

T.C.
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**İZOLE PERFÜZE SIÇAN KALBİNDE OLUŞTURULAN İSKEMİ
REPERFÜZYON HASARI ÜZERİNE POLİ(ADP Riboz)POLİMERAZ
İNİBİTÖRÜ 5-AMİNOİSOQUİNOLİNONE ve Na⁺-H⁺ ANTİPORT
İNİBİTÖRÜ ZONİPORİDE’NİN ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Ecz. AHMET GÜRKAN

**DANIŞMAN
YRD. DOÇ. DR. HASAN AKKOÇ**

FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI

DİYARBAKIR 2012

T.C.
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**İZOLE PERFÜZE SIÇAN KALBİNDE OLUŞTURULAN İSKEMİ
REPERFÜZYON HASARI ÜZERİNE POLİ(ADP Riboz)POLİMERAZ
İNİHİTÖRÜ 5-AMİNOİSOQUİNOLİNONE ve Na⁺-H⁺ ANTİPORT
İNİHİTÖRÜ ZONİPORİDE’NİN ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Ecz. AHMET GÜRKAN

**DANIŞMAN
YRD. DOÇ. DR. HASAN AKKOÇ**

FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI

**Bu tez, Dicle Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri komisyonu tarafından
11 TF- 17 nolu Yüksek Lisans proje numarası ile desteklenmiştir.**

DİYARBAKIR 2012

DİCLE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

‘İzole perfüze sıçan kalbinde oluşturulan iskemi-reperfüzyon hasarı üzerine Poli(ADP-Riboz)Polimeraz inhibitörü 5-aminoisoquinolinone ve Na⁺-H⁺ antiport inhibitörü Zoniporide’nin etkilerinin araştırılması’ isimli yüksek lisans tezi 05/06/2012 tarihinde tarafımızdan değerlendirilerek başarılı bulunmuştur.

Tez Danışmanı : Yrd. Doç .Dr. Hasan AKKOÇ
Tezi Teslim Eden : Ecz. Ahmet GÜRKAN

Jüri Üyesinin

Ünvanı	Adı Soyadı	Üniversitesi-Fakültesi
Başkan	: Prof. Dr. Meral ERDİNÇ	D.Ü. Tıp Fakültesi
Üye	: Prof. Dr. Nuriye METE	D.Ü. Tıp Fakültesi
Üye	: Yrd. Doç. Dr. Hasan AKKOÇ	D.Ü. Tıp Fakültesi

Yukarıdaki imzalar tasdik olunur.

08/06/2012

Prof. Dr. Salih HOŞOĞLU
Dicle Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim süresince desteğini, bilgisini ve ilgisini esirgemeyen sayın Prof. Dr. Meral ERDİNÇ'e, tez danışmanım sayın Yrd. Doç. Dr. Hasan AKKOÇ'a, Farmakoloji Anabilimdalı Öğretim Üyeleri Prof. Dr. Osman GÖKALP, Yrd. Doç. Dr. Aşkın HEKİMOĞLU ve Yrd. Doç. Dr. İlker KELLE'ye teşekkürlerimi sunarım.

Ecz. Ahmet GÜRKAN

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

1. Ön Sayfalar	Sayfa
1.1. Kapak	
1.2. İç Kapak	
1.3. Onay Sayfası.....	I
1.4. Teşekkür Sayfası.....	II
1.5. İçindekiler Dizini.....	III
1.6. Şekiller Dizini.....	V
1.7. Tablolar Dizini.....	VI
1.8. Grafikler Dizini.....	VII
1.8. Simgeler ve Kısaltmalar Dizini.....	VIII
2. Özet Sayfaları	
Türkçe Özet.....	X
İngilizce Özet.....	XI
3. Tez Metni	
1. Giriş ve Amaç	1
2. Genel Bilgiler.....	2
2.1. İskemi.....	2
2.2. Reperfüzyon.....	3
2.3. Reperfüzyon Hasar Mekanizmaları.....	3
2.3.1. Serbest Radikaller.....	3
2.3.1.1. Serbest Radikal Kaynakları.....	4
2.3.1.1.1. Oksijen.....	4
2.3.1.1.2. Aktive Nötrofiller.....	9
2.3.1.1.3. Nitrik Oksit.....	9
2.3.1.1.4. Endoplazmik Retikulum.....	10
2.3.1.1.5. Peroksizomlar.....	10
2.3.1.1.6. Plazma Membranları.....	11
2.3.1.2. Serbest Radikallere Bağlı Hücre Hasarı.....	11
2.3.1.2.1. Serbest Radikallerin Membran Lipitlerine Etkileri.....	11
2.3.1.2.2. Serbest Radikallerin İyon Pompalarına Etkileri.....	12
2.3.1.2.3. Serbest Radikallerin Proteinlere Olan Etkileri.....	12

2.3.1.2.4.Serbest Radikallerin DNA Üzerine Olan Etkileri.....	12
2.3.2.Renin-Anjiotensin-Aldesteron Sistemi.....	13
2.3.3.Trombositler.....	13
2.3.4.Kontraktür.....	13
2.4.Poli(ADP-riboz)Polimeraz (PARP)	14
2.4.1.Parp İnhibitörleri.....	16
2.4.1.1.KlasikParp İnhibitörleri.....	17
2.4.1.2.Yeni Parp İnhibitörleri.....	17
2.4.1.3.Çinko Pamak Parp İnhibitörleri.....	17
2.4.2.İskemi Reperfüzyon Hasarı ve Parp-1.....	18
2.5.Na/H Antiportu.....	18
2.5.1.Na/H Antiport İnhibitörleri.....	20
2.5.2.Zoniporide.....	20
3. Gereç ve Yöntem.....	21
3.1. Gereç.....	22
3.1.1. Kullanılan Deney Hayvanları.....	21
3.1.2. Kullanılan İlaç ve Kimyasal Maddeler.....	21
3.1.3. Kullanılan Alet ve Cihazlar.....	21
3.1.4.Kullanılan Solüsyonlar.....	22
3.2. Yöntem.....	23
3.2.1. Cerrahi Yöntem.....	23
3.2.2.Hemodinamik Analizler.....	25
3.2.3.Laktat Dehidrogenaz Analizi	25
3.2.4.Nekroz Alanı Tayini.....	25
3.2.5.İstatistiksel Analiz.....	26
4. Bulgular.....	27
4.1. Hemodinamik Bulguları.....	27
4.2.Nekroz Alanı Bulguları.....	30
4.3.LDH Bulguları.....	31
5. Tartışma.....	33
6. Sonuç ve Öneriler.....	37
7. Kaynaklar.....	38

ŞEKİLLER DİZİNİ**Sayfa**

Şekil.2.1. İyi bilinen serbest radikaller veya reaktivitesi fazla olan moleküller.....	4
Şekil.2.2. Enzimatik yolla SOR oluşumuna yol açan tepkimelerden bazıları.....	6
Şekil.2.3. SOR ürünlerinin enzimatik olmayan kaynakları.....	6
Şekil.2.4. Süperoksit radikalinden hidrojen peroksit oluşumu.....	7
Şekil.2.5. Hidroksil radikali oluşumu.....	8
Şekil.2.6. Haber-Weiss tepkimesi ve Fenton tepkimesi.....	8
Şekil.2.7. Hipoklorik asit oluşumu.....	9
Şekil.2.8. Parp-1'in aktivasyonu ile oluşan hasar mekanizmaları.....	16
Şekil.2.9. Na/H antiportunun yapısı.....	19
Şekil.3.1. Çalışma protokolünün şematik gösterimi.....	24

TABLULAR DİZİNİ**Sayfa**

Tablo.3.1. Modifiye tyrode solüsyonu bileşimi	22
Tablo.4.1. Grupların hemodinamik parametreleri.....	27
Tablo.4.2. Nekroz alanı.....	30
Tablo.4.3. Grupların LDH düzeyleri.....	31

GRAFİKLER DİZİNİ

	Sayfa
Grafik.4.1. Kalp atım hızları.....	28
Grafik.4.2. Koroner perfüzyon basınçları.....	28
Grafik.4.3. LVDP değerleri.....	29
Grafik.4.4. dP/dt max değerleri.....	29
Grafik.4.5. dP/dt min değerleri.....	30
Grafik 4.6. Grupların nekroz alanı.....	31
Grafik 4.7. Grupların LDH düzeyleri.....	32

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

İR	: İskemi-Reperfüzyon
Na⁺/H⁺	: Sodyum-Hidrojen antiportu
Na⁺/Ca⁺⁺	: Sodyum-Kalsiyum antiportu
NAD	: Nikotinamid Adenin Dinükleotit
ATP	: Adenozin Tri Fosfat
PARP	: Poli(ADP-riboz)Polimeraz enzimi
5-AİQ	: 5-Aminoisoquinolinone
SOR	: Serbest oksijen radikali
NO	: Nitrik oksit
MPO	: Myeloperoksidaz enzimi
NOS	: Nitrik Oksit Sentaz
nNOS	: Nöronal Nitrik Oksit Sentaz
eNOS	: Endotelyal Nitrik Oksit Sentaz
MDA	: Malon dialdehit
Mg⁺⁺	: Magnezyum
Na⁺	: Sodyum
FAD	: Flavin Adenin Dinukleotid
RAA	: Renin Anjiotensin Aldesteron
K⁺	: Potayum
Ca⁺⁺	: Kalsiyum
İCAM	: İntraselular Adezyon Molekülü
TNF -α	: Tümör nekroz faktör alfa
3-AB	: 3-Aminobenzamid
İNO2AB	: İodonitrobenzamide
TTS	: Trifenil Tetrazolium Solüsyonu
LDH	: Laktatdehidrogenaz
CK	: Kreatinkinaz
NA	: Nekroz alanı
LVDP	: Sol Ventrikül Gelişen Basıncı
dP/dtmax	: Sol ventrikül sistolik basınç yükselme hızı

dP/dt_{min}	: Sol ventrikül diyastolik basınç gevşeme hızı
DNA	: Deoksi Ribonükleik asit
SOD	: Süperoksit dismutaz
Fe⁺²	: Demir
NO	: Nitrik oksit
NOS	: Nitrik oksit sentaz
NADPH	: Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat

ÖZET

Na⁺-H⁺ antiport inhibitörü zoniporide ve Poli(ADP-Riboz) Polimeraz (PARP) inhibitörü 5-aminoisoquinolinone'nün (5-AIQ) kalpte iskemi reperfüzyon hasarına karşı koruyucu etkilerinin olduğu bilinmektedir. Bu çalışmada zoniporide ve 5-AIQ'nun birlikte kullanılmasının kalpte iskemi reperfüzyon hasarına karşı ek bir katkı yapıp yapmayacağını araştırılması hedeflenmiştir. Çalışmada 250-350 g ağırlığında 40 adet erkek Sprague-Dawley sıçan kullanıldı. Ratlar beş gruba ayrıldı (n=8); Grup 1: Sham opere grubu, Grup 2: İR grubu, Grup 3: 5-AIQ grubu, Grup 4: Zoniporide grubu, Grup 5: Mix grup. İzole rat kalpleri Langendorff sistemi kullanılarak 30 dk iskemi ve ardından 120 dk reperfüzyona maruz bırakıldı. Stabilizasyon periyodunun ardından Grup 3,4 ve 5'teki kalplere Zoniporide (50 nM/L) ve 5-aminoisoquinolinone (7.5µM/L) Tyrode solüsyonuna eklenmek suretiyle uygulandı. Tüm gruplarda hemodinamik parametreler [kalp hızı, koroner perfüzyon basıncı, sol ventrikül geliştirilen basıncı (LVDP), maksimum kasılma (dP/dtmax) ve gevşeme hızı (dP/dtmin)] kayıt altına alındı. Miyokardiyal hasar kalp dokusunda nekroz alanı ölçümü ve perfüzyon sıvısında Laktat Dehidrojenaz (LDH) düzeylerinin ölçümüyle ortaya konuldu. Kalp hızı dışında grup 3,4 ve 5'ten elde edilen hemodinamik parametreler İR grubuna göre anlamlı derecede farklılık gösteriyordu (p<0.05). Zoniporide ve 5-AIQ grupları mix grupla karşılaştırıldığında gruplar arasında hemodinamik parametreler ve LDH düzeyi açısından farklılık bulunmazken (p>0.05), mix grupta hacim ve ağırlık metoduyla hesaplanan nekroz alanının anlamlı olarak azaldığı gözlemlendi [(p<0.05) ve (p<0.001)]. Bu sonuçlar Zoniporide ve 5-AIQ'nün birlikte kullanımının özellikle nekroz alanını azaltarak iskemi reperfüzyon hasarına karşı koruyuculukta artışa yol açtığını göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: İskemi Reperfüzyon Hasarı, Langendorff, Zoniporide, 5-aminoisoquinolinone, Sıçan kalpleri

Investigating The Effect of Na⁺- H⁺ Exchanger Inhibitor – Zoniporide – and Poly(ADP-ribose) Polymerase Inhibitor – 5-Aminoisoquinolinone – on Isolated Perfused Rat Heart During Ischemia-Reperfusion Injury

Summary

It is known that Na⁺- H⁺ Exchanger Inhibitor – Zoniporide – and Poly(ADP-ribose) Polymerase Inhibitor – 5-Aminoisoquinolinone (5-AIQ) have cardioprotective effects against ischemia-reperfusion (IR) injury. The present study was performed to investigate whether the use of Zoniporide and 5-AIQ together will provide an increase in protection against IR injury. Forty Male Sprague-Dawley rats weighing each 250-350 g were used. Rats were divided into five groups (n=8); Group 1: Sham-operated, Group 2: IR, Group 3: (5-AIQ), Group 4: Zoniporide and Group 5: Mix (Zoniporide + 5-AIQ). Isolated rat hearts were exposed to 30 minutes of global ischemia followed by 120 minutes of reperfusion using Langendorff's apparatus. In groups 3, 4 and 5, Zoniporide (50 nM/L) and 5-aminoisoquinolinone (7.5µM/L) were added into Tyrode Solution after stabilization period. In all groups hemodynamic parameters [heart rate, coronary perfusion pressure, left ventricular developed pressure (LVDP), LV(dP/dt)max and LV(dP/dt)min] were recorded. Myocardial injury was assessed in the terms of infarct size and release of lactate dehydrogenase (LDH) enzyme. Except heart rate all parameters were found significantly different in groups 3, 4 and 5 versus IR group (p<0.05). When compared to Zoniporide and 5-AIQ groups, in mix group there was no significant difference determined in LDH and hemodynamic parameters (p>0.05) but myocardial infarct size estimated by volume and weight method reduced significantly [(p<0.05) and (p<0.001)]. These results show that use of Zoniporide and 5-AIQ together provides an increase in protection against IR injury especially by reducing the myocardial infarct size.

Key words: Ischemia-Reperfusion Injury, Langendorff, Zoniporide, 5-Aminoisoquinolinone, Rat heart

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Günümüzde iskemik kalp hastalıkları, önemli morbidite ve mortalite nedeni olarak güncelliğini korumaktadır. Son yıllarda yapılan birçok çalışma ile iskemi ve sonrasında oluşan reperfüzyon sürecinin, kalpte hangi mekanizmalarla hasar oluşturduğu ortaya konulmuştur. Bu konuda yapılan çalışmaların vardığı ortak nokta, iskemi-reperfüzyonun (İR) hücrelerde, özellikle hücre içi iyon dengesini ve enerji depolarını etkileyerek hasar oluşturduğudur.

İskemi, miyokardiyal hücrelerde hidrojen iyonu konsantrasyonunun artmasına ve hücre içi pH'nın düşmesine yol açar; bu durum hücre membranında yer alan ve Sodyum/Hidrojen (Na^+/H^+) antiportunu sağlayan iyon kanallarını aktive eder. Artan hücre içi sodyum (Na^+) konsantrasyonu Sodyum/Kalsiyum ($\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$) antiportunu sağlayan iyon kanalını uyarır. Bu kanalın aktivasyonu sonucu hücre içinde düzeyi aşırı derecede artan kalsiyum iyonu, kontraktüre ve aritmiler yol açarak hücre hasarının oluşumunu hızlandırır. Yine İR döneminde mitokondrilerde meydana gelen Nikotinamid Adenin Dinükleotid (NAD^+) ve Adenozin Trifosfat (ATP) kaybı hücrede enerji açığına yol açarak hücre fonksiyonları bozar.

Son yıllarda yapılan araştırmalarda, membranda Na^+/H^+ antiportunu engellemek amacıyla Na^+/H^+ antiport inhibitörü adı verilen maddelerle çalışmalar yapılmış ve bu iyon kanalının blokajının İR hasarını önemli ölçüde azalttığı ortaya konulmuştur. Benzer şekilde mitokondrilerde iskemi gibi stres durumlarında aktive olan ve aşırı aktivasyonu durumunda mitokondrilerde NAD^+ ve ATP kaybını hızlandıran Poli(ADP-Riboz)Polimeraz (PARP) enziminin inhibe edilmesiyle, İR hasarının azaldığı gösterilmiştir.

Biz de çalışmamızda sıçan kalbinde Langendorff izole perfüze kalp düzeneği kullanarak iskemi reperfüzyon modeli oluşturup; tek başlarına kullanıldıklarında faydalı etkileri kanıtlanmış olan Na^+/H^+ antiport inhibitörü Zoniporide ve PARP inhibitörü 5-aminoisoquinolinone (5-AIQ) adlı iki maddeyi birlikte uygulayıp, iki ayrı yolağın eşzamanlı olarak blokajının oluşturacağı etkileri kalbe ait hemodinamik, biyokimyasal parametreler ve nekroz alanını (NA) ölçerek araştırmayı hedefledik.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. İskemi

Arteriyel ya da venöz kan akımı azalmasına bağlı yetersiz perfüzyonu sonucu doku veya organların oksijenden yoksun kalması şeklinde tanımlanan iskemi, hücrel enerji depolarının boşalması ve toksik metabolitlerin birikmesi sonucunda hücre ölümüne yol açmaktadır (1).

İskeminin ilk zarar verdiği yer hücrenin aerobik solunumudur. Hücrede ilk etkilenen olay mitokondrial oksidatif fosforilasyondur ve bunun sonucunda ATP ve fosfokreatinin sentezinde azalma meydana gelir. Aynı zamanda hücrede adenin nükleotidinin yıkılımda artmaktadır. Bu durum serbest oksijen radikallerinin (SOR) prekürsörü olan hipoksantin hücre içi birikimini de artırmaktadır. Özellikle hücre zarında ATP aktivitesinin azalması zarda aktif Na^+ pompasının yetersizliğine yol açarak hücre içi Na^+ birikimine ve hücreden potasyum (K^+) atılımına yol açar. Solit materyalin birikimine izoozmotik su birikimi eşlik ederek akut hücrel şişme oluşur. Hücrel ATP azlığı anaerobik glikolizisi hızlandırır. Glikolizisin artması hücre içinde laktik asit ve fosfat türevlerinin hidrolizi sonucu oluşan inorganik fosfat birikimine yol açar. Bu birikim hücre içi pH'nın düşmesine yol açar (2,3). İntraselüler asidozis hücre membranında yer alan ve Na^+/H^+ antiportunu sağlayan iyon kanalı aktive eder. Sonucunda artan hücre içi Na^+ konsantrasyonu $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$ antiportunu sağlayan iyon kanalını uyarır. Bu kanalın aktivasyonu hücre içindeki Ca^{++} konsantrasyonunu artırır (4).

Bu aşamaya kadar hücrede meydana gelen bozuklukların tümü oksijen verilmesiyle geri döner. Buna rağmen eğer iskemi sürerse geri dönüşsüz zedelenme oluşur. Geri dönüşsüz zedelenme morfolojik olarak mitokondrilerde aşırı vakuolizasyon, hücre zarında aşırı zedelenme, lizozomlarda şişme ve özellikle iskemik alanın yeniden kanlanması durumunda hücre içi aşırı Ca^{++} tutulumu ile birlikte (2). Artan sitoplazmik Ca^{++} membran hasarını artıran, yapısal ve membran proteinlerini katabolize eden, ATP kaybını hızlandıran ve genetik materyali parçalayan çeşitli fosfolipazları, proteazları, ATPazları ve endonükleazları aktive ederek hücreler için sitotoksik etki gösterir (5).

Proteinler, temel koenzimler, ribonükleik asitler aşırı geçirgen zarlardan sürekli kaybedilir. Hücreler ATP'nin yeniden oluşumunda kullanacakları metabolitleri kaybeder ve pH'nın düşmesi lizozom zarlarının zedelenmesine ve lizozomal enzimlerin sitoplazmaya geçmesine yol açar. Bu enzimler sitoplazma ve çekirdek içi yapıların sindirimine neden olur. Sonuçta ölü hücreler myelin biçimler ve fosfolipidlerden oluşan büyük kitlelere dönüşürler.

Bunlar daha sonra diğer hücreler tarafından fagosite edilir veya yağ asitlerine parçalanırlar. Yağ asitlerinin kalsifikasyonu kalsiyum sabunları oluşur (2).

Özetle; İskemi nedeniyle oluşan hipoksi oksidatif fosforilasyonu etkiler ve ATP yapımını engeller; kritik noktadan sonra hücrede ATP'nin yetersizliği hücre zarında zedelenmeye yol açar. Ca^{++} hücre ölümünde morfolojik değişikliklerden sorumlu önemli bir mediyatördür (2).

2.2. Reperfüzyon

Reperfüzyon, iskemiye maruz kalan doku ya da organların yeniden kanlanması ve oksijenlenmesi olayıdır. Reperfüzyon hasarı ise iskemi periyodunu izleyen yeniden kanlanma döneminde doku yada organlarda meydana gelen hasar olarak tanımlanır (3).

Dokuların yeniden kanlanması ve dolayısıyla hücrelere oksijen sunulması ile iskemiye bağlı hasarın azalacağı düşünülebilir. Ancak, iskemik dokunun reperfüzyonu dokuda paradoksal olarak sadece iskemi ile oluşan hasara göre çok daha ciddi bir hasara yol açar (1).

Hücre içine moleküler oksijenin sunumuyla hızla oluşan SOR türevleri en çok suçlanan faktör olmakla birlikte reperfüzyon hasarından birçok mekanizma sorumlu tutulmuştur (3,6).

2.3. Reperfüzyon Hasar Mekanizmaları

2.3.1. Serbest Radikaller

Atomlar, proton ve nötronlardan oluşan pozitif yüklü bir çekirdek ve çekirdeğin etrafında bulunan negatif yüklü elektronlardan oluşurlar. Elektronlar hem partikül, hem de dalga özelliğine sahip olup; çekirdek etrafında ışık hızı ile hareket ederler. Bu nedenle elektronların çekirdek etrafındaki yeri tam olarak tarif edilemez, yalnızca bulunma olasılığının en fazla olduğu yerden bahsedilebilir. Belirli elektronların bulunma olasılığının en yüksek olduğu yer orbital olarak adlandırılır. Her orbital zıt spinli olmak üzere iki elektron içerebilir. Sayılarına göre, farklı enerji seviyesindeki elektronlar, farklı orbitalleri doldururlar. Çekirdekten uzaklaştıkça elektronların enerji seviyeleri artar. Bir atomda hangi yörüngelerin bulunduğu, orbitallerin ne kadar elektron içerdiği ve orbitallere elektronların nasıl dağıldıkları atom türüne bağlı olarak değişir (6).

Serbest radikaller, dış yörüngelerinde paylaşılmamış elektron içeren kimyasal türlerdir. Paylaşılmamış elektrona sahip moleküller kararsız bir haldedir ve stabil değildir. Başka bir moleküle etkileşime girerek, orbitalindeki elektronu eşleme ve kararlı duruma

gelme eğilimindedirler. Böylece bu moleküller herhangi bir molekül ile etkileşime girerek, elektron alırlar veya verirler (6,7).

HO_2^-	Hidroperoksi radikali	$^1\text{O}_2$	Singlet oksijen
O_2^-	Süperoksid radikali	ROO	Peroksi radikali
H_2O_2	Hidrojen peroksid	ROOOH	Hidroperoksit
OH	Hidroksil radikali	ROOR	Endoperoksit
HOCl	Hipokloröz asit	RO	Alkoksi radikali
NO	Nitrik oksit	NO_2	Nitrojen dioksit
NO_2^+	Nitril katyonu	NO^-	Nitroksil katyonu
NO^+	Nitrozil	ONOO $^-$	Peroksinitrit
ONOO	Peroksinitrit radikali	N_2O_3	Dinitrojen trioksit
N_2O_4	Dinitrojen tetraoksit	LOOL \cdot	Siklik peroksid

Şekil 2.1.: İyi bilinen serbest radikaller veya reaktivitesi fazla olan moleküller (6,8).

2.3.1.1. Serbest Radikal Kaynakları

Biyolojik sistemlerde serbest radikal oluşumu eksojen ve endojen kaynaklı olabilir. Eksojen kaynakların başında hiperoksi, inflamatuvar ilaçlar, yüksek enerjili ışınlar, sigara dumanı, fotokimyasallar, hava kirliliği, organik solventler, anestezipler, peptisitler, aromatik hidrokarbonlar, elektromanyetik radyasyon sayılabilir (8-10).

Biyolojik sistemlerde oluşan serbest radikallerin endojen kaynakları oksijen, aktive nötrofil, nitrik oksid (NO), mitokondriyal elektron transport sistemi, endoplazmik retikulum, peroksizom ve plazma membranıdır (11).

2.3.1.1.1. Oksijen

Moleküler oksijen dış orbitallerinde paylaşılmamış iki elektron içerir. Bu elektronlar, spinleri aynı yönde ve farklı orbitallerde iken minimum enerji seviyesindedirler. Radikal tanımına göre oksijen diradikal yapıya sahip bir moleküldür. Diradikal yapıya sahip olan oksijenin herhangi bir molekülle tepkimeye girebilmesi için, tepkimeye gireceği molekülün de benzer yapıya sahip olması gerekir. Oysa başta organik moleküller olmak üzere, atom ve moleküller orbitallerinde elektronları antiparalel ve eşleşmiş olarak içerirler veya paylaşılmamış elektronlar kovalent bağlara katılmışlardır. Bunun sonucu oksijenin diğer moleküllere olan reaktivitesi son derece kısıtlanmıştır. Bu kısıtlama spin kısıtlaması olarak adlandırılır (7).

Canlıların oksijeni kullanabilmesi için, oksijene elektron transferi yaparak spin kısıtlamasını aşmaları gerekir. Bu işlem için canlılar geçiş elementleri sınıfından bazı metal iyonlarından yararlanırlar. Geçiş elementlerinden demir, bakır, manganez, çinko, kobalt ve molibden vücudun gereksinim duyduğu başlıca eser elementler olup, bu elementler dış orbitallerinde bir veya daha fazla sayıda paylaşılmamış elektron içerirler. Canlılarda oksijeni kullanan enzimler yada oksijenle etkileşime giren proteinler, bu elementlerden en az bir tanesini içermek zorundadırlar (7).

Oksijenin dış orbital elektronlarının mevcut durumunun değiştirilmesi onu reaktif hale getirir ve kullanımına olanak sağlar. Bu amaçla spin kısıtlaması iki yolla aşılabılır:

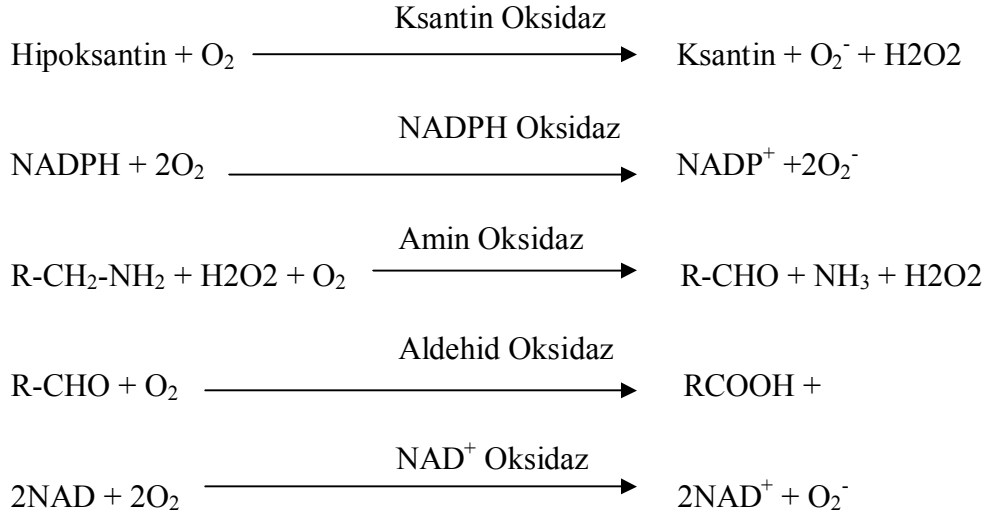
a) Oksijene elektron transferi ile: Serbest metal iyonları ve çok daha etkili olmak üzere proteinlere bağlı metal iyonları aracılığı ile oksijene bir veya iki elektron aktarımı katalizlenebilir. Oksijene tek elektron transferi ile süperoksit radikali oluşur (7).

b) Enerji absorpsiyonu ile de oksijenin spin kısıtlaması ortadan kaldırılabilir. Bu mekanizma ile singlet oksijen formu oluşur (7).

Endojen Serbest Oksijen Radikallerinin Oluşumu

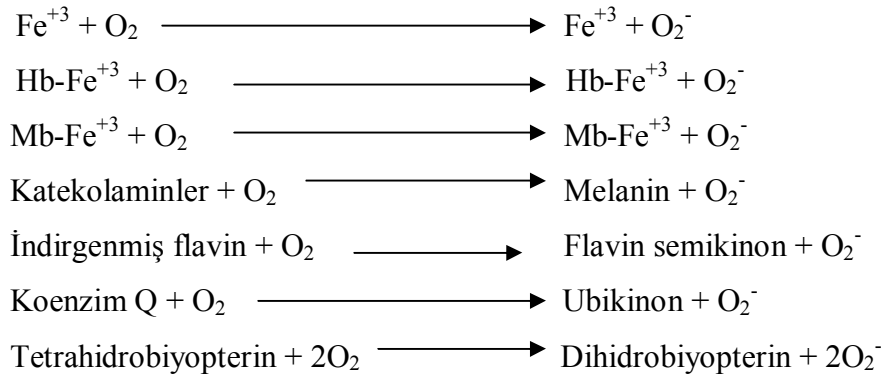
Endojen SOR enzimatik tepkimeler, enzimatik olmayan tepkimeler ve mitokondriyal elektron transportu sürecinde oluşabilir (12).

1. Enzimatik Tepkimeler: Oksijen içeren tepkimeleri katalizleyen enzimler oksidazlar veya oksijenazlar olarak sınıflandırılmaktadır. Elektronları oksijene aktaran oksidazlar oksijenin su veya hidrojen perokside indirgenmesini sağlamaktadır. Oksijenazlar, oksijenin bir substratın yapısına katılmasını gerçekleştirmektedir. Bu grupta ksantin oksidaz, nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH) oksidaz, amin oksidaz, aldehid oksidaz, dihidroorotat dehidrogenaz, peroksidaz, NAD⁺ oksidaz, metilamin dehidrogenaz, galaktoz oksidaz, ribonükleotid redüktaz, prostaglandin oksidaz ve pirüvat format liyaz enzimlerinin katalizlediği tepkimelerle serbest radikaller oluşabilmektedir (Şekil 2.2.) (12).



Şekil 2.2.: Enzimatik yolla SOR oluşumuna yol açan tepkimelerden bazıları (12).

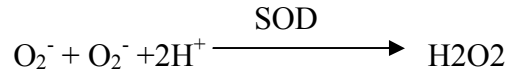
2. Enzimatik Olmayan Tepkimeler: Otooksidasyon tepkimeleri sonucu enzimatik olmayan kaynaklardan reaktif oksijen metabolitleri oluşabilmektedir (Şekil 2.3.) (12).



Şekil 2.3.: SOR ürünlerinin enzimatik olmayan kaynakları (12)

3. Elektron Transport Zinciri: Normal koşullarda mitokondri, sitokrom oksidaz sistemi ile oksijeni suya indirgeyerek detoksifiye etmektedir. Elektron transport zincirinde yer alan NAD^+ , flavin adenin dinükleotid (FAD), koenzim Q gibi pek çok bileşik oksijen ile tepkimeye girerek SOR oluşumuna neden olmaktadır. Bu mekanizma ile çok küçük miktarlarda oluşan SOR türevleri hücrel antioksidan sistemler tarafından kolaylıkla yok edilebilmektedir. Ancak özellikle iskemi sırasında bozulan mitokondriyal enzim fonksiyonları nedeniyle hücrel antioksidan sistemlerin kapasitesini aşacak miktarlarda SOR ortaya çıkmaktadır (12-14).

Süperoksid Radikali: Canlılarda oluştuğu ilk olarak gösterilen radikaldir. Süperoksid radikali başta dehidrogenazlar ve oksidazlar olmak üzere yüzlerce enzimin katalitik etkisi sırasında, mitokondrideki enerji metabolizması sırasında oksijen kullanılırken, aktive nötrofiller tarafından oluşturulabilirler. Hücresel koşullarda üretilen süperoksit, oksitleyici veya indirgeyici olarak davranabilir. Aldığı elektronu metal iyonuna, sitokrom C' ye veya bir radikale verirse tekrar oksijene oksitlenir. Oksijenden daha oksitleyici olan süperoksit bir elektron daha alırsa peroksi anyonuna indirgenir. Aerobik canlılarda süperoksitlerin hidrojen perokside çevrilmesi katalitik aktivitesi çok yüksek bir enzim olan süperoksit dismutaz (SOD) enzimi tarafından katalizlenir (Şekil 2.4.) (7).



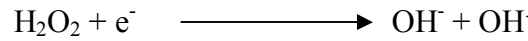
Şekil 2.4.: Süperoksid radikalinden hidrojen peroksid oluşumu (7).

SOD enziminin yüksek katalitik aktivitesi nedeniyle hücrelerde süperoksit birikimine izin verilmez. Ancak çeşitli patolojik durumlarda süperoksit yapımının artması durumunda, süperokside özgül tepkimeler görülmeye başlar. Süperoksit metal iyonlarını indirgeyerek bağlı oldukları proteinlerden salınımına neden olur, kofaktörlerin oksidasyon düzeylerini bozar, metal iyonlarının katıldığı hidroksil radikali yapımı tepkimelerini hızlandırır. Diğer radikallere göre daha az reaktif olsa da, süperoksit indirgenmiş nükleotidleri, bazı aminoasitleri ve antioksidan bileşikleri oksitler. Süperoksit hücre zarlarının hidrofobik ortamlarında daha uzun ömürlüdür ve çözünürlüğü daha fazladır. Zar fosfolipidleri nedeniyle hücre zarı yüzeyleri daha asidiktir ve süperoksit burada daha kolayca bir proton alarak hidroperoksit radikalini oluşturur. Bu radikal de çok reaktif olup, hücre zarlarında lipid peroksidasyonunu başlatabilir ve zarsal antioksidanları oksitleyebilir (7) .

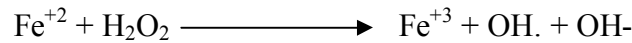
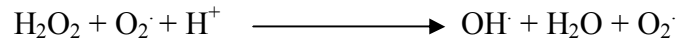
Hidrojen Peroksit: Hidrojen peroksit, oksijenin enzimatik olarak iki elektronla indirgenmesi ya da süperoksitlerin enzimatik veya nonenzimatik dismutasyonu tepkimeleri sonucu oluşur. Hidrojen peroksitin iyonizasyon sabitesi 10.6 olduğundan, nötral ve asidik koşullarda net yük taşımaz, biyolojik zarları kolayca geçebilir. Yapısında paylaşılmamış elektron içermediğinden radikal özelliği taşımaz, reaktif bir tür değildir. Hidrojen peroksitin oksitleyici bir tür olarak bilinmesinin nedeni bakır ve demir gibi metal iyonları varlığında hidroksil radikalinin öncülü olarak davranmasıdır. Hidrojen peroksit özellikle proteinlerdeki

hem grubunda bulunan demir ile tepkimeye girerek yüksek oksidasyon düzeyindeki ferril demir (Fe^{IV}) ve perferril demir (Fe^{V}) oluşumuna neden olur. Bu formdaki reaktif demir çok güçlü oksitleyici özelliklere sahip olup, hücre zarlarında lipid peroksidasyonu gibi radikal tepkimeleri başlatabilir. Belirtilen potansiyel oksitleyici özelliği nedeniyle biyolojik sistemlerde oluşan hidrojen peroksitin derhal ortamdan uzaklaştırılması gerekir. Bu görevi, hücrelerdeki önemli antioksidan enzimler olan katalaz ve peroksidaz enzimleri yerine getirirler (7).

Hidroksil Radikali: Hidrojen peroksitin eksik indirgenmesi ile hidroksil radikali yapımı, vücutta bu radikalin en önemli kaynağıdır. Hidrojen peroksitin iki elektron indirgenmesi ile su oluşurken, tek elektron indirgenmesi hidroksil radikali (Şekil 2.5.) yapımına neden olur. Bu tür indirgenme demir, bakır gibi metal iyonları tarafından katalizlenir. Haber-Weiss tepkimesi ya da Fenton tepkimesi (Şekil 2.6.) olarak adlandırılan bu tepkime ile ne kadar hidroksil radikali oluşacağı, vücutta üretilen hidrojen peroksit derişimi ve serbest metal iyonunun varlığına bağlıdır. Süperoksit hem hidrojen peroksitin öncülü hem de metalleri indirgeyici bir tür olduğundan, biyolojik koşullarda süperoksit yapımının arttığı ortamda hidroksil radikali üretimi kaçınılmazdır. Fenton tepkimesini katalizleyen en aktif metal iyonları demir ve bakırdır. Mangan ve kobalt da bu bakımdan aktif olsalar da, vücuttaki derişimlerinin düşüklüğü nedeniyle demir ile kıyaslandıklarında çok daha az etkindirler (7).



Şekil 2.5.: Hidroksil radikali oluşumu (11)



Şekil 2.6.: Haber-Weiss tepkimesi veya Fenton tepkimesi. Fe: demir (12)

Biyolojik sistemlerin tanıdığı en reaktif tür olan hidroksil radikali, su dahil ortamda rastladığı her biyomolekülle difüzyon limiti hızı ile tepkimeye girer. Bu nedenle 10^{-9} saniyeden daha kısa bir ömre sahiptir. Her tür biyolojik molekül hidroksil radikalinin bir hedefi ise de, özellikle elektronca zengin bileşikler seçilen tercihli hedeflerdir. Nükleik asitler,

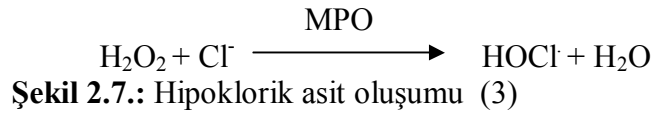
proteinler ve lipidlerde başlatılan radikalik tepkimelerinde binlerce farklı ara ürünler oluşabilir (7).

Singlet Oksijen: Oksijenin enerjistik olarak uyarılan bu formunda spin kısıtlamasının kaldırılmış olması nedeniyle reaktivitesi çok yüksektir. Vücutta pigmentlerin oksijenli ortamda ışığı absorplamasıyla, hidroperoksitlerin metaller varlığındaki yıkım tepkimelerinde, kendiliğinden dismutasyon tepkimeleri sırasında, prostoglandin endoperoksit sentaz, bazı sitokrom p450 tepkimelerinde ve miyelo/ kloro/laktoperoksidaz enzimlerinin etkileri sırasında oluşabilir (7).

Özellikle karbon-karbon çift bağları singlet oksijenin tepkimeye girdiği bağlardır. Bu moleküllerin başında tokoferoller, fenoller, bilirubin, deoksiribonükleik asit (DNA), karotenler, kolesterol, NADPH, triptofan, methionin, sistein ve histidin gibi bileşikler gelir. Doymamış yağ asitleri ile doğrudan tepkimeye girerek peroksi radikalini oluşturur ve hidroksil radikali kadar etkin bir şekilde lipid peroksidasyonunu başlatabilir (7).

2.3.1.1.2. Aktive Nötrofiller

Reperfüzyon hasarının en önemli hücresel elemanı polimorfonükleer lökositlerden olan nötrofillerdir (15,16). Nötrofiller kompleman 5a, interlökin-8, lökotrien B4 ve dönüştürücü büyüme faktörü- α gibi kemotaktik elemanların etkisi ile inflamasyon alanına göç ederler (3,17). Aktive olmuş nötrofiller hücre zarlarındaki NADPH-oksidadaz enzim aracılığı ile moleküler oksijeni süperoksit iyonuna indirgerler. Süperoksit, çoğu kez spontan dismutasyonla hidrojen peroksit'e dönüşür. Hidrojen peroksit, klorür iyonlarının mevcudiyetinde, nötrofillerin azurofilik granüllerinde bulunan myeloperoksidaz enzimi (MPO) aracılığı ile hipoklorik asite indirgenir (Şekil 2.7.). Hipoklorik asit güçlü bir oksidandır ve birçok biyolojik moleküle kolayca reaksiyona girebilir (3,11,18).



2.3.1.1.3. Nitrik Oksit

Aynı anda farklı hücre türlerinde sentezlenen, otokrin veya parakrin mediatör fonksiyonu gören NO, yağda çözünür ve biyolojik membranlardan kolaylıkla geçer. Molekül ağırlığı 30 olup, çok kısa yarılanma ömrüne (3-5 sn) sahiptir. Basit kimyasal yapıya sahip

olmasına rağmen oldukça farklı ve zıt etkileri bulunmaktadır. NO güçlü bir vazodilatör, önemli bir hücre içi sinyalleme aracı, atipik bir nörotransmitter, immünolojik olaylarda rol oynayan nonspesifik sitotoksik bir mediyatör, çevresel bir toksin ve biyolojik bir ulak olarak fonksiyon gören gaz yapısında bir moleküldür (19).

Endojen NO oluşumu nitrik oksit sentaz (NOS) enzimi tarafından gerçekleştirilir. NOS enziminin sinir ve akciğer, pankreas, mide ve uterus gibi dokularda bulunan nöronal NOS (nNOS), endotel hücrelerinde bulunan endotelial NOS (eNOS), immünolojik olaylarla indüklenebilen ve bütün çekirdekli hücrelerde bulunan indüklenebilir NOS (iNOS) gibi izoformları bulunmaktadır (19).

Radikal olarak reaktivitesi düşük olan NO, metal içeren merkezler ve radikaller ile büyük bir hızla tepkimeye girer. Özellikle lipid radikallerle tepkimeye girmesi NO'e antioksidan bir etki kazandırır. Süperoksit ile NO arasındaki tepkime ile oluşan peroksinitrit, hidroksil radikali benzeri aktiviteye sahip olup radikalik tepkimeleri başlatmaya ilave olarak biyomoleküllerin nitrasyonuna neden olur. Fizyolojik derişimde üretilen NO esas olarak oksihemoglobin tarafından nitrate (NO_3^-) oksitlenerek aktivitesi sonlandırılır. Oksijen radikallerindeki durumun aksine, NO'ü ortamdaki temizleyen herhangi bir özel enzim yoktur. Aerobik ortamda NO stabil değildir, derişiminin artması ile oksidasyonu hızlanır. Bu nedenle ortamdaki derişimi ile kendi ömrü arasında ters bir orantı vardır. Özellikle iNOS enziminin indüksiyonu sırasında NO derişiminin artması ile oksidasyonu da hızlanır ve çeşitli reaktif nitrojen oksit türleri oluşur. Bu reaktif türler NO'ün dolaylı etkilerinden sorumlu olup; hücrel moleküllerin nitrozilasyonuna, nitrasyonuna, nitrozasyonuna neden olarak proteinlerin ve enzimlerin inaktivasyonuna neden olabilirler (7).

2.3.1.1.4. Endoplazmik Retikulum

Endoplazmik retikulum sitokrom p450 ve sitokrom b5 enzim sistemleri aracılığı ile yağ asitleri ve ksenobiyotiklerin oksidasyonunu gerçekleştirirken serbest radikalleri oluşturabilir (11).

2.3.1.1.5. Peroksizomlar

Peroksizomlar D-aminoasid oksidaz, urat oksidaz, Açıl Koenzim A oksidaz gibi enzimleri içerdiğinden önemli bir hidrojen peroksit kaynağıdır (11).

2.3.1.1.6. Plazma Membranları

Hücre mebranında siklooksijenaz ve lipooksijenaz enzimleri ile prostoglandin ve lökotrienlerin oluşumu sırasında hidroksi ve peroksi radikalleri açığa çıkabilmektedir (11,20).

2.3.1.2. Serbest Radikallere Bağlı Hücresel Hasarı

Reperfüzyon döneminde oluşan serbest radikallere bağlı olarak, hücrenin temel yapı ve fonksiyonlarında değişik derecelerde hasar oluşmaktadır. Bu hasar en fazla duyarlı olan yapılar membran lipidleri, proteinler, nükleik asitler ve DNA molekülleridir (8-10).

2.3.1.2.1 Serbest Radikallerin Membran Lipidlerine Etkileri

Reperfüzyon hasarının en önemli nedeni, artan serbest radikallerin plazma ve organel membranları üzerinde başlattıkları lipid peroksidasyonudur. Radikal aracılı bir zincir reaksiyon mekanizması şeklinde gelişen lipid peroksidasyonu sırasında, doymamış yağ asitlerinin yan zincirlerinde yeniden düzenlenme söz konusudur (12,21,22).

Lipid peroksidasyonu sırasında, karbon bağlarının kopması ile aldehid yapısında yıkılım ürünleri ortaya çıkmaktadır. Bu sitotoksik metabolitler, malondialdehid (MDA) gibi alkaneller, 4 hidroksinonenal gibi hidroksialkenallerdir. MDA sınıfından olan tiyobarbitürik asid ile reaksiyon veren maddeler, İR olayında lipid peroksidasyonunun en duyarlı göstergelerindedir (22,23). Lipid peroksidasyonunun yıkılım ürünü olan MDA, proteinlerin amino grupları ile şift bazı oluşturur ve tiyol grupları ile etkileşir.

Lipid peroksidasyonu, ortamda doymamış yağ asitleri, oksijen ve metal katalizörler bulunduğu sürece logaritmik olarak artarken yeni serbest radikallerin oluşumuna neden olmaktadır. Bu nedenle reperfüzyon dönemi, lipid peroksidasyonu için gerekli koşulları sağlaması bakımından çok uygundur (21,22,24). Lipid radikalleri veya MDA gibi peroksidasyon ürünleri aracılığı ile lipid peroksidasyonu, biyolojik membranlarda yaygın hale geldiği zaman hücresel yapı ve fonksiyon hasarları ortaya çıkmaktadır. Yapısal hasarın derecesine göre, plazma membranında akışkanlığın azalması, membran geçirgenliğinin değişmesi, membran potansiyeli azalması, membrana bağlı enzimlerin aktivitesinde azalma gözlenir (11,22,25). Lizozomal ve mitokondrial membranları ilgilendiren ileri derecede lipid peroksidasyonu ile organel içeriğinin hücre içine salınması sonucunda proteolizin hızlanır ve doku hasarının şiddetlenir (11,22). Membran geçirgenliğinin bozulması ile protein sentezi için çok önemli olan K^+ ve magnezyum (Mg^{++}) iyonlarının konsantrasyonları değişir ve buna bağlı olarak protein sentezinin inhibisyonu gerçekleşir (22).

2.3.1.2. Serbest Radikallerin İyon Pompaları Üzerine Etkileri

Reperfüzyon sırasında miyokardiyal dokularda üretilen SOR, proteinler, membran lipidleri ve nükleik asitlerin oksidasyonuna yol açar, membran iyon kanallarının K^+ , Ca^{++} ve Na^+ 'a geçirgenliğini değiştirir. Oksidatif strese maruz kalan dokuda Na^+/K^+ ATPaz, Na^+/Ca^{++} ATPaz gibi iyon pompalarının aktivitesi azalmıştır (26). İR'de hücre içine Ca^{++} girişi artıp, çıkışı azaldığı için hücre içi Ca^{++} homeostazı bozulur. Bu etki, L-tipi Ca^{++} kanalları aracılığıyla sarkolemal Ca^{++} girişinin artmasıyla ya da sekonder olarak sarkoplazmik retikulum- Ca^{++} siklusundaki değişikliklerle ilişkilidir. Fizyolojik koşullarda hücre içinde biriken fazla Ca^{++} dışarı atılarak ya da hücre içinde depolanarak tolere edilir. İskemi sırasında hücrede enerji tükendiğinden sitoplazma ve mitokondride aşırı miktarda Ca^{++} birikmekte ve Ca^{++} 'un toksik etki göstermesine neden olmaktadır. Enerji eksikliği nedeniyle pompalar ve depolama mekanizmaları iflas eder ve artan Ca^{++} düzeyi fosfolipazları, proteazları aktive ederek radikal veya asitlerin oluşumunu artırır ve hücreyi ölüme sürükleyebilirler (27). Hücrenin sürekli K^+ kaybetmesi, yüksek enerjili fosfatların tüketimi, hücre içi Ca^{++} konsantrasyonunun artması, sistolik kan basıncının azalması, diyastolik kan basıncının artması, metabolik fonksiyonların depresyonu, aritmiler ve nekrozu kapsayan reperfüzyon hasarına neden olabilir (26,27).

2.3.1.2.3. Serbest Radikallerin Proteinler Üzerine Olan Etkileri

Hücrenin protein yapıları, serbest radikallerin, özellikle duyarlı amino asitler ile direkt etkileşimi sonucunda hasara uğramaktadır. Metionin, sistein gibi terminal sülfidril grubu bulunduran aminoasitler ile triptofan, tirozin, fenilalanin, histidin gibi aromatik aminoasitler, oksidasyona en fazla maruz kalan moleküllerdir. Oksidasyon sonucu proteinlerin sekonder ve tersiyer yapılarında oluşan değişiklikler fonksiyonlarını etkilemektedir. Enzim veya reseptör fonksiyonuna sahip membran proteinleri, özellikle serbest radikallerin modifikasyonlarına duyarlı oldukları için protein oksidasyonu ile önemli hücresel ve membran fonksiyonları bozulmaktadır (12,22,25,28).

2.3.1.2.4. Serbest Radikallerin DNA Üzerine Olan Etkileri

Reaktif oksijen radikallerinin, hücrede saldırdığı bir diğer önemli makromolekül nükleik asitlerdir. DNA'nın temel taşı olan nükleotidin yapısı içinde yer alan purin ve pirimidin bazıları oksijen radikallerinin etkilerini gösterdiği bölgelerdir. Özellikle guanin

bazının bu radikaller aracılığı ile hidroksilasyonu sonucunda DNA molekülünün yapısı değişmekte ve mutasyonlar ortaya çıkmaktadır. (12,12,22,29).

2.3.2. Renin-Anjiotensin-Aldesteron Sistemi

Renin-anjiotensin- aldesteron (RAA) sisteminin ürünü olan angiotensin-II, myositlerde hücre içi Ca^{++} düzeylerinde artışa yol açarak, pozitif inotropik etkinin yanısıra diastolik fonksiyonları bozar ve koroner vazokonstriksiyona neden olur. Bu etkileriyle myokardiyal reperfüzyon döneminde gelişen hasara katkıda bulunur (30,31).

2.3.3 Trombositler

İR döneminde aktive olan trombositler hasarlı bölgeye doğru doğru göç ederler ve birikirler. Trombositler ve trombosit ürünleri olan tromboksan A2 ve serotonin mikrosirkülatur spazm, mikrovasküler konjesyon, trombozis ve koroner akımda yavaşlama gibi etkileriyle oluşturduğu vasküler disfonksiyonla İR hasarını ağırlaştırır (32).

2.3.4 Kontraktür

Myokardiyal kontraktür, kalp kası hücrelerinin kasılmasına yol açan aktin ve myozin arasında çapraz bağlanmanın geri dönüşsüz olmasıyla ortaya çıkar. İR döneminde farklı mekanizmalarla gelişen iki ayrı kontraktür tipi gözlenebilir. Bunlar Ca^{++} bağımlı kontraktür ve rigor tipi kontraktürdür (33,34).

Ca^{++} bağımlı kontraktür: İskemi, hücrelerin Ca^{++} düzeylerini dengeleme fonksiyonlarında hasara yol açar. Bu hasar sonucunda hücre dışından ve hücre içi depolarından akımın artışı ile sitoplazmada yükselen Ca^{++} düzeyleri, reperfüzyon döneminde toksik düzeylere çıkabilir. Sitoplazmik Ca^{++} düzeylerinin aşırı yüksekliği myofibrillerin duyarlılığını azaltarak kontraktür gelişimine yol açar. Bu tip kontraktür genellikle kısa süreli iskemi periyodunu izleyen reperfüzyon döneminde hızla yükselen ATP düzeyleriyle birlikte (5,34).

Rigor tipi kontraktür: İskemi periyodunun uzaması, hücrelerin reoksijenasyon döneminde yeniden enerji üretim yeteneğini kısıtlar veya ortadan kaldırır. Bu dönemdeki ATP düzeylerinin düşüklüğü rigor tipi kontraktür gelişimini provake eder. Kontraktürün oluşumu Ca^{++} dan bağımsızdır (33,34).

Her iki kontraktür tipide mekanik güçsüzlüğe, doku nekrozuna ve global iskeminin bütün kalbi etkilemesiyle görülen taşkalp fenomenine yol açabilir (33,34).

2.4. Poli(ADP-riboz)Polimeraz

Poli(ADP-riboz)Polimeraz (PARP), birçok ökaryotik hücrenin çekirdeğinde geniş bir yayılım gösteren 113kDa ağırlığında çekirdek proteindir. Kabul edici (akseptör) proteinlere poli(ADP-riboz) birimleri sentezler. Substrat olarak NAD^+ kullanılır. Çekirdekte bulunan birçok poli(ADP-riboz) akseptör protein, DNA'nın doğruluğunun devam ettirilmesinden sorumludur (35,36).

Ökaryotik hücrelerdeki proteinlerde translasyon sonrasında görülen en keskin değişimlerden biri de PARP enzim ailesi tarafından katalizlenen poli(ADP-ribozil)asyon işlemidir. PARP enzimleri, ADP-riboz'u NAD^+ molekülünden kabul edici proteinlere veya PARP moleküllerinin bizzat kendisine aktarma yoluyla poli(ADP-riboz) zincirlerini oluşumunu katalizler (35,37).

PARP'lar; multifonksiyonel enzim yapısına sahiptir. DNA tamirinin yanı sıra genlerin bakımında, apoptoziste, hücrel farklılaşma, replikasyon ve telomeraz aktivitesinin düzenlenmesi gibi bir çok hücrel fonksiyonlarda rol oynamaktadır (37-39).

PARP'lar sadece hücrenin yaşamsal faaliyetleri ve programlı hücre ölümü ile ilgili değildir. PARP ailesi aynı zamanda transkripsiyonun düzenlenmesi, telomer kohezyonu, hücre bölünmesi esnasında mitotik içcik şekillenmesi, hücre içi beslenme ve enerji metabolizması gibi biyolojik işlevleri de düzenler (35,39,40).

Poli(ADP-riboz) şekillenmesi ilk olarak 1963 yılında Chambon ve arkadaşları tarafından rapor edilmiştir. Bu çalışma tavuk karaciğerinden hazırlanan asitte çözünmeyen nükleer preparat kesitine C-adenin işaretli ATP'nin eklenmesi, nikotinamid mononükleoti ile 1000 katlanma meydana gelmesini sağlamıştır (35).

Ökaryotik hücrelerde, NAD^+ 'ın biyoenerjik olaylarda temel bir koenzim/transmitter molekül olduğu gösterilmiştir. Mevcut redoks tepkimelerin dengelenmesi ve ATP üretimi, doğrudan hücrelerdeki NAD^+ düzeylerine bağlıdır. Bu molekülün kimyasal yapısı, oksidatif fosforilasyon sırasında ATP'nin üretimine öncülük eden mitokondriyal elektron transport zinciri enzimleri aracılığıyla katalizlenen reaksiyonlarda hem elektron kabul edici hem de elektron verici olarak görev yapmasına olanak tanır (35,36,41-43).

Enerji metabolizmasındaki iyi bilinen rolüne ek olarak, NAD^+ aynı zamanda çok yönlü ADPribozilasyon reaksiyonları için bir substrat veya öncül molekül gibi ayrı bir fonksiyona da sahiptir. Nikotinamid ve riboz arasındaki yüksek enerjili bağın hidrolizi sonucunda 34,3

kJ/mol'luk serbest enerji açığa çıkar. Bu enerji, NAD^+ metabolizmasının dışında, ADP(ribozil)asyon enzimlerinin ADP-riboz polimerlerini sentezinde ve ADP-riboz yapılarının proteinlere transferinde kullanılır. Serbest ve protein ilişkili poli(ADP-riboz)'un protein düzenlemesinde ve yenilenmesinde olduğu kadar, ikincil mesajcıların üretiminde de önemli görevleri mevcuttur (35-37,41,44).

Uzun zamandır, memeli hücrelerinde Poli(ADP-ribozil)asyon faaliyetinden sorumlu olan tek enzimin PARP-1 olduğu düşünülüyordu. PARP-1 geni olmayan farelerdeki çalışmalar ve yeni Poli(ADP-ribozil)asyon enzimlerinin tanımlanmasıyla bu düşünce değişmiştir. PARP-1 farelerden elde edilen primer kültür hücrelerde DNA hasarını takiben hala PARP'ın sentezlenebildiği gözlenmiştir (35,37,40,44).

PARP ailesinin günümüze kadar 18 üyesi keşfedilmiştir. Altı temel PARP süperailisi üyeleri kendi aralarında domain yapılarına, katalitik domainlerin sekanslarına ve enzimatik aktivitelere göre üç alt gruba ayrılırlar. Alt grup 1 'de PARP-1, PARP-1b, PARP-2 ve PARP-3 yer almaktadır. Bunlardan PARP-1b, daha önceleri kısa PARP-1 olarak tanımlanmış ve PARP-1 gen bölgelerinin alternatif transkripsiyon başlatma ürünü gibi görünmektedir. Deneysel çalışmalar hem PARP-1 hem de PARP-2'nin strese karşı yanıtta farklı yollar kullanarak önemli rol oynadığını göstermektedir (35,38).

Alt grup 2' nin tek üyesi olan PARP-4'e atlayan parp adı verilir. PARP-4, PARP ailesinin en büyük molekül ağırlığına sahip üyesi olup (192,6 kDa) atlamış bir komplekse sahip olduğu tanımlanmıştır. Bu atlayan kompleks, iki tane yüksek oranda korunmuş protein ve kodlanmamış RNA ile ilişkili işlevi bilinmeyen sitoplazmik bir ribonukleoproteindir (35).

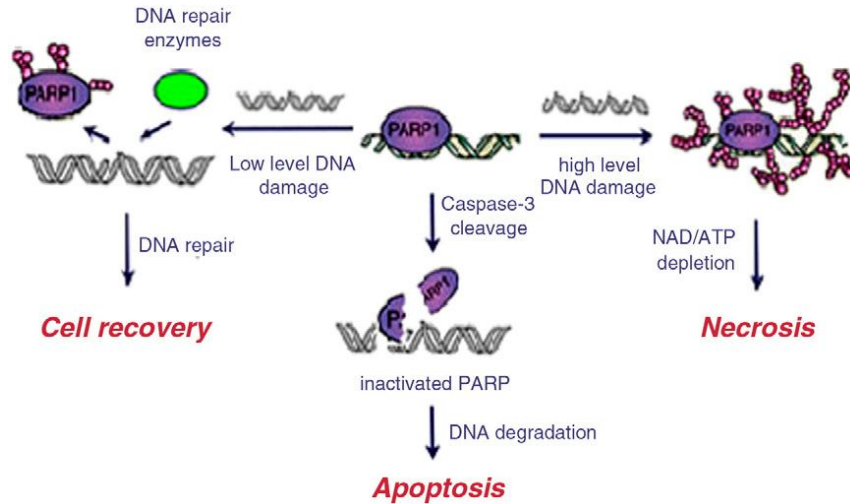
Alt grup 3'ün üyeleri ise trankiraz-1, trankiraz-2 ve bunun alternatif transkript şekli trankiraz-2b olup PARP-5, PARP-6a ve PARP-6b olarak bilinirler. Hem PARP-5 hem de PARP-6 telomerik kompleksin kısımları gibi tanımlanmıştır (35).

Tüm bu temel PARP enzimleri otomodifikasyon ve daha çok kovalent oto-ADP-ribozilasyon faaliyetine sahiptirler (35).

Bu 18 üyenin tanımlanmasına rağmen, PARP-1 en çok rastlanan ve fonksiyonlarının %90'ından sorumlu olan formdur. PARP-1 kromatine bağlı bir enzim olup DNA'dan gelen mesajları algılayıp DNA hasarına karşı koruyucu görev yapar. DNA orta seviyede hasar gördüğünde, PARP-1 DNA'da tamir sürecine katılarak hücreyi korur. Ancak, DNA fazla hasar gördüğünde, PARP-1 aşırı aktive olarak NAD^+ ve ATP seviyelerinin azalmasına neden

olur, bu durum hücrenin fonksiyon kaybına ve ölümüne neden olur. Bu nedenle, PARP-1'in aşırı aktivasyonu felç, miyokardial enfarktüs, nörodejeneratif hastalıklar, diyabet ve daha başka enflamasyon hastalıklarının patogenezisinden sorumlu tutulmaktadır. PARP inhibisyonu terapötik yararı için gerekçe iki gözlemden oluşur. İlki, PARP aktivasyonunun enerji tüketen hücresel işlemlere katkıda bulunup, NAD^+ ve ATP tüketimine sebep olarak, mitokondriyal ve hücresel disfonksiyona sebep olduğudur. İkincisi, PARP inflamatuvar sinyal iletimi süreçlerine karıştığı ve transkripsiyon seviyesinde çeşitli proteinlerin kullanımını düzenlediğidir. Diğer bir önemli nokta ise; İNOS, intraselüler adezyon molekülü-1 (İCAM I), tümör nekrozis faktör- α (TNF α) ve major histokompabilite kompleksi sınıfII (MHC II) gibi enflamasyon mediatörlerinin üretimini düzenlemesidir (37,41,43-46).

Parp-1; enflamasyon, diyabet, nöronal hasar, HIV enfeksiyonu, parkinson, kanser, yaşlanma ve İR hasarı gibi birçok patolojik durumda yukarıda belirtilen etkilerinden dolayı aktif rol oynamaktadır (37,44,45).



Şekil 2.8.: PARP-1'in aktivasyonu ile oluşan hasar mekanizmaları

2.4.1. PARP İnhibitörleri

Birçok PARP inhibitörü enzime kompetitif inhibitör olarak bağlanır ve enzimdeki katalitik etki alanına bağlanarak NAD^+ 'ın bağlanmasını engeller. Bununla birlikte DNA'ya bağlanmaları PARP'dan iplikçik kırılmalarını algılamalarını ve aktive olmasının önlenmesiyle ilişkilendirilir. PARP inhibitörleri klasik, yeni ve çinko parmak PARP inhibitörleri olmak üzere 3'e ayrılır (37).

Klasik PARP inhibitörleri, enzimi zayıf bir şekilde inhibe ederek hücresel alışverişi sınırlandırabilir. Hücre direnç zamanını azaltabilir ve bazı nonspesifik etkilerde bulunabilirler. Ancak yeni PARP inhibitörleri çok daha güçlü ve spesifiktir. Bu gruptaki bileşiklerin çoğu karboksamide bağlı aromatik halkadan veya aromatik laktam veya imid erimesiyle oluşan poliaromatik heterosiklik iskeletle oluşan karbomoil grubundan oluşur. Bu yapı güçlerini artırır ve spesifik özellik katar (38).

2.4.1.1. Klasik Parp İnhibitörleri

Nikotinamid, benzamid, prozinamid, 3-aminobenzamid (3-AB) ve 3-metoksibenzamidin klasik PARP inhibisyonu yaptığı gösterilmiştir. 3-AB ve PARP-1 enziminden izole edilen nikotinamid oldukça benzerdir. Bu bileşikler; çeşitli sinyal iletim yollarını ve bazı mediatörleri bloke ederek proinflamatuvar upregülasyonu engeller. Çeşitli çalışmalarda; böbrek, beyin, kalp ve bağırsaklarda İR hasarına karşı koruyucu etkisi ortaya konmuştur. Aynı zamanda deneysel modellerde şok, inflamasyon, inme ve diyabete karşı da koruma sağlamıştır (37,38).

2.4.1.2.Yeni Parp İnhibitörleri

Bazı araştırmacılar, isoquinolinone ve dihidroisoquinolinoneleri 3-AB'den daha güçlü bulmuştur. Bu gücün 5. pozisyonunda bulunan hidroksi grubundan kaynaklandığı düşünülmüştür. 5-metilhidroksiisoquinolinone'nun iyonlaştırıcı radyasyon ve DNA onarımı üzerinde etkileri olduğu in vitro ortamda gösterilmiştir. 5-AİQ'nun kalbi koruyucu etkileri, miyokard infarktüsü ve şok hasarı üzerinde in vitro deneysel çalışmalarda kanıtlanmıştır. Aynı gruptan başka bir örnek 3,4-dihydro-5-[4-1(1-piperidinyl)butoxyl]-1(2H)-isoquinolinone' nun (DPQ) in vivo inme modellerde nöroprotektif etkileri rapor edilmiştir. Tetrasiklik laktam grubundan benzopyrono(432)isoquinolinone' nun deneysel modellerde diyabet, inme, nörodejenerasyon ve çeşitli inflamatuvar durumlarda önemli koruyucu etkisi belirlenmiştir. Benzimidazol, indol gibi bileşiklerinde PARP inhibisyonu yaptığı bildirilmiştir (37,38).

2.4.1.3.Çinko Parmak Parp İnhibitörleri

6-nitroso,1,2-benzopirone,3,3-nitrosobenzamide ve iodonitrobenzamid (INO2BA) gibi bileşikler DNA bağlayıcı etki alanına selektif bir şekilde bağlanan önemli iki çinko parmak PARP inhibitörleridir. Bu bileşiklerle PARP'm DNA ile bağlandığı bölge ortadan kaldırılmadan

iyon enjeksiyonu sonucunda PARP'nin çinko parmaklarını okside edip inaktif hale getirir. Bu bileşiklerin AIDS ve kanser tedavisinde yararlı etkileri kanıtlanmıştır (37,38).

2.4.2. İskemi Reperfüzyon Hasarı ve PARP-1

Kalp, göz, iskelet kası, barsak ve böbrek gibi organlarda İR hasarında PARP aktivasyonunun rolü birçok çalışmaya konu olmuştur. 3-AB ve ps34 ile yapılmış PARP inhibisyonu ile bağırsaktaki İR hasarının önemli ölçüde azaldığı gözlenmiştir. PARP inhibisyonu reperfüze barsaktaki nötrofillerin infiltrasyonunu engellediği ve reperfüze dokuların histolojik yapısını iyileştirdiği görülmüştür. Ayrıca reperfüzyon aşamasında üretilen peroksinitrit veya hidroksil radikali DNA zincirinde kırılmalara neden olarak PARP'ı harekete geçirir ve hücrel disfonksiyona sebep olur (37).

İskemi ve reperfüzyona tabi olan retina gangliyon hücre tabakası ve iç hücrelerde poli(ADP-riboz) seviyelerinin yükseldiği gösterilmiştir. İR ile indüklenen böbrek epitel hücrelerinde PARP aktivasyonu disfonksiyon ve ölümlerle ilişkilendirilmiştir. PARP inhibitörleri kullanıldığı İR uygulanan böbrekte renal fonksiyonlarda, glomerular filtrasyon hızında ve histopatolojik görünüşte düzelme ve böbrek ATP düzeylerinde yükselme görülmüştür (37).

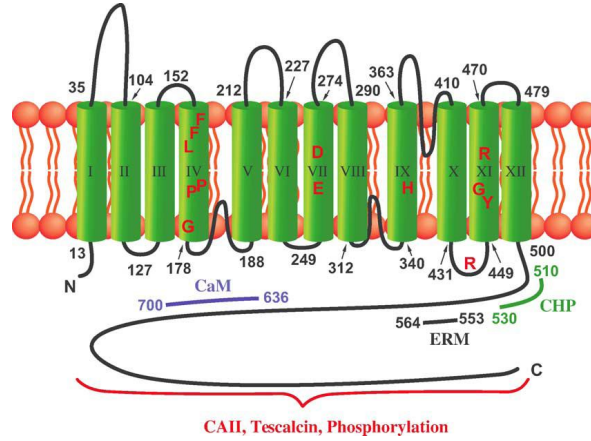
İmmunohistokimyasal çalışmalar reperfüzyondan sonra PARP'nin hızlıca aktive olduğu ve 2 ile 24 saat boyunca aktif kaldığını göstermiştir. İR'nin yol açtığı oksidatif stres, DNA zincirlerinde kırılmalara neden olur ki bu da PARP'ı aktive eder. Aşırı aktive olmuş PARP hücrel ATP ve NAD⁺ 'ı tüketir ve ICAM-1, P-selektin, E-selektin ve TNF- α düzeylerini artırır. 3-AB, nikotinamid, 5-AİQ, B6P-15, GPI16150, PJ54 ve İNO-1001 gibi PARP inhibitörleri İR ile hasara uğramış miyosit kültüründe, perfüze kalp sisteminde ve in vivo modellerde düzelme meydana getirmiştir (37).

2.5. Na⁺/H⁺ Antiportu

Na⁺/H⁺ antiportu bütün memeli hücre tiplerinde yer almaktadır. Bu antiport hücre içindeki proton ile hücre dışındaki Na⁺ iyonunu yer değiştirerek asidifikasyona karşı hücreyi korur. Ayrıca bu antiport Na⁺ akılarını içeren düzenlemeyi yaparak osmotik büzülmeye karşı hücrenin şeklini korur. Na⁺/H⁺ antiportu İR sürecinde miyokardial hasar ile ilgili anahtar rol oynamaktadır. Bu antiportun aktivasyonu kalpte zararlı etkilere sebep olur. Hücre içinde artan Na⁺ iyonu Na⁺/Ca⁺⁺ antiportunun aktivasyonuna ve hücre içinde Ca⁺⁺ iyonu birikimine sebep

olur. Bu birikim kardiomyositlerde kontraktüre, aritmilere ve hücre ölümüne sebebiyet verir (4,47-56).

Günümüze 10 farklı Na^+/H^+ antiportu tanımlanmıştır. Myokoradiyal dokularda Na^+/H^+ -1 formu ağırlıklı olarak bulunmaktadır. Bu yapı 815 parça aminoasitten oluşmaktadır. N-terminali ve C-terminali olmak üzere 2 ana yapıdan oluşur. N-terminali hidrofobiktir ve 500 aminoasitten oluşur. C-terminali ise hidrofilik olup, 315 aminoasitten oluşmaktadır. C-terminali stoplazmada N-terminali ise membranda bulunur. Membrana bağlı 12 geçiş alanı bulunmaktadır ve bunlardan biri iyon transferinde rol oynamaktadır (48,50-55,57-59).



Şekil 2.9.: Na^+/H^+ antiportunun yapısı

Na^+/H^+ -1; özellikle kardiomyositlerde, trombositlerde ve renal bazoletaral membran tübüllerinde bulur. Na^+/H^+ -2; gastrointestinal sistemde ağırlıklı olarak lokalize olmuştur. Özellikle mide, kolon ve ince bağırsakta, daha az olarak iskelet kasında ve bazı nefron segmentlerinde bulunur. Na^+/H^+ -3; özellikle kolonda ve ince bağırsakta yüksek oranda, önemli seviyede böbrek ve midede bulunur. Na^+/H^+ -4; midede yüksek miktarda ayrıca orta seviyede ince bağırsak ve kolonda bulunur. Na^+/H^+ -5; dalak, testis ve iskelet kasında düşük seviyede saptanmıştır, Na^+/H^+ -6; ilk Na^+/H^+ antiportudur. En çok beyin ve iskelet kasında daha sonra kalp ve diğer dokularda bulunur. Na^+/H^+ -7; beyinde ve iskelet kasında bulunur. Ayrıca mide, prostat, pankreas ve tiroit bezinde rastlanmıştır (54,55).

2.5.1. Na⁺/H⁺ Antiport İnhibitörleri

Aşırı Na⁺/H⁺ antiport aktivasyonunun zararlı sonuçlarını azaltmak amacıyla, özellikle Na⁺/H⁺-1 alt tipini inhibe eden birçok inhibitör madde geliştirilmiştir. Bunlardan amilorid ilk ilaç olarak tarif edilmiş olup, üretilen diğer ilaçlar amilorid türevidir. Amilorid; Na⁺/H⁺-1 ve Na⁺/H⁺-2 ye çok duyarlı olup Na⁺/H⁺-3 ve Na⁺/H⁺-4'e daha rezistanstır. Na⁺/H⁺-7'ye duyarlı değildir (49,50).

Simetidin, harmalin ve klonidin gibi maddeler zayıf ve spesifik olmayan Na⁺/H⁺ antiportu inhibitörleri olarak rapor edilmiştir (4).

Eniporid ve cariporid; amilorid'in prazin halkasının piridin ve fenil halkasıyla yer değiştirilerek elde edilen yeni yapıda Na⁺/H⁺ antiport inhibitörleridir (4,60).

HOE694 ve BIIB-51 gibi maddeler de Na⁺/H⁺ antiport inhibitörü olarak benzoilguanidin halkası içermektedir. Prazin türevlerinde tespit edildiği gibi, açilguanidine ait nitrojene bağlı bileşenler Na⁺/H⁺ antiportunu inhibe edici gücü azaltmıştır. Daha sonra bazı molekülleri temel alarak bisiklik yapılar dizayn edilmiştir. Bunlar; quonilon (zoniporide , MS-31038), indol (SM-220, SM-20550,SMP-300), benzoksizon (KB-129032), dihidrobenzofuran (BMS-284640), tetrahydroheptalen (T-162559) ve tetrahidrosikloheptapridin (TY-12533)'dir (4).

T-162559 hariç hepsi açilguanidin halkası taşır. Enzimatik çalışmalar zoniporide, BMS-284640, T-162559 ve SL-591227'nin Na⁺/H⁺-1'e selektif olduğu diğer türevlere göre karşılaştırılarak değerlendirilmiştir. Ama SM-20220, SM-20550 ve TY-1533 gibi maddelerinde Na⁺/H⁺-1' i az da olsa inhibe etmiştir (4).

2.5.2. Zoniporide

Zoniporide, güçlü ve selektif Na⁺/H⁺ antiport inhibitörüdür. Kardiyovasküler hastalıklarda miyokardial İR hasarını önlemede Na⁺/H⁺-1 antiport inhibitörü olarak yeni bir sınıfı temsil etmektedir. Zoniporide'nin IC50 değeri 14 nM'dir ve diğer Na⁺/H⁺ antiport türlerine göre 150 kat daha fazla selektiftir. Yapılan çalışmalarda zoniporide'nin infarkt alanını, İR hasarı oluşturulan hayvan modellerinde ölümcül aritmilerin görülme sıklığı ve süresini azaltmıştır (51,61,62).

Klinik öncesi çalışmalar zoniporide'in; fare, sıçan, tavşan, köpek ve maymun türlerinde renal klerensinin orta ile yüksek arasında olduğu gösterilmiştir. Dağılım hacminin orta ve plazma yarı ömürlerinin 1.5 saat ya da daha kısa olduğu belirlenmiştir (61).

GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Gereç

3.1.1. Kullanılan Deney Hayvanları

Çalışmamızda Dicle Üniversitesi Sağlık Bilimleri Uygulama ve Araştırma Merkezinden temin edilen 250-350 g ağırlığında 40 adet erkek Sprague-Dawley sıçan kullanıldı.

02/03/2011 tarihli 1 sayılı Deney Hayvanları Etik Kurul izni ile başlanan çalışmamız süresince hayvan hakları ile ilgili NIH tarafından belirlenen ‘Hayvan Haklarının Korunması’ hususundaki esaslara özenle uyuldu.

3.1.2. Kullanılan İlaç ve Kimyasal Maddeler

Tiyopental Sodyum	Pentothal® Abbott
Heparin	Liquemine® Roche
Zoniporide	Tocris Bioscience
5-aminoisoquinolinone	Sigma Chemical Co.
Trifenil Tetrazolium (TTS)	Santa Cruz Biotech.
Sodyum dihidrojen fosfat (NaH ₂ PO ₄)	Sigma Chemical Co.
Disodyum Hidrojen Fosfat (Na ₂ HPO ₄)	Sigma Chemical Co.
Sodyum Klorür (NaCl)	Sigma Chemical Co.
Potasyum Klorür (KCl)	Sigma Chemical Co.
Kalsiyum Klorür (CaCl ₂)	Sigma Chemical Co.
Magnezyum Klorür (MgCl ₂)	Sigma Chemical Co.
Sodyum karbonat (NaHCO ₃)	Sigma Chemical Co.
Glukoz	Sigma Chemical Co.

3.1.3. Kullanılan Alet ve Cihazlar

Langendorff (MAY 0702)
 MP 30 B Amplifikatör (Biopac System. Inc. Santa Barbara, CA, USA)
 FDT-10A, Basınç transduseri (Commat iletişim Co. Ankara, Türkiye)
 MAY WBC 3044 Organ Banyosu için su sirkülasyon cihazı
 MAY PRS 9508 Peristaltik Pump Cihazı
 Hassas terazi (Sartorius BP 1215)

Cerrahi alet seti	
Bilgisayar	
Otoanalizör (Architect c16000)	
pH metre	Gp 353 EDT İns.
PH ölçümü için prob	HI 1332 HANNA İns.
Bilgisayar programı	BIOPAC Student Lab PRO Manuel Professional version 3.6.6 for PC
İstatistik programı	SPSS for Windows 11.0.
ImageJ bilgisayar programı	(1.46a, National Institutes of Health, USA)

3.1.4. Kullanılan Solüsyonlar

3.1.4.1. Modifiye Tyrode Solüsyonu

Modifiye Tyrode solüsyonu Tablo 3.1'de belirtilen miktarda maddelerin hassas terazisi ile tartıldıktan sonra distile suda çözülmesiyle günlük olarak hazırlandı. Solüsyon kullanılmadan önce filtreden geçirildi.

Tablo 3.1: Modifiye Tyrode solüsyonu bileşimi

Madde	gr/L
NaCl	7.5
KCl	0.35
MgCl ₂	0.1
NaH ₂ PO ₄	0.05
NaHCO ₃	1.7
CaCl ₂	0.15
Glukoz	2

3.1.4.2. Fosfat Tampon ve %1'lik Trifenil Tetrazolium Solüsyonu

Distile su içerisinde ayrı ayrı olarak NaH₂PO₄ (11,998 gr/L) ve Na₂HPO₄ (14,196 gr/L) solüsyonları hazırlandı. İlk solüsyondan 1 litre, ikinci solüsyondan 2 litre alınarak karıştırıldı ve pH:7.4 olan 3 litre fosfat tampon solüsyonu elde edildi. % 1'lik Trifenil Tetrazolium Solüsyonu (TTS) solüsyonu hazırlamak için fosfat tampon solüsyonundan 100 ml alındı ve içerisinde 1 gr Trifenil Tetrazolium çözdürüldü.

3.2. Yöntem

3.2.1. Cerrahi Yöntem

Cerrahi işlem öncesinde ratlara anestezik olarak tiyopental 60 mg/kg dozunda intraperitoneal olarak uygulandı. Anestezinin oturmasını müteakip ratlara femoral venden 1000 IU/kg dozunda heparin verildi. Bu uygulamadan yaklaşık 5 dakika sonra ratlar torakotomi ile açıldı ve kalp hızlı bir şekilde externe edilip buzlu Tyrode solüsyonu içeren bir kaba alındı. Çevre dokulardan temizlendikten sonra kalp, arcus aortadan kanüle edilip yaklaşık 1 dakikalık süre aşılmadan Langendorff sistemine entegre edildi. Kalpler burada 8 ml/dk hızla %95 CO₂+%5 O₂ karışımı ile havalandırılan 37 °C sıcaklıktaki modifiye Tyrode solüsyonu ile perfüze edildi. 10 dakikalık stabilizasyon periyodunun ardından sol atriyuma küçük bir kesi atıldı. Bu kesi vasıtasıyla basınç değişikliklerinin algılayan lateks balon sol atriyum ve mitral kapaktan geçirilerek sol ventriküle yerleştirildi. Lateks balonda 5-6 mmHg'lik bazal basınç değeri balonun diğer ucuna bağlı olan kateterden distile su verilmek suretiyle oluşturuldu. Kalbin ön ve arka yüzüne EKG kaydı amacıyla proplar yerleştirildi. Ventrikül içi basınç değişikliği, EKG kaydı ve perfüzyon basıncı Langendorff düzeneğine bağlı Mp-30 veri kayıt sistemi aracılığıyla bilgisayar ekranından takip edilip kayıt altına alındı. Balon yerleştirilme işleminin tamamlanmasının ardından ilaç verilecek gruplardaki kalpler, litrede 7.5µM 5-AIQ ve/veya 50 nM Zoniporide içeren Tyrode solüsyonu ile 30 dakika süreyle perfüze edildi. İskemi, perfüzyonun 30 dakika süreyle kapatılması ile gerçekleştirildi. Ardından reperfüzyon akışın tekrar başlatılması ile sağlandı ve reperfüzyon 120 dakika süreyle sınırlandırıldı. İlaçlı gruplarda reperfüzyon 7.5µM 5-AIQ ve/veya 50 nM Zoniporide içeren Tyrode solüsyonu ile sağlandı. İlaç uygulanmayacak gruplarda ise perfüzyon ve reperfüzyon Tyrode solüsyonu ile yapıldı. Deneysel süreç boyunca kalpten dönen perfüzattan stabilizasyonun sonunda, iskeminin öncesinde ve reperfüzyonun 0. ve 30. dakikalarında örnekler alındı. Reperfüzyon döneminin ardından Langendorff düzeneğinden alınan kalplerde nekroz alanı tayini yapıldı.

Çalışmamız her grupta 8 (n=8) hayvan olacak şekilde planlandı. Gruplar şu şekilde oluşturuldu (Şekil 3.1.).

Grup 1: Sham opere grubu: 10 dk stabilizasyon + 180 dk Tyrode solüsyonu perfüzyonu

Grup 2: İR grubu: 10 dk stabilizasyon + 30 dk Tyrode solüsyonu perfüzyonu + 30 dk iskemi + 120 dk Tyrode solüsyonu ile reperfüzyon

Grup 3: 5-AIQ grubu: 10 dk stabilizasyon + 30 dk Tyrode/5-aminoisoquinolinone solüsyonu perfüzyonu + 30 dk iskemi + 120 dk Tyrode/5-aminoisoquinolinone solüsyonu perfüzyonu

Grup 4: Zoniporide grubu: 10 dk stabilizasyon + 30 dk Tyrode/Zoniporide solüsyonu perfüzyonu + 30 dk iskemi + 120 dk Tyrode /Zoniporide solüsyonu perfüzyonu

Grup 5: Mix grup: 10 dk stabilizasyon + 30 dk Tyrode/5-aminoisoquinolinone/ Zoniporide solüsyonu perfüzyonu + 30 dk iskemi + 120 dk Tyrode/5-aminoisoquinolinone/ Zoniporide solüsyonu perfüzyonu

Grup 1: Sham Opere

S	Tyrode Solüsyonu
10 dk	180 dk

Grup 2: İR grubu

S	Tyrode	İSKEMİ	Tyrode Solüsyonu
10 dk	30 dk	30 dk	120 dk

Grup 3: 5-AIQ grubu

S	Tyrode+5-AIQ	İSKEMİ	Tyrode+5-AIQ Solüsyonu
10 dk	30 dk	30 dk	120 dk

Grup 4: Zoniporide grubu

S	Tyrode +Zoniporide	İSKEMİ	Tyrode +Zoniporide Solüsyonu
10 dk	30 dk	30 dk	120 dk

Grup 5: Mix grup

S	Tyrode+5-AIQ+Zon.	İSKEMİ	Tyrode+5-AIQ+Zoniporide Solüsyonu
10 dk	30 dk	30 dk	120 dk

Şekil 3.1.: Çalışma her grupta 8 hayvan olacak şekilde beş grup üzerinden planlanmıştır.

S: Stabilizasyon, 5AIQ: 5-aminoisoquinolinone

3.2.2. Hemodinamik Analizler

Perfüzyon, ventrikül içi basınç ve EKG verileri Langendorff düzeneğine bağlı Mp-30 veri kayıt sistemi aracılığıyla bilgisayar ortamında kayıt altına alındı. Bu kayıtlardan BIOPAC Student Lab PRO Manuel Professional version 3.6.6 for PC veri analiz programı vasıtasıyla koroner perfüzyon basıncının yanı sıra EKG kaydından kalp hızı, ventrikül içi basınç değişikliklerinden ise sol ventrikül gelişen basıncı (LVDP: Left Ventricular Developed Pressure), sol ventrikül sistolik basınç yükselme hızı (dP/dt max) ve sol ventrikül diyastolik basınç gevşeme hızı (dP/dt min) değerleri hesaplandı.

3.2.3. Laktat Dehidrojenaz Analizi

Laktat dehidrojenaz (LDH) analizi yapmak amacıyla stabilizasyonun sonunda, iskeminin öncesinde ve reperfüzyonun 0. ve 30. dakikalarında kalpten dönen perfüzyondan örnekler alındı. Alınan örnekler çalışmanın tamamlanmasına kadar geçen sürede $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de muhafaza edildi. Analizler Architect c16000 model otoanalizör cihazı ile yapıldı ve sonuçlar U/L olarak ifade edildi.

3.2.4. Nekroz Alanı Tayini

Reperfüzyon döneminin ardından kalp Langendorff düzeneğinden alındı. Aort, auricula ve çevre dokulardan tamamen temizlenen kalpler streç filme sarılarak $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de bir gece bekletildi. Ertesi gün yarı donmuş durumdaki kalp 2 mm'den daha kalın olacak şekilde dilimlendi. Yaklaşık dört ayrı dilime ayrılan kalp dokuları $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ ısıya sahip pH değeri 7.4 olan % 1'lik TTS solüsyonuna bırakıldı. Bu solüsyonda 15-20 dakika bekletilen kalp dilimlerinde nekrotik alan soluk sarı, canlı dokular kiremit kırmızısı rengine boyandı. Süre sonunda TTS solüsyonundan çıkarılan kalp dilimleri renk ayrımının belirginleşmesi amacıyla 20 dakika % 10 luk formalin solüsyonunda bekletildi. Formalin solüsyonundan çıkarılan kalp dilimleri birbirinden uzaklığı 2 mm olan 2 cam arasına konuldu ve bu şekilde kleplendi. Kalp dilimlerinin camda oluşan görüntüsü şeffaf bir asetetat üzerine asetat kalemleri ile boyamak suretiyle kopye edildi (63).

Asetat üzerine kopye edilen kalp dilimlerinin görüntüsünden NA'nın tayini için mevcut olan ağırlık ve hacim metodlarının her ikisinde kullanıldı. Ağırlık metoduna göre her bir kalpten elde edilen asetatlar boyanma renklerine göre düzgün bir şekilde kesildi. Nekrotik alanı gösteren soluk sarıya boyanan asetat parçaları ile canlı dokuları gösteren kırmızıya boyalı alanlar ayrı ayrı tartıldı. Böylece nekrotik doku ve canlı dokulara ait ağırlık verileri elde edildi. Hacim metodunda ise boyalı asetatların görüntüleri bilgisayar ortamına aktarıldı.

Bu görüntülerde ImageJ (1.46a, National Institutes of Health, USA) programı kullanılarak planimetrik yöntemle alan hesabı yapıldı. Elde edilen alanların 2 mm'lik kesit kalınlığı ile çarpılması ile de hacim cinsinden nekrotik ve canlı doku verileri elde edildi. Her iki metod içinde nekrotik alana ait ağırlık veya hacim cinsinden değerlerin aynı kalpten elde edilen tüm kalbe ait değere oranlanmasıyla yüzde cinsinden NA verisi elde edildi (63).

3.2.5. İstatistiksel Analiz

Çalışmamızda elde edilen veriler aritmetik ortalama \pm standart sapma olarak ifade edildi. İstatistiksel analizler SPSS 11.0 (Chicago, ill., USA) programı kullanılarak yapıldı. Gruplar arası karşılaştırma tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve post hoc Tukey testi kullanılarak yapıldı. Tüm istatistiksel analizlerde anlamlılık düzeyi $p < 0.05$ olarak kabul edildi.

BULGULAR

4.1. Hemodinamik Bulgular

Grupların kalp atım hızı, koroner perfüzyon basıncı, LVDP, dP/dt max dP/dt min verileri Tablo 4.1.'de gösterilmiştir.

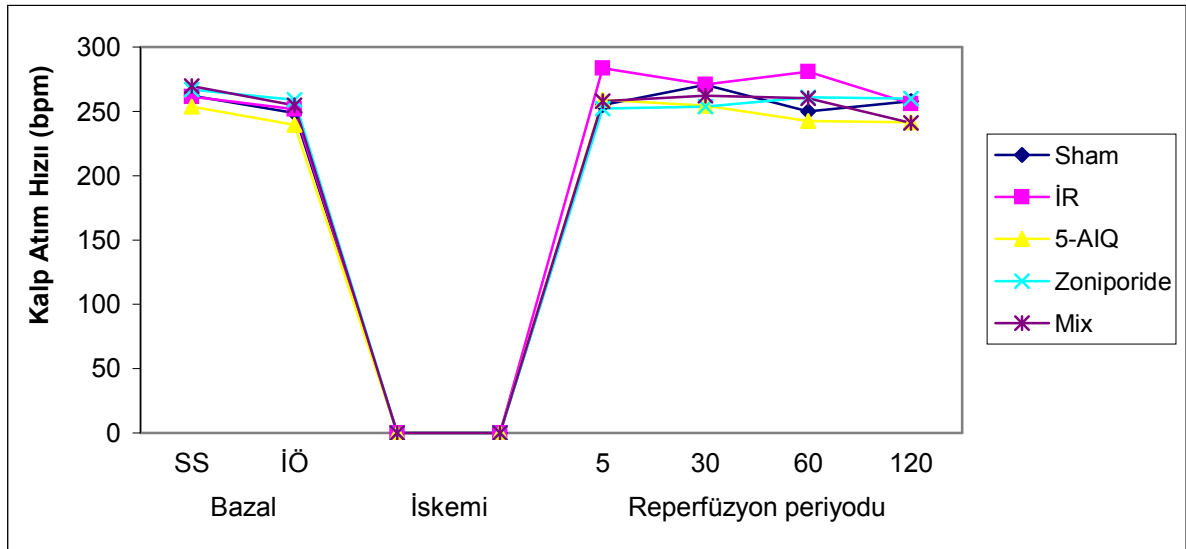
Tablo 4.1.: Grupların hemodinamik parametreleri aritmetik ortalama±standart sapma olarak verilmiştir. 5-AIQ: 5-aminoisoquinolinone, LVDP: Left Ventricular Developed Pressure

	Kalp Atım Hızı (bpm)					
	Bazal		Reperfüzyon periyodu			
	Stab. Sonu	İskemi Öncesi	5. dk	30. dk	60. dk	120. dk
Sham	262±19	248±21	255±28	270±38	250±32	258±45
İR	261±17	251±24	283±85	270±78	280±63	256±74
5-AIQ	253±24	239±23	259±61	254±36	242±45	241±58
Zoniporide	266±39	258±31	252±47	253±43	260±37	259±43
Mix	269±35	254±30	257±51	262±45	260±48	241±38
Koroner Perfüzyon Basıncı (mmHg)						
Sham	54±4	57±3	54±4	53±4	53±4	54±3
İR	57±6	61±3	81±6 ϕ	83±6 ϕ	85±4 ϕ	92±6 ϕ
5-AIQ	58±3	61±4	66±4*	68±7*	71±5*	74±6*
Zoniporide	54±4	57±3	62±6*	64±6*	67±6*	70±10*
Mix	56±3	60±5	63±7*	65±7*	69±8*	70±8*
LVDP (mmHg)						
Sham	73±12	72±12	45±8	68±10	69±13	65±6
İR	70±18	68±12	41±4 ϕ	28±3 ϕ	28±3 ϕ	21±4 ϕ
5-AIQ	71±17	65±13	46±5**	43±12**	44±8**	44±4*
Zoniporide	71±9	69±9	43±5**	42±3**	44±8**	40±3*
Mix	68±12	65±32	46±17*	46±3*	44±4**	44±8*
dP/dt max (mmHg/sn)						
Sham	990±87	916±48	943±34	895±22	870±44	802±73
İR	977±83	915±133	284±87 ϕ	290±34 ϕ	284±49 ϕ	217±65 ϕ
5-AIQ	981±93	966±142	592±155*	544±164*	552±138*	445±87*
Zoniporide	950±92	889±110	548±55*	524±114*	491±66*	414±63*
Mix	944±97	896±137	623±91*	558±82*	558±65*	559±135*
dP/dt min (mmHg/sn)						
Sham	900±46	874±59	851±50	867±46	814±46	798±43
İR	887±77	861±63	321±49 ϕ	335±33 ϕ	363±60 ϕ	323±56 ϕ
5-AIQ	846±95	781±121	499±32*	501±118*	575±154*	482±35*
Zoniporide	864±80	772±30	524±67*	525±80*	548±70*	461±75*
Mix	837±60	818±128	532±123*	531±58*	552±42*	515±89*

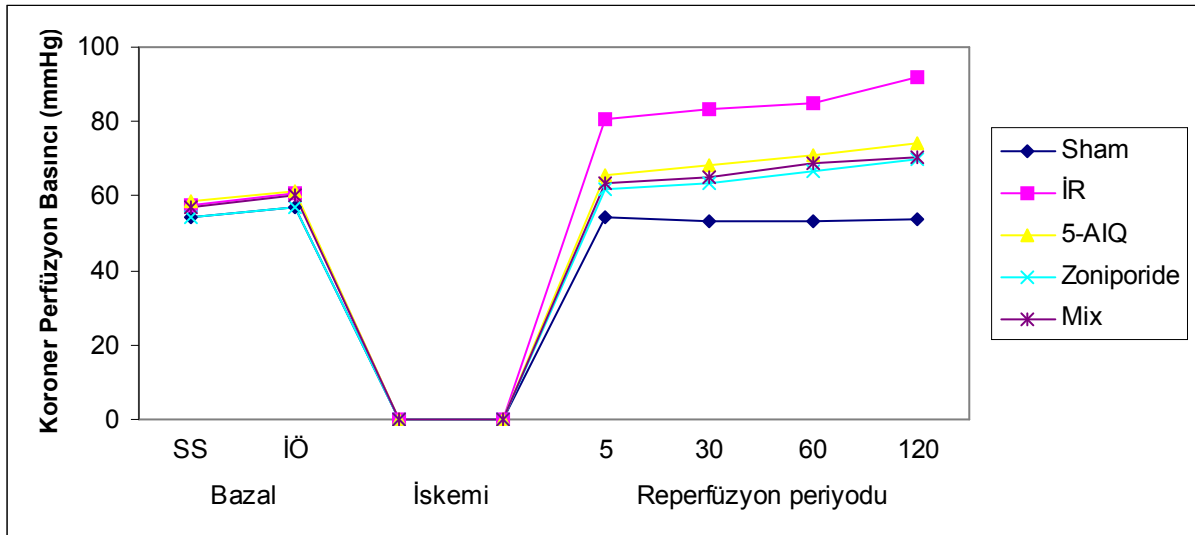
ϕ p <0.001 vs sham, * p <0.001 vs I/R, ** p <0.01 vs İR

Kalp atım hızı açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır (p>0.05) (Tablo. 4.1, Grafik 4.1). Diğer hemodinamik parametreler açısından yapılan analizlerde İR grubunda sham opere grubuna göre koroner perfüzyon basıncının

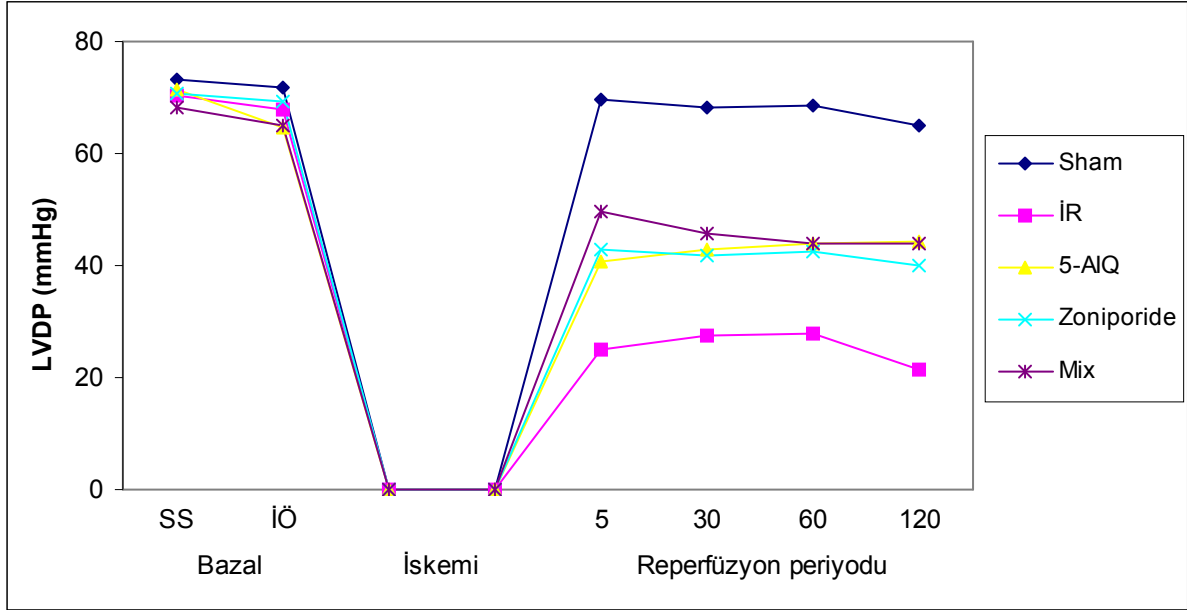
anlamli olarak yükseldiği, LVDP, dP/dt max, dP/dt min değerlerinin ise anlamli olarak düştüğü gözlenmiştir. Madde içeren gruplarda ise İR grubunda gözlenen değişikliklerin anlamli olarak düzeldiği gözlenmiştir (Tablo 4.1, Grafik 4.2-4.5). Her iki maddenin eş zamanli olarak uygulandığı mix gruba ait hemodinamik parametrelerin maddelerin ayrı ayrı uygulandığı Zoniporide ve 5-AIQ gruplarda elde edilen verilerle yapılan karşılaştırmada istatistiksel olarak anlamli bir farklılık tespit edilememiştir. ($p>0.05$) (Tablo 4.1., Grafik 4.1-4.5).



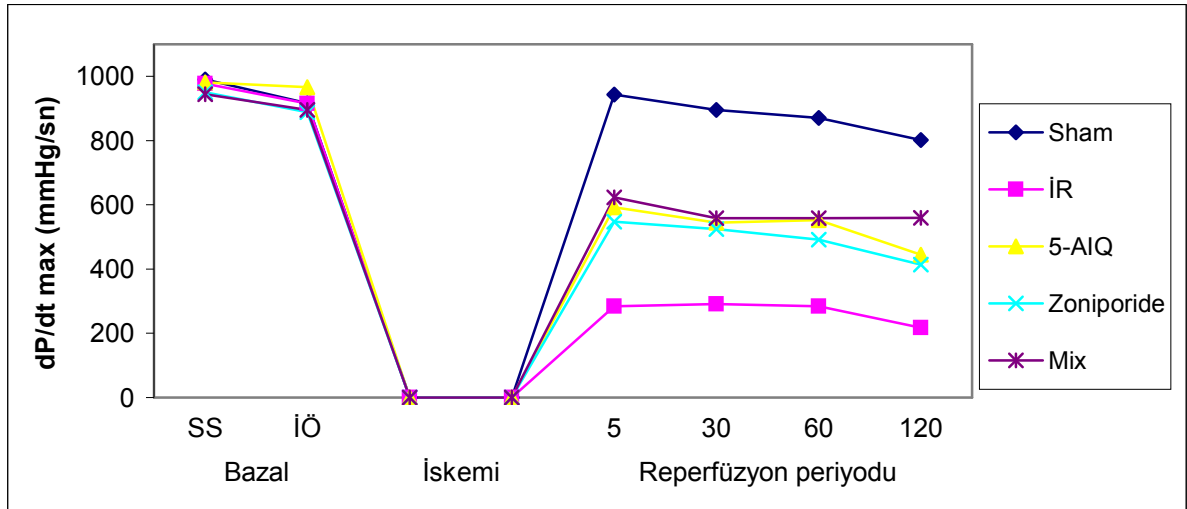
Grafik 4.1: Kalp atım hızları. 5-AIQ: 5-aminoisoquinolinone, SS: Stabilizasyon sonrası, İÖ: İskemi öncesi



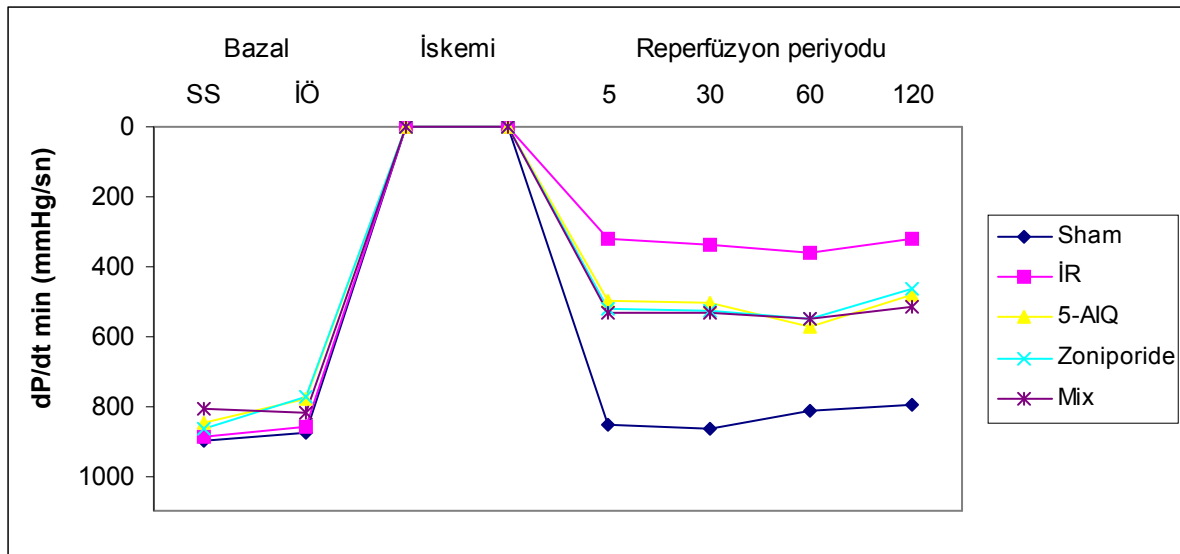
Grafik 4.2: Koroner perfüzyon basıncı değerleri. 5-AIQ: 5-aminoisoquinolinone, SS: Stabilizasyon sonrası, İÖ: İskemi öncesi



Grafik 4.3: LVDP değerleri. 5-AIQ: 5-aminoisoquinolinone, SS:Stabilizasyon sonrası, İÖ: İskemi öncesi



Grafik 4.4: dP/dt max değerleri. 5-AIQ: 5-aminoisoquinolinone, SS:Stabilizasyon sonrası, İÖ: İskemi öncesi



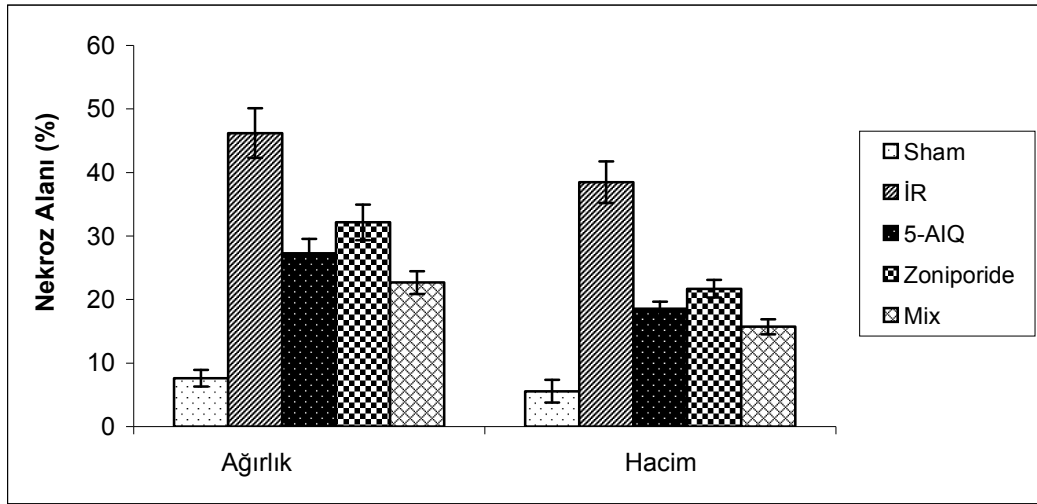
Grafik 4.5: dP/dt min değerleri. 5-AIQ: 5-aminoisoquinolinone, SS:Stabilizasyon sonrası, İÖ: İskemi öncesi

4.2. Nekroz Alanı Bulguları

Ağırlık ve hacim açısından yapılan analizlerde İR grubundaki NA sham opere grubunun NA ile karşılaştırıldığında belirgin olarak arttığı gözlenirken, madde içeren gruplardaki (5-AIQ, Zoniporide ve Mix) NA'nın ise İR grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı olarak azaldığı gözlenmiştir (Tablo 4.2. Grafik 4.6). Madde içeren gruplar arasında yapılan karşılatırmada ise her iki maddenin aynı zamanda verildiği mix gruptaki NA'nın maddelerin ayrı ayrı uygulandığı Zoniporide ve 5-AIQ gruplarına göre belirgin olarak azaldığı tespit edilmiştir (Tablo 4.2., Grafik 4.6.).

Tablo 4.2.: Grupların NA yüzdeleri aritmetik ortalama±standart sapma olarak verilmiştir. 5-AIQ: 5-aminoisoquinolinone, *p <0.001, ** p <0.05 diğer dört grupla karşılaştırıldığında

	Nekroz Alanı (%)	
	Ağırlık	Hacim
Sham	7,61±1,30*	5,56±1,81**
İR	46,21±3,91*	38,47±3,35**
5-AIQ	27,27±2,35*	18,56±1,10**
Zoniporide	32,15±2,88*	21,70±1,43**
Mix	22,67±1,85*	15,71±1,28**



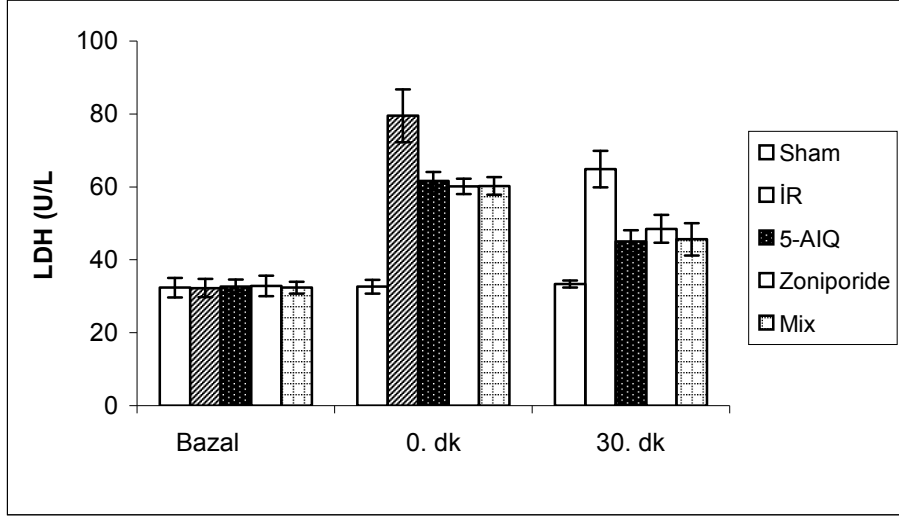
Grafik 4.6.: Grupların NA yüzdeleri aritmetik. 5-AIQ: 5-aminoisoquinolinone,

4.3. LDH Bulguları

İskemi öncesi grupların bazal LDH değerleri açısından yapılan istatistiksel analizde veriler arasında anlamlı bir farklılık saptanmamıştır ($p > 0.05$) (Tablo 4.3, Grafik 4.7). Reperfüzyonun 0. ve 30. dakikalarında alınan perfüzyat örneklerinden elde edilen LDH değerleri arasında yapılan karşılaştırmada İR grubuna ait LDH düzeyi sham opere grubuna ait LDH düzeyine göre anlamlı olarak yüksek bulunurken ($p < 0.001$) (Tablo 4.3, Grafik 4.7), madde içeren gruplara (5-AIQ, Zoniporide ve Mix) ait LDH değerleri İR grubuna göre anlamlı olarak düşük bulunmuştur ($p < 0.001$) (Tablo 4.3, Grafik 4.7). İlaçlı gruplar arasında LDH değerleri açısından yapılan karşılaştırmada anlamlı bir farklılık bulunmamıştır ($p > 0.05$) (Tablo 4.3, Grafik 4.7).

Tablo 4.3: Grupların LDH düzeyleri U/L cinsinden aritmetik ortalama \pm standart sapma olarak verilmiştir. 5-AIQ: 5-aminoisoquinolinone, * $p < 0.001$ sham grubu ile karşılaştırıldığında, ** $p < 0.001$ sham ve İR grupları ile karşılaştırıldığında

	LDH (U/L)		
	Bazal	Reperfüzyon	
		0.dk	30.dk
Sham	32,37 \pm 2,77	32,62 \pm 1,92	33,37 \pm 1,06
İR	32,25 \pm 2,54	79,50 \pm 7,21*	64,87 \pm 5,02*
5-AIQ	32,62 \pm 2,06	61,62 \pm 2,50**	45,00 \pm 3,16**
Zoniporide	32,87 \pm 2,85	60,12 \pm 2,10**	48,50 \pm 3,89**
Mix	32,37 \pm 1,59	60,25 \pm 2,43**	45,62 \pm 4,43**



Grafik 4.7: Grupların LDH düzeyleri. 5-AIQ: 5-aminoisoquinolinone

TARTIŞMA

Başta iskemik kalp hastalıkları olmak üzere kardiyovasküler hastalıklar yılda tahminen 12 milyon kişinin ölümüne yol açmaktadır (41). Tüm dünyada iskemik kalp hastalıklarının önde gelen mortalite ve morbidite sebeplerinden biri olması araştırmaların bu konu üzerinde yoğunlaşmasına neden olmuştur. Deneysel İR modelleride bu yoğunlaşmanın ürünü olarak araştırmalarda sıklıkla tercih edilmiştir. İn vitro deneysel İR modellerinden biride bizim çalışmamızda kullandığımız Landendorff izole perfüze kalp modelidir.

Araştırmacılar Langendorff modelinde İR hasarı oluşturabilmek için izole kalbi önce belli bir süre iskemiye ve ardından yine belli bir süre reperfüzyona maruz bırakmışlardır. Bu çalışmada İR hasarı oluşturabilmek için kalpler 30 dakika perfüzyonun tamamen kesilmesiyle iskemiye, ardından perfüzyonun tekrar başlatılmasıyla 120 dk reperfüzyona tabi tutulmuştur. Bu protokolle yeterli düzeyde İR hasarı oluştuğunu gösteren bir çok çalışma mevcuttur (41,64-67). Kaur ve arkadaşları (64) izole perfüze rat kalplerinde 30 dk iskemi ardından 120 dk reperfüzyon uyguladıkları çalışmalarında kalplerdeki hemodinamik parametreleri kayıt altına alıp, doku NA tayini yapmış ve perfüzattan aldıkları örneklerde kreatinkinaz (CK) ve LDH analizi yapmışlardır. Çalışmanın sonunda İR uygulanan grupta NA, LDH ve CK düzeylerinin anlamlı olarak yükseldiğini ortaya koymuşlardır.

30 dk iskemi 120 dk reperfüzyonun uygulandığı başka bir çalışmada ise İR grubunda NA'nın % 45-50'lere ulaştığını, reperfüzyonun 0. ve 30. dakikalarında alınan perfüze örneklerindeki LDH düzeyinin sham opere gruba göre anlamlı olarak yükseldiğini ortaya konulmuştur. Araştırmacılar koroner perfüzyon basıncı ile ters orantı gösteren koroner akım hızının ise İR grubunda sham opere gruba göre anlamlı olarak düştüğünü gözlemlemişlerdir (65).

Çalışmamızda uyguladığımız protokole benzer İR protokollerin uygulandığı başka çalışmalarda koroner akım, LVDP, dP/dtmax, dP/dtmin değerlerinin İR grubunda sham opere gruba göre anlamlı olarak bozulduğu gözlemlenmiştir (66-68).

Bu çalışmada tüm protokol boyunca kalbe ait hemodinamik parametreler kayıt altına alınmış, perfüze örneklerinden LDH düzeyleri analiz edilmiş ve çalışmanın sonunda kalp dokusunda NA tayini yapılmıştır. 30 dk iskemi ve 120 dk reperfüzyon uyguladığımız grup olan İR grubunda hemodinamik parametreler olan koroner perfüzyon basıncı, LVDP, dP/dtmax, dP/dtmin değerleri açısından sham opere gruba göre anlamlı değişiklikler gözlenmiştir. Sham opere grubuna göre İR grubunda tüm reperfüzyon süreci boyunca koroner

perfüzyon basıncı anlamlı olarak yüksek, LVDP, dP/dt_{max} , dP/dt_{min} değerleri ise anlamlı olarak daha düşük bulunmuştur. Reperfüzyonun 0. ve 30. dakikalarında alınan perfüzyon örneklerindeki LDH düzeyi ile hacim ve ağırlık metotlarıyla tayin edilen NA yüzdeleri İR grubunda sham opere gruba göre belirgin ölçüde yüksek bulunmuştur. Çalışmamızda elde ettiğimiz bu sonuçlar uyguladığımız protokolün yeterli düzeyde İR hasarına yol açtığını göstermektedir.

Bu çalışmada izole perfüze kalp preparatlarında oluşturulan İR hasarına karşı koruyucu olarak zoniporide ve 5-AIQ adlı maddeler kullanıldı. Zoniporide iskemi periyodunda azalan hücre içi pH'ya bağlı olarak aktive olan Na^+-H^+ antiportunu inhibe ederek hücre içi Na^+ ve Ca^{++} 'un birikimine engel olmakta ve bu yolla İR hasarının azalmasına katkıda bulunmaktadır (49,68,69). 5-AIQ'nin ise PARP enzim inhibisyonu ile aşırı NAD^+ ve ATP kaybının önüne geçerek kalpte İR hasarına karşı koruyucu etkiler gösterdiği birçok çalışma ile ortaya konulmuştur. (41,70). Çalışmamızda İR hasarına karşı farklı yollardaki etkileriyle faydalı oldukları gösterilmiş zoniporide ve 5-AIQ adlı maddeler eş zamanlı olarak uygulanmıştır. Böylelikle aynı kalpte iki farklı yolağın eşzamanlı olarak blokajının maddelerin İR hasarına karşı tek başlarına kullanılmasına göre bir üstünlüğünün olup olmadığı kalbe ait hemodinamik parametreler, LDH ve NA değerleriyle ortaya konulmaya çalışılmıştır.

Na^+-H^+ antiport inhibitörlerinin kullanıldığı bir çalışmada Langendorff modelinde 40 dakika iskemi ardından 30 dakika reperfüzyon uygulanmıştır. Araştırmacılar koroner akım hızı ve LVDP değerlerinin Na^+-H^+ antiport inhibitörü uygulanan grupta belirgin olarak düzeldiğini gözlemlemişlerdir (71). Na^+-H^+ antiport inhibitörü olan HOE642'nin kullanıldığı başka bir çalışmada ise İR süresi boyunca kalpte koroner akım, LVDP, dP/dt_{max} , dP/dt_{min} değerlerini ölçülmüştür. Çalışmada HOE642 uygulanan grupta hemodinamik parametrelerin maddenin uygulanmadığı gruba göre anlamlı derecede korunduğu gözlenmiş bu durumun Na^+-H^+ antiport inhibitörlerinin İR hasarına karşı koruyucu etkisinden kaynaklandığı ifade edilmiştir (72).

İR hasarına karşı zoniporide, eniporide ve caniporide gibi Na^+-H^+ antiport inhibitörlerinin karşılaştırıldığı bir çalışmada İR grubu ile madde uygulanan gruplar arasında kalp ritmi açısından bir fark bulunmazken, her üç Na^+-H^+ antiport inhibitörünün uygulandığı gruplarda LVDP ve koroner akım hızının İR grubuna göre belirgin derecede korunduğu gözlemlenmiştir (68). Williams ve arkadaşları ise (69) izole perfüze kalp preparatlarında İR hasarına karşı zoniporide'nin etkilerini hücre içi Na^+ konsantrasyon değişimini ölçerek ortaya koymaya çalışmışlardır. 30 dk iskemi ve 30 dk reperfüzyon uyguladıkları grupta iskeminin

başlangıcından itibaren hücre içi Na^+ konsantrasyonunun artmaya başladığını, reperfüzyonun başlarında ise Na^+ düzeyinin pik yaptığını saptamışlardır. Araştırmacılar Zoniporide uygulanan grupta ise hücre içi Na^+ konsantrasyonundaki artışın belirgin olarak sınırlandığını gözlemiş ve bu etkinin Zoniporide'nin İR hasarına karşı koruyucu etkide aracılık ettiğini ifade etmişlerdir.

Bu çalışmada etkisini araştırdığımız diğer bir madde olan 5-AIQ'un kullanıldığı bir çalışmada izole rat kalbine 30 dk iskemi 120 dk reperfüzyon uygulanmıştır. Kalp ritmi ve koroner akım hızı açısından yapılan incelemelerde bu değerlerin 5-AIQ uygulanmasıyla korunduğu gözlenmiştir (41). PARP inhibitörlerinin kullanıldığı başka bir çalışmada ise İR hasarına karşı PARP enzim inhibisyonunun sol ventrikül fonksiyonlarının bir göstergesi olan LVDP ve dP/dtmax değerleri üzerinde koruyucu etki gösterdiği tespit edilmiştir (73). PARP inhibitörlerinin hangi mekanizmalarla İR hasarına karşı koruyucu etki gösterdiğinin araştırıldığı İR çalışmalarında bu inhibitörlerin uygulandığı durumlarda hücre içi ATP, kreatin fosfat ve yüksek enerjili fosfat düzeylerinin herhangi bir koruyucu madde uygulanmayan duruma göre oldukça iyi bir şekilde korunduğu gözlenmiştir. Araştırmacılar PARP inhibitörlerinin enerji kaynakları üzerindeki bu etkileri nedeniyle İR hasarına karşı koruyucu etki gösterdiğini ifade etmişlerdir (74,75).

Çalışmamızda İR hasarına karşı zoniporide ve 5-AIQ kullandığımız kalplerden elde ettiğimiz hemodinamik veriler literatür bilgileriyle uyumluluk göstermektedir. Zoniporide ve 5-AIQ uygulanan gruplarda koroner perfüzyon basınç değerlerinin İR grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı derecede korunduğu gözlenmiştir. Hemodinamik parametreler olarak ifade ettiğimiz LVDP, dP/dtmax ve dP/dtmin değerleri daha çok sol ventrikül fonksiyonlarını değerlendirmek amacıyla kullanılmaktadır. İR hasarına karşı koruyucu olarak kullandığımız maddelerin ayrı ayrı kullanıldığı grupların her ikisinde de LVDP, sol ventrikül kasılma hızını ifade eden dP/dtmax ve sol ventrikül gevşeme hızını ifadesi olan dP/dtmin değerlerin İR grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı olarak korunmuştur. Literatür bilgileriyle paralellik gösteren bu sonuçlar bize zoniporide ve 5-AIQ adlı maddelerin izole perfüze kalp preparatlarında oluşturulan İR hasarına karşı sol ventrikül fonksiyonlarını koruduğunu işaret etmektedir.

Her iki maddenin eşzamanlı olarak uygulandığı mix gruptan elde edilen hemodinamik veriler ile maddelerin ayrı ayrı kullanıldığı gruplardan elde edilen veriler arasında yapılan karşılaştırmada hemodinamik parametreler açısından anlamlı bir farklılık tespit edilememiştir.

LDH miyositlerde lokalize bir enzimdir. Salınımı miyokardiyal dokularda meydana gelen hasarla birlikte artmaktadır. Yapılan İR çalışmalarında LDH düzeyindeki yükselmenin miyokardiyal hasarın önemli bir biyokimyasal göstergesi olduğu gösterilmiştir. Bu konuda yapılan çalışmalarda perfüzyondaki LDH düzeyindeki yükselmenin reperfüzyonun hemen başında ve 30. dakikasında olduğu tespit edilmiştir. Reperfüzyonun başında olan yükselme daha çok iskemi dönemindeki hasarı gösterirken, reperfüzyonun 30. dakikasındaki ise reperfüzyon dönemindeki hasarın bir göstergesi olarak kabul edilmiştir (76-79). İR hasarına karşı $\text{Na}^+\text{-H}^+$ antiport inhibitörleri veya PARP inhibitörlerinin kullanıldığı çalışmalarda bu maddelerin miyokardiyal hasarı engellediği ve LDH düzeylerinde buna paralel olarak seyrettiği gösterilmiştir (41,71,72,80).

Bu çalışmada zoniporide, 5-AIQ ve bu iki maddenin birlikte uygulandığı mix gruptan reperfüzyonun 0. ve 30. dakikalarında alınan perfüzyat örneklerinden elde edilen LDH değerleri İR grubundan elde edilen değerlere göre anlamlı olarak daha düşük bulunmuştur. Mix gruptan elde edilen LDH sonuçları zoniporide ve 5-AIQ gruplarına göre farklılık göstermemektedir. Bu sonuçlar zoniporide ve 5-AIQ'nun literatür bilgileriyle uyumlu olarak LDH düzeyini ve buna paralel olarak miyokardiyal hasarı azalttığını göstermektedir.

Bu çalışmada elde ettiğimiz bir diğer parametre ise makroskopik yöntemlerle NA'nın hesaplanmasıdır. Makroskopik yöntemlerle NA tayinin geçerliliği konusunda yapılan çalışmalarda bu yöntemin mikroskopik olarak elde edilen sonuçlarla iyi korelasyon gösterdiği tespit edilmiş ve makroskopik yöntemin doku hasarını göstermede iyi bir tercih olduğu ifade edilmiştir (81,82). İR hasarına karşı Zoniporide, 5-AIQ'nün kullanıldığı çalışmalarda bu maddelerin NA'nı anlamlı derecede azalttığı gösterilmiştir (41,68).

Bu çalışmada hem volüm hemde ağırlık yöntemleriyle elde edilen NA yüzdelerinin İR grubu ile karşılaştırıldığında 5-AIQ grubunda daha fazla olmak üzere hem zoniporide, hem de 5-AIQ gruplarında anlamlı olarak azaldığı tespit edilmiştir. Her iki maddenin eş zamanlı olarak uygulandığı mix grupta ise maddelerin tek başlarına uygulandığı duruma göre anlamlı olarak daha iyi bir NA gözlenmiştir. Yani ilaçların tek başlarına kullanılmasıyla karşılaştırıldığında birlikte uygulanması NA'nı azaltmada ciddi bir avantaj sağlamıştır.

SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışma ile Na^+ - H^+ antiport inhibitörü olan zoniporide ve PARP inhibitörü olan 5-AIQ'nün izole perfüze kalp preparatlarında İR hasarına karşı koruyucu etkilerini koroner perrüzyon basıncı, LVDP, dP/dtmax , dP/dtmin gibi kalbe ait hemodinamik veriler, LDH ve NA tayini ile ortaya koymaya çalıştık. İR hasarının oluşumunda farklı mekanizmalara olan etkileriyle belirgin olarak düzelme sağlayan bu iki maddenin eş zamanlı olarak uygulanmasının yaratacağı sonuçları gözlemlemek amacıyla oluşturduğumuz grupta; yukarıda saydığımız hemodinamik parametreler ve LDH düzeyleri açısından bir farklılık gözlemlemedik. Ancak nekroz alanı açısından her iki maddenin eş zamanlı uygulandığı grupta ayrı ayrı uygulanmalarına göre belirgin bir azalma saptadık. Bu sonuçlar Zoniporide ve 5-AIQ'nün birlikte kullanımının özellikle nekroza uğrayan doku miktarını azaltarak İR hasarına karşı koruyuculukta artışa yol açtığını göstermektedir.

KAYNAKLAR

1. Şener G, Berrak Ç. İskemi reperfüzyon hasarı. Klinik Gelişim Dergisi 2009;5-11.
2. Kumar V, Cotran RS, Robbins SL. Çeviri Editörü:Uğur Çevikbaş. Temel Patoloji. Beşinci Baskı, İstanbul:Nobel Tıp Kitabevi 1994.p.4-16.
3. Damjanov İ, Linder J. Cell injury and cellular adaptations. Anderson's Pathology Tenth Edition: Volum 1; 357-365
4. Masereel B, Pocket L, Laeckmann, An overview of inhibitors of Na/H exchanger. Eur J Med Chem 2003;38:547-554.
5. Kumar V, Cotran RS, Robbins SL. Temel Patoloji(Basic Pathology), 6.Edisyon, 2000 ;6-10,30-36.
6. Maxwell SRJ, Lip GYH. Reperfusion injury: a review of the pathophysiology, clinical manifestations and therapeutic options. Int J Cardiol 1997;58:95-117.
7. Kılınç K, Kılınç A. Oksijen toksisitesinin aracı molekülleri olarak oksijen radikalleri. Hacettepe Tıp Dergisi 2002;33:110-118.
8. Reilly PM, Schiller HJ, Bulkley GB. Pharmacologic approach to tissue injury mediated by free radicals and other reactive oxygen metabolites. The Am J Off Surgery 1991;161:488-503.
9. Li C, Jackson RM. Reactive species mechanisms of cellular hypoxia-reoxygenation injury. Am J Physiol Cell 2002;282:227-241.
10. Akkuş İ. Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri, Konya: Mimoza yayınları 1995; 1-74
11. Konukoğlu D. Biyokimya. Nobel Tıp Kitapevleri 2000;428-429.
12. Onat T, Emerk K, Sözmén EY. İnsan Biyokimyası. Palme Yayıncılık 2002;665-674.
13. Hearse DJ, Manning AS, Downey JM, Yellon DM. Xanthine oxidase: a critical mediator of myocardial injury during ischemia and reperfusion?. Acta Physiol Scand Suppl 1986;548:65-78.
14. Ferrari R, Ceconi C, Curello S, Cargnoni A, Pasini E, De Giuli F, Albertini A. Role of oxygen free radicals in ischemic and reperfused myocardium. Am J Clin Nutr 1991;53:215-222.
15. Carden DL, Young JA, Granger DN. Pulmonary microvascular injury after intestinal ischemia-reperfusion:role of P-selectin. J Appl Physiol 1993;75:2529-2534.

16. Xiao F, Eppihimer MJ, Young JA, Nguyen K, Carden DL. Lung neutrophil retention and injury following intestinal ischemia-reperfusion. *Microcirculation* 1997;4:359-367.
17. Romson JL, Hook BG, Kunkel SL, etc al. Reduction of the extent of ischemic myocardial injury by neutrophil depletion in the dog. *Circulation* 1983;67:1016-1023.
18. Granger DN. Role of xanthine oxidaze and granulocytes in ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol* 1988;255:1269-1275.
19. Büyükaşar K. Nitrik oksidin fizyolojik ve patolojik olaylardaki rolü. *Türk Farmakoloji Derneği Farmakoloji Eğitim Sempozyumları Programı, Nitrik Oksidin Farmakolojisi*. 27 Mayıs 2005; Mersin, URL: http://www.tfd.org.tr/mersin_kitap.pdf.
20. Barber DA, Harris SR. Oxygen free radicals and antioxidants: a review. *Am Pharm* 1994;NS;34;9:26-35.
21. White BC, Grossman LI, Krause GS. Brain injury by global ischemia and reperfusion: a theroretical perspective on membrane damage and repair. *Neurology* 1993; 43:1656-1665.
22. İşlekel H, İşlekel S, Güner G. Biochemical mechanism and tissue injury of cerebral ischemia and reperfusion. URL:<http://med.ege.edu.tr/norobil/2000/NBD09200.html>.
23. Gutteridge JM. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clin Chem* 1995;41:1819-1828.
24. Krause GS, Joyce KM, Nayini RN, Zonia CL, Garritano AM. Cardiac arrest and resuscitation:Brain iron delocalization during reperfusion. *Ann EmergMed* 1985;14: 1037-1043.
25. Rice-Evans CA. Formation of free radicals and mechanisms of action in normal biochemical processes and pathological states. In: Rice-Evans CA, Burdon RH. *Free radical damage and its control*. England, Elsevier Science Press 1994;131-153.
26. Xu KY, Zweier JL, Becker LC. Hydroxyl radical inhibits sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase fuction by direct attack on the ATP binding site. *Circ Res* 1997;80:76-81.
27. Harman AW, Maxwell MS. An evaluation of the role of calcium in cell injury. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1995;35:129-144.

28. Kilgore KS, Lucchesi BR. Free radicals and the inflammatory response. In: Rice-Evans CA, Bruckdorfer KR. Oxidative stress, lipoproteins and cardiovascular dysfunction, London, Portland Press 1995;161-180.
29. Kilgore KS, Lucchesi BR. Reperfusion injury after myocardial infarction: The role of free radicals and the inflammatory response. *Clin Biochem* 1993;26:359-370.
30. Linz W, Lau HH, Beck G, Schokens BA. Influence of the thromboxane synthetase inhibitor HOE 944, prostacyclin and indomethacin on reperfusion arrhythmias, cardiodynamics and metabolism in isolated ischemic rat hearts. *Biomed Biochim Acta* 1988;47:S23-S26.
31. Neves LA, Almeida AP, Khosla MC, Campagnole-Santos MJ, Santos RA. Effect of angiotensin-(1-7) on reperfusion arrhythmias in isolated rat hearts. *Braz J Med Biol Res* 1997;30:801-809.
32. Xiao CY, Hara A, Yuhki K, Fujino T, Ma H, Okada Y. Roles of prostaglandin I(2) and thromboxane A(2) in cardiac ischemia-reperfusion injury: a study using mice lacking their respective receptors. *Circulation* 2001;104:2210-2215.
33. Gross GJ, Kersten JR, Warltier DC. Mechanisms of postischemic contractile dysfunction. *Ann Thorac Surg* 1999;68:1898-1904.
34. Piper HM, Meuter K, MD, Schafer C. Cellular Mechanisms of Ischemia-Reperfusion Injury. *Ann Thorac Surg* 2003;75:644-648.
35. Gülle K. Fare ovaryumunda poli(ADP-ribozil)asyon yolu. Doktora tezi. Süleyman Demirel Üniversitesi. 2008.
36. Di Paola R, Geravese T, Caputi AP, Thereadgill M, Thiemermann C, Cuzzocrea S. Beneficial effects of 5-aminoisoquinolinone, a novel, a potent, water-soluble, inhibitor of poly(ADP-ribose)polymerase, in a rat model of splanchnic artery occlusion and reperfusion. *Eur J Pharmacol* 2004;492:203-210.
37. Sodhi RK, Singh N, Jaggi AS. Poly(ADP-ribose)polymerase-1(PARP-1) and its therapeutic implicants. *Vascul Pharmacol* 2010;53:77-87.
38. Yuan Y, Liao YM, Hsueh CT, Mirshahidi HR. Novel targeted therapeutics: inhibitors of MDM2, ALK and PARP. *J Hematol Oncol* 2011;4:16.
39. Halmosi R, Berente Z, Osz E, etc al. Effect of poly(ADP-ribose)polymerase inhibitors on the ischemia-reperfusion induced oxidative cell damage and mitochondrial

- metabolism in Langendorff heart perfusion system. *Mol Pharmacol* 2001;59:1497-1505.
40. Schreiber V, Dontzar F, Ame JC, de Murcia G. Poly(ADP-ribose): novel functions for an old molecule. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2006;7:517-528.
 41. Sodhi RK, Singh M, Singh N, Jaggi AS. Protective effects of Caspase-9 and poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors on ischemia-reperfusion-induced myocardial injury. *Arch Pharm Res* 2009;32:1037-1043.
 42. Weyman N, McDonald MC, Thompson AS, Threadgill MD, Thiermann C. 5-aminoisoquinolinone, a potent inhibitor of poly(ADP-5-diphosphate-ribose) polymerase, reduces myocardial infarct size. *Eur J Pharmacol* 2001;430:93-100.
 43. Chatterjee PK, Chatterjee MC, Pedersson H, et al. 5-aminoisoquinolinone reduces renal injury and dysfunction caused by experimental ischemia/reperfusion. *Kidney Int* 2004;65:499-509.
 44. Hendryk S, Czuba ZP, Jedrzejowska-Szypulha H, et al. Influence of 5-aminoisoquinolinone (5-AIQ) on neutrophil chemiluminescence in rats with transient and prolonged focal cerebral ischemia and after reperfusion. *J Physiol Pharmacol* 2008; 59:811-822.
 45. Kauppinen TM, Swanson RA. The role of poly(ADP-ribose) polymerase-1 in CNS disease. *Neuroscience* 2007;145:1267-272.
 46. Cuzzocrea S, McDonald MC, Mazzon E, et al. Effects of 5-aminoisoquinolinone, a water-soluble, potent inhibitor of the activity of poly(ADP-ribose) polymerase, in a rodent model of lung injury. *Biochem Pharmacol* 2002;63:293-304.
 47. Knight DR, Smith AH, Flynn DM, et al. A novel sodium-hydrogen exchanger isoform-1 inhibitor, zoniporide, reduces ischemic myocardial injury in vitro and in vivo. *J Pharmacol Exp Ther* 2001;297:254-259.
 48. Guzman-Perez A, Wester RJ, Allen MC, et al. Discovery of zoniporide: a potent and selective sodium-hydrogen exchanger type 1 (NHE-1) inhibitor of with high aqueous solubility. *Bioorg Med Chem Lett* 2001;11:803-807.
 49. Clements-Jewery H, Sutherland FJ, Allen MC, et al. Cardioprotective efficacy of zoniporide, a potent and selective inhibitor of Na/H exchanger isoform-1, in an experimental model of cardiopulmonary bypass. *Br J Pharmacol* 2004;142:57-66.

50. Castataneda-Corral G, Rocha-Gonzalez HI, Godinez_Chaparro B, Jimenez-Andarade JM, Granados-Sato V. Role of the spinal Na/H exchanger in formalin-induced nociception. *Neurosci Lett* 2011;501:4-9.
51. Pettersen JC, Chuinard L, Kerlin RL, etc al. Neurotoxic effects of zoniporide: a selective inhibitor of the Na/H exchanger isoform1. *Toxicol Pathol* 2006;36:608-619.
52. Tzeng J, Lee BL, Sykes BD, Fliegel L. Structural and functional analysis of critical amino acids in TMVI of the NHE1 isoform of the Na/H exchanger. *Biochim Biophys Acta* 2011;1808:2327-2335.
53. Fliegel L. Regulation of myocardial Na/H exchanger activity. *Basic Res Cardiol* 2001;96:301-305.
54. Fliegel L. The Na/H exchanger isoform 1. *Int J Biochem Cell Biol* 2005;37:33-37.
55. Fliegel L. Molecular Biology of the myocardial Na/H exchanger. *J Mol Cell Cardiol* 2008;44:228-237.
56. Lee BK, Lee DH, Park S, etc al. Effects of KR-33028, a novel Na/H exchanger-1 inhibitor on glutamate-induced neuronal cell death and ischemia-induced cerebral infarct. *Brain Res* 2009;1248:22-30.
57. Orłowski J, Grinstein S. Diversity of the mammalian sodium/protein exchanger SLC9 gene family. *Pflugers Arch* 2004;447:549-565.
58. Cook AR, Bardswell SC, Preteshan S, etc al. Paradoxical resistance to myocardial ischemia and age-related cardiomyopathy in NHE1 transgenic mice: A role for ER stress?. *J Cell Cardiol* 2009;46:225-233.
59. Ohqahi R, vanIJzendoorn SC, Matsushita M, Hoekstra D, Kanazawa H. Organellar Na/H exchangers: novel players in organelle pH regulation and their energing functions. *Biochemistry* 2011;50:443-450.
60. Ayoub IM, Kolarova JD, Kontola RL, etc al. Zoniporide preserves left ventricular compliance during ventricular fibrillation and minimizes post resuscitation myocardial dysfunction through benefits on energy metabolism. *Crit Care Med* 2007;35:2329-2336.
61. Dalvie D, Zhang C, Chen W, Smolarek T, Obach RS, Loi CM. Cross-species comparison of the metabolism and excretion of zoniporide: contribution of aldehyde oxidase to interspecies differences. *Drug Metab Dispos* 2010;38:641-654.

62. Morala RB, Brown JB, Kong JX, et al. Zoniporide: a potent and highly selective inhibitor of human Na/H exchanger-1. *Eur J Pharmacol* 2002;451:37-41.
63. Ercüment Ö. Miyokardiyal iskemi-reperfüzyonda nekrotik alanın değerlendirilmesi. İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı <http://www.ctf.edu.tr/farma/tfd/gaziantepolmez.pdf>.
64. Kaur K, Singh M, Singh N, Jaggi AS. Possible mechanism of rottlerin induced modulation of ischemia reperfusion injury in isolated rat hearts. *Biol Pharm Bull* 2008;31:174-178.
65. Khanna G, Diwan V, Singh M, Singh N, Taggi AS. Reduction of ischemic, pharmacological and remote preconditioning effects by an antioxidant N-acetyl cysteine pretreatment in isolated rat heart. *Yakuçaku Zasshi* 2008;128:469-477.
66. Li T, Liu J, Yang C. Pretreatment with hemoglobin-based oxygen carries protect isolated rat heart from myocardiol infarction. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol* 2010;38:115-118.
67. Ferrera R, Benhabouche S, Bopassa JC, Li B, Ovize M. One hour reperfusion is enough to asses function and infarct size with TTC staining in Langendroff rat model. *Cardiovasc Drugs Ther* 2009;23:327-331.
68. Knight DR, Smith AH, Flynn DM, et al. A novel sodium-hydrogen exchanger isoform-1 inhibitor, zoniporide, reduces ischemic myocardial injury in vitro and in vivo. *J Pharmacol Exp* 2001;297:254-259.
69. Williams IA, Xiao XH, Allen DG. The rise of [Na]⁽ⁱ⁾ during ischemia and reperfusion in the rat heart-underlying mechanisms. *Pflugers Arch* 2007;454:903-912.
70. Halmosi R, Berente Z, Osz E, et al. Effect of poly(ADP-ribose)polymerase inhibitors on the ischemia-reperfusion induced oxidative cell damagae and mitochondrial metabolism in Langendroff heart perfusion system. *Mol Pharmacol* 2001;59:1497-1505.
71. Wang Y, Meyer SN, Ashraf M, Shull GE. Mice with a null mutation in the NHE1 Na/H exchanger are resistant to cardiac ischemia-reperfusion injury. *Circ Res* 2003; 93:776-782.
72. Zhou RH, Long C, Liu J, Liu B. İnhibition of the Na/H exchanger protects the immature rabbit myocardium from ischemia and reperfusion injury. *Pediatr Cardiol* 2008; 29:113-120.

73. Kovacs K, Hanto K, Bogнар Z, etc al. Prevalant role of Akt and ERK activation in cardioprotective effect of Ca channel and beta-adrenergik receptor blockers. *Mol Cell Biochem* 2009;321:155-164.
74. Kovacs K, Toth A, Deres P, etc al. Critical role of PI3-kinase/Akt activation in the parp inhibitor induced heart function recovery during ischemia-reperfusion. *Biochem Pharmacol* 2006;71:441-452.
75. Palfi A, Toth A, Kulcsor A, etc al. The role of Akt and mitogen-activated protein kinase systems in the protective effect of poly(ADP-ribose)polymerase inhibition in langendroff perfused and in isoproteranol-damaged rat hearts. *J Pharmacol Exp Ther* 2005;315:275-282.
76. Jaggi AS, Singh M, Sharma A, Singh D, Singh N. Cardioprotective effects of mast cell modulators in ischemia-reperfusion-induced injury in rats. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 2007;29:593-600.
77. Diwan V, Jaggi AS, Singh M, Singh N, Singh D. Possible involvement of erythropoietin in remote renal preconditioning-induced cardioprotection in rats. *J Cardiovasc Pharmacol* 2008;51:126-130.
78. Khanna G, Diwan V, Singh M, Singh N, Jaggi AS. Reduction of ischemic, pharmacological and remote preconditioning effects by an antioxidant N-acetyl cysteine pretreatment in isolated rat heart. *Yakugaku Zasshi* 2008;128:469-477.
79. Wang Y, Hirai K, Ashraf M. Activation of mitochondrial ATP-sensitive K(+) channel for cardiac protection against ischemic injury is dependent on protein kinase C activity. *Circ Res* 1999;85:731-741.
80. Javadou S, Choi A, Rajapurohitem V, Zeidon A, Basnakien AG, Karmazyn M. NHE-1 inhibition-induced cardioprotection against ischemia/reperfusion is associated with attenuation of the mitochondriol permeability transtion. *Cardiovasc Res* 2008;77:416-424.
81. Banka N, Anand, IS, Sharma PL, Wahi, PL. Macroscopic measurements of experimental myocardial infarct size in rhesus monkey- a comparison of two methods. *Bull P GI* 1981;15:147-150 .
82. Collinson PO, Gaze DC. Biomarkers of cardiovascular damage. *Med Princ Pract* 2007;16:247-261.

ÖZGEÇMİŞ

1985 yılında Diyarbakır'da doğdum. Lisans eğitimimi, Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesinde 2004-2008 yılları arasında tamamladım. 2009 yılından beri Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Farmakoloji A.D. 'da yüksek lisans eğitimime devam etmekteyim.