

T.C.
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**İZOLE PERFÜZE RAT KALBİNDE MYOKARDİYAL İSKEMİ
REPERFÜZYON HASARI ÜZERİNE 3-AMİNOBENZAMİD VE
SİKLOSPORİN A KOMBİNASYONUNUN MUHTEMEL KORUYUCU
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Ecz. ZÜLFİYE GÜL

DANIŞMAN

YRD. DÇ. DR. AŞKIN HEKİMOĞLU

FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI

DİYARBAKIR 2012

T.C.

DİCLE ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**İZOLE PERFÜZE RAT KALBİNDE MYOKARDİYAL İSKEMİ
REPERFÜZYON HASARI ÜZERİNE 3-AMİNOBENZAMİD VE
SİKLOSPORİN A KOMBİNASYONUNUN MUHTEMEL KORUYUCU
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Ecz. ZÜLFİYE GÜL

DANIŞMAN

YRD. DÇ. DR. AŞKIN HEKİMOĞLU

FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI

Bu tez, Dicle Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri komisyonu tarafından

10 TF- 12 nolu Yüksek Lisans proje numarası ile desteklenmiştir

DİYARBAKIR 2012

DİCLE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DİCLE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

'İzole perfüze sıçan kalbinde oluşturulan iskemi-reperfüzyon hasarı üzerine 3-Aminobenzamid ve Siklosporin A'nın etkilerinin araştırılması' isimli yüksek lisans tezi 05/06/2012 tarihinde tarafımızdan değerlendirilerek başarılı bulunmuştur.

Tez Danışmanı : Yrd. Doç .Dr. Aşkın HEKİMOĞLU

Tezi Teslim Eden : Ecz. Zülfiye GÜL

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. Aşkın HEKİMOĞLU	D.Ü. Tıp Fakültesi

Yukarıdaki imzalar tasdik olunur.

...../...../2012

Prof. Dr. Salih HOŞOĞLU

Dicle Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

TEŐEKKÖR

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

Ecz. Zülfiye GÖL

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

1. Ön Sayfalar	Sayfa
1.1. Kapak	
1.2. İç Kapak	
1.3. Onay Sayfası.....	1
1.4. Teşekkür Sayfası.....	ii
1.5. İçindekiler Dizini.....	iv
1.6. Şekiller Dizini.....	vi
1.7. Tablolar Dizini.....	vii
1.8. Simgeler ve Kısaltmalar Dizini.....	viii
2. Özet Sayfaları	
Türkçe Özet.....	x
İngilizce Özet.....	xi
3. Tez Metni	
3.1. Giriş ve Amaç	1
3.2. Genel Bilgiler.....	2
3.2.1. İskemi	2
3.2.2. Reperfüzyon	3
3.2.3. Kalpte İskemi-Reperfüzyon Hasarı	3
3.2.4. Reperfüzyon Hasarının Mekanizmaları	5
3.2.4.1. Serbest Radikaller	6
3.2.4.2. Serbest Oksijen Radikalleri	9

3.2.4.3. Ca ²⁺ sitotoksitesisi	10
3.2.4.4. Oksjen Paradoksu ve Reperfüzyon Hasarı	11
3.2.4.5. Reperfüzyon Hasarında Nötrofil Aktivasyonunun Rolü	12
3.2.4.6. No-Reflow Fenomeni	12
3.2.4.7. Reperfüzyon Hasarında Kompleman Sisteminin Rolü	12
3.2.5. İskemi- Reperfüzyon Hasarının Kalp Üzerindeki Etkileri	13
3.2.6. PARP (Poli ADP-Riboz Polimeraz)	15
3.2.6.1. PARP (Poli ADP-riboz Polimeraz) Yapısı	15
3.2.6.2. PARP Süper Ailesi	16
3.2.6.2.1. PARP-1 ve PARP-2	16
3.2.6.3. Apoptozis Sürecinde Poli (ADP-riboz) Sentezi	17
3.2.6.4. DNA-hasarına Bağlı PARP Sentezi	17
3.2.6.5. PARP İnhibitörleri	18
3.2.6.5.1. Klasik PARP İnhibitörleri.....	18
3.2.6.5.2. İskemi-Reperfüzyon Hasarında PARP-1 İnhibisyonu.....	18
3.2.6.5.3. 3- Aminobenzamid	19
3.2.7. Siklosporin A	20
3.2.7.1. Siklosporin A'nın Etki Mekanizması	20
3.2.7.2. Siklosporin A'nın Farmakokinetik Özellikleri	21
3.2.7.3. Siklosporin A'nın Yan Etkileri ve Toksisitesi	22
3.3. Gereç ve Yöntem.....	23
3.3.1. Gereç.....	23
3.3.1.1. Kullanılan Deney Hayvanları	23
3.3.1.2. Kullanılan Araç ve Gereçler	23

3.3.1.3. Kullanılan Alet ve Cihazlar	23
3.3.1.4. Kullanılan Solüsyonlar	24
3.3.1.4.1. Modifiye Tyrode Solüsyonu	24
3.3.2. Yöntem.....	24
3.3.2.1. Cerrahi Yöntem	24
3.3.2.2. Hemodinamik Analizler	27
3.3.2.3. Laktat Dehidrojenaz Analizi	27
3.3.2.4. Nekroz Alanı Tayini	27
3.3.2.5. İstatistiksel Analiz	28
3.4. Bulgular	29
3.5. Tartışma.....	35
3.6. Sonuç ve Öneriler.....	40
3.7. Kaynaklar.....	41
3.8. Özgeçmiş.....	50

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil.1. Hidroksil radikali oluşumu	8
Şekil.2.Haber-Weis tepkimesi ve Fenton tepkimesi.....	9
Şekil.3. Miyokardiyal iskemi sonrası reperfüzyona bağlı olarak gelişen kardiyak hasara aracılık eden major hücresel mekanizmalar	11
Şekil.4. 3-Aminobenzamid kimyasal formülü	19
Şekil.5. Siklosporin A'nın Kimyasal Yapısı	20
Şekil.6. 5 grup olarak düzenlenen çalışma grupları.....	26
Şekil.7. Grafik 1: Kalp atım hızları (atım/dk)	30
Şekil.8. Grafik 2: Koroner perfüzyon basınç değerleri (mmHg)	31
Şekil.9. Grafik 3: LVDP değerleri (mmHg/sn)	31
Şekil.10. Grafik 4: dP/dt max değerleri(mmHg/sn)	32
Şekil.11. Grafik 5: dP/dt min değerleri(mmHg/sn)	32
Şekil.12. Grafik NA: Grupların nekroz alanı yüzdeleri aritmetik	33
Şekil 13: Grafik LDH: Grupların LDH düzeyleri	34

TABLolar DİZİNİ

	Sayfa
Tablo.1. 1L Krebs Henseleit solüsyonu içindeki maddeler	24
Tablo.2. Gruplara ait elde edilen veriler	29
Tablo.3. Grupların nekroz alanı yüzdeleri	33
Tablo.4. Grupların LDH düzeyleri (U/L)	34

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

PARP	: Poli(ADP-riboz)Polimeraz enzimi
3-AB	: 3-Aminobenzamid
CsA	: Siklosporin A
MPTP	: Mitokondri Permeabilite Transit Porları
İR	: İskemi-Reperfüzyon
NAD	: Nikotinamid Adenin Dinükleotit
ATP	: Adenozin Tri Fosfat
SOR	: Serbest oksijen radikali
NO	: Nitrik oksit
MPO	: Myeloperoksidaz enzimi
NOS	: Nitrik Oksit Sentaz
nNOS	: Noronal Nitrik Oksit Sentaz
eNOS	: Endotelial Nitrik Oksit Sentaz
MDA	: Malon dialdehit
K	: Potasyum
Ca	: Kalsiyum
İCAM	: İntraselular Adezyon Molekülü
TNF a	: Tümör nekroz faktör a
İNO2AB	: İodonitrobenzamide
TTS	: Trifenil Tetrazolium Solüsyonu
LDH	:Laktatdehidrogenaz

CK	: Kreatinkinaz
NA	: Nekroz alanı
PB	: Perfüzyon Basıncı
KAH	: Kalp Atım Hızı
LVDP	: Sol Ventrikül Gelişen Basıncı
LV(dP/dt)max	: Sol ventrikülün birim zamandaki maksimum sistolik basıncı
LV(dP/dt)min	: Sol ventrikülün birim zamandaki minimum diastolik basıncı
DNA	: Deoksi Ribo nükleik asit
SOD	: Süperoksit dismutaz
Fe+2	: Demir
NO	: Nitrik oksit
NOS	: Nitrik oksit sentaz
NADPH	: Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat
i.p	: İntraperitoneal
i.v	: intravenöz

ÖZET

Bu çalışmada kuvvetli PARP inhibitörü 3-aminobenzamid ile enerji kaynaklarının tüketimi engellenerek ve güçlü stimulus baskılanarak siklosporin A ile kombinasyonunun miyokardiyal reperfüzyon hasarının tek başına PARP inhibisyonunun ya da tek başına MPTP baskılanmasının sağladığı korumayı potansiyelize edip etmeyeceğinin araştırılması amaçlandı. Bu amaçla kalpte İR ile indükte oksidatif kardiyak hasar üzerine PARP inhibitörü 3-aminobenzamid(3-AB) + Siklosporin A'(CsA)nın etkilerinin araştırılması planlandı. Çalışmada 350–400 g ağırlığında 40 adet erkek Wistar-albino sıçan kullanıldı. Langendorff sisteminin kullanıldığı çalışmamızda kalpler 18 ml/dk hızla %95 CO₂+%5 O₂ karışımı ile havalandırılan 37 °C sıcaklıktaki modifiye Tyrode solüsyonu ile perfüze edildi. İlaç uygulaması Tyrode solüsyonu içerisine litrede 3 mM 3-Aminobenzamid ve/veya 0,2 µM Siklosporin A katılarak yapıldı. Deney gruplarında 10 dakikalık stabilizasyon periyodunun ardından 30 dakika iskemi ve 60 dakika reperfüzyon uygulandı. Gruplar şu şekilde oluşturuldu (n=8); Grup 1: Sham opere grubu, Grup 2: Kontrol grubu, Grup 3: 3-AB grubu, Grup 4: CsA grubu, Grup 5: 3-AB+CsA grup. 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. Reperfüzyonun 0 ve 30. dakikalarında alınan örneklerde laktat dehidrojenaz (LDH) ölçümü yapıldı ve deney sonrasında kalplerde hacim ve ağırlık olarak nekroz alanı yüzdesi tayin edildi. Madde uygulanan gruplarda (Grup 3, 4 ve 5) ölçülen parametreler açısından kontrol grubuna göre anlamlı bir değişiklikler saptanmıştır (p>0.05). 3-AB+CsA gruptan elde edilen hemodinamik parametreler ve LDH değerleri ve ağırlık ve hacim metoduyla ölçülen nekroz alanı değerleri açısından grup 3 ve 4'ten elde edilen değerlerle karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmamıştır (p>0.05). Bu verilerden yola çıkarak her iki mekanizmanın eş zamanlı olarak inhibisyonunun hem hemodinamik parametreler açısından hemde nekroz alanı azaltmada anlamlı bir fark yaratmadığını düşünmekteyiz.

Anahtar Kelimeler: Langendorff, İskemi Reperfüzyon Hasarı, Siklosporin A, 3-Aminobenzamid, Poli(ADP-Riboz) Polimeraz enzimi

The possible protective effects of 3-aminobenzamide and Cyclosporin A combination on myocardial ischemia reperfusion damage in isolated rat heart.

ABSTRACT

In this study we tried to determine that if we inhibit strong stimulus and decrease the depletion of energetic pools by potent PARP inhibitor 3-aminobenzamide (3-AB) will the combination of 3-Aminobenzamid (3-AB) and Cyclosporin A (CsA) be more efficient in the protection of myocardial reperfusion damage than their individual usage. With this aim we planned to search the possible protective effects of PARP inhibitor 3-aminobenzamide + Cyclosporin A combination on the IR induced oxidative cardiac damage. Fourty male wistar albino rats weighing 350-400g were used in the study. Rats were divided into five groups (n=8); Group 1: Sham-opereted, Group 2: IR, Group 3: 3-AB, Group 4: CsA and Group 5: 3-AB + CsA. Isolated rat hearts were exposed to 30 minutes of global ischemia followed by 60 minutes of reperfusion using Langendorff's apparatus. In groups 3, 4 and 5, 3-Aminobenzamid (0,3 nM/L) and Siklosporin A (0,2 µM/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 CsA and 3-AB groups, in 3-AB+CsA group there was no significant difference determined in LDH and hemodynamic parameters and myocardial infarct size estimated by volume and weight method. These results show that use of CsA and 3-AB together provides no significant difference in protection against IR injury

Key words: Ischemia-Reperfusion Injury ,Langendorff , Cyclosporin A ,3-Aminobenzamide,RatHeart

GİRİŞ VE AMAÇ

İskemi reperfüzyon (İR) hasarı olarak adlandırılan, birçok yerle birlikte kalp damarlarında da görülen, kalp damarlarının bir süreliğine tıkanması sonucu oksijensiz kalan ve damarın tekrar açılması ile tekrar oksijenlenen kalp kası dokusunun oksijensiz kaldığı sürece hasarlanması ancak kanlanmanın tekrar olmasıyla yeniden oksijenlenen bu dokunun daha fazla hasar görmesi durumudur. Sonuçta nekroz adını verdiğimiz ve özellikle kalp kasında bilgilerimize göre geri dönüşümsüz hasarlar meydana gelir. Kalp kası gördüğü hasarla orantılı olarak fonksiyonunu yitirir. Kalp krizi olarak nitelendirilen, kalbin pompa görevini sürdürmesini engelleyen, ölümcül bir durumdur.

Birçok çalışma bu durumu ve sonuçlarını engellemek amacıyla yapılmaktadır. İR esnasında meydana gelen DNA hasarının tamir etmeye çalışan Poly (ADP-riboz) polimeraz (PARP) adlı bir enzim bulunmaktadır. Bu enzimlerin aktivasyonunun aşırı olduğu durumlar hücre içi enerji tüketimi aşırı derecede artırmakta ve paradoksal olarak hücre ölümüne neden olmaktadır. Oksidatif hasar diğer taraftan hücre içersinde enerji üretiminden sorumlu mitokondri adlı hücre organelinin iç membranında bazı porlar oluşturarak ve bunları aktive ederek buradan enerji kaybını daha fazla artırırken mitokondri morfolojisine zarar vererek enerji üretimini de bozmaktadır. Mitokondri permeabilite transit porları (MPTP) adı verilen bu porlar iskemi periyodunda kapalı durumda iken reperfüzyon esnasında açılmaktadır ki bu süreç hücre hasarlanmasında ağırlıklı rol oynamaktadır.

Biz de çalışmamızda sıçan kalbinde izole perfüze kalp düzeneği (Langendorff) kullanarak iskemi reperfüzyon modeli oluşturup; tek başlarına kullanıldıklarında faydalı etkileri kanıtlanmış olan MPTP inhibitörü Siklosporin A(CsA) ve Poli(ADP-Riboz) Polimeraz inhibitörü 3-Aminobenzamid(3-AB) adlı iki maddeyi birlikte uygulayarak, iki ayrı yolağın eşzamanlı olarak blokajının oluşturacağı etkileri kalbe ait hemodinamik, biyokimyasal parametreler ve nekroz alanını ölçerek araştırmayı hedefledik.

GENEL BİLGİLER

2.1. İskemi

Hipoksi aerobik oksidatif solunumu etkileyen, son derece önemli ve genel bir hücre zedelenme ve ölüm nedenidir. Hipoksi kalp-akciğer yetersizliğine bağlı kanın yetersiz oksijenlenmesi ve anemi veya karbonmonoksit zehirlenmesinde olduğu gibi kanın oksijen taşıma gücünün kaybına bağlı olarak gelişebileceği gibi hipoksinin en önemli nedeni, arteriyel ya da venöz kan akımı bozukluğuna bağlı organ ve dokunun yetersiz perfüzyonuna yol açan iskemidir (1,2).

Hipoksinin ilk zarar verdiği yer hücrenin aerobik solunumudur. Hücrede ilk etkilenen olay mitokondrial oksidatif fosforilasyondur ve bunun sonucunda adenosin trifosfat (ATP) ve fosfokreatinin sentezinde azalma meydana gelir. Aynı zamanda hücrede adenin nükleotidinin yıkılımı da artmaktadır. Bu durum serbest oksijen radikallerinin (SOR) prekürsörü olan hipoksantin hücre içi birikimini de artırmaktadır. Özellikle hücre zarında ATP aktivitesinin azalması zarda aktif sodyum pompasının yetersizliğine yol açarak hücre içi sodyum birikimine ve hücreden potasyum atılımına yol açar. Solid materyalin birikimine izoozmotik su birikimi eşlik ederek akut hücresel şişme oluşur. Hücresel 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'ın düşmesine yol açar. Sonraki fenomen granüllü endoplazmik retikulumdan ribozomların ayrılması ve polizomların monozomlara parçalanmasıdır. Bu aşamaya kadar hücrede meydana gelen bozuklukların tümü oksijen verilmesiyle geri döner. Buna rağmen eğer iskemi sürerse geri dönüşsüz zedelenme oluşur (1,2).

Geri dönüşsüz zedelenme morfolojik olarak mitokondrilerde aşırı vakuolizasyon, hücre zarında aşırı zedelenme, lizozomlarda şişme ve özellikle iskemik alanın yeniden kanlanması durumunda hücre içi aşırı kalsiyum (Ca^{++}) tutulumu ile birliktedir. Proteinler, temel koenzimler, ribonükleik asitler aşırı geçirgen zarlardan sürekli kaybedilir. Hücreler ATP'nin yeniden oluşumunda kullanacakları metabolitleri kaybeder ve pH'ın 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 (1). Özetle; iskemi nedeniyle oluşan hipoksi oksidatif fosforilasyonu etkiler ve ATP yapımını engeller; kritik noktadan sonra hücrede ATP'nin yetersizliği hücre zarında zedelenmeye yol açar. Kalsiyum hücre ölümünde morfolojik değişikliklerden sorumlu önemli bir mediyatördür (1).

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 ya da organlarda meydana gelen hasar olarak tanımlanır (2).

Dokuların yeniden kanlanması ve dolayısıyla hücrelere oksijen sunulması ile iskemiye bağlı hasarın azalacağı düşünülebilir. Fakat yapılan birçok çalışma iskemi periyodunu izleyen reperfüzyon döneminin, iskemiye bağlı olarak oluşan hasarı daha da şiddetlendirdiğini ortaya koymuştur (2,3). Reperfüzyondan dolayı ortaya çıkan hücresel hasar; iskemik olayın süresine bağımlı olarak geri dönüşümlü veya geri dönüşümsüz olabilir. Yirmi dakikalık iskemi periyodunu takip eden dönemde reperfüzyonun oluşturduğu hasar geri dönüşlüdür fakat daha uzun sürelerdeki iskemiye takip eden reperfüzyon miyokardiyal hasar ya da hücresel nekrozla sonuçlanır (4). Hücre içine moleküler oksijenin sunumuyla hızla oluşan SOR türevleri en çok suçlanan faktör olmakla birlikte reperfüzyon hasarından birçok mekanizma sorumlu tutulmuştur (2,5,6).

2.3. Kalpte İskemi-Reperfüzyon Hasarı

Dokunun metabolik ihtiyaçlarını karşılamak için arteriyel akım ile yeterli oksijen ve besinin sağlanamadığı durumlarda iskemiden söz edilir. İskemi, doku hasarına yol açtığı için önemli bir durumdur. Oluşan hasarın miktarında, iskeminin ciddiyeti kadar süresi de önemli bir faktördür. Ciddi bir iskemide bile süre 40 dk. dan az ise hücresel ve fonksiyonel değişiklikler geri dönüşümlüdür ve tedaviye olanak

vardır. İskemi süresi, 40–50 dk. ise tam bir fonksiyon kaybı ve iskemi süresine bağlı ve ilerleyici olan geri dönüşümsüz bir hasar meydana gelir (7). Bu süre 50 dk. dan fazla ise reoksijenasyon ya da reperfüzyon hasarına benzeyen, fakat aynı olmayan mekanizmalar devreye girer (8).

İskemik doku en az üç fizyolojik anormallik gösterir (9) :

- a) Hipoksi; oksidatif metabolizma için yetersiz oksijen sunumu,
- b) Aerobik metabolizmadan anaerobik metabolizmaya dönüşü ifade eden toksik metabolitlerin birikimi,
- c) Uygun elektron akseptörü yokluğunda katabolik reaksiyonlar sonucunda meydana gelen asidoz.

Deneysel koşullarda, ana koroner arterin ani kapatılması ile oluşan iskemideki metabolik değişiklikler; aerobik metabolizmanın durması, kreatin fosfatın (CP) azalması, anaerobik glikolizin başlaması, laktat ve alfa-gliserol fosfat (GP) gibi glikolitik ürünler ile nükleotid yıkım ürünlerinin birikmesidir. Bunlarla bağlantılı olarak kontraksiyon durur, membran potansiyelleri değişir ve elektrokardiyografik değişiklikler meydana gelir.

Miyokardiyumun yüksek enerjili fosfatlara olan ihtiyacı, yapılandan fazla olduğu için dokudaki net ATP miktarı azalmıştır. Ciddi bir iskemik hasarda tüketilen ATP'nin % 80'i anaerobik glikoliz kaynaklıdır. İskeminin ilk dönemlerinde varolan ATP, kontraktıl fonksiyon için kullanılmasına karşın, süre ilerledikçe, artık kontraksiyon yapılamadığı için, mitokondriyal ATPaz'lar tarafından, muhtemelen, bozulan durumların restorasyonu için harcanır. ATP'nin az bir kısmı da iyon transport ATPaz'ları tarafından tüketilir. İskemi süresi uzadıkça tüm bu metabolik olayların yavaşladığı görülmüştür.

Geri dönüşümsüz hasara maruz kalmış bir hücrede, ATP seviyelerinin aşırı düştüğü, anaerobik glikolizin durduğu, H⁺, AMP, inozin, laktat ve GP'nin arttığı, osmolar bir artış olduğu, hücre zarı harabiyeti, mitokondrilerde şişme ve amorf cisimciklerin oluştuğu tespit edilmiştir.(10)

2.4. Reperfüzyon Hasarının Mekanizmaları

İlk kez, Tennant ve Wiggers (11) iskemik miyokardiyumun reperfüzyonunun potansiyel olarak malign ventriküler aritmilerin oluşmasına neden olabileceğini açık olarak göstermişlerdir. Daha sonra Jolly ve ark.(12) iskemide oluşan serbest oksijen radikallerinin miyokardiyal reperfüzyon hasarında rol oynadıkları ve süperoksit dismutaz (SOD) ve katalaz (CAT) uygulamasıyla bu hasarın azaltılabileceğini tespit etmişler. Daha sonraki çalışmalar, tam kan reperfüzyonundaki polimorfonükleer lökositlerin de bu hasarın oluşmasında önemli bir rolü olduğunu göstermiştir. Hearse ve ark.(3) ise, izole sıçan kalbinde reperfüzyon ya da reoksijenasyonun ani ve masif bir enzim yıkımına, ultrastrüktürel hasara ve kontraktüre neden olduğunu bildirmişlerdir. Reoksijenasyonun ilk dakikalarında olan ve geri dönüşümsüz doku hasarını hızla artıran bu duruma oksijen paradoksu denilmektedir. Hill ve Ward'ın (13) çalışmasında iskemik hasardaki inflamatuvar olaylarda kompleman sisteminin mediyatör olarak önemine dikkat çekilmiştir.

Yapılan çalışmaların sonuçları genellikle birbirini desteklemektedir. Kloner ve ark. (14) çalışmalarında altı saatlik bir iskemiye takiben reperfüzyon yapıldığında transmural nekroz olmuş ve reperfüzyonun koruyucu bir etkisi görülmemiştir. Diğer bazı araştırmalarda ise iki saatlik iskemiden sonra yapılan reperfüzyonda transmural nekroz görüldüğü saptanmıştır (15). Buna karşılık, Beyersdorf ve ark., altı saatlik iskemi sonunda reperfüzyon yapılmadığı takdirde hala nekroz olmadığını göstermişlerdir. Reperfüzyon hasarı kendini çeşitli şekilde gösterebilmektedir (16,17,18,19):

- a) Aritmiler
- b) Myokard sersemlemesi
- c) Reperfüzyonun henüz başlangıcında canlılığını koruyan dokulara ölümcül hasar
- d) İrreversibl hasarlı dokularda artmış nekroz hızı (oksijen paradoksu)
- e) No-reflow fenomeni
- f) Kontraktıl fonksiyonlarda azalma

Kurtarılan doku miktarını artırabilmek için optimum koşullarda ve uygun zamanda reperfüzyon yapılmalıdır. Reperfüzyon hasarı alanının büyüklüğü, iskemi süresi ve ciddiliğine, kollateral kan akımına, tutulan damar yatağına, dokudaki oksijen tüketim miktarına ve reperfüzyonun nasıl yapıldığına bağlıdır. Bunlardan, reperfüzyonun yapılış şekli, tedaviye yönelik en iyi olanakları sunan seçenektir.

2.4.1. Serbest Radikaller

Serbest radikal, eşlenmemiş elektron içeren atom veya moleküldür. Genelde elektronlar atom veya molekülde eşlenik olarak bulunmaları nedeniyle molekül stabildir ve reaktif değildir. Ancak, moleküle bir elektron ilavesi ya da bir elektron kaybı onu reaktif hale getirir. Bu özellikleri nedeniyle SR'ler kolaylıkla hücre bileşenleri ile reaksiyona girebilir ve onların kimyasal yapılarını değiştirerek bu yapılarda hasar oluşturabilirler (20).

Bugüne kadar yapılan çalışmalarda pek çok hastalığın oluşumunda rol oynadıkları gösterilmiştir (20). Bunların başında kanser, ateroskleroz, katarakt, romatoid artrit ve diğer otoimmün hastalıklar gibi çeşitli inflamatuvar hastalıklar, epilepsi, Alzheimer ve Parkinson hastalıkları gibi bazı santral sinir sistemi hastalıkları, ülser ve kolit gibi gastrointestinal sistem hastalıkları sayılabilir (20).

SR'ler organizmada hem metabolizma sırasında endojen olarak sürekli oluşurlar, hem de radyasyon, ilaçlar ve zararlı kimyasallar gibi etkenlere bağlı eksojen olarak ortaya çıkabilirler. Solunan oksijenin %95'inden fazlası mitokondrilerde ATP şeklinde enerji oluşumunda kullanılırken, yaklaşık %5'ide oldukça toksik SR'lere dönüşmektedir (20). Oksijenin bir elektron alarak indirgenmesi ile O_2 radikali, iki elektron alarak indirgenmesi ile H_2O_2 oluşur. Üçüncü elektron ilavesi ile yüksek derecede reaktif OH radikali oluşur. Dördüncü elektron ilavesi ile de su oluşmaktadır.

SR'ler organizmada mitokondrinin yanı sıra hücrelerin tüm fraksiyonlarında zara bağlı veya serbest halde bulunan pek çok enzimin katalizlediği reaksiyonlar sırasında oluşmaktadır. Bunlar arasında mikrozomal karma fonksiyonlu oksidaz sistemi, sitoplâzmadaki ksantin oksidaz, hücre zarına bağlı NADPH oksidaz ve lipooksijenazlar gibi enzimlerin kataliz ettiği reaksiyonlar sayılabilir.

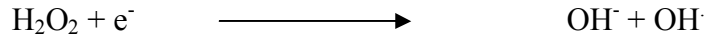
Aerobik organizmada oluşan SR'lerin çoğu oksijen ve azot kaynaklıdır. Bunlardan bir kısmı radikal niteliklidir, bir kısmı ise bazı reaksiyonlara katılıp radikallere dönüşebilmektedir, ancak bu radikallerin organizmaya zarar vermesi organizmanın endojen antioksidan savunma sistemi tarafından engellenmektedir. Bu nedenle SR'lerin oluşum hızı ile etkisizleştirme hızının dengede tutulması son derece önemlidir. Bu dengenin bozulması durumunda SR'lerin zararlı etkileri ortaya çıkmakta ve çeşitli organ ve sistemler olumsuz etkilenmektedir. SR'ler çevredeki tüm biyomoleküllere (nükleik asitler, membran lipidleri, enzimler, reseptörler gibi) zarar verirler. Hücrel hasar oluşumunda üç tip reaksiyon önemlidir.

Lipid peroksidasyonu: SR'lerin lipidler üzerindeki en önemli etkileri lipid peroksidasyonu uyarmasıdır. Lipid peroksidasyonu SR'ler tarafından başlatılan ve hücre zarlarında bulunan çoklu doymamış yağ asitlerinin oksidasyonuna yol açan kimyasal bir olaydır. Süperoksit radikali, hidroksil radikali, peroksil radikali, alkoksil radikali, lipid peroksidasyonunu başlatan başlıca radikallerdir (20). Hücre zarlarında lipid peroksidasyonu sonucu zar transport sistemi etkilenmekte, hücre içi ve dışı iyon dengeleri bozulmaktadır. Bunun sonucunda hücre içi Ca konsantrasyonu artmakta ve Ca bağımlı proteazlar aktive olmaktadır. Bu olaylar hücre hasarında önemli role sahiptir. Nitekim hücrede aşırı Ca birikmesinin sitotoksik olduğu gösterilmiştir (20). Öte yandan lipid peroksidasyonunun son ürünü olan aldehitler de sitotoksik özelliğe sahiptirler.

Proteinlerin oksidatif modifikasyonu: SR'ler aminoasit yan zincirlerinin oksidasyonuna neden olarak protein-protein bağlarının oluşmasına yol açarlar. Ayrıca protein ana-zincirini okside ederek protein parçalanmasına neden olurlar. Böylece hücrede fonksiyonel öneme sahip enzimlerde bozulmalar ortaya çıkmaktadır (26). DNA hasarı: SR'ler, nükleer ve mitokondrial DNA'da timin ile reaksiyona girerek tek zincir kırılmaları oluşturur. Bu durumda DNA onarım mekanizmasının uyarılması ile poli (ADP-riboz) polimeraz (PARP) enzimi aktive olur (20). PARP nükleusta bulunan, protein modifikasyonu ve nükleotid polimerizasyonu yapan bir enzimdir. Fizyolojik rolü tam bilinmemekle birlikte gen ekspresyonu, gen amplifikasyonu, hücrel farklılaşma, malign transformasyon, hücre bölünmesi ve DNA replikasyonunda rolü olduğuna dair veriler vardır. PARP'nin aktivasyonu

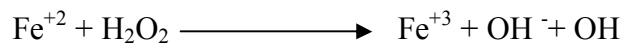
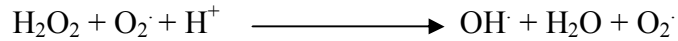
sonucu bu enzimin substratı olan nikotinamid dinükleotid (NAD) düzeyi düşer. NAD ise glikoliz ve trikarboksilik asit sikluslarında kofaktör olduğundan bu sikluslar durur ve böylece ATP oluşumu azalır. Sonuçta hücrelerin enerji kaybetmeleriyle nekrotik tip hücre ölümü olur (20).

SR'ler molekülün yapısına göre oksijen merkezli (süperoksit radikali, peroksit radikali, hidroksil radikali, vb.), karbon merkezli (karbon tetraklorür, aromatik hidrokarbonlar) veya sülfür merkezli (glutatyon radikali) olarak gruplandırılabilir. Oluşan SR'ler hücre membranı ve hücre içi organelleri etkilerken ekstrasellüler komponente de geçer ve uzak etkiler oluşturur. Oksijen merkezli SR'ler incelendiğinde, OH radikali çok potent olmasına rağmen difüzyon hızı yavaştır. Bu yüzden ancak oluştuğu yerde veya yakınında etki gösterir. Buna karşın H₂O₂ çok az potent olmasına rağmen plazma membranını, mitokondrial ve peroksizomal membranları rahatlıkla geçerek uzak etki gösterebilirler (21,22). O₂ radikali aktivitesi kısmen düşük olduğu halde diğer radikalleri oluşturduğu için önemlidir. OH radikali bu grupta en potent SR'dir ve oluşması için ortamda demir veya bakır gibi transizyonel metallerin varlığı gerekmektedir. Transizyonel bir metal tarafından katalizlenen bu reaksiyonlar Fenton reaksiyonları olarak bilinir (23).



Şekil 1. Hidroksil radikali oluşumu (24)

Bir transizyonel metalin varlığında O₂ radikali H₂O₂ ile tepkimeye girerek OH-radikalini oluşturur. Buna Haber-Weiss reaksiyonu denir (23).



Şekil 2. Haber-Weiss tepkimesi ve Fenton tepkimesi. Fe: demir (25)

Hidroksil radikali büyük molekül yapısı ve elektronegativitesi nedeni ile DNA, protein, karbonhidrat ve lipidler gibi makromoleküllerle reaksiyona girerek bu yapılarda oksidatif hasara neden olur (Şekil 4). Makromoleküller hücrelerde kısıtlı miktarlarda bulduklarından bu yapılarda oluşan hasar oldukça önemlidir. *In vivo* herhangi bir OH radikal süpürücüsünün etkili olabilmesi için mevcut hedef moleküllerin önemli bir bölümünü kapsayacak kadar yüksek konsantrasyonda bulunması gerekir. Bu nedenle OH radikalının oluşumunun önlenmesi, bu radikalın süpürülmesinden daha etkilidir (26).

2.4.2. Serbest Oksijen Radikalleri

Serbest radikaller, bir veya daha fazla ortaklanmamış elektronlarından dolayı çok reaktif olan atom veya moleküllerdir. Biyolojik sistemlerdeki en önemli serbest radikaller, oksijenden oluşan radikallerdir. Mitokondriler, ksantin oksidaz enzimi, PG biyosentezi ve inflamatuvar cevapta rol oynayan fagositler (nötrofil ve monosit) süperoksit radikali, hidroksil radikali ve hidrojen peroksitin ve diğer reaktif oksijen ürünlerinin kaynağı olarak bilinirler. Reaktif oksijen ürünleriyle reaksiyon veren maddeler (SOD, CAT, merkaptopropiyonil glisin gibi) veya inflamatuvar hücrelerin serbest radikal üretimini engelleyici ajanlar doku hasarını azaltırlar (27). Reaktif metabolitlerin oluşma hızı, hücrenin oksidan strese karşı savunma kapasitesini aşarsa toksik etki oluşmaya başlar. Hücrenin antioksidan mekanizmaları arasında SOD, CAT, glutatyon peroksidaz (GSH-Px) ve glutatyon redüktaz vardır (28). Pentoz monofosfat yolağı da NADPH sağlayarak redükte glutatyon oluşumuna ve lipid peroksitlerin detoksifikasyonunda rol alan GSH-Px'a yardım eder.

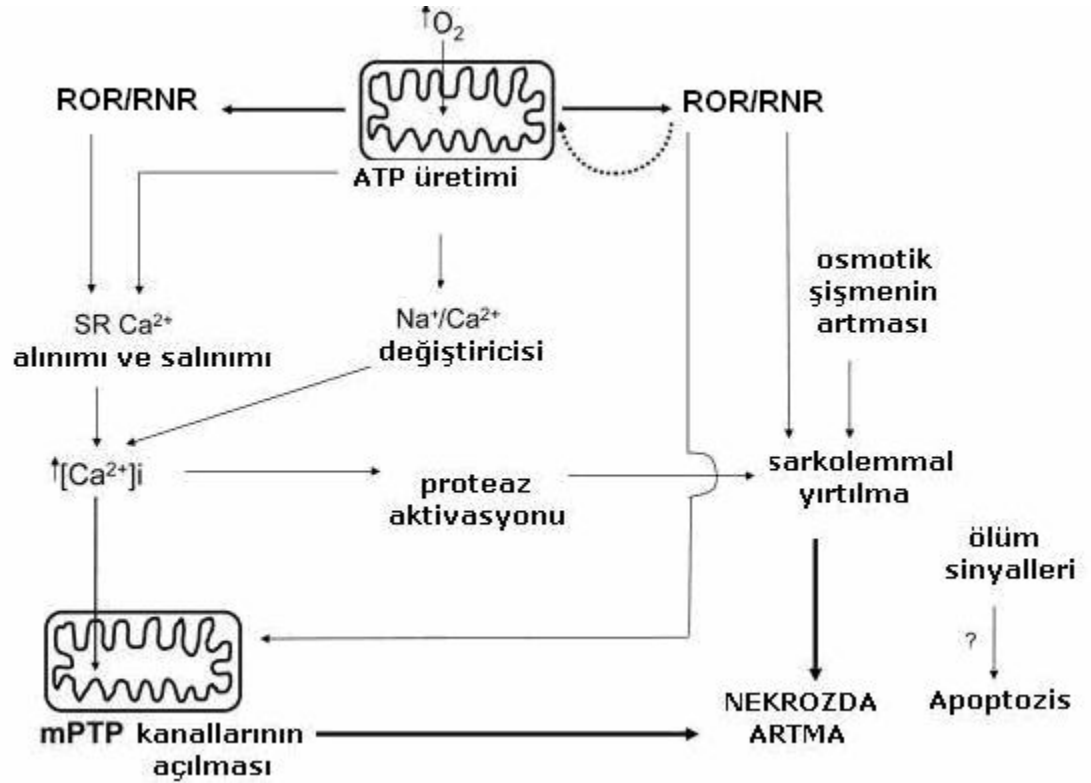
Birçok çalışma, radikallerin İR'da mediyatör rol oynayabileceğini göstermiştir. Biyolojik hedeflerle (lipid, katekolamin, DNA, protein karbonhidrat) direkt reaksiyona girerler ve sonuçta lipid peroksidasyonu, mitokondrial solunum zincirinin inhibisyonu, Na kanalları membran Na/K-ATPaz aktivitesinin inhibisyonu gibi İR patolojisinde rol oynayabilen olayları meydana getirebilirler. (29)

DNA hasarı oluşturan radikaller hücrede nükleer bir enzim olan poli ADP-riboz sentazı (PARP) aktive ederler. PARP enzimi nikotinamid adenin dinükleotidi (NAD) substrat olarak kullanır. Sonuçta bu olay ATP tüketimine ve hücrelerin

ölümüne yol açabilir. PARP inhibitörleri, PARP aktivitesini inhibe ederek İR hasarını önleyebilir. Oluşan serbest radikaller hücre membranı ve hücre içi organelleri etkilerken ekstrasellüler kompartmana da geçer ve uzak etkileri oluşturur. Burada serbest radikalın çözünürlüğü ve diffüzyon hızı önem kazanmaktadır. Serbest radikaller incelendiğinde hidroksil radikali çok potent olmasına rağmen, diffüzyon hızı yavaştır. Bu yüzden ancak olduğu yerde ya da yakınında etki gösterir. Buna karşılık hidrojen peroksit (H_2O_2) daha az potent olmasına rağmen plazma membranını, mitokondrial ve peroksimal membranları rahatlıkla geçerek uzak etki gösterebilir.(30,31)

2.4.3. Ca^{+2} sitotoksitesi

Hücre içine artan Ca^{+2} girişi ve azalan çıkışı sellüler Ca^{+2} homeostazını bozar. İskemi sırasında hücrede enerji tükendiğinden sitoplazma ve mitokondride aşırı miktarda Ca^{+2} birikmekte ve Ca^{+2} 'un toksik etki göstermesine neden olmaktadır. Fizyolojik koşullarda hücre içi biriken fazla Ca^{+2} dışarı atılarak ya da hücre içinde depolanarak tolere edilir. Ancak iskemi sırasında enerji eksikliği nedeniyle pompalar ve depolama mekanizmaları iflas eder. Artan Ca^{+2} düzeyi fosfolipazları, proteazları aktive ederek radikal ve yağ asitleri oluşumunu artırır ve hücreyi ölüme sürükleyebilirler (37,38). ATP'nin yeniden sağlanması ile Na^+ / Ca^{+2} değiştiricisinin etkisi düzelir ve hücre içinde birikmiş Na^+ atılarak hücre dışından Ca^{+2} hücre içine alınır, sarkoplazmik retikulumdan Ca^{+2} salınımının da ilavesiyle intrasellüler Ca^{+2} düzeyleri artar. Mitokondriyal matrikste Ca^{+2} birikmesi, ROR/RNR, ve protonların uzaklaştırılmasına bağlı olarak pH'nın artmasının kombine etkileri MPTP kanallarının açılmasını desteklemektedir. MPTP kanallarının açılması esas olarak nekrotik hücre ölümü ile ilişkilendirilir ve bu hücreler muhtemelen zaten iskemi esnasında hasara uğramış durumdadır.



Şekil 3. Miyokardiyal iskemi sonrası reperfüzyona bağlı olarak gelişen kardiyak hasara aracılık eden major hüresel mekanizmalar – Ferdinandy (2007)'den değiştirilerek.

2.4.4. Oksijen Paradoksu ve Reperfüzyon Hasarı

Gerek reperfüzyon ve gerekse reoksijenasyonda temel hasar doku yeniden oksijenle karşılaştığında olmaktadır. Oksijen paradoksu denilen bu olay, miyokardiyal kontraktür gelişimi ve irreverzibl hücre hasarı ile birlikte, kreatinkinaz gibi miyokardiyal enzimlerin salınımı ile karakterizedir (3). Reoksijenasyon, miyokard hücrelerinde ani değişikliklere, istirahat geriliminin artması ile birlikte kontraktil fonksiyonun hızla azalma veya yok olmasına ve kontraktil band nekrozu şeklinde ultrasütrüktürel değişikliklere neden olmaktadır.

Reperfüzyonda oksijenden başka, kandaki diğer bazı faktörler de ayrıca doku hasarına yol açar (32). Bunlar kan hücreleri ve kompleman sisteminin aktivasyonu gibi faktörlerdir. Reperfüzyon, reoksijenasyondan farklı olarak kompleman yoluyla olan zar bütünlüğünün kaybı ve zamana bağımlı inflamatuvar bir reaksiyonu içeren bir fenomendir. Bu durum, reperfüzyon hasarı kavramının temelidir. Reperfüzyon

hasarı, iskemik hücre ölümünden, mekanizma ve hücre ölümü tipi açısından ayrılmaktadır. Reperfüzyon nekrozu; hücre şişmesi ve kontraksiyon bandları ile karakterize kontraktıl band nekrozu şeklinde görülürken (33), iskemik hücre ölümü koagülatif nekroz görünümündedir (28).

2.4.5. Reperfüzyon Hasarında Nötrofil Aktivasyonunun Rolü

Reperfüzyonda inflamatuvar hücrelerin toplanması ve inflamatuvar mediyatörlerin salınması ile karakterize bir hücresel reaksiyon vardır (34). Bu durum, doku hasarının artmasına yol açmaktadır. Nötrofiller bu inflamatuvar cevabın en önemli bileşenleridir (35). Lökositlerin iskemik alanda toplanabilmeleri için, kemotaktik maddeler yardımıyla dokuya doğru çekilmeleri ve endotel ile temas ederek, birtakım aktifleştirici maddeler yardımıyla aktive edilmeleri gerekir. Lökositlerin doku içine migrasyonu için mutlaka endotel ile temas etmeleri gerekir. İnfiltrate olan aktive nötrofiller, reaktif oksijen radikalleri ve proteazlar salgırlar. Hücre içi savunma mekanizmalarında kullanılan serbest radikal süpürücü SOD ve peroksit yıkıcı CAT ve GSH-Px enzimleri, lökositlerin salgıladıkları bu sitotoksik reaktif oksijen metabolitleri tarafından oluşturulan hasarı azaltabilme kapasitesine sahiptir.(32)

2.4.6. No-Reflow Fenomeni: Bazen reperfüzyon sağlanmış olmasına rağmen koroner arterler uniform miyokardiyal reperfüzyonu sağlamada yetersiz kalmaktadır. Çünkü mikrovasküler seviyede önemli akım bozukluğu vardır. Bu yüzden bu fenomene no-reflow ismi verilir. No-reflow'un ana belirleyicisi mikrovasküler seviyede nötrofil aktivasyonudur. Aktive nötrofiller sıkıca kapiller endoteline yapışır ve bu yüzden akımı mekanik olarak bloke ederler. Kendileri mekanik blokaj yaptıkları gibi, salgıladıkları mediyatörler aracılığıyla da vazokonstriksiyon yaparlar. Bu fenomenin oluşması, reperfüzyonun beklenen faydalı etkilerini kısıtlamakla beraber tekrarlayan myokardiyal iskemik ataklar, aritmiler, nekroz oluşumunda artış ve kontraktıl fonksiyonlarda azalmaya yol açabilir. Ayrıca azalmış olan kan akımına bağlı olarak kullanılan ilaçların yeterince o bölgeye gitmesine de engel teşkil etmektedir (36).

2.4.7. Reperfüzyon Hasarında Kompleman Sisteminin Rolü

Konuyla ilgili eski çalışmalar toksik oksijen metabolitleri ve nötrofillerin reperfüzyon hasarındaki rolleri üzerinde yoğunlaşmıştır. Daha sonra doku hasarında kompleman sisteminin çok önemli bir yere sahip olduğu anlaşılmış, kompleman sisteminin reperfüzyonda direkt veya indirekt olarak doku hasarına ve hücre ölümüne yol açtığı gösterilmiştir (37). Kompleman sisteminin myokardiyal iskemik hasarda etkili olduğunu gösteren diğer bir kanıt da, kobra venom faktörü ile kompleman sisteminin baskılanmasından sonra infarkt miktarında azalma saptanmasıdır (38). Kompleman birimlerinin dolaşımında azalması, iskemik dokuya nötrofil infiltrasyonunu ve doku hasarını azaltmaktadır.

2.5. İskemi- Reperfüzyon Hasarının Kalp Üzerindeki Etkileri

Kalpte, İR hasarına bağlı olarak myokardiyal sersemleme, reperfüzyon aritmileri, myositlerde nekroz, koroner endotelial ve mikrovasküler disfonksiyon gözlenebilir. Myokardiyal sersemleme, İR'a bağlı olarak geri dönüşsüz hasar olmamasına ve reperfüzyonun tam veya tama yakın bir şekilde sürmesine rağmen kalpte oluşan uzamış mekanik fonksiyon bozukluğu olarak tanımlanır (39,40). İlk olarak 1975 yılında Heyndrickx ve arkadaşları tarafından tanımlanmıştır (41).

Myokardiyal sersemleme genellikle global iskemik ataklardan sonra gözlenir (39,42,43). Fakat kısa süreli iskemiye takip eden dönemlerde bile myokardiyal sersemleme beklenmedik derecede uzun sürebilir. Örneğin; köpek kalbinde oluşturulan 15 dakikalık iskeminin, 24 saatlik myokardiyal sersemleme oluşturduğu gözlenmiştir (44). İskemik periyodu takip eden reperfüzyon dönemi ölümcül aritmilere öncülük edebilir. Oluşan aritmiler genellikle idioventrikülerdir ve en fazla ventriküler taşikardi ve fibrilasyon gözlenir (45,46).

Kalp hücrelerinde nekroz gelişimi İR döneminde harekete geçen mekanizmaların ortak sonucudur. Bununla birlikte reperfüzyon döneminin ilk dakikalarında gelişen nekrozun başlıca sebebi kalp hücrelerinde gelişen kontraktürdür (47). Reperfüzyonun erken dönemlerinde ortaya çıkan koroner

endotelial disfonksiyonun, köpek ve kedi kalplerinde yapılan çalışmalarda 4-12 haftaya kadar sürebildiği gösterilmiştir. Reperfüzyonun ilk 2 ila 5 dakikalık bölümünde endotelial disfonksiyonla beraber NO formasyonunda azalma ve 20 dakikadan sonraki bölümde ise lökosit varlığı gözlenebilir (48,49). Sadece iskemi uygulanan kalplerde koroner endotelial disfonksiyon 2 ila 3 saat sürer ve 4 –6 saat sonra hiçbir histolojik bulgu gözlenmez (50).

Koroner endotelial disfonksiyon sonucu vazodilatör cevap azalır. Güçlü vazokonstriktör etkileri bulunan endotelin-1 ve SOR oluşumu koroner vazokonstriksiyona yol açarak kan akımında azalma meydana getirir (51). İR sonrası oluşan endotelial disfonksiyon, trombositlerin yol açtığı mikrovasküler tıkanıklık, ödem ve oksidatif hasar mikrovasküler disfonksiyona yol açar. Mikrovasküler disfonksiyonun olduğu kalp bölgelerinde reperfüzyon döneminde kan akımı kısıtlanır ve hipoperfüze alanlar gözlenir (52,53). Ayrıca kalbin yeniden damarlanması ve sol ventikül serbest duvarında oluşabilen rüptür mikrovasküler disfonksiyonunun nedeniyle gözlenen olaylardır (54,55).

2.6. PARP (Poli ADP-Riboz Polimeraz)

ADP-ribozun proteinlere aktarımı ilk olarak *Corynebacterium diphtheria*' dan elde edilen bakteriyal bir toksinde bulunmuştur. ADP-ribozun negatif yüklü polimerlerinin proteinlere eklenmesi, NAD⁺'dan PAR polimerazların (PARPs) sentezlemesi aracılığıyla gerçekleşir. Poli (ADP-riboz) sadece hücrenin yaşamsal faaliyetleri ve programlı hücre ölümü ile ilgili değil aynı zamanda PARP ailesinin yeni üyelerinin sahip olduğu ilişkileri ile diğer biyolojik işlevleri de düzenler. Bu işlevler arasında, transkripsiyonun düzenlenmesi, telomer kohezyonu, hücre bölünmesi esnasında mitotik iğcik şekillenmesi, hücre içi beslenme ve enerji metabolizması sayılabilir.

Poli (ADP-riboz) şekillenmesi ilk olarak 1963 yılında rapor edilmiştir(56). 1966'da, Mandel'in (57) grubu PADPR'nin ve linkaj bölgesinde bağlantılı ADPR parçalarının tanımlandığı, önemli bir hidroliz ürünü olan ADP-ribozun yapısını ifade ettiler. Fare karaciğerinden hazırlanan nükleer preparat kullanarak, NMN'nin C-adenin-ATP'den asitte çözünmeyen materyal oluşumunu büyük oranda sağladığı ile

ilgili daha önceki yapılan çalışmaları kanıtladılar. Reaksiyon ürünü yılan zehri fosfodiesteraz ile hidrolize edilmiştir. Bu temel hidroliz ürününün NAD^+ olarak adlandırılması önerildi.

Reaktif oksijen radikalleri gibi DNA hasarına yol açan stimulusların yoğunluğu, hücrenin canlılığını devam ettireceğini ya da apoptoza mı nekroza mı gideceğini belirler. DNA hasarı, PARP aktivitesinin aşırı artışına neden olur ki bu durum da hücrenin NAD seviyelerinin hızla tükenmesine yol açar. Enerji metabolizmasında önemli bir koenzim olan NAD'ın tükenmesi, daha az adenosin trifosfat (ATP) üretimiyle sonuçlanır. Dahası hücre, NAD'ı tekrar sentezlemek amacıyla ATP'yi daha da tüketecektir ve bu enerji krizi hücre ölümüyle sonuçlanacaktır. Aşırı DNA hasarını takiben oluşan PARP aracılı hücre ölümü genel görüşü, selektif PARP inhibitörlerinden faydalanarak hücre ölümünün engellendiği ve hedef PARP geni delesyonu ile hücre ölümünden korunduğu çalışmalarla desteklenmektedir (58).

2.6.1. PARP (Poli ADP-riboz Polimeraz) Yapısı

PARP, çekirdekte geniş bir dağılım gösteren 113 kDa ağırlığında bir proteindir. NAD^+ (β -nikotinamid adenin dinükleotit)'ı substrat olarak kullanıp 200 veya daha üzeri Poli (ADP-riboz) birimleri sentezleyebilir. Birçok Poli(ADP-riboz) akseptör protein DNA'nın doğruluğunun sürdürülmesinden sorumludur. Bunlar; histonlar, topoizomerazlar, DNA ve RNA polimerazlar, DNA ligazlar, ve Ca^{2+} ve Mg^{2+} bağımlı endonüklezlerdir (59). Son çalışmalarda tümör baskılayıcı protein olarak adlandırılan p53'ün de PARP substratı olduğu bildirilmiştir.

2.6.2. PARP Süper Ailesi

Uzun zamandır, memeli hücrelerinde Poli-ADP-ribozilasyon faaliyetinden sorumlu olan tek enzimin PARP-1 olduğu düşünülüyordu. PARP-1 geni olmayan farelerdeki çalışmalar ve yeni Poli-ADP-ribozilasyon enzimlerinin tanımlanmasıyla bu düşünce değişmiştir. PARP-1 farelerden elde edilen primer kültür hücrelerde DNA hasarını takiben hala Poli (ADP-riboz) sentezlenebildiği gözlemlendi (60,61). Son yıllarda PARP enzimlerini kodlayan 5 yeni gen daha tanımlanmış ve böylece PARP ailesinin üye sayısı 18'i bulmuştur (62).

Altı temel PARP süperailisi üyeleri kendi aralarında domain yapılarına, katalitik domainlerin sekanslarına ve enzimatik aktivitelerine göre üç alt gruba ayrılırlar (63).

Altgrup I 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 (64,65). Deneysel çalışmalar hem PARP-1 hem de PARP-2'nin strese karşı yanıtta farklı yolları kullanarak önemli bir rol oynadığını göstermektedir (66).

PARP-4, PARP ailesinin en büyük molekül ağırlığa sahip üyesi olup (192.6 kDa) atlamış (vault) bir komplekse sahip olduğu tanımlanmıştır. Bu atlayan kompleks, 2 tane yüksek oranda korunmuş protein ve kodlanmamış RNA ile ilişkili işlevi bilinmeyen sitoplazmik bir ribonükleoproteindir (67,68).

2.6.2.1. PARP-1 ve PARP-2

PARP süper ailesinin üzerinde en çok çalışılan üyesi PARP-1'dir. DNA hasarına bağlı olarak NAD⁺'ı kullanarak daima kromatin ile ilişkili çekirdekteki kabul edici (aksptör) proteinlere çok dallı veya düz olacak şekilde ADP-riboz polimerlerini sentezler. PARP-1, DNA kırıkları ve DNA kırıklarının uzaysal onarımında anahtar bir role sahip olup bu kırıkların tanımlanmasında rol alan moleküler algılayıcıdır. Oldukça iyi korunmuş çok işlevsel bir enzim olup, katalitik faaliyet DNA kırıklarının üzerinde 500 den fazla katlantı ile ortaya çıkar.

Kimyasal baskılayıcılar kullanılarak PARP faaliyetinin durdurulduğu PARP-1 den yoksun farelerde yapılan çalışmalarda PARP-1'in genomik yapının bütünlüğünü ve doğruluğunun korunmasında son derece önemli bir işleve sahip olduğu gösterilmiştir (69). PARP-2'nin katalitik alt biriminin PARP-1'in ki ile çok güçlü bir benzerliğe (%69) sahip olduğu bulunmuştur. Kristal yapıları oldukça benzer olan PARP-1 ve PARP-2'nin, akseptör protein bölgelerindeki farklılık metabolik yollarda kullanılan substratlarında farklı olabileceğini düşündürmektedir. Bununla beraber, DNA bağlayıcı alt birimler PARP-1 den farklı olup, hedefi DNA üzerindeki çentikler değil boşluklardır.

2.6.3. Apoptozis Sürecinde Poli (ADP-riboz) Sentezi

Apoptozis, çok hücreli organizmaların homeostazis ve gelişiminin kontrolünün sağlanması amacıyla gerçekleşen fizyolojik bir hücre ölümü mekanizmasıdır. Apoptotik hücre ölümünün gerçekleşmemesi kanser ile sonuçlanır. PARP aktivitesinin DNA hasarını takip eden süreçte hücre içindeki NAD miktarı ile yakından ilişkili olduğu bulunmuştur. Apoptozis esnasında hücre içi NAD miktarının azalmasının PARP aktivasyonu ile yakından ilişkili olduğu tespit edilmiştir. Apoptozis sürecinde PARP aktivasyonunun rolü daha çok Poli (ADP-riboz) seviyelerinin ölçümünden sonra anlaşılmıştır. Knockout fare modellerinden elde edilen bilgiler apoptozisi uyaran faktörler arasında yer alan anti-FAS ajanının, PARP yokluğunda apoptozisi engellediği rapor edilmiştir (66).

2.6.4. DNA-hasarına Bağlı PARP Sentezi

Şimdiye kadar sadece PARP-1 ve PARP-2 aktivitelerinin DNA'daki kesiklerin varlığı ile yüksek derecede uyarıldığı gösterilmiştir (67). Sonuçta PARP üretiminin amaçları: birincisi DNA hasarını indükleyen histon H1 ve H2B N- ve C-terminallerinin Poli-ADP-ribozilasyonu veya serbest veya PARP-1-bağlı PAR ile bu proteinlerin seçici etkileşimi 30-nm kromatin lifinin gevşemesine katkıda bulunur ve kırılmalara erişimini artırır; ikincisi, DNA hasarının vuku bulmasını ve boyutunun sinyalini verir.

2.6.5. PARP İnhibitörleri

Birçok PARP inhibitörü kompetitif inhibitör gibi hareket eder ve enzimle NAD⁺'ın bağlandığı katalitik etki alanına bağlanıp bloke eder (68). Bununla birlikte DNA'ya bağlanmaları, PARP'ın DNA iplikçik kırılmalarını algılamalarını ve aktive olmalarının önlenmesiyle ilişkili olabilir. Klasik PARP inhibitörleri enzimleri zayıf bir şekilde inhibe ederek; hücre alışıverişini sınırlandırabilir, hücre direnç zamanını azaltabilir ve bazı nonspesifik etkiler yapabilirler (69). Bu gruptaki bileşiklerin çoğu karboksamid bağlı bir aromatik halkadan veya aromatik laktam veya imid erimesiyle

oluşan poliaromatik heterosiklik iskeletle oluşan karbamoil grubundan oluşur. Bu yapı güçlerini artırır ve spesifik özellikler katar (70).

2.6.5.1. Klasik PARP İnhibitörleri

Nikotinamid ve 5-metil türevlerinin 30 yıl önce PARP inhibitörü olduğu gösterilmiştir (71). Benzamid, pirazinamid ve yapısal olarak benzer bileşikler, benzamid türevleri ve özellikle 3- aminobenzamid(3-AB) ve 3-metoksibenzamid'in de klasik PARP inhibisyonu yapan guruplardır(68). 3-Aminobenzamid ve PARP-1 enziminden izole edilen nikotinamidle oldukça benzerdir. Bu bileşikler; çeşitli sinyal iletim yollarını ve bazı in vitro mediatörleri bloke ederek proinflamatuvar upregülasyonunu engelleyebilirler (72).

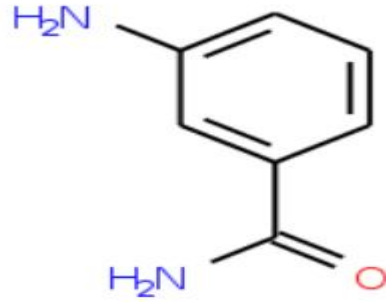
Benzamid ve türevlerinin 5mM'a yaklaşan konsantrasyonlarda glikoz metabolizması ve DNA ve RNA sentezini inhibe ettiği bununla birlikte cAMP, fosfodiesteraz, karboksipeptidaz A ve kromotripsin'i zayıf bir şekilde inhibe ettiği rapor edilmiştir.

2.6.5.2. İskemi-Reperfüzyon Hasarında PARP-1 İnhibisyonu

Kalp, göz, iskelet kası, bağırsak ve böbrek reperfüzyon yaralanmasında PARP'in aktivasyonun rolü araştırılmıştır. 3-aminobenzamid ve PJ34 ile yapılmış PARP inhibisyonu ve PARP'in genetik inaktivasyonu ile bağırsak iskemi reperfüzyon hasarının önemli ölçüde azalmış olduğu gözlenmiştir (73,74,75). PARP inhibisyonu reperfüze bağırsaktaki nötrofillerin infiltrasyonunu engellediği ve reperfüze dokuların histolojik durumunu iyileştirdiği görülmüştür. PARP inhibisyonu Splanchnic (sil) splanknik arter oklüzyonu/reperfüzyonu ile indüklenen yaralanmaları üzerinde birden fazla koruyucu etki uygular (76). Reperfüze iskelet kası, karaciğer ve koklea da PARP inhibitörlerinin koruyucu etkinliğini kanıtlayan bazı deliller bulunmuştur.(77)

İmmünohistokimyasal çalışmalar reperfüzyondan sonra PARP'in hızlıca aktive olduğunu ve 2 ile 24 saat boyunca aktif kaldığını göstermiştir (106,107). İskemi ve reperfüzyonun yol açtığı oksidatif stres, DNA zincirlerinde kırılmalara neden olur ki buda PARP'ı aktive eder.

2.6.5.3. 3- Aminobenzamid



Şekil 4. 3-Aminobenzamid kimyasal formülü (The Merck Index)

3 amino benzamid; çeşitli sinyal iletim yollarını ve bazı in vitro mediatörleri bloke ederek proinflamatuvar upregülasyonunu engelleyebilirler (72). Bununla beraber invivo çalışmalar 3-AB'nin böbrek, iskelet kasları, beyin, kalp, bağırsaklar gibi çeşitli organların iskemi- reperfüzyon hasarına karşı koruyucu etkisi olduğunu ortaya koymuştur. Aynı zamanda deneysel modellerde şok, inflamasyon, inme ve diyabete karşı koruma sağlamıştır (79,80).

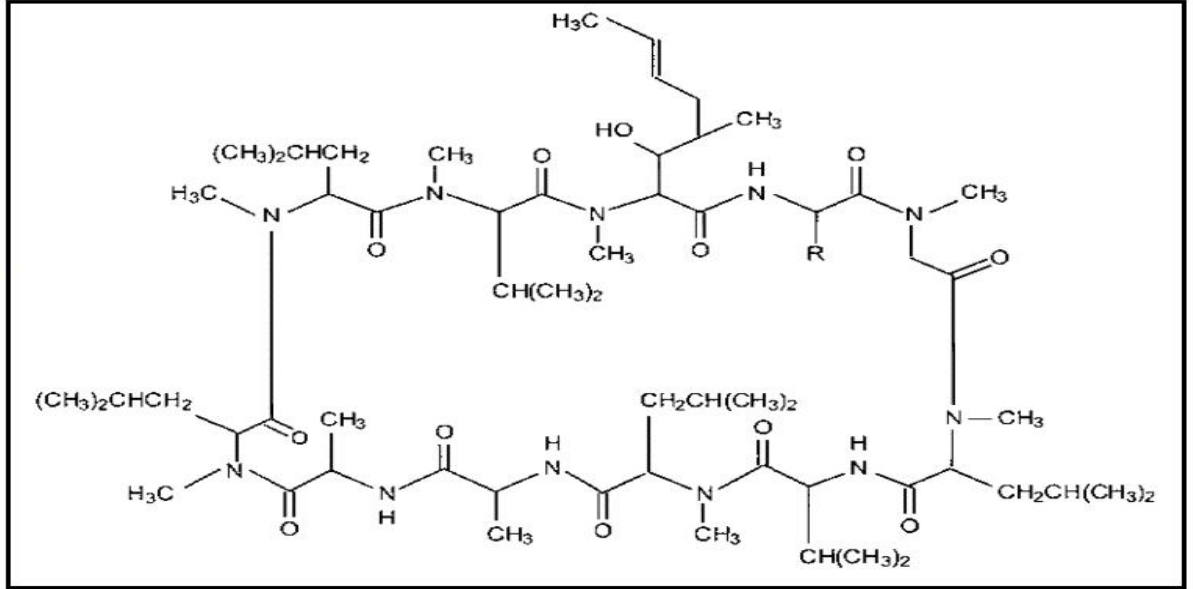
3-AB kompetitif inhibitör gibi hareket eder ve enzimle NAD⁺'in bağlandığı katalitik etki alanına bağlanıp bloke eder. Bununla birlikte DNA ya bağlanmaları, PARP'ın DNA iplikçik kırılmalarını algılamaları ve aktive olmalarının önlenmesiyle ilişkili olabilir. 3-AB; enzimleri zayıf bir şekilde inhibe ederek; hücresel alışverişi sınırlandırabilir, hücre direnç zamanını azaltabilir ve bazı nonspesifik etkiler yapabilirler (75,76).

2.7. Siklosporin A

Tolypocladium inflatum Gams adlı fungustan elde edilen, 11 amino asitli, siklik bir polipeptiddir. Kimyasal formülü C62-H111-N11-012'dir. Molekül ağırlığı yaklaşık olarak 1200 KD olan CsA nötr bir bileşiktir.

Lipofiliktir. Beyaz veya beyazımsı tozdur. Pratik olarak suda çözünmez, ancak etanolde, pek çok organik çözücüde ve lipidlerde oldukça fazla çözünür. Siklik yapısına bağlı olarak çok dayanıklı bir bileşiktir, ancak dayanıklılığı sınırsız değildir.

Hava geçirmeyen ambalaj içinde güneşten korunarak saklanmalıdır. Dehidratasyon, [MeBmt1] yan zincirinin kaybı, fotooksidasyon, açık zincirli oligopeptit yapıların oluşması ve izosiklosporin A'nın oluşması gibi kararsızlıkları bildirilmiştir (81).



Şekil 5. Siklosporin A'nın Kimyasal Yapısı (The Merck Index, 1989)

2.7.1. Siklosporin A'nın Etki Mekanizması

Solid organ transplantlarının reddini kontrol etmek ve otoimmün hastalıkları tedavi etmek için bir immunosüpresan olarak yaygın bir şekilde kullanıldığından, etki mekanizması kapsamlı bir şekilde çalışılmıştır. Etki mekanizması hakkındaki çalışmalar ilk önce molekülün T lenfositlerinin aktivasyonunu inhibe edebilmesine odaklanmıştır. Daha sonra, siklosporinin çeşitli hücre tiplerinde apoptozisin inhibe edilmesi gibi başka aktivitelere de sahip olduğu anlaşılmıştır.

Siklosporinin bu etkilerine, siklofilin A ve siklofilin D olarak adlandırılan iki sitoplazmik proteine bağlanması aracılık eder. Siklofilinler, hatalı katlanmış proteinlerin doğru katlanmasını katalize eden şaperonin aktivitesine sahip proteinler olan peptidil-prolil izomerazlardır (82). Siklosporinin siklofilin A'ya bağlanması, T-hücre aktivasyonunu sağlayan nükleer faktör ile etkileşerek T-lenfosit aktivasyonunun inhibisyonuna yol açar. Siklosporin-siklofilin A kompleksi kalsinörine (serin-treonin fosfataz) bağlanır ve aktivitesini inhibe eder. Kalsinörin, hücre içi kalsiyum düzeyi artışına yanıt olarak hücre sitoplazmasında T-hücre

aktivasyonu için nükleer faktörü (NF) defosforile eder. Defosforile olmuş nükleer faktör daha sonra nükleusa taşınır, orada T-hücre aktivasyonuna katılan bazı protein ürünlerinin gen transkripsiyonunu hızlandırır.

Siklofilin D'ye siklosporin bağlanması apoptozisi inhibe edici etkisinden primer olarak sorumlu olduğuna inanılmaktadır. Siklosporin-siklofilin D kompleksi mitokondriyel permeabilite geçiş (MPTP) kanalına bağlanır ve açılmasını önler. Hücrel stres veya hasara yanıt olarak bu kanalın açılması apoptozis kaskadında birinci basamaktır. MPTP kanalı açıldığında mitokondriyel proteinler intermembran aralığından geçerler. DNA'yı parçalayan nükleazlar ve sitokrom c doğrudan apoptoziste etki ederler ve kaspazları aktive ederler (116,117).

2.7.2. Siklosporin A'nın Farmakokinetik Özellikleri

Organ nakillerinde ve otoimmün rahatsızlıkların tedavisinde en etkili etken maddelerden birisi olan CsA'nın dar terapötik pencereye sahip olması ve absorpsiyon, dağılım, metabolizasyon ve eliminasyonunda bireylerarası çeşitlilik olması nedeniyle, başarılı bir tedavi için kan seviyelerinin takip edilmesi gerekmektedir (118). Maddenin absorpsiyonunun dozaj şeklinin yapısı ve hastanın durumuna bağlı olarak sınırlanması ile absorpsiyonu %10–89 aralığında farklı değerlere ulaşabilmektedir. Kanda istenilen etken madde düzeylerine ulaşmak ise, oluşturduğu farklı biyoyararlanım sonuçlarına bağlı olarak güç olmaktadır. Sudaki çözünürlüğünün pratik olarak olmaması nedeniyle, su ile temasta madde katı hale dönüşüp ayrılma eğilimi göstermektedir (119).

Lipofilik yapısı nedeniyle, CsA, 3–5 l/kg gibi büyük bir oranda kan dışına dağılır. Kan ile plazma arasındaki bu dağılım sıcaklığa bağlı olarak değişebilmektedir. Plazmada ise büyük oranda lipoproteinlere bağlanır.

CsA'nın metabolizması yaşa bağımlıdır ve CsA klirens oranı 0.38–3 l/kg ile doğrusal eliminasyon göstermektedir (120). Erişkinlerle çocuklar karşılaştırıldığında, klirens ve eliminasyonları arasında 1.5-2.5 kat oynama olabilmektedir. CsA absorpsiyonu erişkinlere oranla çocuklarda düşük olduğu için bu hastaların doz miktarı arttırılabilir. Çocuklarda klirensin yüksek olmasının nedeni tam olarak anlaşılamamıştır (120). Maddenin eliminasyon yarı ömrünün 19 saat olarak

ölçüldüğü çalışmalar mevcuttur; gerçek değer ise büyük olasılıkla bu değer daha altında olduğu düşünülmektedir. Birçok çalışmada, CsA'nın eliminasyon yarı ömrü 8 saat olarak belirtilmektedir. Oral uygulamanın ardından, dozun % 90'ı safra ile (<% 1 değişmeden) ve % 6'sı idrarla (< % 0.1 değişmeden) atılmaktadır (120).

CsA'nın metabolizasyonundan sorumlu olan sitokrom P450III A enzimleri, ketakonazol, diltiazem ve eritromisin gibi başka maddelerin de metabolizasyonunu gerçekleştirdikleri için, bu maddelerin varlığında CsA'nın sistemik konsantrasyonunda artış olmaktadır. Bunun yanı sıra, bu maddeler P-glikoproteine de bağlanarak metabolik inhibisyon ile birlikte EM'nin absorpsiyonuna etki ederler.(121)

2.7.3. Siklosporin A'nın Yan Etkileri ve Toksikitesi

CsA'nın önemli yan etkileri arasında, nefrotoksikite, titreme, özellikle kadınlarda tüylenmede artış, yüksek tansiyon (122), diş etlerinde şişme ve organ nakillerinin ardından görülen lenfoproliferatif rahatsızlıklar sayılabilir. Ayrıca, renal vasokonstrüksiyona neden olmakta ve glomerüler filtrasyon oranını da azaltmaktadır (122). Uzun süreli kullanımı sonucu, kansızlık, kemik iliğinde gelişim bozukluğu, karaciğer iltihabı ve renal tübüler hücre hasarı, lenfositlerde azalma (lymphopenia) gibi zararlı ama geri dönüşümlü olan etkiler de oluşturmaktadır (123).

GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Gereç

3.1.1. Kullanılan Deney Hayvanları

Çalışmamızda Dicle Üniversitesi Sağlık Bilimleri Uygulama ve Araştırma Merkezinden temin edilen her iki cinsiyetten 250-350 g ağırlığında 40 adet Wistar-Albino sıçan kullanıldı.

02/03/2011 tarihli 2 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

Siklosporin A (Santa Cruz Biotechnology), 3-Aminobenzamid (Santa Cruz Biotechnology), Ketamin HCL (Ketalar 50 mg/ml, 10 ml flakon, Pfizer), Ksilazin (Rompun %2, Bayer), Heparin (Liquemine), Trifenil Tetrazolium (TTS)(Santa Cruz Biotech.), Sodyum dihidrojen fosfat (NaH_2PO_4)(Sigma Chemical Co.), Disodyum Hidrojen Fosfat (Na_2HPO_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 sirkülatör 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 1’de belirtilen miktarda maddelerin hassas terazi ile tartıldıktan sonra distile suda çözülmesiyle günlük olarak hazırlandı. Solüsyon kullanılmadan önce filtreden geçirildi.

Tablo 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

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

Anestezi altında (75 mg/ kg ketamin hidroklorid and 8 mg/ kg ksilazin, intraperitoneal) ve heparinize (sodyum heparin 100 IU /sıçan i.p.) 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 18 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 atriya küçük bir kesi atıldı. Bu kesi vasıtasıyla basınç değişikliklerinin algılayan lateks balon sol atriya 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 probalar 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 gruptaki kalpler, litrede 0,3µM Siklosporin A ve/veya 0,2 mM 3-Aminobenzamid (3-AB) 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 60 dakika süreyle sınırlandırıldı.

İlaçlı grupta reperfüzyon 0,3µM Siklosporin A ve/veya 0,2 mM 3-Aminobenzamid (3-AB içeren Tyrode solüsyonu ile sağlandı. İlaç uygulanmayacak grupta ise perfüzyon ve reperfüzyon Tyrode solüsyonu ile yapıldı. Deneysel süreç boyunca kalpten dönen perfüzyondan 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 + 120 dk. Tyrode solüsyonu perfüzyonu

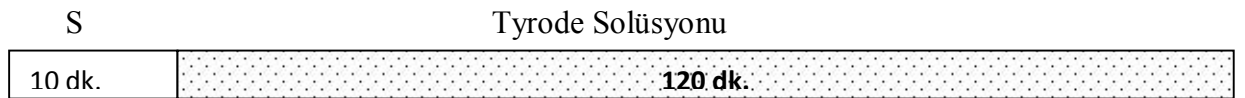
Grup 2: Kontrol grubu: 10 dk. stabilizasyon + 30 dk. Tyrode solüsyonu perfüzyonu + 30 dk. iskemi + 60 dk. Tyrode solüsyonu ile reperfüzyon

Grup 3: 3-AB grubu: 10 dk. stabilizasyon + 30 dk. Tyrode/3 –aminobenzamide solüsyonu perfüzyonu + 30 dk. iskemi + 60 dk. Tyrode/3-aminobenzamid solüsyonu perfüzyonu

Grup 4: CsA grubu: 10 dk. stabilizasyon + 30 dk. Tyrode/Siklosporin A solüsyonu perfüzyonu + 30 dk. iskemi + 60 dk. Tyrode /Siklosporin A solüsyonu perfüzyonu

Grup 5: 3-AB+CsA grubu: 10 dk. stabilizasyon + 30 dk. Tyrode/3-aminobenzamid /Siklosporin A solüsyonu perfüzyonu + 30 dk. iskemi + 60 dk. Tyrode/3-aminobenzamid/Siklosporin A solüsyonu perfüzyonu

Grup1: Sham Opere



Grup 2: Kontrol



Grup 3: 3-AB grubu



Grup 4: CsA grubu



Grup 5: 3-AB + CsA grubu



Şekil 6: Çalışma her grupta 8 hayvan olacak şekilde beş grup üzerinden planlanmıştır.

S: Stabilizasyon, 3-AB: 3 amino-benzamid, CsA: Siklosporin A

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 alınmıştır. 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 hesaplanmıştır.

3.2.3. Laktat Dehidrojenaz Analizi

Laktat dehidrojenaz (LDH) analizi yapamak amacıyla stabilizasyonun sonunda, iskeminin öncesinde ve reperfüzyonun 0 ve 30. dakikalarında kalpten dönen perfüzyattan örnekler alındı. Alınan örnekler çalışmanın tamamlanmasına kadar geçen sürede -20°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°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°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

kopya edildi. (Miyokardiyal iskemi-reperfüzyonda nekrotik alanın değerlendirilmesi. Ercüment Ölmez İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı. <http://www.ctf.edu.tr/farma/tfd/gaziantepolmez.pdf>)

Asetat üzerine kopya edilen kalp dilimlerinin görüntüsünden nekroz alanının tayini için mevcut olan ağırlık ve hacim metodlarının her ikisi de 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 metot içinde nekrotik alana ait ağırlık veya hacim cinsinden değerlerin aynı kalpten elde edilen tüm kalbe ait değere oranlamasıyla yüzde cinsinden nekroz alanı verisi elde edildi. (Miyokardiyal iskemi-reperfüzyonda nekrotik alanın değerlendirilmesi. Ercüment Ölmez İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı. <http://www.ctf.edu.tr/farma/tfd/gaziantepolmez.pdf>)

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

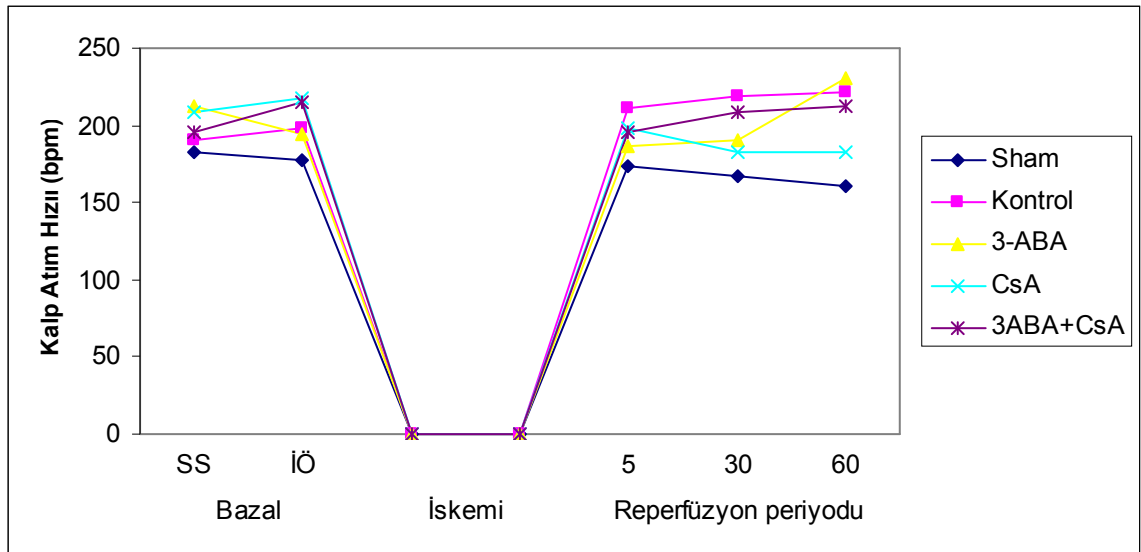
Grupların kalp atım hızı, koroner perfüzyon basıncı, LVDP, dP/dt max dP/dt min verileri Tablo 2’de gösterilmiştir.

Kalp Atım Hızı (bpm)						
	Bazal		Reperfüzyon periyodu			
	Stab. Sonu	İskemi Öncesi	5. dk	30. dk	60. dk	
Sham	182±23	178±21	174±11	167±18	161±22	
Kontrol	190±17	198±34	211±61	219±32	222±44	
3-AB	213±31	194±24	187±57	191±29	231±66	
CsA	209±44	217±28	198±50	182±32	182±35	
3-AB+CsA	195±34	215±48	195±31	208±40	213±80	
Koroner Perfüzyon Basıncı (mmHg)						
Sham	76±12	71±5	70±8	75±9	82±11	
Kontrol	69±8	72±7	111±11*	125±14*	133±32*	
3-AB	75±31	83±16	93±13σ	99±13ç	102±12 σ	
CsA	66±12	73±12	89±10 σ	93±8 ç	103±11 σ	
3-AB+CsA	76±10	82±10	108±16	125±14	147±20	
LVDP (mmHg)						
Sham	70±6	71±12	69±7	71±9	68±14	
Kontrol	67±14	67±9	26±8*	27±3 *	27±3 *	
3-AB	74±13	67±6	38±7 σ	42±12ç	46±8ç	
CsA	71±9	71±9	42±7ç	42±3ç	43±6ç	
3-AB+CsA	70±9	59±27	36±7	32±4	32±6	
dP/dt max (mmHg/sn)						
Sham	928±79	944±110	926±44	906±28	884±43	
Kontrol	1013±87	940±98	282±34*	277±43*	290±44	
3-ABA	996±74	929±118	578±157ç	558±125ç	551±119ç	
CsA	934±101	945±102	544±51ç	490±80ç	467±63ç	
3ABA+CsA	953±86	893±137	464±88 σ	404±63 σ	415±91 σ	
dP/dt min (mmHg/sn)						
Sham	867±125	884±68	877±36	856±60	846±32	
Kontrol	896±84	813±75	332±58*	337±61*	353±41*	
3-AB	832±77	819±83	549±38ç	543±69ç	604±103ç	
CsA	864±80	834±71	474±36ç	484±118ç	519±119ç	
3-AB+CsA	847±95	873±72	410±37ç	431±36	446±62	

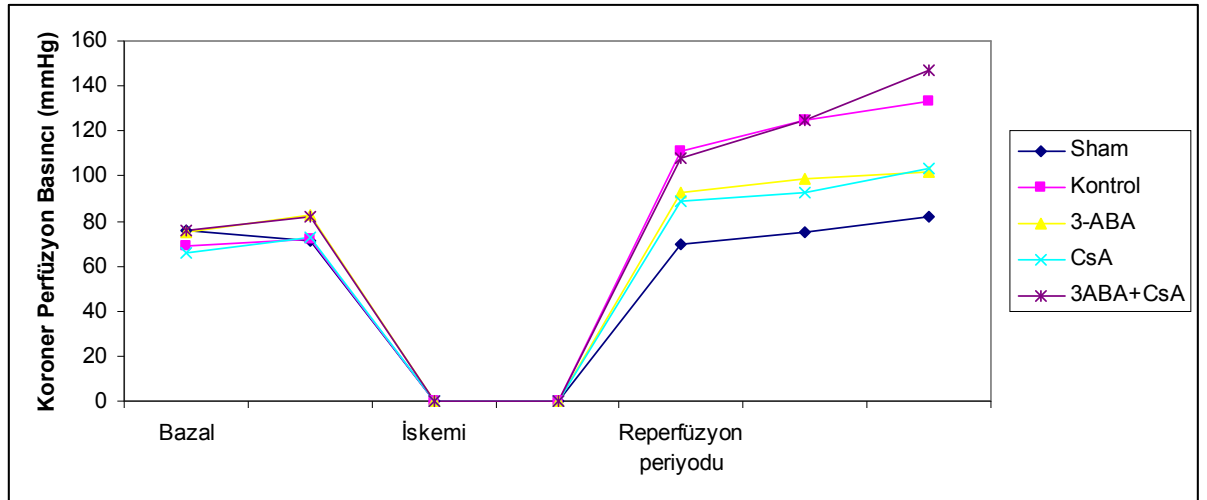
p< 0,001 vs sham , σ p< 0,05 vs kontrol , ç p<0,01 vs kontrol

Tablo 2: Grupların hemodinamik parametreleri aritmetik ortalama±standart sapma olarak verilmiştir. 3-AB: 3-aminobenzamid, CsA: Siklosporin A, LVDP: Left Ventricular Developed Pressure

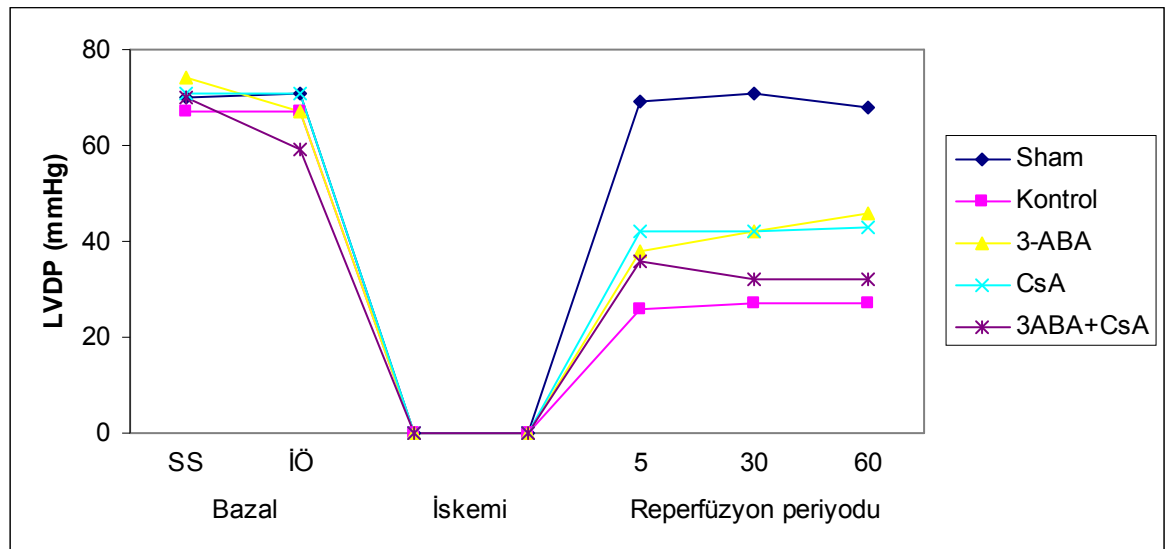
Kalp atım hızı açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p>0.05$) (Tablo 2, Şekil 7). Diğer hemodinamik parametreler açısından yapılan analizlerde kontrol grubunda sham opere grubuna göre koroner perfüzyon basıncının anlamlı olarak yükseldiği, LVDP, dP/dt max, dP/dt min değerlerinin ise anlamlı olarak düştüğü gözlenmiştir. Madde içeren gruplarda ise kontrol grubunda gözlenen değişikliklerin anlamlı olarak düzeldiği gözlenmiştir (Tablo 2, Şekil 8-11). Her iki maddenin eş zamanlı olarak uygulandığı 3-AB+CsA gruba ait hemodinamik parametrelerin maddelerin ayrı ayrı uygulandığı 3-AB ve CsA gruplarda elde edilen verilerle yapılan karşılaştırmada istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık tespit edilememiştir. ($p>0.05$) (Tablo 2, Şekil 7-11).



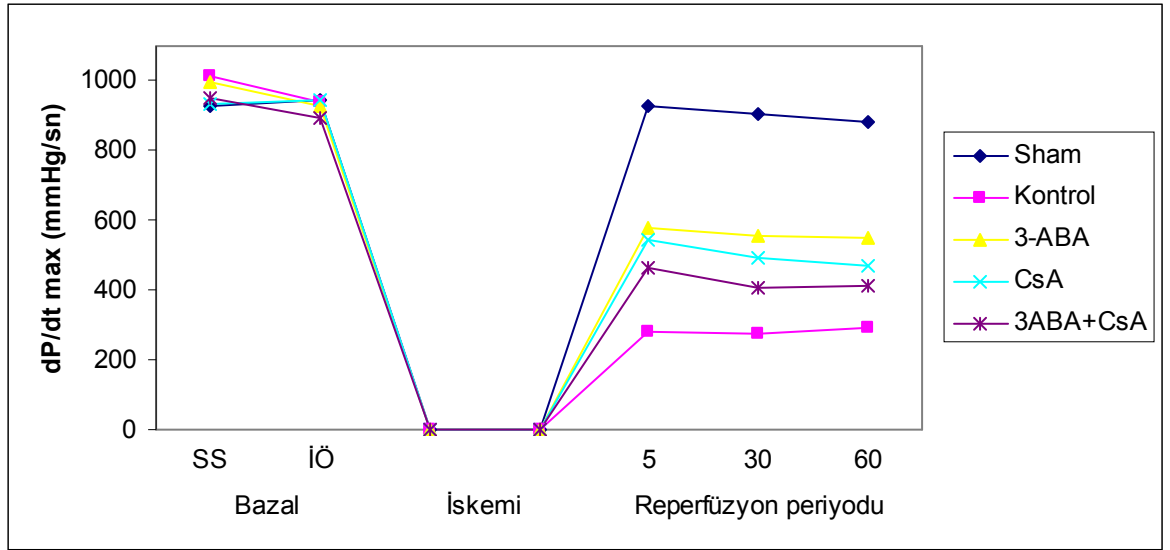
Şekil 7: Grafik 1: Kalp atım hızları. 3-AB: 3-Aminobenzamid, CsA: Siklosporin A
SS: Stabilizasyon sonrası, İÖ: İskemi öncesi



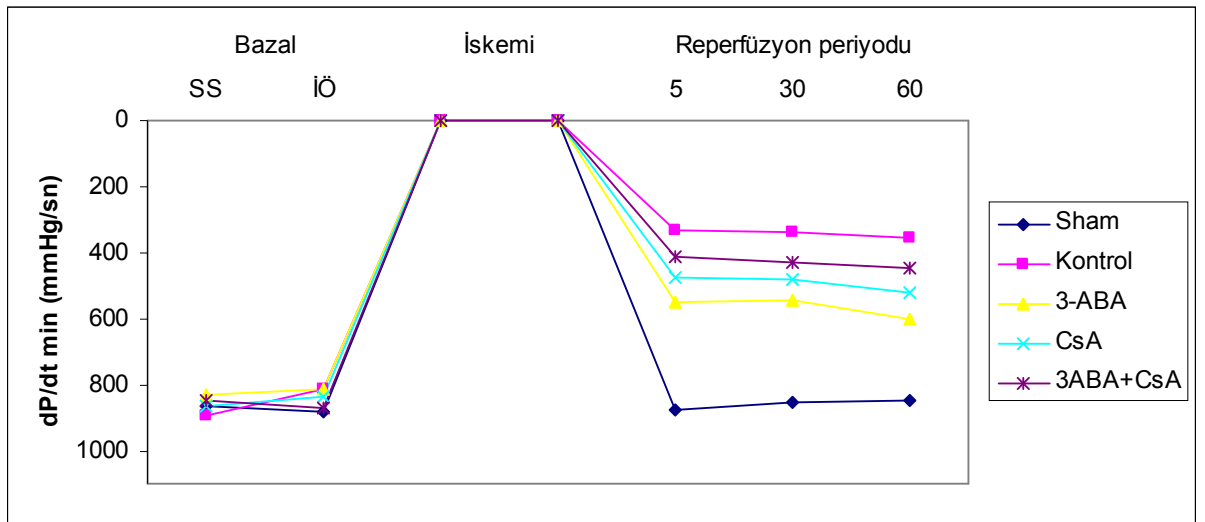
Şekil 8: Grafik 2: Koroner perfüzyon basınç değerleri. 3-AB: 3- Aminobenzamid, CsA: SiklosporinA, SS: Stabilizasyon sonrası, İÖ: İskemi öncesi



Şekil 9: Grafik 3: LVDP değerleri. 3-AB: 3-Aminobenzamid, CsA: Siklosporin A, SS: Stabilizasyon sonrası, İÖ: İskemi öncesi



Şekil 10: Grafik 4: dP/dt max değerleri, 3-AB: 3-Aminobenzamid, CsA: Siklosporin A, SS:Stabilizasyon sonrası, İÖ: İskemi öncesi



Şekil 11: Grafik 5: dP/dt min değerleri. 3-AB: 3-Aminobenzamid, CsA: Siklosporin A, SS:Stabilizasyon sonrası, İÖ: İskemi öncesi

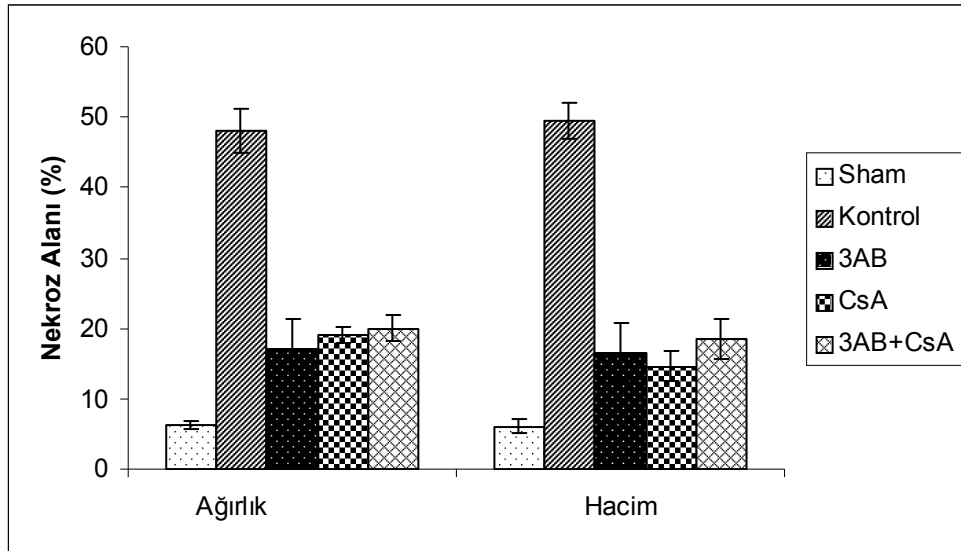
4.2. Nekroz Alanı Bulguları

Ağırlık ve hacim açısından yapılan analizlerde kontrol grubundaki nekroz alanı sham opere grubun nekroz alanı ile karşılaştırıldığında belirgin olarak arttığı gözlenirken, madde içeren gruplardaki (3-AB, CsA ve 3-AB+CsA) nekroz alanının ise kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı olarak azaldığı gözlenmiştir (Tablo 3). Madde içeren gruplar arasında yapılan karşılaştırmada ise her iki maddenin aynı zamanda verildiği 3-AB+CsA gruptaki nekroz alanının maddelerin ayrı ayrı uygulandığı 3-AB ve CsA gruplarına göre yapılan karşılaştırmada istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık tespit edilememiştir (Tablo 3).

Tablo 3 : Grupların nekroz alanı yüzdeleri aritmetik ortalama±standart sapma olarak verilmiştir. 3-aminobenzamid CsA: Siklosporin A

	Nekroz Alanı (%)	
	Ağırlık	Hacim
Sham	6,3±0,5	6,0±1,0
Kontrol	48,0±3,17**	49,5±2,6**
3AB	17,2±4,2*	16,6±4,1*
CsA	19,1±1,2*	14,6±2,1*
3AB+CsA	20,5±1,9*	18,5±2,9*

* p< 0.001 vs kontrol, ** p< 0.001 vs sham



Şekil 12: Grafik NA: Grupların nekroz alanı yüzdeleri aritmetik. 3-AB: 3-aminobenzamid CsA: Siklosporin A

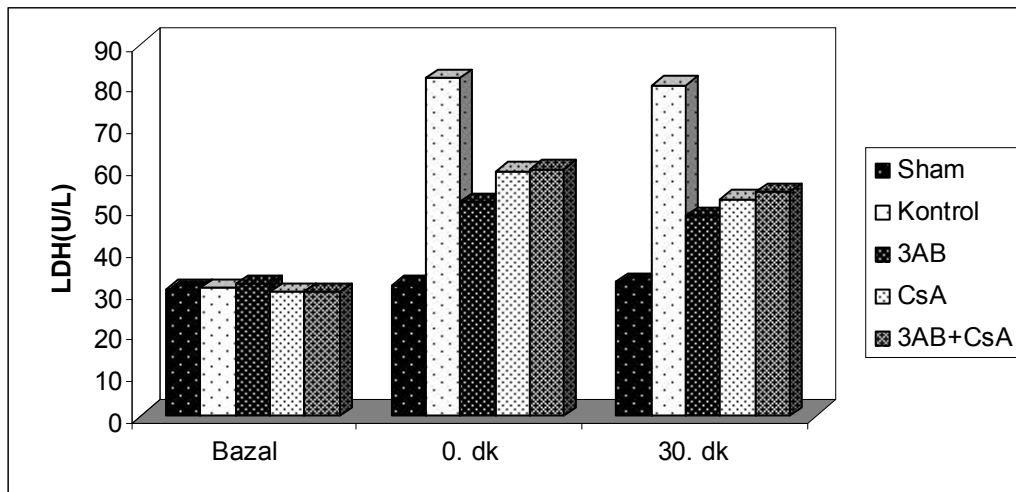
4.3. LDH Bulguları

İskemi öncesi grupların bazal LDH değerleri açısından yapılan istatistiksel analizde veriler arasında anlamlı bir farklılık saptanmamıştır ($p>0.05$) (Tablo 4, Şekil 13). Reperfüzyonun 0 ve 30. dakikalarında alınan perfüzyat örneklerinden elde edilen LDH değerleri arasında yapılan karşılaştırmada kontrol grubuna ait LDH düzeyi sham opere grubuna ait LDH düzeyine göre anlamlı olarak yüksek bulunurken ($p<0.001$) (Tablo 4, Şekil 13), madde içeren gruplara (5-AIQ, Zoniporide ve Mix) ait LDH değerleri kontrol grubuna göre anlamlı olarak düşük bulunmuştur ($p<0.001$) (Tablo 4, Grafik 13). İlaçlı gruplar arasında LDH değerleri açısından yapılan karşılaştırmada anlamlı bir farklılık bulunmamıştır ($p>0.05$) (Tablo 4, Şekil 13).

Tablo 4: Grupların LDH düzeyleri U/L cinsinden aritmetik ortalama±standart sapma olarak verilmiştir

	LDH(U/L)Reperfüzyon		
	Bazal	0.dk	30.dk
Sham	30,7±3,8	31,7±1,6	32,5±1,8
Kontrol	30,9±3,6	81,7±5,5*	80,2±8,2*
3AB	31,8±8,4	51,8±6,5**	48,5±5,1**
CsA	30,0±4,0	59,3±2,8**	52,6±4,6**
3AB+CsA	30,1±4,6	59,7±9,2**	54,3±3,9**

*p <0.001 sham grubu ile karşılaştırıldığında, ** p <0.001 sham ve kontrol grupları ile karşılaştırıldığında



Şekil 13: Grafik LDH: Grupların LDH düzeyleri 3-AB:3-aminobenzamid CsA: Siklosporin A

TARTIŞMA

İskemi reperfüzyon (İR) hasarı olarak adlandırılan, birçok yerle birlikte kalp damarlarında da görülen, kalp damarlarının bir süreliğine tıkanması sonucu oksijensiz kalan ve damarın tekrar açılması ile tekrar oksijenlenen kalp kası dokusunun oksijensiz kaldığı sürece hasarlanması ancak kanlanmanın tekrar olmasıyla yeniden oksijenlenen bu dokunun daha fazla hasar görmesi durumudur. Sonuçta nekroz adını verdiğimiz ve özellikle kalp kasında bilgilerimize göre geri dönüşümsüz hasarlar meydana gelir. Kalp kası gördüğü hasarla orantılı olarak fonksiyonunu yitirir. Kalp krizi olarak nitelendirilen, kalbin pompa görevini sürdürmesini engelleyen, ölümcül bir durumdur. Birçok çalışma bu durumu ve sonuçlarını engellemek amacıyla yapılmaktadır. Buradan yola çıkarak bizde in vitro deneysel iskemi reperfüzyon sistemlerinden biri olan Langendorff izole perfüze kalp sisteminde iskemi ve reperfüzyon aşamalarında oluşan hasarı azaltmaya yönelik çalıştık.

Daha önce Langendorff sisteminde yapılan çalışmalar; 30 dk. iskemi ve ardından 30 dk. reperfüzyonun, iskemi-reperfüzyon hasarı oluşturmada yeterli olduğunu ortaya koymuştur (91). Halmos ve ark. yaptığı çalışmada ise 25 dk. iskemi ve 15 reperfüzyon sonucunda da iskemi reperfüzyon hasarının oluştuğunu göstermişlerdir (93). Bu çalışmaları göz önüne alarak bizde çalışmamızda 30 dk. iskemi ve hemen ardından 60 dk. reperfüzyon protokolü uyguladık. Bu çalışmada tüm protokol boyunca kalbe ait hemodinamik parametreler kayıt altına alınmış, perfüze örneklerinden LDH düzeyleri analiz edilmiş ve çalışmanın sonunda kalp dokusunda nekroz alanı tayini yapılmıştır. Uyguladığımız protokole sham opere grubuna göre kontrol grubunda tüm reperfüzyon süreci boyunca koroner perfüzyon basıncı anlamlı olarak yüksek, LVDP, dP/dtmax, dP/dtmin değerleri ise anlamlı olarak daha düşük bulunmuştur. Reperfüzyonun 0. ve 30. dakikalarında alınan perfüze örneklerindeki LDH düzeyi ile hacim ve ağırlık metotlarıyla tayin edilen nekroz alanı yüzdeleri kontrol grubunda sham opere grubu göre belirgin ölçüde yüksek bulunmuştur. Çalışmamızda elde ettiğimiz bu sonuçlar uyguladığımız protokolün yeterli düzeyde iskemi reperfüzyon hasarına yol açtığını göstermektedir.

Çalışmamızda İzole perfüze rat kalbinde myokardiyal iskemi reperfüzyon hasarı üzerine 3-aminobenzamid ve siklosporin A kombinasyonunun muhtemel koruyucu etkilerinin araştırdık. 3-Amino benzamid ise PARP enzim inhibisyonuyla özellikle reperfüzyon döneminde aşırı NAD⁺ ve ATP kaybının önüne geçerek kalpte iskemi reperfüzyon hasarın karşı koruyucu etkiler gösterdiği yapılan birçok çalışma ile gösterilmiştir (93,94). Siklosporin A; mitokondriyal permeabilite transitini siklofilin D'ye bağlanarak inhibe ettiği gösterilmiştir. Kalpte reperfüzyon hasarına karşı koruyucu etkisi de gösterilmiştir (92). Ancak Siklosporin A kullanımını kısıtlayan en önemli durum mitokondrideki kuvvetli stimulus durumunda bu maddenin por açılmasını inhibe etmede yetersiz kalmasıdır.

Bizim çalışmamızda kuvvetli PARP inhibitörü 3-aminobenzamid ile bir taraftan enerji kaynaklarının tüketimi engellenir ve güçlü stimulus baskılanırken diğer taraftan siklosporin A ile mitokondri iç membranındaki MPTP'nin inhibisyonu birlikte sağlanır ise miyokardiyal reperfüzyon hasarının tek başına PARP inhibisyonunun ya da tek başına MPTP baskılanmasının sağladığı korumayı potansiyelize edip etmeyeceğinin kalbe ait hemodinamik parametreler, LDH ve nekroz alanı değerleriyle ortaya konulmaya çalışılmıştır.

Birçok iskemi-reperfüzyon çalışmalarında MPTP'nin hücre ölümü açısından kritik öneme sahip olduğu gösterilmiştir. MPTP çeşitli patolojik durumlarda mitokondri iç membranından oluşur ve açılır. MPTP'nin indüksiyonu çeşitli durumlarda hücre ölümünden sorumludur (95). MPTP iskemi tarafından oluşturulan kalp krizi ve inme gibi durumlarda anahtar rol oynamaktadır. Çalışmalar MPTP'nin iskemi esnasında kapalı durumda olduğunu ancak iskemik periyoddan sonra reperfüzyonda açıldığını ve reperfüzyon hasarından ağırlıklı olarak sorumlu olabileceği göstermiştir (96,92). MPTP'nin aktive olması mitokondri morfolojisine de zarar vererek işlevini kaybetmesine neden olmaktadır. Bu nedenle kardiyak enerji üretiminin normalizasyonunda mitokondrinin oksidatif hasardan korunması önemli bir basamak gibi görünmektedir. (96) Siklosporin A adlı madde MPTP'nin önemli bir inhibitörüdür. Siklosporin A mitokondriyal permeabilite transitini siklofilin D'ye bağlanarak inhibe ettiği gösterilmiştir. (97)

Bradley G. Leshnower ve arkadaşları yaptıkları çalışmada siklosporin A'nın iskemi reperfüzyon protokolü uygulanandığında myositlerdeki nekrozu ve apoptozu kontrol grubuna göre anlamlı ölçüde sınırladığını ve nekroz alanında %20 oranında azalma yaptığını göstermiştir. Bunun için elektron mikroskopunda yaptıkları incelemede; iskemi reperfüzyon sonucu kontrol grubundaki hücrelere göre CsA grubundaki hücrelerde anlamlı ölçüde daha az morfolojisi bozulmuş mitokondriye rastlandığını göstermiştir. Hemodinamik parametreler de CsA'nın iskemi reperfüzyon hasarına karşı koruyucu olduğu göstermiştir (92).

Bu çalışmada etkisini araştırdığımız diğer madde 3-AB'in kullanıldığı bir çalışmada izole rat kalbine iskemi reperfüzyon protokolü Langendorff kalp siteminde uygulanmıştır. Kalp ritmi ve koroner akım hızı açısından yapılan incelemelerde bu değerlerin 3-AB uygulanmasıyla korunduğu gözlenmiştir. Ayrıca nekroz alanının ölçülmesiyle de kontrol grubuna göre anlamlı ölçüde nekroz alanını azalttığı da gözlenmiştir (98). PARP inhibitörlerini kullanıldığı başka bir çalışmada ise iskemi reperfüzyon hasarına karşı enzim inhibisyonunun sol ventrikül fonksiyonlarının bir göstergesi olan LVDP ve dp/dt_{max} değerleri üzerinde de koruyucu etki gösterdiği tespit edilmiştir (99).

Çalışmamızda iskemi reperfüzyon hasarına karşı siklosporin A ve 3-AB kullandığımız kalplerden elde ettiğimiz hemodinamik veriler literatür bilgileriyle uyumluluk göstermektedir. Siklosporin A ve 3-AB uygulanan gruplarda koroner perfüzyon basınç değerlerinin kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı derecede korunduğu gözlenmiştir. Siklosporin A ve 3-AB maddelerinin ayrı ayrı kullanıldığı grupları her ikisinde de LVDP, sol ventrikül kasılma hızını ifade eden dp/dt_{max} ve sol ventrikül gevşeme hızını ifadesi olan dp/dt_{min} değerlerin kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı olarak korunduğunu tespit ettik. Bu sonuçlar bize Siklosporin A ve 3-AB adlı maddelerin izole perfüze kalp preparatlarında oluşturulan iskemi reperfüzyon hasarına karşı sol ventrikül fonksiyonlarını koruduğunu göstermektedir.

Her iki maddenin eşzamanlı olarak uygulandığı 3-AB+CsA adlı gruptan elde edilen hemodinamik veriler ile maddelerin ayrı ayrı kullanıldığı gruplardan elde edilen veriler arasında yapılan karşılaştırmada anlamlı bir farklılık tespit edilememiştir. Yani 3-AB ve CsA eşzamanlı olarak uygulanması kalp fonksiyonlarını koruma açısından ayrı ayrı uygulanmasına göre bir avantaj sağlamamıştır.

Yapılan iskemi reperfüzyon çalışmalarında LDH düzeyindeki yükselmenin miyokardiyal hasarın önemli bir biyokimyasal göstergesi olduğu gösterilmiştir. Bu konuda yapılan çalışmalarda perfüzyondaki LDH düzeyinin reperfüzyonun hemen başında ve 30. dakikasında olduğu tespit edilmiştir. Reperfüzyonun başında olan yükselme daha çok iskemi dönemindeki hasarı gösterirken, reperfüzyonun 30 dakikasında hasar ise daha reperfüzyon dönemindeki hasarın bir göstergesi olarak kabul edilmiştir (100). İskemi reperfüzyon hasarına karşı MPTP inhibitörü Siklosporin A veya PARP inhibitörlerinin kullanıldığı çalışmalarda bu maddelerin miyokardiyal hasarı engellediği ve LDH düzeylerinde buna paralel olarak seyrettiği gösterilmiştir (92,94).

Bu çalışmada 3-AB ve CsA ve bu iki maddenin birlikte uygulandığı 3-AB+CsA adlı gruptan reperfüzyonun 0 ve 30 dakikalarında alınan perfüzyat örneklerinden elde edilen LDH değerleri iskemik reperfüzyon grubundan elde edilen değerlere göre anlamlı olarak daha düşük bulundu. 3-AB+CsA adlı gruptan elde edilen LDH sonuçları 3-AB ve CsA gruplarına göre farklılık göstermemekteydi. Bu sonuçlar CsA ve 3-AB'in literatür bilgileriyle uyumlu olarak LDH düzeyini ve buna paralel olarak miyokardiyal hasarı azalttığını göstermektedir. Bu çalışmada elde ettiğimiz bir diğer parametre ise makroskopik yöntemlerle nekroz alanının hesaplanmasıdır. Makroskopik yöntemlerle nekroz alanı 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 yöntem olduğu ifade edilmiştir (101,102). İskemi reperfüzyon hasarına karşı CsA, 3-AB'in kullanıldığı çalışmalarda bu maddelerin nekroz alanını anlamlı derecede azalttığı gözlemiştir (92,94).

Bu çalışmada hem volüm hem de ağırlık yöntemleriyle elde edilen nekroz alanı yüzdelerinin kontrol grubu ile karşılaştırıldığında hem 3-AB hem de CsA

gruplarında anlamlı olarak azaldığı tespit edilmiştir. Her iki maddenin eş zamanlı olarak uygulandığı 3-AB+CsA grubunda ise maddelerin tek başlarına uygulandığı duruma göre anlamlı olarak daha iyi bir nekroz alanı gözlenmemiştir. Yani ilaçların tek başlarına kullanılmasıyla karşılaştırıldığında birlikte uygulanması nekroz alanını azaltmada ciddi bir avantaj sağlamamıştır.

SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışma ile PARP inhibitörü olan 3-AB nin ve Siklosporin A'nın izole perfüze kalp preparatlarında iskemi reperfüzyon hasarına karşı koruyucu etkilerini koroner perrüzyon basıncı, LVDP, dP/dt_{max} , dP/dt_{min} gibi kalbe ait hemodinamik veriler, LDH ve nekroz alanı tayini ile ortaya koyduk. İskemi reperfüzyon hasarının oluşumunda farklı mekanizmalara olan etkileriyle belirgin olarak düzelme sağlayan bu iki maddenin eş zamanlı olarak uygulanmasının yaratacağı sonuçları gözlemek amacıyla oluşturduğumuz grupta; yukarıda saydığımız hemodinamik parametreler ve LDH düzeyleri ve nekroz alanı açısından bir farklılık gözlemedik.

KAYNAKLAR

- 1)Kumar V, Cotran RS, Robbins SL. Çeviri Editörü: Uğur Çevikbaş. Temel Patoloji. Beşinci Baskı, İstanbul Nobel Tıp Kitabevi 1994;5:4–16
- 2)Damjanov İ, Linder J. Cell injury and cellular adaptations. Anderson's Pathology. Tenth Edition 2002;1:357–65
- 3)Hearse DJ, Humphrey SM, Bullock GR. The oxygen paradox and the calcium paradox: two facets of the same problem. *J Mol Cell Cardiol* 1978;10:641– 68
- 4)Collard CD, Gelman S. Pathophysiology, Clinical Manifestations, and Prevention of Ischemia-Reperfusion Injury. *Anesthesiology* 2001;94:1133
- 5) Li C, Jackson RM. Reactive species mechanisms of cellular hypoxia-reoxygenation injury. *Am J Physiol Cell Physiol* 2002;282 (2) (Feb):227- 241
- 6)Miki S, Ashraf M, Salka S, Sperelakis N. Myocardial dysfunction and ultrastructural alteration mediated by oxygen metabolites. *J Mol Cell Cardiol* 2003;9:641
- 7) Eng C, Cho S, Factor SM, Kirk ES. A nonflow basis for the vulnerability of the subendocardium. *J Am Coll Cardiol* 1987;9:3747–3779
- 8)Lucchesi BR. Reperfusion injuries and clinical capillary leak syndrome. Armonk NY, Future Publishing Company 1994;3:171–202
- 9)Braunwald E. Heart Disease. A textbook of cardiovascular medicine. WB Saunders Company. Fourth Edition 1992;2:1161-1199
- 10)Jennings RB, Reimer KA. The cell biology of acute myocardial ischemia. *Annu Rev Med* 1991;42:225-246
- 11)Tennant R, Wiggers CJ. The effect of coronary occlusion on myocardial contraction. *Am J Physiol* 1935;112:351-361
- 12)Jolly SR, Kane WJ, Bailie MB, Abrams GD, Lucchesi BR. Canine myocardial reperfusion injury: Its reduction by the combined administration of superoxide dismutase and catalase. *Circ Res* 1984;54:277
- 13) Lee KS, Ladinsky H, Struckey JH. Decreased Ca²⁺ uptake by sarcoplasmic reticulum after coronary artery occlusion for 60 and 90 minutes. *Circ Res* 1967;21:439–444

- 14)Kloner RA, Ellis SG, Carlson NV, Braunwald E. Coronary reperfusion for the treatment of acute myocardial infarction: post ischemic ventricular dysfunction. *Cardiology* 1983;70:233-246
- 15) Bush LR, Buja LM, Samowitz W, Rude RE, Wathen M, Tilton GD, Willerson JT. Recovery of left ventricular segmental function after long term reperfusion. *Anesthesiology* 2001;94:1133–1138
- 16) Moens A.L, Claeys M.J, Timmermans J.P, Vrints C.J. Myocardial ischemia / reperfusion - injury, a clinical view on a complex pathophysiological process. *International Journal of Cardiology* 2005;100:179– 190
- 17) Hearse DJ. Ischemia reperfusion, and the determinants of tissue injury. *Card Drugs Ther* 1990;4:767–776
- 18) Ambrosio G, Tritto I. Reperfusion injury: Experimental evidence and clinical implications. *J Am Heart* 1999;138:S69-S75
- 19) Ambrosio G, Weisman HF, Manisi JA, et al. Progressive impairment of regional myocardial perfusion after initial restoration of post-ischemic blood flow. *Circulation* 1989;80:1846–1861
- 20) Nakamura T, Vollmar B, Vinning J, Ueda M, Menger M.D, Schafers H.J. Heparin and the nonanticoagulant N-Acetyl heparin attenuate capillary no-reflow after normothermic ischemia of the lung. *Ann. Thorac. Surg.* 2001;72:1183–1189
- 21) Dutka AJ, Kochanek PM, Hallenbeck JM. Influence of granulocytopenia in canine cerebral ischemia induced by air embolism. *Stroke* 1989;20:390–95
- 22) Slater TF. Free radicals mechanisms in tissue injury. *J Biochem* 1984;222:1–15
- 23) Burçak G, Andican G. Oksidatif DNA hasarı ve yaslanma. *Cerrahpasa Tıp Dergisi* 2004;4:35-4
- 24) Konukoğlu D: *Biyokimya. Nobel Tıp Kitapevleri* 2000;5:428–429
- 25) Onat T, Emerk K, Sözmén EY. *İnsan Biyokimyası. Palme Yayıncılık* 2002;9:665-674
- 26) Philips JW. A radical view of cerebral ischemic injury. *Prog Neurobiol* 1994;42:441-448

- 27) Lucchesi BR. Modulation of leukocyte-mediated myocardial reperfusion injury. *Ann Rev Physiol* 1990;52:561-576
- 28)Şahna E. Melatoninin fizyolojik ve farmakolojik konsantrasyonlarının miyokardiyal iskemi-reperfüzyona bağlı aritmiler ve nekroz üzerine etkisi. Doktora Tezi 2001
- 29) Jennings RB, Ganote GB, Kloner RA, Whalen DA, Hamilton DG. Explosive swelling of myocardial cells irreversibly injured by transient ischemia. In: *Recent Advances in Studies on Cardiac Structure and Metabolism. Vol 6: Pathophysiology and Morphology of Myocardial Cell Alteration.* Baltimore, Md: University Park Press. 1975;8:405–413
- 30) Freeman BA, Crapo JD. Biology of disease: Free radicals and tissue injury. *Lab Invest* 1982;47 (5):412–426
- 31) Kılıç E. Pinealektomi yapılmış sıçanda melatoninin beyin fokal iskemi reperfüzyon hasarına etkileri. Uzmanlık Tezi. 1999
- 32) Cheung JY, Bonventre JV, Malis CD, Leaf A. Calcium and ischemic injury. *N Engl J Med* 1986;314:1670–1676
- 33) Harman AW, Maxwell MJ. An evaluation of the role of calcium in cell injury. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1995;35:129-144
- 34) Lucchesi BR, Mullane KM. Leucocytes and ischemia-induced myocardial injury. *Ann Rev Pharmacol Toxicol* 1986;26:201-224
- 35) Jolly SR, Kane WJ, Hook BG, Abrams GD, Kunkel SL, Lucchesi BR. Reduction of myocardial infarct size by neutropil depletion: effect of duration of occlusion. *J Am Heart* 1986;112:682–690
- 36)Pagliaro P, Chiribiri A, Mancardi D, Rastaldo R, Gattullo D, Losano G. Coronary endothelial dysfunction after ischemia and reperfusion and its prevention by ischemic preconditioning. *Ital Heart* 2003;4 (6):383–394
- 37) Birincioğlu M. İskemi-reperfüzyon aritmilerine ACE inhibitörleri, Glutation ve indometazinin etkileri. Uzmanlık Tezi. 1996
- 38) Maroko PR, Carpenter JB, Chiariello M, Fishbein MC, Radvany Pknotsman JD, Hale SL. Reduction by cobra venom factor of myocardial necrosis after coronary artery occlusion. *J Clin Invest* 1978;61:661–670

- 39) Kloner RA, Arimie RB, Kay GL, Cannon D, Matthews R, Bhandari A. Evidence for stunned myocardium in humans: a 2001 update. *Coron. Artery Dis* 2001;12 (5):349–356
- 40) Braunwald E, Kloner RA. The stunned myocardium: prolonged, postischemic ventricular dysfunction. *Circulation* 1982;66 (6):1146–1149
- 41) Heyndrickx GR, Millard RW, McRitchie RJ, Maroko PR, Vatner SF. Regional myocardial functional and electrophysiological alterations after brief coronary artery occlusion in conscious dogs. *J. Clin. Invest* 1975;56 (4):978–985
- 42) Kloner RA, Jennings RB. Consequences of brief ischemia: stunning, preconditioning, and their clinical implications: part 1. *Circulation* 2001;104 (24):2981–2989
- 43) Kloner RA, Jennings RB. Consequences of brief ischemia: stunning, preconditioning, and their clinical implications: part 2. *Circulation* 2001;104 (25):3158–3167
- 44) Bolli R. Oxygen-derived free radicals and postischemic myocardial dysfunction (“stunned myocardium”). *J. Am. Coll. Cardiol* 1988;12 (1):239–249
- 45) Manning AS, Hearse DJ. Reperfusion-induced arrhythmias: mechanisms and prevention. *J. Mol. Cell. Cardiol* 1984;16 (6):497–518
- 46) Kaeffer N, Richard V, Francois A, Lallemand F, Henry JP, Thuillez C. Preconditioning prevents chronic reperfusion-induced coronary endothelial dysfunction in rats. *Am. J. Physiol* 1996;271 (3 Pt 2):H842–H849
- 47) Piper HM, Meuter K, MD, Schafer C. Cellular Mechanisms of Ischemia-Reperfusion Injury. *Ann Thorac Surg* 2003;75:644-648
- 48) Kaeffer N, Richard V, Francois A, Lallemand F, Henry JP, Thuillez C. Preconditioning prevents chronic reperfusion-induced coronary endothelial dysfunction in rats. *Am. J. Physiol* 1996;271:H842–H849
- 49) Pearson PJ, Schaff HV, Vanhoutte PM. Long-term impairment of endothelium-dependent relaxations to aggregating platelets after reperfusion injury in canine coronary arteries. *Circulation* 1990;81 (6):1921–1927
- 50) Viehman GE, Ma XL, Lefter DJ, Lefter AM. Time course of endothelial dysfunction and myocardial injury during coronary arterial occlusion. *Am. J. Physiol* 1991;261 (3 Pt 2):H874–H881

- 51) Lefer AM, Lefer DJ. The role of nitric oxide and cell adhesion molecules on the microcirculation in ischaemia–reperfusion. *Cardiovasc. Res.* 1996;32 (4):743–751
- 52) Kloner RA, Ganote CE, Jennings RB. The “no-reflow” phenomenon after temporary coronary occlusion in the dog. *J. Clin. Invest* 1974;54 (6):1496–1508
- 53) Kloner RA, Rude RE, Carlson N, Maroko PR, DeBoer LW, Braunwald E. Ultrastructural evidence of microvascular damage and myocardial cell injury after coronary artery occlusion: which comes first. *Circulation* 1980;62 (5):945–952
- 54) Erlebacher JA, Weiss JL, Weisfeldt ML, Bulkley BH. Early dilation of the infarcted segment in acute transmural myocardial infarction: role of infarct expansion in acute left ventricular enlargement. *J. Am. Coll. Cardiol* 1984;8:56-57
- 55) Mann JM, Roberts WC. Rupture of the left ventricular free wall during acute myocardial infarction: analysis of 138 necropsy patients and comparison with 50 necropsy patients with acute myocardial infarction without rupture. *Am. J. Cardiol* 1988;62 (13):847–859
- 56) Chambon P, Weill J.D, Mandel P. Nicotinamide mononucleotide activation of new DNA-dependent polyadenylic acid synthesizing nuclear enzyme. *Biochem Biophys Res Commun* 1963;11:39–43
- 57) Chambon P, Weil J, Doly J, Strosser M.T, Mandel P. On the formation of a novel adenylic compound by enzymatic extracts of liver nuclei. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1966;25:638–643
- 58) Meyer-Ficca M.L, Meyer R.G, Coyle D.L, Jacobson E.L, Jacobson M.K. Human poly(ADP-ribose) glycohydrolase is expressed in alternative splice variants yielding isoforms that localize to different cell compartments. *Exp Cell Res* 2004;297:521–32.
- 59) Ueda K, Hayaishi O. ADP-ribosylation, *Annu. Rev. Biochem* 2001;5:54-73
- 60) Ame J.C, Spenlehauer C, Murcia G. The PARP superfamily. *Bioessays* 2004;26:882–93
- 61) Shieh W, Shieh M. Poly(ADP-ribose) polymerase null mouse cells synthesize ADP-ribose polymers. *J Biol Chem* 1998;273:69–72
- 62) Ame J.C. PARP–2, A novel mammalian DNA damage-dependent poly(ADP-ribose) polymerase. *J Biol Chem* 1999;274:17860–8

- 63) Johansson M.A. Human poly(ADP-ribose) polymerase gene family(ADPRTL): cDNA cloning of two novel poly(ADP-ribose) polymerase homologues. *Genomics* 1999;57:442–5
- 64) Kaminker P.G. TANK2, a new TRF1-associated poly(ADP-ribose)polymerase, causes rapid induction of cell death upon overexpression. *J Biol Chem* 2001;276:35891–9
- 65) Augustin A. PARP–3 localizes preferentially to the daughter centriole and interferes with the G1/S cell cycle progression. *J Cell Sci* 2003;1161:551–62
- 66) D'Amours D, Desnoyers S, D'Silva I, Poirier G.G. Poly(ADPribose)ation reactions in the regulation of nuclear functions. *Biochem* 1999;J 342 (Pt 2):249–68
- 67) Sallmann F.R, Vodenicharov M.D, Wang Z.Q, Poirier G.G. Characterization of sPARP–1. An alternative product of PARP–1 gene withpoly(ADP-ribose) polymerase activity independent of DNA strand breaks. *JBiol Chem* 2000;275:15504–11
- 68) Hassa P.O, Hottiger M.O. The functional role of poly(ADPribose)polymerase 1 as novel coactivator of NF-kappaB in inflammatory disorders. *Cell Mol Life Sci* 2002;59:1534–53
- 69) Cosi C. New inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase and their potential therapeutic targets. *Expert Opin. Ther. Patents* 2002;12:1047–1071
- 70) Southan G.J, Szabo C. Poly(ADP-ribose)polymerase inhibitors. *Curr. Med. Chem.* 2000;10:321–340
- 71) Jagtap P, Szabo C. Poly(ADP-ribose) polymerase and the therapeutic effects of its inhibitors. *Nat. Rev. Drug Discov* 2005;4:421–440
- 72) Clark J.B, Ferris J.M, Pinder S. Control of nucleic acid and nicotinamide nucleotide synthesis in generating rat liver. *Biochem. Biophys. Acta* 1971;238:82–87
- 73) Southan G.J, Szabo C. Poly(ADP-ribose)polymerase inhibitors. *Curr. Med. Chem.* 2003;10:321–340
- 74) Liaudet L, Szabo A, Soriano F.G, Zingarelli B, Szabo C, Salzman A.L. Poly(ADP-ribose) synthetase mediates intestinal mucosal barrier dysfunction after mesenteric ischemia. *Shock* 2000;14:134–141
- 75) Chiang S.K, Lam T.T. Post-treatment at 12 or 18 hours with 3-aminobenzamiden ameliorates retinal ischemia–reperfusion damage. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2000;41:3210–3214

- 76) Martin D.R, Lewington A.J, Hammerman M.R, Padanilam B.J. Inhibition of poly (ADP-ribose) polymerase attenuates ischemic renal injury in rats. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol* 2000;279:R1834–R1840
- 77) Jagtap P, Szabo C. Poly(ADP-ribose) polymerase and the therapeutic effects of its inhibitors. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2005;4:421–440
- 78) Chiang S.K, Lam T.T. Post-treatment at 12 or 18 hours with 3-aminobenzamide ameliorates retinal ischemia–reperfusion damage. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2000;41:3210–3214
- 79) Cuzzocrea S, Zingarelli B, Costantino G, Szabo A, Salzman A.L, Caputi A. Beneficial effects of 3-aminobenzamide, an inhibitor of poly(ADP-ribose) synthetase in a rat model of splanchnic artery occlusion and reperfusion. *Br. J. Pharmacol.* 1997;121:1065–1074
- 80) Chatterjee P.K, Cuzzocrea S, Thiernemann C. Inhibitors of poly(ADP-ribose) synthetase protect rat proximal tubular cells against oxidant stress. *Kidney Int.* 1999;56:973–984
- 81) Kumar M, Singhal S.K, Singh A. Development and validation of a stability indicating HPLC assay method for cyclosporine in cyclosporine oral solution. *USP, J Pharm. Biomed. Anal.* 2001;25(1):9–14
- 82) Foulks GN. Topical cyclosporine for treatment of ocular surface disease. *Int Ophthalmol Clin.* 2006;46(4):105–22
- 83) Green DR, Kroemer G. The pathophysiology of mitochondrial cell death. *Science* 2004;305:626–9
- 84) Sullivan PG, Rabchevsky AG, Waldmeier PC. Mitochondrial permeability transition in CNS trauma: cause or effect of neuronal cell death? *J Neurosci Res.* 2005;79:231–9
- 85) Stettin M, Halwachs-Baumann G, Genser B, Frühwirth F, März W, Khoschsorur G.A. Determination of cyclosporine A in whole blood: Comparison of chromatographic method with three different immunological methods, *Talanta* 2006;69:1100–1105
- 86) Ortiz J.A. Postoperative care in liver transplantation, In: *Practical Manual of Abdominal Organ Transplantation*, M. Cosme (Ed), Kluwer Academic Publishers, Hingham 2002;89:169–170

- 87) Inoue K, Amano S, Kimura C, Sato T, Fujita N, Kagaya F, Kaji Y, Oshika T, Tsuru T, Araie M. Long-term effects of topical cyclosporine A treatment after penetrating keratoplasty, *Jpn. J. Ophthalmol* 2000;44 (3):302–305
- 88) Chock G. Cyclosporine: Pharmacology, In: *Cyclosporine; Clinical Application in Autoimmune Diseases*, D. E. Yocum, (Ed), Harcourt Health Communications, Philadelphia 2000;89:15–29
- 89) Allison A.C. Immunosuppressive drugs: the first 50 years and a glance forward, *Immunopharmacology* 2000: 47 (2–3), 63–83.
- 90) Tran H, Mali D, Chrzanowski A, Puc M.M, Matthews M.S, Hewitt C.W. Site-specific immunosuppression using a new formulation of topical cyclosporine A with polyethylene glycol–8 glyceryl caprylate/caprates, *J. Surg. Res.* 1999;83:136–140
- 91) Ferrera R, Benhabouche S, Bopassa JC, Li B, Ovize M: One hour reperfusion is enough to assess function and infarct size with TTC staining in Langendorff rat model. *Cardiovasc Drugs Ther* 2009;23:327–31
- 92) Hinmon R, Gorman JH, Gorman RC, Leshnower BG, Kanemoto S, Matsubara M, Sakamoto H. Cyclosporine Preserves Mitochondrial Morphology After Myocardial Ischemia/Reperfusion Independent of Calcineurin Inhibition. *Ann Thorac Surg* 2008;86:1286–1292
- 93) Halmosi R, Berente Z, Osz E, Toth E, Literati-Nagy P, Sumegi B. Effect of Poly(ADP-Ribose) Polymerase Inhibitors on the Ischemia-Reperfusion-Induced Oxidative Cell Damage and Mitochondrial Metabolism in Langendorff Heart Perfusion System. *Cardiovasc Res* 2008;77:416–24
- 94) 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;32:1037–43
- 95) Halestrap AP, McStay GP, Clarke SJ. The permeability transition pore complex: another view. *Biochimie* 2002;84:153–66
- 96) Clarke SJ, McStay GP, Halestrap AP. Sangliferin A acts as a potent inhibitor of the mitochondrial permeability transition and reperfusion injury of the heart by binding to cyclophilin-D at a different site from Cyclosporin A. *J Biol Chem* 2002;277:34793–9

- 97) Halestrap AP, Clarke SJ, Javadov SA. Mitochondrial permeability transition pore opening during myocardial reperfusion—a target for cardioprotection. *Cardiovasc Res* 2004;61:372–85
- 98) Rupinder K. Sodhi¹, Manjeet Singh², Nirmal Singh², and Amteshwar S. Jaggi². Protective Effects of Caspase-9 and Poly(ADP-ribose) Polymerase Inhibitors on Ischemia-Reperfusion-Induced Myocardial Injury. ¹ASBASJS College of Pharmacy, Bela (Ropar), Punjab, India and ²Department of Pharmaceutical Sciences and Drug Research, Punjabi University, Patiala (Punjab), India
- 99) 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;32:1037–43
- 100) 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
- 101) Banka N, Anand I.S, Sharma PL, Wahi P.L. Macroscopic measurements of experimental myocardial infarct size in rhesus monkey- a comparison of two methods. *Bull. P.G.I.* 1981;15:147–50
- 102) Collinson PO, Gaze DC. Biomarkers of cardiovascular damage. *Med Princ Pract* 2007;16:247–61

ÖZGEÇMİŞ

1987 yılında Diyarbakır'da doğdum. Lisans eğitimimi, İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesinde 2004–2008 yılları arasında tamamladım. 2009 yılından beri Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Farmakoloji A.B.D. 'da yüksek lisans eğitimime devam etmekteyim.