıçta işlevsel miyokardiyal dokunun azalmasına yol açarken, ileri dönemlerde iskemik dilate kardiyomyopati ile sonuçlanır. Bu süreci değerlendirmek amacıyla kapsamlı bir sıçan modeli geliştirilmiştir. Koroner stenozlu sıçanların %19-61'inde bir ayda sol ventrikül yetmezliği, sol ventrikül dilatasyonu ve sol ventrikül duvarında incelme ortaya çıkar. Histolojik olarak kardiyomyosit kaybı (%10-20) ile birlikte birden çok sayıda

miyokardiyal zedelenme alanı ve hipertrofik kardiyomyositler görülür. Miyokard zedelenmesi ve işlev bozukluğu tıkalı olmayan LAD ligasyonundan 45 dk sonra histolojik kardiyomyosit vakuolleşme bulguları, kontraksiyon bantları ve interstisyel fibroz ile görülmektedir.<sup>98,99</sup>

### In Vitro Modeller

In vitro modeller, tam kontrollü koşullarda fizyolojik ve farmakolojik ajanlara karşı hücresel yanıtların değerlendirilmesine yardımcı olurlar. Hücre kültürü sistemi ile in vivo sistemlerde karşılaşılan fizyolojik etkileşimlerden bağımsız, kontrollü bir ortam sağlar. DeLuca ve ark., 1974 yılında embriyonik hücre ve organ kültürlerinin oksijenden ve glukozdan yoksun bırakılarak miyokardiyal iskeminin taklit edilebileceğini göstermişlerdir.<sup>100</sup> Acosta ve Puckett adlı araştırmacılar ise sıçan kalbi hücrelerini birincil tek tabakalı kültürlerini farklı oksijen ve glukoz düzeylerine maruz bırakarak bu yöntemde değişiklik yapmışlardır.<sup>101</sup>

Tumiati ve ark., insan ventriküler kardiyomyositleri kullanarak geliştirdikleri in vivo koşulları taklit eden bir in vitro İ/R modeli ile hücresel düzeyde İ/R'nin mekanizmasıyla çeşitli maddelerin etkilerinin çalışılmasına olanak sağlamışlardır. Bu çalışmalarda, kültür ortamı olarak değiştirilmiş fosfat tampon çözeltisi [*modified phosphate buffered saline*, (PBSG)] kullanılmıştır. İskemik kalp birçok ekstraselüler substrata maruz kaldığından, bu durumu taklit etmek amacıyla in vitro çözeltiye hücrelere uygulanabilecek tek ekstraselüler substrat olan glukoz eklenmiştir. İskemik öncesi hücreler PBSG ile 30 dk bekletilmiş (iskemi öncesi dönem), ardından ekstraselüler sıvı toplanıp 5 dk kapalı bir bölümde %100 azota maruz bırakılmıştır. İskemik dönemde hücrelere deoksiPBSG eklenerek 60, 90 veya 120 dklık iskemik süresince pO<sub>2</sub> 0 mmHg düzeyinde tutulmuştur. İskemik sonunda ekstraselüler sıvı PBSG ile değiştirilerek hücrelerin 30 dk reperfüze edilmelerinin ardından hücreler sıvı azot ile dondurularak -80°C'de saklanmıştır. Çalışma sonunda 90 dk iskemik hücrelerde önemli derecede olmasa da zedelenmeye neden olmasına karşın, 120 dklık iskemik oldukça önemli düzeyde zedelenmeye yol açtığı bildirilmiştir.<sup>102</sup>

### Transgenik modeller

Moleküler biyoloji alanında yapılan çalışmalar, gen modifikasyonu ya da gen aktarımı yoluyla memeli genomunun değiştirilmesi sonucunda kardiyovasküler hastalıkların araştırılmasında kullanılabilir yeni modellerin geliştirilmesine yol açmıştır. Transgenik farelerde (örneğin; belirli bir geni hedeflenen “knockout” fareler) kardiyak işlevin değerlendirilmesi genom manipülasyonunun işlevsel sonuçlarını anlamak açısından önemlidir. Bu türlerde kalp işlevlerinin ölçülmesine yönelik yöntemler yeni geliştirilmektedir.<sup>103</sup> Szczepek ve ark. mitokondriyi hedefleyen transkripsiyonel açıdan etkin olmayan sinyal ileticisi ve transkripsiyon etkinleştiricisi (signal transducer and activator of transcription) 3'ün aşırı eksprese edildiği transgenik farelerde bu transkripsiyon faktörünün İ/R zedelenmesine karşı kalbi koruyucu etkisinin, transkripsiyonel etkinliği dışında elektron taşıma sistemini düzenleyerek de katkıda bulunduğunu göstermişlerdir.<sup>104</sup> Ziesenissa ve ark., kardiyomyosite özgü proli-4-hidroksilaz alan (prolyl-4-hydroxylase domain) 3'ün aşırı eksprese edildiği transgenik farelerde sol ön inen arter ligasyonu yoluyla oluşturulan iskemiyi miyokardiyumda hipoksi ile indüklenebilen faktör 1-alfa birikimini etkileyerek miyokardiyal yanıtı bozduğunu göstermişlerdir.<sup>105</sup>

### RENAL İSKEMİ/REPERFÜZYON ZEDELLENMESİ

Akut renal yetmezlik (ARY), insanlarda yüksek mortalite ile ilişkili majör bir böbrek hastalığıdır. Klinik olarak ARY gelişmesine neden olan iskemi, kalp debisinin azalması, renal vasküler oklüzyon ya da obstrüksiyon ile renal transplantasyon gibi durumlar sonucu ortaya çıkabilen bir durumdur.<sup>106</sup> İskemi ya da nefrotoksisite gibi durumlarda ARY düzleşmiş epitel ve tübüler genleşme sonucu ortaya çıkan “akut tübüler nekroz” ile belirlenir. ARY, prerenal, renal (intrinsek) ve postrenal yetmezlik olmak üzere üçe ayrılmaktadır. Prerenal ARY, renal perfüzyonun azalmasının bir sonucu olarak gelişmektedir. Bu durumlarda, tübüler zedelenme ve ilişkili glomerüller hemodinamikler birbirlerinin ortaya çıkmasına neden olabilmektedirler.<sup>107</sup> Hücre zedelenmesinin selüler ve moleküler ayrıntılı me-

kanizmaları ve ardından gelişen yeniden yapılanma tam olarak bilinmemesine karşın, önceki çalışmalar renal epitelyal hücrelerin İ/R zedelenmesinin korteks ve medulla arasındaki çizgiye lokalize, nekroz ya da apoptoz yoluyla tübüler epitelyal hücrelerin ölümü ile ilişkili ve iskemik durumun şiddetine bağlı olduğunu göstermiştir.<sup>108</sup>

1960'lı yıllardan itibaren iskemik ARY için birçok hayvan modeli geliştirilmiş ve test edilmiştir. Günümüzde ise başlıca iki farklı sıcak renal İ/R modeli kullanılmaktadır: 1) Çift taraflı (bilateral) renal İ/R ve 2) Tek taraflı (unilateral) renal İ/R. Çift taraflı iskemik ARY modeli insandaki patolojik duruma çok daha uygun olmasından dolayı yaygın olarak kullanılmaktadır.<sup>109</sup> İlk iskemik ARY modelleri köpek ve tavşan gibi büyük hayvanlarda geliştirilmiştir.<sup>110,111</sup> Sıçan modelleri ise 1960 yılından beri yapılan yaklaşık 1.300 yayındaki en popüler modeller olmuştur. Fare ilk kez 1990 yılında iskemik ARY çalışmasında kullanılmıştır.<sup>112</sup> Fare ile yapılan çalışmalar transgenik farelerin kullanımıyla daha da hızlanmıştır. Son 10 yılda yapılan çalışmalarda fareler sıçanlardan daha çok kullanılmıştır. Ek olarak, farenin sıçandan 10 kat daha küçük olması deneysel test için ilacın daha az tüketimi anlamına gelmektedir. Bu avantaja karşın, fare modelinin sonuçlarda tutarsızlığa neden olan daha büyük varyasyonlara sahip olduğu bilinmektedir. Son yıllarda Wei ve Dong fare çift taraflı renal iskemik ARY'yi optimize etmişlerdir.<sup>113</sup>

Renal İ/R zedelenmesi girişimi ventral (laparoskopik) ya da dorsal (retroperitoneal) yaklaşımlarla gerçekleştirilebilir. Dorsal yaklaşım daha az travmatiktir, daha hızlı iyileşme sağlar ve sağkalımı artırır.<sup>114</sup>

Deneysel olarak yapılan bir ARY çalışmasında, sol renal arterin bir saat süresince sıkıştırılmasının ardından reperfüzyon ile anestezi altındaki tek taraflı nefrektomi uygulanmış köpeklerde üç saat içinde renal yetmezlik gelişmiştir.<sup>115</sup> Bhalodia ve ark., sıçanlarda her iki böbrek pedikülünün 60 dk süresince sıkıştırılması ve 24 saat reperfüzyonu ile 24 saat içinde renal yetmezlik geliştirmişlerdir.<sup>116</sup> Sıçanlarda travmatik olmayan küçük bir vasküler klemp ile 45 dk süresince tek taraflı sol

renal arter sıkıştırılması ve İ/R sonrasında 24 saat reperfüzyonu ile ARY geliştiği gösterilmiştir.<sup>117</sup> Foglieni ve ark., sağ renal arter ve venin her ikisini birlikte 60 dk mikrocerrahi klemp ile sıkıştırma sonrası 60 dk reperfüzyon sonucu renal yetmezlik bildirmişlerdir.<sup>118</sup> Baker ve ark., domuzlarda intrarenal aortun standart köşeli arteriyel çapraz klemp (cross-clemp) ile 150 dk süresince oklüzyonunun ardından (Toplam aortik oklüzyonu doğrulamak amacıyla distal aort palpasyonu yapılır) 180 dk reperfüzyon ile renal yetmezlik geliştiğini bildirmişlerdir.<sup>119</sup> Matthijsen ve ark., farelerde 1 cm uzunluğunda abdominal orta hattın açılmasının ardından sol renal pediküle 40 dk travmatik olmayan vasküler klemp uygulamasıyla iskemi gelişmesinin ardından 24 saat reperfüzyon sonucu İ/R ile indüklenmiş renal yetmezlik geliştirmişlerdir.<sup>120</sup> Benzer olarak Susa ve ark., farelerde sol renal arterin atravmatik mikrovasküler klemp ile 25-37 dk oklüzyonunun ardından 24 saat reperfüzyon sonucu renal yetmezlik geliştirmişlerdir.<sup>121</sup> Singh ve ark. ise, 45 dk iskeminin ardından 24 saat reperfüzyonun, insanlardaki hemodinamik değişimler ile indüklenen renal işlevleri taklit eden, daha uygun ve yaygın kullanılan hayvan modeli olduğunu ileri sürmüşlerdir.<sup>108</sup>

## ÇİFT TARAFLI RENAL İSKEMİ/REPERFÜZYON

Farelerde yapılan çalışmalarda çift taraflı hafif iskeminin ardından akut böbrek zedelenmesine ağırlıklı olarak yoğunlaşmıştır (Tablo 1).<sup>122</sup> Çift taraflı İ/R tübüler epitelyal hücrelerde nekrozun karakteristik görünümü ve interstisyel inflamatuvar hücre infiltrasyonu ile sonuçlanmaktadır. Reperfüzyon sonrasındaki ilk 24 saat içinde her ikisi birden ortaya çıkar. Tübüler nekroz en çok hipoksinin en yüksek olduğu dış medullada belirgindir. İnterstisyel inflamatuvar hücreler, baskın olarak polimorfonükleer hücrelerdir; ancak sayısız çalışmada İ/R zedelenmesinde lenfosit ve makrofajların önemli rol oynadığı ileri sürülmektedir.<sup>123</sup> Farelerde zedelenmenin derecesi iskeminin süresine bağlıdır. Yayımlanan çoğu çalışmada, yediden 10 kata dek artan ve reperfüzyon sonrası 24-48 saatte pik yapan ve ölümcül olmayan zedelenme sonrası birden iki haftaya dek bazal düzeye dönen serum kreatinin düzeyiyle belirlenen glomerüller süzülmede akut düşme olduğu bildirilmiştir.<sup>124</sup> Genellikle farelerde 45 dkdan daha uzun süren uzatılmış çift taraflı iskemi, nekroza ve renal yetmezliğe bağlı yüksek ölüm oranına neden olabilmektedir.<sup>125</sup> Sıçanlarda yapılan çalışmalar, haftalar ve aylar sonra yaşayan hayvanlarda idrar yoğunlaştırma yeteneğinin bo-

**TABLO 1:** Fare çift taraflı renal İskemi/Reperfüzyon işlemi.

1. Anestezi altındaki fare ısıtılmış yüzeye sırtüstü konur
2. Abdomen derisi %70'lik alkolle yıkanır
3. 200 µL %0,09'luk tuz çözeltisi üst uyluktan subkütan uygulanır
4. Linea alba boyunca peritondan orta hat insizyonu yapılır
5. Sol böbreğe ulaşımı sağlamak için inen kolon ve dalak dikkatle orta hattan sağa doğru taşınır
6. Sol böbrek pedikül altındaki adipoz dokudan forseps kullanarak diseke edilir ve atravmatik bir mikroanevrizma klemp uygulanır. Böbrekte kısa süreli renk değişimi görülür
7. Dalak yerine döner. Yatay ve inen kolon ile ince barsak gerektiği gibi sağ böbreğe ulaşım için sola taşınır. Renal pedikülü açığa çıkarmak için karaciğerin sağ lobunun hafifçe kaldırılması gerekebilir
8. Sağ renal pedikül diseke edilir ve solda olduğu gibi klemplenir
9. Tüm karın içeriği karna geri konur ve yara iskemik dönem sırasında dikilir. Renal pediküller uygun hazırlık ve deneyim ile her biri için 3 dk içinde klemplenebilir
10. Fare iskemik intervale bırakılır. Kararlı vücut ısısı iskemi sırasında çok önemlidir
11. İskemik interval sonrası yara yeniden açılır ve klempler çıkarılır. Her iki böbrekte reperfüzyon görülür
12. Abdomen dikilir
13. 800 mL %0,9 tuz çözeltisi öbür üst uyluktan deri altına verilir

zulması ve tübülointerstisyel fibrozda aşamalı bir artış ile belirlenen kronik böbrek zedelenmesi gelişebildiğini göstermiştir.<sup>126</sup>

### TEK TARAFLI RENAL İSKEMİ/REPERFÜRZYON

İki taraflı renal pedikül sıkıştırma yönteminin yaygın olarak kullanılmasına karşın, etkili klemp basıncıları arasındaki ve/veya her iki böbrek arasında iskemiye verilen renal yanıtlardaki farklılık sıklıkla daha değişken sonuçlara yol açmaktadır. Kısa süreli sıkıştırmanın çeşitli tübüler zedelenmelere neden olduğu bilinirken, daha uzun süre sıkıştırma uygulanan farelerde daha tutarlı sonuçlara ulaşılabilmektedir. Öte yandan, bu fareler çoğu kez zedelenmeden sonraki ilk üç gün içinde şiddetli renal yetmezlik nedeni ile ölmüştür. Tek taraflı renal İ/R yöntemi ile pediküller arasındaki sıkıştırmadaki farklılıktan kaynaklanan değişiklikler azaltılabilmekte, zedelenme sonrası sağkalım artırılabilir ve daha tutarlı önceden tahmin edilebilir sonuçlar elde edilebilmektedir.<sup>114</sup> Tek taraflı model iki alt türe ayrılır: 1) Kontralateral nefrektomi ile tek taraflı İ/R ve 2) Kontralateral nefrektomisz tek taraflı İ/R. Kontralateral nefrektomisz tek taraflı İ/R modelinin avantajı, iskemi uygulanmayan böbrekte akut tübüler nekroz gelişmeyeceğinden her hayvan için ayrı ayrı kontrol sağlamak için bu böbreklerin

kullanılabilmesidir. Ayrıca, girişim nefrektomi uygulananlara göre daha hafif ve daha az agresiftir.<sup>127</sup>

### SONUÇ

İ/R zedelenmesi miyokard infarktüsü, inme gibi klinik durumlar ile damar cerrahisi ve organ transplantasyonunda bir komplikasyon olarak ortaya çıkabilmektedir. Miyokardiyal İ/R'de günümüzde en yaygın kullanılan yöntem LAD'nin cerrahi bağlanmasıdır. Renal İ/R'de ise en kullanışlı yöntem çift taraflı renal İ/R uygulamasıdır. Bununla birlikte, İ/R zedelenmesini önleyecek ya da hafifletecek ilaçların denenmesi için kullanılan modeller gün geçtikçe değişikliğe uğramakta olup, son yıllarda "koşullama" olarak adlandırılan girişim öncesi kısa bir İ/R uygulanan yöntemler önem kazanmaya başlamıştır. İlaçların miyokardiyal ve renal İ/R zedelenmesine bağlı olarak gelişen fizyopatolojik değişiklikler üzerindeki etkilerinin araştırılması amacıyla kullanılan deneysel modeller ile ilgili olarak güncel gelişmelerin izlenmesi ve yapılacak olan araştırmalarda uygulanması, iskemiyle belirgin kardiyovasküler ve renal hastalıkların tedavisinde çok daha doğru cerrahi ve farmakolojik yaklaşımlarda bulunulmasına katkı sağlayabilecektir.

### KAYNAKLAR

1. Pac-Soo CK, Mathew H, Ma D. Ischaemic conditioning strategies reduce ischaemia/reperfusion-induced organ injury. *Br J Anaesth* 2015;114(2):204-16.
2. Ong SB, Gustafsson AB. New roles for mitochondria in cell death in the reperfused myocardium. *Cardiovasc Res* 2012;94(2):190-6.
3. Sanada S, Komuro I, Kitakaze M. Pathophysiology of myocardial reperfusion injury: pre-conditioning, post-conditioning, and translational aspects of protective measures. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2011;301(5):H1723-41.
4. Ruiz-Meana M, Abellán A, Miró-Casas E, Agulló E, García-Dorado D. Role of sarcoplasmic reticulum in mitochondrial permeability transition and cardiomyocyte death during reperfusion. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2009;297(4):H1281-89.
5. Benhabbouche S, Crola da Silva C, Abrial M, Ferrera R. [The basis of ischemia-reperfusion and myocardial protection]. *Ann Fr Anesth Reanim* 2011;30(Suppl 1):2-16.
6. Raedschelders K, Ansley DM, Chen DD. The cellular and molecular origin of reactive oxygen species generation during myocardial ischemia and reperfusion. *Pharmacol Ther* 2012;133(2):230-55.
7. Kalogeris T, Baines CP, Krenz M, Korthuis RJ. Cell biology of ischemia/reperfusion injury. *Int Rev Cell Mol Biol* 2012;298:229-317.
8. Şener G, Yeğen BÇ. [Ischemia reperfusion injury]. *Klinik Gelişim* 2009;3(22):5-13.
9. Eltzschig HK, Collard CD. Vascular ischemia and reperfusion injury. *Br Med Bull* 2004;70:71-86.
10. Niki E, Yoshida Y, Saito Y, Noguchi N. Lipid peroxidation: mechanisms, inhibition, and biological effects. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;338(1):668-76.
11. Bae YS, Oh H, Rhee SG, Yoo YD. Regulation of reactive oxygen species generation in cell signaling. *Mol Cells* 2011;32(6):491-509.
12. Divakaruni AS, Brand MD. The regulation and physiology of mitochondrial proton leak. *Physiology (Bethesda)* 2011;26(3):192-205.
13. Murphy MP. How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem J* 2009;417(1):1-13.
14. Guéraud F, Atalay M, Bresgen N, Cipak A, Eckl PM, Huc L, et al. Chemistry and biochemistry of lipid peroxidation products. *Free Radic Res* 2010;44(10):1098-24.

15. Esterbauer H. Cytotoxicity and genotoxicity of lipid-oxidation products. *Am J Clin Nutr* 1993;57(5 Suppl):779S-85S.
16. Joffe A, Geacintov NE, Shafirovich V. DNA lesions derived from the site selective oxidation of Guanine by carbonate radical anions. *Chem Res Toxicol* 2003;16(12):1528-38.
17. Simonelli V, Mazzei F, D'Errico M, Dogliotti E. Gene susceptibility to oxidative damage: from single nucleotide polymorphisms to function. *Mutat Res* 2012;731(1-2):1-13.
18. Deigner HP, Hermetter A. Oxidized phospholipids: emerging lipid mediators in pathophysiology. *Curr Opin Lipidol* 2008;19(3):289-94.
19. Forman HJ, Fukuto JM, Miller T, Zhang HQ, Rinna A, Levy S. The chemistry of cell signaling by reactive oxygen and nitrogen species and 4-hydroxynonenal. *Arch Biochem Biophys* 2008;477(2):183-95.
20. Penna C, Tullio F, Perrelli MG, Moro F, Abbadessa G, Piccione F, et al. Ischemia/reperfusion injury is increased and cardioprotection by a postconditioning protocol is lost as cardiac hypertrophy develops in nandrolone treated rats. *Basic Res Cardiol* 2011;106(3):409-20.
21. Kim JS, Jin Y, Lemasters JJ. Reactive oxygen species, but not Ca<sup>2+</sup> overloading, trigger pH and mitochondrial permeability transition dependent death of adult rat myocytes after ischemia-reperfusion. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006;290(5):H2024-34.
22. Di Lisa F, Canton M, Carpi A, Kaludercic N, Menabò R, Menazza S, et al. Mitochondrial injury and protection in ischemic pre- and post-conditioning. *Antioxid Redox Signal* 2011;14(5):881-91.
23. Loor G, Kondapalli J, Iwase H, Chandel NS, Waypa GB, Guzy RD, et al. Mitochondrial oxidant stress triggers cell death in simulated ischemia-reperfusion. *Biochim Biophys Acta* 2011;1813(7):1382-94.
24. Murphy E, Steenbergen C. What makes the mitochondria a killer? Can we condition them to be less destructive? *Biochim Biophys Acta* 2011;1813(7):1302-8.
25. Hausenloy DJ, Yellon DM. Remote ischaemic preconditioning: underlying mechanisms and clinical application. *Cardiovasc Res* 2008;79(3):377-86.
26. Karatzas T, Neri AA, Baibaki ME, Dontas IA. Rodent models of hepatic ischemia/reperfusion injury: time and percentage-related pathophysiological mechanisms. *J Surg Res* 2014;191(2):399-412.
27. Teoh NC, Farrell GC. Hepatic ischemia reperfusion injury: pathogenic mechanisms and basis for hepatoprotection. *J Gastroenterol Hepatol* 2003;18(8):891-902.
28. Akkoç H. [Ischemia-reperfusion-induced injury of myocardium]. *Dicle Med J* 2008;35(3):211-5.
29. Heyndrickx GR, Millard RW, McRitchie RJ, Maroko PR, Vatner SF. Regional myocardial functional and electrophysiological alterations after brief coronary artery occlusion in conscious dogs. *J Clin Invest* 1975;56(4):978-85.
30. Kloner RA, Arimie RB, Kay GL, Cannom D, Matthews R, Bhandari A, et al. Evidence for stunned myocardium in humans: a 2001 update. *Coron Artery Dis* 2001;12(5):349-56.
31. Bolli R. Oxygen-derived free radicals and postischemic myocardial dysfunction ("stunned myocardium"). *J Am Coll Cardiol* 1988;12(1):239-49.
32. Kaeffer N, Richard V, François A, Lallemand F, Henry JP, Thuillel C. Preconditioning prevents chronic reperfusion induced coronary endothelial dysfunction in rats. *Am J Physiol* 1996;271(3 Pt 2):H842-9.
33. Piper HM, Meuter K, MD, Schäfer C. Cellular mechanisms of ischemia-reperfusion injury. *Ann Thorac Surg* 2003;75(2):S644-8.
34. Viehman GE, Ma XL, Lefer DJ, Lefer AM. Time course of endothelial dysfunction and myocardial injury during coronary arterial occlusion. *Am J Physiol* 1991;261(3 Pt 2):H874-81.
35. Lefer AM, Lefer DJ. The role of nitric oxide and cell adhesion molecules on the microcirculation in ischaemia-reperfusion. *Cardiovasc Res* 1996;32(4):743-51.
36. Kloner RA, Rude RE, Carlson N, Maroko PR, DeBoer LW, Braunwald E. Ultrastructural evidence of microvascular damage and myocardial cell injury after coronary artery occlusion: which comes first? *Circulation* 1980;62(5):945-52.
37. Sutton MG, Sharpe N. Left ventricular remodeling after myocardial infarction: pathophysiology and therapy. *Circulation* 2000;101(25):2981-8.
38. Allen DG, Orchard CH. Myocardial contractile function during ischemia and hypoxia. *Circ Res* 1987;60(2):153-68.
39. Marban E, Koretsune Y, Kusuoka H. Disruption of intracellular Ca<sup>2+</sup> homeostasis in hearts reperfused after prolonged episodes of ischemia. *Ann N Y Acad Sci* 1994;723:38-50.
40. Mauser M, Hoffmeister HM, Nienaber C, Schaper W. Influence of ribose, adenosine, and "AICAR" on the rate of myocardial adenosine triphosphate synthesis during reperfusion after coronary artery occlusion in the dog. *Circ Res* 1985;56(2):220-30.
41. Skyschally A, van Caster P, Boengler K, Gres P, Musiolik J, Schilawa D, et al. Ischemic post-conditioning in pigs: no causal role for RISK activation. *Circ Res* 2009;104(1):15-8.
42. Schafer C, Ladilov Y, Inserte J, Schäfer M, Haffner S, Garcia-Dorado D, et al. Role of the reverse mode of the Na/Ca<sup>2+</sup> exchanger in reoxygenation-induced cardiomyocyte injury. *Cardiovasc Res* 2001;51(2):241-50.
43. Inserte J, Barba I, Poncelas-Nozal M, Hernandez V, Agulló L, Ruiz-Meana M, et al. cGMP/PKG pathway mediates myocardial postconditioning protection in rat hearts by delaying normalization of intracellular acidosis during reperfusion. *J Mol Cell Cardiol* 2011;50(5):903-9.
44. Neuhof C, Neuhof H. Calpain system and its involvement in myocardial ischemia and reperfusion injury. *World J Cardiol* 2014;6(7):638-52.
45. Rodríguez-Sinovas A, Abdallah Y, Piper HM, Garcia-Dorado D. Reperfusion injury as a therapeutic challenge in patients with acute myocardial infarction. *Heart Fail Rev* 2007;12(3-4):207-16.
46. Taga R, Okabe E. Hydroxyl radical participation in the in vitro effects of gram-negative endotoxin on cardiac sarcolemmal Na, K-ATPase activity. *Jpn J Pharmacol* 1991;55(3):339-49.
47. Sekili S, McCay PB, Li XY, Zughaib M, Sun JZ, Tang L, et al. Direct evidence that the hydroxyl radical plays a pathogenetic role in myocardial "stunning" in the conscious dog and demonstration that stunning can be markedly attenuated without subsequent adverse effects. *Circ Res* 1993;73(4):705-23.
48. Inserte J, Garcia-Dorado D, Hernandez V, Soler-Soler J. Calpain-mediated impairment of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase activity during early reperfusion contributes to cell death after myocardial ischemia. *Circ Res* 2005;97(5):465-73.
49. Kloner RA. Does reperfusion injury exist in humans? *J Am Coll Cardiol* 1993;21(2):537-45.
50. Kloner RA, Bolli R, Marban E, Reinlib L, Braunwald E. Medical and cellular implications of stunning, hibernation, and preconditioning: an NHLBI workshop. *Circulation* 1998;97(18):1848-67.
51. Kloner RA, Jennings RB. Consequences of brief ischemia: stunning, preconditioning, and their clinical implications: part 1. *Circulation* 2001;104(24):2981-9.
52. Heusch G, Ferrari R, Hearse DJ, Ruigrok TJC, Schulz R. 'Myocardial hibernation': questions and controversies. *Cardiovasc Res* 1997;36(3):301-9.
53. Verdouw PD, van den Doel MA, de Zeeuw S, Duncker DJ. Animal models in the study of myocardial ischaemia and ischaemic syndromes. *Cardiovasc Res* 1998;39(1):121-35.
54. Bolli R. Mechanism of myocardial "stunning". *Circulation* 1990;82(3):723-38.
55. Heyndrickx GR, Millard RW, McRitchie RJ, Maroko PR, Vatner SF. Regional myocardial functional and electrophysiological alterations after brief coronary artery occlusion in conscious dogs. *J Clin Invest* 1975;56(4):978-85.
56. Jennings RB, Reimer KA. Factors involved in salvaging ischemic myocardium: effects of reperfusion of arterial blood. *Circulation* 1983;68(2 Pt 2):125-36.

57. Becker LC, Levine JH, DiPaula AF, Guarnieri T, Aversano T. Reversal of dysfunction in postischemic stunned myocardium by epinephrine and postextrasystolic potentiation. *J Am Coll Cardiol* 1986;7(3):580-9.
58. Bush LR, Buja LM, Samowitz W, Rude RE, Wathen M, Tilton GD, et al. Recovery of left ventricular segmental function after long-term reperfusion following temporary coronary occlusion in conscious dogs: comparison of 2- and 4-hour occlusions. *Circ Res* 1983;53(2):248-63.
59. Lubbe WF, Daries PS, Opie LH. Ventricular arrhythmias associated with coronary artery occlusion and reperfusion in the isolated perfused rat heart: a model for assessment of antiarrhythmic action of antiarrhythmic agents. *Cardiovasc Res* 1978;12(4):212-20.
60. Clark C, Foreman MI, Kane KA, McDonald FM, Parratt JR. Coronary artery ligation in anesthetized rats as a method for the production of experimental dysrhythmias and for the determination of infarct size. *J Pharmacol Methods* 1980;3(4):357-68.
61. Harris N, Kane KA, Muir AW, Winslow E. Influences of hypothermia, cold, and isolation stress on the severity of coronary artery ligation-induced arrhythmias in rats. *J Pharmacol Methods* 1982;7(2):161-71.
62. Bernier M, Hearse DJ, Manning AS. Reperfusion-induced arrhythmias and oxygen-derived free radicals. Studies with "anti-free radical" interventions and a free radical-generating system in the isolated perfused rat heart. *Circ Res* 1986;58(3):331-40.
63. Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation* 1986;74(5):1124-36.
64. Zhao ZQ, Corvera JS, Halkos ME, Kerendi F, Wang NP, Guyton RA, et al. Inhibition of myocardial injury by ischemic post-conditioning during reperfusion: comparison with ischemic pre-conditioning. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003;285(2):H579-88.
65. Kin H, Zhao ZQ, Sun HY, Wang NP, Corvera JS, Halkos ME, et al. Post-conditioning attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury by inhibiting events in the early minutes of reperfusion. *Cardiovasc Res* 2004;62(1):74-85.
66. Haroun-Bizri S, Khoury SS, Chehab IR, Kasas CM, Baraka A. Doeseoflurane optimize myocardial protection during cardiopulmonary bypass? *J Cardiothorac Vasc Anesth* 2001;15(4):418-21.
67. Durdu S, Sirlak M, Cetintas D, Inan MB, Eryilmaz S, Ozcinar E, et al. The efficacies of modified mechanical post conditioning on myocardial protection for patients undergoing coronary artery bypass grafting. *J Cardiothorac Surg* 2012;7:73.
68. Staat P, Rioufol G, Piot C, Cottin Y, Cung TT, L'Huillier I, et al. Postconditioning the human heart. *Circulation* 2005;112(14):2143-8.
69. Yang XC, Liu Y, Wang LF, Cui L, Wang T, Ge YG, et al. Reduction in myocardial infarct size by post-conditioning in patients after percutaneous coronary intervention. *J Invasive Cardiol* 2007;19(10):424-30.
70. Balakumar P, Rohilla A, Singh M. Pre-conditioning and postconditioning to limit ischemia-reperfusion-induced myocardial injury: what could be the next footstep? *Pharmacol Res* 2008;57(6):403-12.
71. Wayman NS, McDonald MC, Chatterjee PK, Thiemeermann C. Models of coronary artery occlusion and reperfusion for the discovery of novel antiischemic and antiinflammatory drugs for the heart. *Methods Mol Biol* 2003;225:199-208.
72. Tarnavski O, McMullen JR, Schinke M, Nie Q, Kong S, Izumo S. Mouse cardiac surgery: comprehensive techniques for the generation of mouse models of human diseases and their application for genomic studies. *Physiol Genomics* 2004;16(3):349-60.
73. Degabriele NM, Griesenbach U, Sato K, Post MJ, Zhu J, Williams J, et al. Critical appraisal of the mouse model of myocardial infarction. *Exp Physiol* 2004;89(4):497-505.
74. Skrzypiec-Spring M, Grothaus B, Szelag A, Schulz R. Isolated heart perfusion according to Langendorff--still viable in the new millennium. *J Pharmacol Toxicol Methods* 2007;55(2):113-26.
75. Vidavalur R, Swarnakar S, Thirunavukkarasu M, Samuel SM, Maulik N. Ex vivo and in vivo approaches to study mechanisms of cardioprotection targeting ischemia/reperfusion (I/R) injury: useful techniques for cardiovascular drug discovery. *Curr Drug Discov Technol* 2008;5(4):269-78.
76. Skrzypiec-Spring M, Grothaus B, Szelag A, Schulz R. Isolated heart perfusion according to Langendorff--still viable in the new millennium. *J Pharmacol Toxicol Methods* 2007;55(2):113-26.
77. Sutherland FJ, Hearse DJ. The isolated blood and perfusion fluid perfused heart. *Pharmacol Res* 2000;41(6):613-27.
78. Neely JR, Rovetto MJ, Whitmer JT, Morgan HE. Effects of ischemia on function and metabolism of the isolated working rat heart. *Am J Physiol* 1973;225(3):651-8.
79. Doring HJ, Dehnert HD. The isolated perfused warm-blooded heart according to Langendorff. In: Köberlein K ed. *Methods in Experimental Physiology and Pharmacology*. 1<sup>st</sup> ed. Freiburg: Bionestechnik-Verlag; 1988.
80. Anderson PG, Digerness SB, Sklar JL, Boor PJ. Use of the isolated perfused heart for evaluation of cardiac toxicity. *Toxicol Pathol* 1990;18(4 Pt 1):497-510.
81. Li RK, Jia ZQ, Weisel RD, Merante F, Mickle DA. Smooth muscle cell transplantation into myocardial scar tissue improves heart function. *J Mol Cell Cardiol* 1999;31(3):513-22.
82. Rona G, Chappel CI, Balazs T, Gaudry R. An infarct-like myocardial lesion and other toxic manifestations produced by isoproterenol in the rat. *AMA Arch Pathol* 1959;67(4):443-55.
83. Medvedev OS, Gorodetskaya EA. Systemic and regional hemodynamic effects of perindopril in experimental heart failure. *Am Heart J* 1993;126(3 Pt 2):764-9.
84. Urasawa K, Sakai H, Saito T, Oyama N, Kaneta S, Kitabatake A. Wire-induced myocardial ischemia: a novel approach to create myocardial ischemia in rats. *Circ J* 2004;68(4):371-5.
85. Chimenti S, Carlo E, Masson S, Bai A, Latini R. Myocardial infarction: animal models. *Methods Mol Med* 2004;98:217-26.
86. Maulik N, Fukuda S, Sasaki H. A survival model for the study of myocardial angiogenesis. *Methods Enzymol* 2002;352:391-407.
87. Anversa P, Beghi C, Kikkawa Y, Olivetti G. Myocardial infarction in rats. Infarct size, myocyte hypertrophy, and capillary growth. *Circ Res* 1986;58(1):26-37.
88. Maulik N. Ischemic preconditioning mediated angiogenic response in the heart. *Antioxid Redox Signal* 2004;6(2):413-21.
89. Fukuda S, Kaga S, Sasaki H, Zhan L, Zhu L, Otani H, et al. Angiogenic signal triggered by ischemic stress induces myocardial repair in rat during chronic infarction. *J Mol Cell Cardiol* 2004;36(4):547-59.
90. Kompa AR, Summers RJ. Lidocaine and surgical modification reduces mortality in a rat model of cardiac failure induced by coronary artery ligation. *J Pharmacol Toxicol Methods* 2000;43(3):199-203.
91. Pfeffer MA, Pfeffer JM, Fishbein MC, Fletcher PJ, Spadaro J, Kloner RA, et al. Myocardial infarct size and ventricular function in rats. *Circ Res* 1979;44(4):503-12.
92. Lutgens E, Daemen MJ, de Muinck ED, Debets J, Leenders P, Smits JF. Chronic myocardial infarction in the mouse: cardiac structural and functional changes. *Cardiovasc Res* 1999;41(3):586-93.
93. Dewald O, Frangogiannis NG, Zoerlein MP, Duerr GD, Taffet G, Michael LH, et al. A murine model of ischemic cardiomyopathy induced by repetitive ischemia and reperfusion. *Thorac Cardiovasc Surg* 2004;52(5):305-11.
94. Nossuli TO, Lakshminarayanan V, Baumgarten G, Taffet GE, Ballantyne CM, Michael LH, et al. A chronic mouse model of myocardial ischemia-reperfusion: essential in cytokine studies. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2000;278(4):H1049-55.



95. Michael LH, Entman ML, Hartley CJ, Youker KA, Zhu J, Hall SR, et al. Myocardial ischemia and reperfusion: a murine model. *Am J Physiol* 1995;269(6 Pt 2):H2147-54.
96. Deten A, Volz HC, Briest W, Zimmer HG. Cardiac cytokine expression is upregulated in the acute phase after myocardial infarction. Experimental studies in rats. *Cardiovasc Res* 2002;55(2):329-40.
97. Hirata Y, Umemura K, Uematsu T, Nakashima M. An experimental myocardial infarction model in the rat and its properties. *Jpn J Pharmacol* 1995;67(1):51-7.
98. Anversa P, Zhang X, Li P, Capasso JM. Chronic coronary artery constriction leads to moderate myocyte loss and left ventricular dysfunction and failure in rats. *J Clin Invest* 1992;89(2):618-29.
99. Capasso JM, Jeanty MW, Palackal T, Olivetti G, Anversa P. Ventricular remodeling induced by acute nonocclusive constriction of coronary artery in rats. *Am J Physiol* 1989;257(6 Pt 2):H1983-93.
100. DeLuca MA, Ingwall JS, Bittl JA. Biochemical responses of myocardial cells in culture to oxygen and glucose deprivation. *Biochem Biophys Res Commun* 1974;59(2):749-56.
101. Acosta D, Puckett M. Ischemic myocardial injury in cultured heart cells: preliminary observations on morphology and beating activity. *In Vitro* 1977;13(12):818-23.
102. Tumiati LC, Mickle DA, Weisel RD, Williams WG, Li R. An in vitro model to study myocardial ischemic injury. *Journal of Tissue Culture Methods* 1994;16(1):1-9.
103. Doevendans PA, Daemen MJ, De Muinck ED, Smits JF. Cardiovascular phenotyping in mice. *Cardiovasc Res* 1998;39:34-49.
104. Szczepanek K, Xu A, Hu Y, Thompson J, He J, Larner AC, et al. Cardioprotective function of mitochondrial-targeted and transcriptionally inactive STAT3 against ischemia and reperfusion injury. *Basic Res Cardiol* 2015;110(6):53.
105. Zieseniss A, Hesse AR, Jatho A, Krull S, Hölscher M, Vogel S, et al. Cardiomyocyte-specific transgenic expression of prolyl-4-hydroxylase domain 3 impairs the myocardial response to ischemia. *Cell Physiol Biochem* 2015;36(3):843-51.
106. Wei Q, Dong Z. Mouse model of ischemic acute kidney injury: technical notes and tricks. *Am J Physiol Renal Physiol* 2012;303(11):F1487-94.
107. Heyman SN, Lieberthal W, Rogiers P, Bonventre JV. Animal models of acute tubular necrosis. *Curr Opin Crit Care* 2002;8(6):526-34.
108. Singh AP, Junemann A, Muthuraman A, Jaggi AS, Singh N, Grover K, et al. Animal models of acute renal failure. *Pharmacol Rep* 2012;64(1):31-44.
109. Altmann C, Andres-Hernando A, McMahan RH, Ahuja N, He Z, Rivard CJ, et al. Macrophages mediate lung inflammation in a mouse model of ischemic acute kidney injury. *Am J Physiol Renal Physiol* 2012;302(4):F421-32.
110. Kaboth U. [Comparative functional and morphological studies on the ischemia-damaged rat kidney]. *Z Gesamte Exp Med* 1965;138:561-80.
111. Lee HT, Park SW, Kim M, Ham A, Anderson LJ, Brown KM, et al. Interleukin-11 protects against renal ischemia and reperfusion injury. *Am J Physiol Renal Physiol* 2012;303(8):F1216-24.
112. Shoskes DA, Parfrey NA, Halloran PF. Increased major histocompatibility complex antigen expression in unilateral ischemic acute tubular necrosis in the mouse. *Transplantation* 1990;49(1):201-7.
113. Wei Q, Dong Z. Regulation and pathological role of bid in ischemic acute kidney injury. *Ren Fail* 2007;29(8):935-40.
114. Skrypnik NI, Harris RC, de Caestecker MP. Ischemia-reperfusion model of acute kidney injury and post injury fibrosis in mice. *J Vis Exp* 2013;78:e50495.
115. Yatsu T, Arai Y, Takizawa K, Inagaki O, Kasai-Nakagawa C, Takanashi M, et al. Effect of YM435, a dopamine DA1 receptor agonist, in a canine model of ischemic acute renal failure. *Gen Pharmacol* 1998;31(5):803-7.
116. Bhalodia Y, Kanzariya N, Patel R, Patel N, Vaghasiya J, Jivani N, et al. Renoprotective activity of benincasa cerifera fruit extract on ischemia/reperfusion-induced renal damage in rat. *Iran J Kidney Dis* 2009;3(2):80-5.
117. Damianovich M, Ziv I, Heyman SN, Rosen S, Shina A, Kidron D, et al. ApoSense: a novel technology for functional molecular imaging of cell death in models of acute renal tubular necrosis. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2006;33(12):281-91.
118. Foglieni C, Fulgenzi A, Ticozzi P, Pellegatta F, Sciorati C, Belloni D, et al. Protective effect of EDTA pre administration on renal ischemia. *BMC Nephrol* 2006;7:5.
119. Baker RC, Armstrong MA, Young IS, McClean E, O'Rourke D, Campbell FC, et al. Methyl prednisolone increases urinary nitrate concentrations and reduces subclinical renal injury during infrarenal aortic ischemia reperfusion. *Ann Surg* 2006;244(5):821-6.
120. Matthijsen RA, Huugen D, Hoebbers NT, Vries B, Peutz-Kootstra CJ, Aratani Y, et al. Myeloperoxidase is critically involved in the induction of organ damage after renal ischemia reperfusion. *Am J Pathol* 2007;171(6):1743-52.
121. Susa D, Mitchell JR, Verweij M, van de Ven M, Roest H, van den Engel S, et al. Congenital DNA repair deficiency results in protection against renal ischemia reperfusion injury in mice. *Aging Cell* 2009;8(2):192-200.
122. Kennedy SE, Erlich JH. Methods in renal research paper murine renal ischaemia-reperfusion injury. *Nephrology* 2008;13(5):390-6.
123. Day Y, Huang L, Ye H, Linden J, Okusa M. Renal ischemia-reperfusion injury and adenosine 2A receptor-mediated tissue protection: role of macrophages. *Am J Physiol Renal Physiol* 2005;288(4):F722-31.
124. Park KM, Byun JY, Kramers C, Kim JI, Huang PL, Bonventre JV. Inducible nitric-oxide synthase is an important contributor to prolonged protective effects of ischemic preconditioning in the mouse kidney. *J Biol Chem* 2003;278(29):27256-66.
125. Heemann U, Szabo A, Hamar P, Müller V, Witzke O, Lutz J, et al. Lipopolysaccharide pretreatment protects from renal ischemia/reperfusion injury: possible connection to an interleukin-6-dependent pathway. *Am J Pathol* 2000;156(1):287-93.
126. Basile DP, Donohoe D, Roethe K, Osborn JL. Renal ischemic injury results in permanent damage to peritubular capillaries and influences long-term function. *Am J Physiol Renal Physiol* 2001;281(5):F887-99.
127. Malagrino PA, Venturini G, Yogi PS, Dariolli R, Padilha K, Kiers B, et al. Catheter-based induction of renal ischemia/reperfusion in swine: description of an experimental model. *Physiol Rep* 2014;28(9):e12150.