



**T.C.
GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ**

**SELEKTİF RHO KİNAZ İNHİBİTÖRÜ, Y-27632’NİN
ORGANOFOSFATA BAĞLI KARDİYAK TOKSİSİTE
VE MORTALİTE ÜZERİNE KORUYUCU
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

UZMANLIK TEZİ

**Dr. Beril KÖSE
ACİL TIP ANABİLİM DALI**

**TEZ DANIŞMANI
Doç. Dr. Cuma YILDIRIM**

Ağustos–2008

**T.C.
GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ**

**SELEKTİF RHO KİNAZ İNHİBİTÖRÜ, Y-27632’NİN
ORGANOFOSFATA BAĞLI KARDİYAK TOKSİSİTE
VE MORTALİTE ÜZERİNE KORUYUCU
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

UZMANLIK TEZİ

**Dr. Beril KÖSE
ACİL TIP ANABİLİM DALI**

**TEZ DANIŞMANI
Doç. Dr. Cuma YILDIRIM**

ÖNSÖZ

Bu çalışmanın hazırlanmasında ve asistanlığım süresince en iyi şekilde yetişmemde büyük emeği geçen başta tez danışman hocam ve Anabilim Dalı Başkanımız Doç. Dr. Cuma YILDIRIM olmak üzere Doç. Dr. Nurullah GÜNAY, Yrd. Doç. Dr. Behçet AL hocalarıma sonsuz saygı, minnet ve şükranlarımı sunar; bizleri yetiştirmek için büyük emek harcıyıp, sabır gösteren, meslek ahlakı eğitiminde gösterdikleri yakın ilgi ve desteklerinden dolayı ayrıca teşekkür ederim.

Gerek bu çalışmanın hazırlanmasında, deneyin yapılışında ve farmakoloji laboratuvarındaki katkısı gerekse fikir ve bilgileri ile çok önemli katkıları olan Tıp Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. A. Tuncay DEMİRYÜREK hocamıza sonsuz teşekkür ederim.

Ayrıca Patoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. İbrahim SARI ve patoloji asistanları ve teknik elemanlarına, Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Mehmet TARAKÇIOĞLU ve Arş. Gör. Nurdan ÖZ CEYLAN'a, hayatım boyunca verdiğim tüm kararlarımda bana güvenen, saygı duyan ve aynı bölümde yıllarca birlikte çalıştığım arkadaşım, dostum ve eşim Uzm. Dr. Ataman KÖSE'ye ve aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Dr. Beril KÖSE
Gaziantep, 2008

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ.....	I
İÇİNDEKİLER.....	II
ÖZET.....	IV
ABSTRACT.....	V
KISALTMALAR	VI
TABLO LİSTESİ.....	VIII
ŞEKİL LİSTESİ.....	IX
RESİM LİSTESİ.....	X
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Organofosfat Zehirlenmesi.....	3
2.1.1. Fiziopatoloji.....	3
2.1.2. Klinik etkiler.....	4
2.1.3. Tanısal testler.....	6
2.1.4. Tedavi.....	7
2.2. Rho-kinaz Sistemi ve İnhibitörleri.....	9
2.2.1. Rho/Rho-kinaz Yolağı.....	9
2.2.2. Rho/Rho-kinaz Aktivitesinin Düzenlenmesi.....	9
2.2.3. Rho-kinaz İnhibitörleri.....	10
2.2.4. Rho/Rho-kinaz Yolağının Fonksiyonları.....	11
2.3. Organofosfat Zehirlenmesinin Kardiyovasküler Etkileri.....	13
2.4. Myokard Hasarının Belirlenmesinde Biyokimyasal Göstergeler.....	15
2.4.1. Kardiyak Belirteçler.....	15
2.4.2. Oksidan-antioksidanlar.....	19
2.5. Myokard Hasarının Belirlenmesinde Histopatolojik Göstergeler.....	22
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	25
3.1. Deney Hayvanları.....	25
3.2. Deney Protokolü.....	25

3.3. Biyokimyasal Çalışmalar.....	27
3.3.1. Serumdaki Ölçümler.....	27
3.3.2. Dokudaki Ölçümler.....	28
3.4. Histopatolojik Değerlendirme.....	29
3.4.1. İmmünohistokimyasal analiz.....	30
3.4.2. Apoptozisin değerlendirilmesi.....	30
3.5. İstatistiksel Çalışmalar.....	31
4. BULGULAR.....	32
5. TARTIŞMA.....	40
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	48
7. KAYNAKLAR.....	49

ÖZET

SELEKTİF RHO KİNAZ İNHİBİTÖRÜ, Y-27632’NİN ORGANOFOSFATA BAĞLI KARDİYAK TOKSİTE VE MORTALİTE ÜZERİNE KORUYUCU ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Dr. Beril KÖSE

Uzmanlık Tezi, Acil Tıp Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Cuma YILDIRIM

Ağustos 2008, 62 sayfa

Bu çalışma selektif Rho kinaz inhibitörü olan Y-27632’nin ratlarda organofosfata bağlı kardiyak toksite ve mortalitede etkilerini değerlendirmek için tasarlandı. Ratlar kontrol grubu (mısır yağı), diklorvos grubu (30 mg/kg i.p), 1 ve 10 mg/kg Y-27632+diklorvos verilen grup olarak randomize olarak dört gruba ayrıldı. Bütün ilaç ve araçlar intraperitoneal olarak verildi ve enjeksiyondan 6 saat sonra venöz kan numuneleri, tiyopental anestezisinin altında direkt kalpten alındı. Daha sonra kalple ilgili doku numuneleri elde edildi. Biyokimyasal ve immunohistokimyasal analizleri yapıldı. Serum kolinesteraz düzeyleri diklorvos ile baskılandı ve bu azalmalar Y-27632 tedavisi ile ortadan kalktı. Serum CK, CK-MB, miyogloblin ve Nt-proBNP düzeylerinde gruplar (Y-27632 ve zehirlenmede) arasında anlamlı bir farklılık saptanmadı. Kardiyak troponin I düzeyleri diklorvos ile anlamlı şekilde artmıştır ve bu artış Y-27632 ile değişikliğe uğramamıştır. Serum nitrik oksit düzeyleri diklorvos ile değişmemesine rağmen, kardiyak nitrik oksit düzeyleri Y-27632 tedavisi ile belirgin olarak artmıştır. Kardiyak glutasyon düzeyleri de 1 mg/kg Y-27632 artmıştır. Grupların tümünde kardiyak dokuda indüklenbilir nitrik oksit sentaz ve apoptozis boyamasında herhangi bir değişiklik gözlenmedi. Y-27632’nin her iki dozları (1 ve 10 mg/kg) akut diklorvos maruziyeti olan ratlarda mortaliteyi engellemiştir (%100 hayatta kalma). Sonuç olarak, Rho-kinaz yolu organofosfat zehirlenmesinde yer almaktadır ve Rho-kinaz inhibitörünün verilmesi ratlarda diklorvos zehirlenmesine karşın koruyucu etkiler oluşturabilir. Bu bulgular organofosfat zehirlenmesinin tedavisi için yeni olasılıklar sağlayabilir.

Anahtar kelimeler: Kardiyak toksisite, Zehirlenme, Diklorvos, Rho-kinaz, Y-27632

ABSTRACT

INVESTIGATION OF PROTECTIVE EFFECTS OF Y-27632 AS A SELECTIVE RHO-KINASE INHIBITOR, ON ORGANOPHOSPHATE-INDUCED CARDIAC TOXICITY AND MORTALITY

Dr. Beril KÖSE

Residency Thesis, Department of Emergency Medicine

Supervisors: Ass. Prof. Cuma YILDIRIM, MD.

August 2008, 62 pages

This study is designed to examine the effects of Y-27632, a selective Rho-kinase inhibitor, on organophosphate-induced cardiac toxicity and mortality in rats. Rats were randomly divided into four groups as control (corn oil), dichlorvos (30 mg/kg i.p.), 1 and 10 mg/kg Y-27632+dichlorvos groups. All drugs and vehicle were administered by intraperitoneally and after 6h of injection, venous blood samples were collected by direct heart puncture under thiopental anesthesia. Cardiac tissue samples were also obtained. Biochemical and immunohistochemical analysis were performed. Serum cholinesterase levels were suppressed with dichlorvos and these reductions were inhibited with Y-27632 pretreatment. Serum levels of creatine kinase (CK), CK-MB, myoglobin, and N-terminal probrain natriuretic peptide were not markedly affected with poisoning or Y-27632. Cardiac troponin I levels were significantly elevated with dichlorvos, and this increase was not modified with Y-27632. Although serum nitric oxide levels did not change with dichlorvos, cardiac nitric oxide levels were markedly increased with Y-27632 pretreatment. Cardiac glutathione levels also increased with 1 mg/kg Y-27632. There was no staining for apoptosis and immunohistochemical analyses of inducible nitric oxide synthase showed no change in cardiac tissue for all of the groups. Both doses of Y-27632 abolished mortality in rats with acute dichlorvos exposure (100% survival). In conclusion, Rho-kinase pathway is involved in the organophosphate poisoning, and administration of Rho-kinase inhibitor can produce protective effects against dichlorvos intoxication in rats. These findings may provide new possibilities for the treatment of organophosphate poisoning.

Keywords: Cardiac toxicity, Poisoning, Dichlorvos, Rho-kinase, Y-27632

KISALTMALAR

ACh	: Asetilkolin
AChE	: Asetilkolinesteraz
ANP	: Atriyal Natriüretik Peptid
BNP	: Beyin Natriüretik Peptid
ChE	: Kolinesteraz
CNP	: C-tipi Natriüretik Peptid
CK	: Kreatinin Kinaz
cT-I	: Kardiyak troponin-I
DNP	: Dendroaspis Natriüretik Peptid
EChE	: Eritrosit Kolinesterazı
EKG	: Elektrokardiyografi
eNOS	: Endotelyal Nitrik Oksid Sentaz
GAP	: GTP'az Aktive Edici Protein
GDI	: GTP'az Ayrıştırıcı İnhibitör
GEF	: Guanin Nükleotid Değiştirici Faktör
GİS	: Gastrointestinal Sistem
iNOS	: İndüklenebilen NOS
KKY	: Konjestif Kalp Yetmezliği
KVS	: Kardiyovasküler Sistem
LPO	: Lipid Peroksidasyonu
Mb	: Myoglobin
MDA	: Malondialdehit
MLC	: Myozin Hafif Zincir Fosfataz
MSS	: Merkezi Sinir Sistemi
NO	: Nitrik Oksit
NOS	: Nitrik Oksit Sentaz
nNOS	: Nöronal Nitrik Oksit Sentaz
NTE	: Neuropathy Target Esterase

NT-proBNP	: N-terminal proBNP
OB	: Organofosfat Bileşikleri
OFZ	:Organofosfat Zehirlenmesi
PAM	: Pralidoksim
PChE	: Pseudokolinesteraz
PVFA	: Poliansature Yağ Asitleri
SF	: Serum Fizyolojik
SOR	: Serbest Oksijen Radikalleri
TDP	:Taze Donmuş Plazma
TUNEL	: Terminal Deoksinükleotidil Transferaz (Tdt)-Mediated Dntp In Situ Nick And Labeling

TABLO LİSTESİ

Tablo 1. Apoptozis skorlanması.....	31
Tablo 2. Serum ChE düzeyleri, kas fasikülasyonun şiddeti ve zehirlenme belirtilerin toplam skoru.....	33
Tablo 3. Serumdaki CK, CK-MB, myoglobin, Tn-I and Nt-pro-BNP diklorvos..... ve Y-27632 etkileri.....	33
Tablo 4. Grupların iNOS skorları.....	38

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1. Rho kinaz inhibitörlerin tedavi hedefleri.....	11
Şekil 2. BNP'nin sentez ve sekresyonu.....	17
Şekil 3. M, D, Y1 ve Y10 gruplarındaki ChE değerleri.....	32
Şekil 4. Gruplardaki CK değerleri.....	34
Şekil 5. Gruplardaki CK-MB değerleri.....	34
Şekil 6. Gruplardaki myoglobin değerleri.....	35
Şekil 7. Gruplardaki troponin-I değerleri.....	35
Şekil 8. Gruplardaki NT-proBNP değerleri.....	36
Şekil 9. Gruplardaki serum NO değerleri.....	36
Şekil 10. Gruplardaki doku NO değerleri.....	37
Şekil 11. Gruplardaki doku glutatyon değerleri.....	37
Şekil 12 Gruplardaki mortalite/survival oranları.....	39

RESİM LİSTESİ

Resim 1. Sıçan kalbinde TUNEL yöntemi ile apoptozis için yapılan boyama..... (skor 0).....	38
Resim 2. Sıçan kalbinde iNOS immunohistokimyasal boyaması (skor 0).....	38
Resim 3. Sıçan kalbinde iNOS immunohistokimyasal boyaması (skor 1).....	38
Resim 4. Sıçan kalbinde iNOS immunohistokimyasal boyaması (skor 2).....	39
Resim 5.Sıçan kalbinde iNOS immunohistokimyasal boyaması (skor 3).....	39

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Organofosfatlar (OF) tüm dünyada akut zehirlenmeden ölümün ve ciddi toksitenin en önemli nedenidir (1). OB ile zehirlenme gelişmekte olan ülkelerde önlenebilir önemli sağlık problemidir ve önemli mortalite ve morbidite nedenidir. Kazayla zehirlenme cilt veya inhalasyon ile maruziyet sonucu olmasına rağmen, ciddi zehirlenme sıklıkla intihar sonucu alıma bağlı gelişir (2). Diklorvos (dimethyl 2,2-dichlorovinyl phosphate, DDVP) pestisitler içerisinde yaygın olarak kullanılan bir organofosfat bileşiğidir (3).

Organofosfatların etkileri asetilkolinesterazı (AChE) inhibe ederek sinapslardaki asetilkolin (ACh) birikimine bağlı olarak ortaya çıkar. ACh birikimi başlangıçta stimüle ederken sonrasında santral sinir sisteminde (MSS), somatik sinirlerde, otonomik ganglialarda, parasempatik sinir sonlanmalarında ve bazı sempatik sinir sonlanmalarında kolinerjik sinaptik iletiyi paraliziye uğratar. OF ve karbamatlar AchE (sinir dokusu ve eritrositlerde bulunan) ve butirilkolinesteraz (plazma ve pseudokolinesteraz) içeren karboksilik ester hidrolazlarının güçlü inhibitörleridir (4). OF zehirlenmelerinde klinik tablo inaktive edilemeyen Ach'nin merkezi ve otonom sinir sistemindeki muskarinik ve nikotinik reseptörlerle iskelet kası nöromusküler bileşkesindeki nikotinik reseptörleri sürekli uyarmasına bağlı olarak ortaya çıkar (4).

Organofosfat zehirlenmesinin standart tedavisi atropin ve oksimlerin kullanımı içerir. Atropin, ACh'nin muskarinik reseptörlerin kompetitif bir antagonistidir ve muskarinik sinapslarda artmış ACh'a bağlı ortaya çıkan kolinerjik semptomların geri çevrilmesi için kullanılır. Oksimler ise santral, muskarinik ve nikotinik etkilerin geri çevrilmesinde kullanılan AChE reaktivatörüdür (5-7).

Rho-kinazlar moleküler ağırlığı 160 kDa olan serin/treonin protein kinazlardır. Rho-kinaz düz kas kontraksiyonu, aktin sitoskeleton organizasyonu, hücre büyümesi, migrasyonu, adhezyonu, motilite, gen ekspresyonu ve apoptozis gibi farklı hücresel fonksiyonlara sahiptir (8,9). Y-27632 gibi selektif Rho kinaz inhibitörleri ROCK1 ve

ROCK2 izoformlarına nonselektif uyum göstermektedir (8). Çalışmalar Rho-kinaz vazospastik angina, iskemik stroke ve kalp yetmezliği gibi kardiyovasküler hastalıklarda önemli rol oynayabildiği gösterilmiştir. Son günlerde Rho kinaz inhibitörlerinin anestezi altındaki sıçanlarda iskemik ön koşullamayı taklit eden etkilerini ve biyokimyasal parametrelerini, infarkt büyüklüğünü, aritmilere karşı miyokardiyumda kardiyoprotektif etkileri oluşabildiği gösterilmiştir (10). Diklorvos cAMP-bağlı ile birlikte Ca^{+2} /kalmodulin bağlı kinaz aktivitesinde artışa neden olduğu gözlenmesine rağmen (11), Rho-kinazda diklorvosun etkileri bilinmemektedir. Ayrıca, OF zehirlenmesinde Rho kinaz inhibitörlerin etkileri henüz araştırılmamıştır. Bu çalışmanın amacı sıçanlarda diklorvosa bağlı zehirlenme ve mortalitede Y-27632 selektif Rho kinaz inhibitörün etkilerini değerlendirmektir. Ayrıca mortalite oranı yüksek olan organofasfat zehirlenmelerinin tedavisinde Rho kinaz inhibitörlerinin etkinliğini belirlemektir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Organofosfat Zehirlenmesi

2.1.1. Fizyopatoloji

Tarımda çeşitli amaçlarla kullanılan pestisit grubu ilaçlar halen piyasada bulunmakla beraber organofosfat zehirlenmeleri daha sık görülmektedir (12). Toksik bileşikler dermal, inhalasyon veya gastrointestinal sistem (GİS) yolu ile hızla emilebilir. Vücuda alındıkları yollar içinde en hızlı etki inhalasyonla başlar (13). İntravenöz (i.v) ve subkütan (s.c) enjeksiyonlar ile perkütan maruziyetle de ciddi toksisite görülebilir. Dermal emilim yavaştır, ancak maruziyet uzadığında ya da yağda çözünen ajan, bir çözücü içinde taşıyıp emülsifiye haldeyse, cilt bütünlüğü bozulmuş ve ortam sıcaklığı yüksekse, etki ciddidir (14). Yağda çözünen OF dışında genellikle hasta ilk oniki saat içerisinde semptomatik hale gelmektedir. Oral yolla alım genellikle çocuklarda kazara, erişkinlerde intihar amacıyla gerçekleşir (5). Çoğu OF'lar yağda çözünürlüğü yüksek bileşiklerdir. Hızla vücut dokularına dağılırlar. Karaciğer ve böbrekte yüksek yoğunlukta birikirler. Yağda çözünürlüğü yüksek olanlar kan-beyin engelini kolaylıkla geçerler ve bu sebeple MSS'ne etkilidirler. Yarı ömürleri dakikalar ile saatler arasında değişse de yağ dokudan redistribüsyon sonucu 48 güne dek serumda gösterilmişlerdir (15). Başlıca karaciğerde esteraz hidrolizi ve konjugasyon ile yıkılırlar. Malathion ve Parathion'un oksidatif ürünleri (maloxon ve paraxon) etkili şekilleridir. Hidroliz ile etkisiz ürünlere dönüşürler. OF'ların ve ürünlerinin vücuttan atılımı çoğunlukla idrar, safra ve dışkı yolu ile olur (13).

Asetilkolin sempatik ve parasempatik ganglionlar, iskelet kası nöromusküler bileşikleri, tüm parasempatik sinirlerin postganglionik uçları, ter bezlerine giden postganglionik sempatik lifler ve MSS'deki birçok sinir ucunda bulunan bir nörotransmitterdir. AChE ise ACh'i inaktif metabolitleri olan asetik asit ile koline yıkan ve aktif enzimi rejenere ederek tekrar kullanımını sağlayan, sinir sistemi, iskelet kası ve eritrosit membranında bulunan bir enzimdir (4,13).

Organofasfat bileşikleri kimotripsin, AChE, pseudokolinesteraz (PChE), plazma ve hepatik karboksieraz ve diğer nonspesifik proteazlar gibi karboksilik ester hidrolazlarının güçlü inhibitörleridir. Organofasfat zehirlenmesinde (OFZ) AChE'nin aktif ucundaki serin rezidüsüne fosfat radikallerinin kovalent bağlanması ile inhibisyon gerçekleşir (5). Enzimin inhibisyonu sonucu sinaptik aralıkta biriken ACh, ilgili reseptörleri sürekli uyararak klinik semptomların ortaya çıkmasına sebep olur. OF enzime geri dönüşümsüz bağlanırlar ve aktif enzim rejenere olmadan bu fosforilize enzimlerin bir kısmı ilk 24-48 saat içinde bir alkil grubunu kaybederek stabil bir hal alır. Bu dönem yaşlanma (aging) terimi ile adlandırılır. Yaşlanma başladığında kolinesterazın enzimatik etkisi yok olur ve yeni enzim sentezlenene dek, ki bu haftalar anlamına gelmektedir. Bu dönem, enzimin spontan hidrolizle rejenere olabileceği yada antidotun olayı geri çevirebileceği ve dolayısıyla tedavinin etkinliğini belirleyen kritik süreci ifade eder (14).

2.1.2. Klinik Etkiler

Etkinin başlama süresi ajana, maruziyet yoluna ve miktarına göre değişir. Fazla miktarlarda oral alımı takiben 5 dakikada semptomlar başlayıp 15. dakikada ölüm gerçekleşebilir. Akut zehirlenmelerde çoğu ilk 8 saatte olmak üzere ilk 24 saatte neredeyse vakaların tamamı semptomatik hale gelir. Akut OFZ'lerinde klinik etkiler (akut kolinerjik faz) ACh'nin birikmesine ve muskarinik, nikotinik ve MSS reseptörlerinin artmış uyarılmalarına bağlı olarak ortaya çıkar (6,13,16).

1. Muskarinik etkiler: Bradikardi, miyozis, bulanık görme, bulantı, kusma, diyare, akciğer ödemi, hipotansiyon, kramp tarzında karın ağrısı, salivasyon, lakrimasyon, diaforez, hırıltı, bronkokonstriksiyon, idrar ve gayta inkontinansı (“**SLUDGE**: Salivation, Lacrimation, Urinary incontinance, Diarrhea, Gastrointestinal distress, Emesis ve **DUMBBELS**: Defecation, Urination, Miosis, Bradycardia, Bronchospasm, Emesis, Lacrimation, Salivation” şeklinde hatırlatıcı kısaltmalar yapılmıştır.)

2. Nikotinik etkiler: Fasikülasyon (çizgili kaslarda), paralizi, kas güçsüzlüğü ve sempatik gangliyonlardaki reseptörlerin uyarılmasıyla hipertansiyon, taşikardi, solukluk, midriyazis (“**MATCH**: Muscle weakness and fasciculation, Adrenal medulla activity increase, Tachycardia, Cramping of skeletal muscles, Hypertension” kısaltması yapılabilir.)

3. Santral etkiler: Bilinç bozukluğu, konfüzyon, psikoz, konvülziyon, bitkinlik, solunum depresyonu, dizartri, ataksi, anksiyete

Intermediate sendrom, organofosfat bileşikleri (OB) ile zehirlenmenin ardından (12–96 saat) ortaya çıkabilir. Erken kolinerjik sendromla geç periferik nöropati arasındaki evrede görülen bu tabloya, vakaların %20-68'inde rastlanmaktadır. Diazinon, monokromotofos, metilparation, metamidafos, dimetoat, etilparation ve fention gibi bileşiklerle zehirlenme ile ilişkilendirilen bu durum, yağda çözünen bileşiklerin yeniden dağılımına bağlı nikotidik reseptörlerde ACh'in uzamış etkisi ile açıklandığı gibi yetersiz oksim tedavisine de bağlanmaktadır. Duyusal fonksiyonlarda bozulma olmadan, bilincin nadiren etkilendiği, reflekslerde azalma, proksimal ekstremitelerde, oküler, bulber, boyun ve solunum kaslarının güçsüzlüğü ile kendini gösteren bu tablo, eğer anoksik beyin hasarıyla komplike olmazsa 4-18 gün içinde düzelebilir. Intermediate sendromun yönetimini öncelikle destek tedavi (havayolu açıklığı ve ventilatör) oluşturmaktadır (4,17).

Gecikmiş polinöropati (OPIDN-Organophosphate Induced Delayed Polyneuropathy), triortocresilfosfat gibi zayıf etkili bileşiklerle olan zehirlenmeleri takiben, myelin kılıfta bulunan neuropathy target esterase (NTE) olarak isimlendirilen bir enzimin fosforilasyonu ile ilişkilendirilmektedir. Semptomlar (parestezi, baldır ağrısı, kas güçsüzlüğü, düşük ayak) maruziyetten 7-21 gün sonra ortaya çıkarak ciddi morbiditeye sebep olabilirler. Atropin ve pralidoksim (PAM) uygulanmasının bu sendromun ortaya çıkmasını engellemediği düşünülmektedir. Hafif vakaların prognozu iyiyken, ağır vakalarda pençe el, düşük ayak, kalıcı atrofi, spastisite ve ataksi sekel olarak kalabilir (17,18).

Kronik nöropsikiyatrik bozukluk; anksiyete, uyuşukluk, depresyon, bitkinlik, irritabilite, duygusal labilite, hafıza problemleri, konfüzyon, letarji ve psikoz görülebilir. Semptomların çoğu bir yıl içinde geriler (14,17).

Ekstrapiramidal etkiler, koreoatetoz, opistotonus, tortikollis, dişli çark rijiditesi, maske yüz, bradikinezi gibi semptomları içeren tipik bir parkinsonizm tablosunu içermektedir. Fention gibi bazal gangliyonlara etkili seçici bileşiklerle ortaya çıkabilen bu etkilerin, bazal gangliyonlar ve substantia nigra ACh ile dopamin arasındaki dengenin bozulmasından kaynaklandığı düşünülmektedir (19).

Ayrıca, rabdomiyoliz ve akut böbrek yetmezliği bildirilmiştir. Akut dönemde ACTH, kortizol ve prolaktin seviyelerinin arttığı, FSH seviyesinin ise azaldığı rapor edilmiştir. Adrenal medullanın uyarılmasına bağlı olarak glikojenoliz, hiperglisemi ve ketozis oluşabilir. Ayrıca hiperamilazemi, pankreatit ve karaciğer enzim yükseklikleri de bildirilmiştir (15).

2.1.3. Tanısal Testler

Organofosfat zehirlenmesinde tanı hikaye ve özgün klinik bulguların birlikteliği ile konur. Kullanılabilecek en güvenilir laboratuvar testi dokularda insektisit ve metabolitlerinin ölçülmesidir, ancak bu erken sonuç alınabilecek bir test değildir. Ancak plazma ve eritrositlerde kolinesteraz seviyesinin ölçülmesi daha pratik ve pek çok yerde uygulanabilen testlerdir. Eritrosit kolinesterazı (EChE) gerçek kolinesteraz yani AChE'dir. AChE, eritrositler, iskelet kası ve sinir dokusunda bulunurken, PChE özellikle karaciğer, plazma, kalp, beyin beyaz maddesi ve pankreasta bulunmaktadır (4).

Zehirli dozda antikolinesteraza maruziyetten sonra PChE aktivitesi hızla düşer ve ilk semptomlar %40-50 azalma ile ortaya çıkarken ciddi nöromüsküler etkiler %80'lik bir azalma sonucu oluşur (4,5). Bazı organofosfatlar PChE'yi EChE'den daha çok inhibe ederken (örn. diazinon), parathion ve sinir gazları gibileri AChE'yi daha fazla inhibe ederler (20).

Tek bir normal değer tanıyı ekarte ettirmez. Tanı, tedavi planı ve prognoz açısından tek ölçüm yerine seri AChE ölçümleri yapılmalıdır. Bazı durumlarda tekrarlayan maruziyet ya da yağ dokuda depolanıp tekrar tekrar kana salınan toksik madde varlığı bu şekilde anlaşılabilir (21).

AChE düzeyi organofosfatlarla ciddi miktarda deprese olur, bununla beraber dolaşan eritrosit ömrünün azaldığı pernisiyöz anemi, orak hücre hastalığı, talasemi gibi hemoglobinopatilerde ve anemilerde de normalden bir miktar düşük seviyede olduğu bilinmektedir. Ayrıca antimalaryal tedavide de bir miktar depresyon gelişmektedir (13).

PChE'in baskılandığı durumlar:

Kalitsal: Enzimin kalıtsal eksikliği (14)

Fizyolojik: Gebelik, ergenlik, yenidoğan ve küçük çocuklarda (14)

Hastalıklar: Karaciğer hastalığı, akut hepatit, siroz, kollajen doku hastalıkları, akut enfeksiyonlar, karsinomalar, yetersiz beslenme, belirgin zayıflamanın olduğu kronik hastalıklar, yanıklar, hemodiyaliz, miksödem, miyokard enfarktüsü ve anemi (14).

Kimyasallar ve ilaçlar: monoaminoksidaz inhibitörleri, süksinilkolin, siklofosamid, lidokain, kokain, morfin, kodein (13).

Tedavisiz PChE 4-6 haftada, eritrosit kolinesterazı 90-120 günde normal değerine döner (4). Rutin laboratuvar testlerinin tanısal değeri olmamakla birlikte OFZ'de sıkça görülen bazı değişiklikler bilinmelidir. Birçok vakada bildirilen nonketotik hiperglisemi ve glukozürinin sempatik ganglion hiperaktivitesine bağlı adrenal medulladan salının katekolaminlerin etkisi ile gerçekleştiği düşünülmektedir. Hipokalemi, yine dolaşan katekolaminlerin artışına bağlı olarak hücre içi ve hücre dışı potasyum dağılımının değişmesine bağlanmaktadır. Sola kayma ile olan ya da tek başına lökositöz ortak bir bulgudur. Artmış parasempatik uyarıya bağlı hiperamilazemi ve sekresyon artışı insanda ve deneysel hayvan çalışmalarında gösterilmiştir (5,16).

2.1.4. Tedavi

Organofosfat zehirlenmesi tedavisinde semptomatik ve destekleyici tedavi ile OF bileşiklerinin emiliminin engellenmesi ve atılımının artırılması, antikolinergik ilaçlarla antimuskarinik tedavi, pyridinium oksimler ile AChE'in yenilenmesi ve anti nikotinik tedavinin sağlanması amaçlanır (13).

Organofosfat ile daha fazla temasın önlenmesi için hasta çevreden uzaklaştırılır ve giysileri çıkartılır. Deriden emilimi önlemek için etanol içeren sabun ve bol su ile cilt OF bileşiklerinden arındırılır. OF alımının ilk 30 dakikası içinde midenin yıkanması çok etkilidir. Aktif kömürün ağızdan veya nazogastrik tüpten verilmesi OF emilimini azaltır. İpeka şurubu gibi kusturuculardan hava güvenliği olmayan olgularda kaçınılmalıdır. Mannitol gibi katartikler emilmemiş OF'ların bağırsaklardan atılımını artırır (14).

Başlangıç tedavisi yeterli solunum yolu ve havalanmanın sağlanmasıdır ve artmış muskarinik etkiyi geri çevirmektir. Hipoksiye bağlı oluşmayan nöbet benzodiazepin ve barbütirat ile tedavi edilir. Hastanın güvenli hava yolunun sürdürülmesi için erken entübasyon ve pozitif basınçlı solunum desteği, önemli kas güçsüzlüğü olanlarda ve zehirlenme sonucu bol salgısı olan hastalarda en iyi yöntemdir. Nöromusküler blok için nondepolarizan ajan (panküronyum, veküronyum gibi)

kullanılmalı, kas-sinir kavşağında etkili depolarizan ajanlar (süksinilkolin) ve aminoglikozid gibi antibiyotikler asla kullanılmamalıdır (14).

Tedavide ikinci öncelik artmış muskarinik aktiviteyi kontrol altına almaktır. Atropin sülfat muskarinik reseptörlerde asetilkolinin yarışmalı antagonistidir. Artmış salgı, miyozis, bronkospazm, kusma, ishal, terleme ve idrar kaçırmayı geri çevirir (5-7). Nikotinik reseptörler üzerine ve SSS'de etkili olmadığından kas zayıflığı, fasikülasyon, respiratuvar depresyon, konvülziyon ve koma gibi klinik tabloları önleyemez (16,22). Atropinizasyon, hastanın sekresyonları kuruyana dek yetişkinlerde 2-3 dakikada bir tekrarlanmak üzere 1-5 mg (i.v), çocuklarda 0.05 mg/kg (i.v) atropin verilmesi ile sağlanır (6,7). Atropinize hastada deri ve mukoz membranlarda kuruma, bağırsak seslerinde azalma veya yokluk, tasikardi, salgılarda azalma ve midriyazis olur. Dikkat edilmesi gereken bir nokta da pupiller dilatasyon gelişmesi durumunda tedavinin sonlandırılmaması ve bunun tedaviye erken dönem cevabı olduğunun bilinmesidir (13). Taşikardi, atropin tedavisi için bir kontrendikasyon değildir. Semptomların geri çevrilmesi bazen binlerce miligram atropin gerektirebilir (1).

Oksimler tedavide kullanılan diğer ajanlardır. AChE'yi, enzime bağlanıp onu inaktive eden fosforu grubunu yapıdan uzaklaştırarak, reaktive eder. Ancak maruz kalınan OF bileşiğin yaşlanma süreci tamamlanmadan, yani ilk 24-48 saat içinde uygulanmalıdır (1,4). Oksimler nikotinik, muskarinik ve MSS etkilidirler (14). PAM'in yetişkin ve çocuktaki başlangıç dozu olan 1-2 gr (30-50 mg/kg) 10-15 dakikada serum fizyolojik (SF) içinde i.v. bolus olarak verilir. Hedeflenen etkiyi oluşturacak minimal plazma konsantrasyonu 4 mcg/ml'dir (7,13). Bu seviyeye ulaşmak için bolus dozu 4-8 saatte bir tekrarlanabildiği gibi 250-500 mg/sa veya 8 mg/kg/sa dozunda infüzyon önerilmektedir (7,16).

Atropin ve oksimler OFZ'lerinin yönetiminde geleneksel olarak kullanılır, fakat mortalite ve morbiditeyi azaltma bazı vakalarda yetersiz olabilirler. Bazı ajanlar; hayvan deneylerinde OF bileşiklerinin toksitesini azalttığı bulunmuş ve OFZ'nin yönetiminde tedavi edici ajan olarak potansiyeline sahiptir. Bu ajanlar magnezyum sülfat, klonidin, sodyum bikarbonat (NaHCO₃) ve florid, taze donmuş plazma (TDP) ve plazmaferezis (23,24).

2.2. Rho-kinaz Sistemi ve İnhibitörleri

2.2.1. Rho/Rho-kinaz Yolağı

Rho, Ras, Rab, Sar1/Arf ve Ran gibi küçük G proteinleri mayalardan insanlara kadar bütün ökaryot hücrelerde bulunan ve 100'den fazla üyeye sahip büyük bir aileyi oluştururlar (25). Rho ailesinin üyeleri RhoA, RhoB, RhoC, Rac1, Rac2, ve Cdc42'dir. RhoA, RhoB, RhoC proteinlerinin efektör bölgelerinin aynı aminoasit dizilişleri vardır ve benzer hücresel fonksiyonları bulunmaktadır (26). RhoA, vücutta en bol bulunan ve eksprese edilen ve en çok çalışılan Rho proteini alt tipidir. Rho, sitoplazmada bulunan GDP/GTP-bağlayıcı bir proteindir ve GTP-az aktivitesi içerir. Rho proteinleri, başlıca hücre iskeleti kontrolünden, stres liflerinin yapılanmasından, fibroblastların fokal adezyonundan ve düz kas kasılmasında Ca^{+2} duyarlılığının düzenlenmesinden sorumludurlar (27). Ayrıca aktin iskeletinin yapılanmasını sağlayarak hücrenin şekli, motilitesi, adezyonu, göçü, kasılması ve sitokinezis gibi birçok hücresel fonksiyonda önemli rol oynarlar (26).

Rho-kinaz yolu NO düzeyleri ile regüle edilmektedir (28). Rho-kinaz, RhoA adı verilen bir G protein ile aktive olmakta ve bunun alfa₁ adrenoseptörlere bağlanarak düz kas hücresindeki myozin hafif zincir fosfatazı (MLC) inhibe ettiği düşünülmektedir (29). Bu şekilde bazal MLC kinaz aktivitesi ile MLC fosforilasyonunda artış olmakta ve sarkoplazmik kalsiyum miktarlarında bir değişme olmaksızın düz kas kasılması gerçekleşmektedir (29). Sonuç olarak çalışmalar GTP bağlayıcı protein olan Rho'nun agonist aracılı Ca^{+2} duyarlılığında yer aldığını ortaya çıkarmıştır. Daha da önemlisi sabit bir Ca^{+2} konsantrasyonunda artmış kasılmaların, aktive edilmiş Rho ile MLC fosforilasyon oranındaki artıştan ziyade, defosforilasyon oranındaki azalmadan kaynaklandığı düşünülmüştür (26).

2.2.2. Rho/Rho-kinaz Aktivitesinin Düzenlenmesi

Rho'nun aktivitesi siklik olarak düzenlenir. Rho aktivitesinin GTP'az aktive edici protein (GAP) ve GTP'az ayrıştırıcı inhibitör (GDI) olmak üzere iki negatif ve guanin nükleotid değiştirici faktör (GEF) olmak üzere bir pozitif düzenleyicisi vardır. İstirahattaki hücrelerde Rho-GDP disosiyasyon inhibitörü (Rho-GDI), GDP-Rho'ya bağlanır ve onu membrandan sökerek sitozole getirir. Hücreler bazı agonistlerle stimüle edilirse Rho spesifik GEF'ler, GDP ayrışmasını ve bunu izleyerek GTP bağlanmasını başlatarak Rho'nun aktivasyonunu arttırırlar. Bundan sonra GTP-Rho C-terminali

geranil-geranillenmiş kuyruğuyla hücre membranına hedeflenir ve spesifik hedefleriyle etkileşir. GAP'ler Rho'nun intrinsik GTPaz aktivitesini hızlandırarak ve onu inaktif GDP-Rho'ya dönüştürerek negatif regülatörler gibi çalışırlar (30). GAP, Rho'nun intrinsik GTP'az aktivitesini artırarak GTP bağlı aktif formunu inhibe eder. Bu GDP/GTP dönüşüm reaksiyonunun hız kısıtlayıcı basamağı GDP-bağlı form'dan GDP'nin ayrılmasıdır. Bu reaksiyon oldukça yavaştır ve GEF tarafından stimüle edilir (31).

Rho'nun aktivitesi G_{12} ve G_{13} proteinleri ile düzenlenir. G_{12} ve G_{13} küçük molekül ağırlıklı GTP bağlayıcı Rho proteinini aktive eder. G_{12}/G_{13} aynı zamanda, hücre iskeleti olaylarını da düzenleyebilen Na^+/H^+ değiş-tokuş proteinini de stimüle eder (32). Rho-kinaz'ın iki major izoformu Rho-kinaz α /ROCK-2 ve Rho-kinaz β /ROCK-1'dir. İnsanda ROCK-1 ve ROCK-2 genleri sırasıyla 18. kromozom (18q11.1) ve 2. kromozomda (2p24) lokalize olmuştur. ROCK1 her yerde olan yüksek oranda bulunduğu, ROCK2 ise öncelikle kalp ve beyin dokusunda olduğu gösterildi (8,9). Myozin II'nin fosforilasyonu düz kas ve hücre kasılması, hücre hareketi, yapışması, hücre iskeleti yapısı, sitokinezis, trombosit aktivasyonu ve çeşitli iyon kanallarının etkileri gibi birçok hücre fonksiyonları için önemlidir. Myozin fosfataz vasküler tonus, kan basıncı kontrolü, gastrointestinal motilite, havayolu direnci, erektil fonksiyon, uterin kasılmalar gibi pek çok düz kas fonksiyonlarını düzenler (33). ROCK aktivasyonu endotelial nitrik oksid sentazın (eNOS) ekspresyonunu azaltır. Rho'nun veya Rho-kinazın inhibisyonu eNOS'un downregüle olmasını önler (34). Statinler, Rho geranilgeranilasyonunu inhibe ederek eNOS aktivitesini artırır (35).

2.2.3. Rho-kinaz İnhibitörleri

Bütün ROCK inhibitörleri ATP bağlanma alanları ile yarışır (36). Bilinen Rho-kinaz inhibitörleri şunlardır; GSK269962A, HA1077 (fasudil oral alındığında aktif metaboliti hidroksifasudile dönüşür), H1152P, SB772077B, Wf536, Y-27632, Y-39983, Slx2119 (selektif ROCK-2 inhibitör) (37). Y-27632 gibi selektif Rho kinaz inhibitörleri ROCK1 ve ROCK2 izoformlarına nonselektif uyum göstermektedir (8). Bir piridin derivesi olan Y-27632'nin etki mekanizmasının, Rho-kinaz üzerindeki ATP bağlanma sahalarını meşgul ederek MLC fosfatazca fosforile edilmesini önlediği düşünülmektedir (38).

2.2.4. Rho/Rho-kinaz Yolağının Fonksiyonları

Rho/Rho-kinaz aracılı hücre içi sinyal yolağı noradrenalin, trombin, anjiyotensin II, trombosit kaynaklı büyüme faktörü ve serotonin gibi çeşitli vazoaaktif ajanlar tarafından aktive edilir (39). Rho-kinaz düz kas kontraksiyonu, aktin sitoskeleton organizasyonu, hücre büyümesi, migrasyonu, adhezyonu, motilite, gen ekspresyonu ve apoptosis gibi farklı hücresel fonksiyonlara sahiptir (8,9).

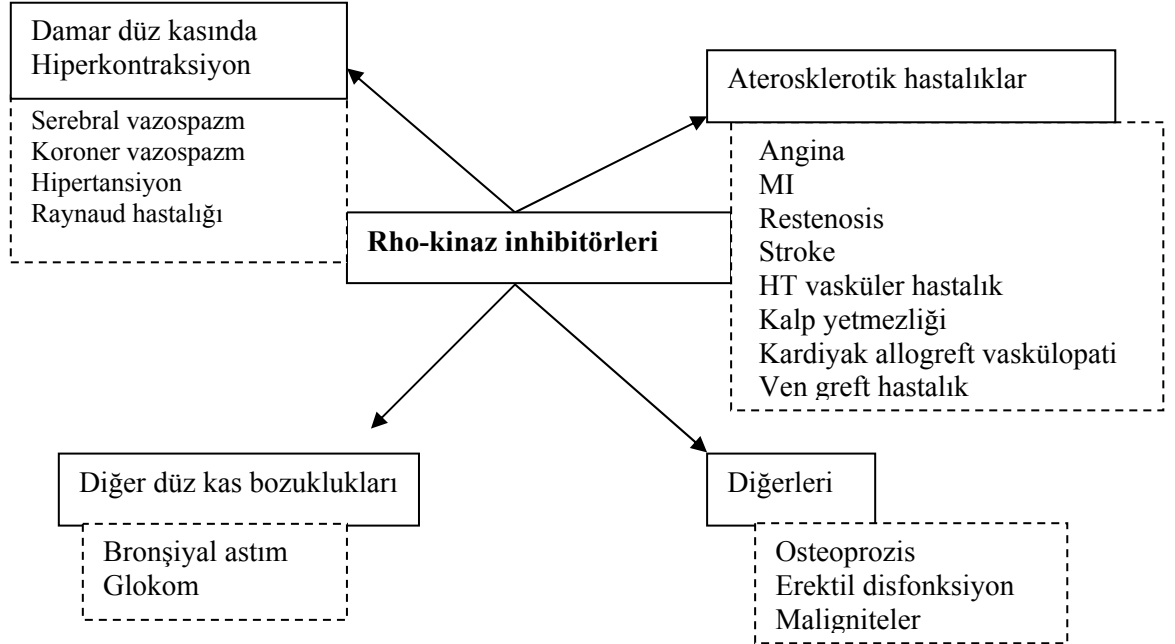
Çalışmalar Rho-kinaz vazospastik angina, iskemik stroke ve kalp yetmezliği gibi kardiyovasküler hastalıklarda önemli rol oynabildiği gösterilmiştir. Son günlerde Rho kinaz inhibitörlerinin anestezi altındaki sıçanlarda iskemik önkoşullamayı teklit eden etkilerini ve biyokimyasal parametrelerini, infarkt büyüklüğünü, aritmilere karşı miyokardiyumda kardiyoprotektif etkileri oluşabildiği gösterilmiştir (10). Vazospastik anjinalı hastalarda Rho kinaz inhibitörü uygulamasının, Ach ile oluşan koroner arter spazmını azalttığı, EKG'deki iskemik değişimleri ve göğüs ağrısını önlediği gösterilmiştir. Yapılan çalışmalar, Rho-kinazın hipertansiyon ve koroner arter spazmları gibi hastalıklarda rolü olduğunu göstermiştir (10). Anestezi altındaki köpekte "pacing" ile indüklenen efor anjinasında, Rho kinaz inhibitörleri ST segment depresyonunu önlemiş ve koroner kan akımını artırmıştır (25). Yapılan araştırmalar, Rho/Rho-kinaz yolağının kardiyovasküler sistem (KVS) fizyolojisi ve patofizyolojisinde yeri olduğunu göstermektedir. Rho-kinaz, vasküler düz kas hücrelerinin adhezyonu, migrasyonu ve proliferasyonunda önemli rol oynar. Aterosklerozun patogenezinde de yer aldığı gösterilmiştir. Son çalışmalar, Rho-kinazın kardiyovasküler yeniden yapılanma (remodeling) patogenezinde rolü olduğunu ortaya konmuştur (37). Rho/Rho-kinaz yolunun önemi pulmoner vazokonstriksiyonda, sıçanlardaki mineralokortikoid kaynaklı hipertansiyonda, artan vasküler reaktivitede ve serebral vazospazmda gösterilmiştir. Kronik NOS inhibisyonu nedeniyle hipertansif olan sıçanların arterlerinde alfa-2 agoniste verilen kontraktıl yanıtın, RhoA aktivasyonu aracılığıyla arttığı bildirilmiştir (40). Rho/Rho-kinaz sinyali vasküler direncin kontrolünde rol oynayabilir ve Rho-kinaz inhibitörleri, hipertansiyon, vazospazm ve ateroskleroz gibi bazı kardiyovasküler hastalıkların tedavisinde etkili olabilir (26). Son zamanlarda yapılan bir çalışma iskemi-reperfüzyonun kalpte RhoA yapımını artırdığını ve miyokardiyal Rho-kinaz aktivitesini yükselttiğini göstermiştir (41).

Hava yolu duyarlılıklarında artış, insan bronşiyal epitel hücresinin interlökin-8 salgılamasında artışa neden olur (42). Kas olmayan hücrelerde Rho/Rho kinaz yolağı; endotelial kontraktile ve kapiller permabilite artışı, trombosit agragasyonu, nötrofil kemotaksisi ve hücre membranı şekil değişikliği, makrofaj fagositozu, mast hücrelerinin salgılama fonksiyonunu ve tümör metastazında rol oynayabilirler. Rho kinaz inhibitörleri tümör metastaz ve invazyonunu önleyebilirler. Genel olarak Rho/Rho kinaz yolağının karıştığı başlıca durumlar, vasküler ve nonvasküler düz kas kasılması, düz kas hücre proliferasyonu, hücre migrasyonu, adezyonu ve sitokinaz, membran şekil değişikliği, fagositoz, hücre farklılaşması, aksonal uzama ve nörit çekilmesi, nörotaransmitter salıverilmesi, hücre bölünmesi ve büyümesidir (8,25).

Çeşitli hastalıklara sekonder gelişen erektil disfonksiyonda Rho kinaz sinyal yolağının katkısının olduğu öne sürülmüştür. Pelvik ateroskleroz ve endotelial hasarlanma ile birlikte vaskülojenik erektil disfonksiyon oluşturulan sıçan modelinde kavernoza Rho-kinaz aktivitesinin arttığı, eNOS enzim ekspresyonunun azaldığı ve erektil fonksiyonun bozulduğu, Rho-kinaz inhibitörü fasudilin kronik oral uygulanmasının erektil fonksiyonları, kavernoza Rho-kinaz aktivitesini ve total eNOS ekspresyonlarını normalize ettiği bildirilmiştir (29). İnsan ve tavşan korpus kavernoza dokularında noradrenerjik sinir stimülasyonu ve fenilefrinle oluşturulan kontraksiyonların, Rho-kinaz inhibitörü Y-27632 ile konsantrasyon bağımlı olarak inhibe olduğu gözlenmiştir (29).

Çeşitli çalışmalarda ROCK inhibitörlerinin spinal kord yaralanmasının hayvan modelinde, Alzheimer hastalığı, multipl skleroz, nöropatik ağrı, diğer nörolojik hastalıklarda potansiyel nörodejeneratif tedavi edici ajan olabileceği öne sürülmüştür (36). Rho-bağımlı sinyal yolağının, vasküler ve vasküler olmayan düz kas kasılması dışında, hücre iskeletinin aktinini etkileyerek sitokinez, hücre morfolojisi ve hücre göçünü de içeren farklı hücresel fonksiyonları (26), aynı zamanda nöronal fonksiyonları düzenlediği bildirilmiştir. Ayrıca kas olmayan hücrelerden sinir hücrelerinde de Rho GTP'azların, sinaps oluşumu, akson göçü, dendrit girintileri ve şekillenmesi, aksonun büyümesi, polaritesi gibi olaylarda fonksiyonu olduğu bildirilmiştir (43,44). İskemik beyinde ROCK-2'nin belirgin olarak arttığı gösterilmiştir. Serebral infarkt esnasında aksonlarda, ROCK'un aktive olduğu, bunun fasudil ile önlediği bildirilmiştir.

Nöropatik ağrıda rol oynayabilir. Rho kinaz inhibisyonu, spinal kord hasarlanması sonrası gelişen ekstremitte fonksiyonlarının yeniden kazanılmasını sağlayabilir (45).



Şekil 1: Rho kinaz inhibitörlerin tedavi hedefleri (25).

2.3. Organofosfat Zehirlenmesinin Kardiyovasküler Etkileri

Genelde toksinlere bağlı kardiyovasküler zehirlenme; hipo veya hipertansiyon, konjestif kalp yetmezliği (KKY) ve pulmoner ödem, kardiyak iletim anormaliteleri veya disritmilerin gelişmesi ile ortaya çıkabilir (46).

OFZ'lerinde kardiyak toksisite çokça araştırılmış olup patogenezi, mekanizması, sıklığı tam olarak tarif edilememiştir (2,47). OFZ bağlı kardiyak toksitesi üç fazda tanımlanmıştır:

Faz I; artmış sempatik tonus (nikotinik etkilere bağlı olarak düşünülen) sonucunda hipertansiyon ve sinüs taşikardinin olduğu kısa dönem (sadece birkaç dakika sürer).

Faz II; Faz I uzamış ikinci faz tarafından takip edilir. Genellikle intoksikasyondan sonra dakikalar içinde başlar, parasempatik aşırı uyarılmaya bağlı hipotansiyon ve sinüs bradikardi ile karakterizedir. Bu faz genellikle malign ventriküler aritmilere kadar kötüleşen bradikardi bağımlı ritm bozuklukları, çeşitli derecelerde atriyoventriküler ritm bozuklukları ve ST-T değişiklikleri ile birlikte.

Faz III; QT uzaması, polimorfik ventriküler taşikardi (torsades de pointes), ventriküler fibrilasyon (VF) ve ani kardiyak ölüm gözlenebilir. Bu üçüncü faz intoksikasyondan kısa süre sonra da görülebilir, fakat genellikle organofosfat maruziyetini takip eden 1-15. günlerde oluşur (48,49). Eğer OF kimyasal savaş ajanı ise, bu hasas periyodun daha uzun sürmesi mümkündür. Ludomirsky ve arkadaşlarına göre QT mesafesinin 580 msn'den daha fazla olması ani kardiyak ölüm için yüksek riski gösterir (50).

Akciğer filminde ciddi ödem, elektrokardiografide (EKG) bradikardi, taşikardi, idiyoventriküler ritm, multiform ventriküler ekstrasistoller, ventriküler taşikardi, Torsades de pointes, VF, bloklar, QT uzaması ve asistol görülebilir (51). Adrenal medulla stimülasyonu sempatik etkiyle sonuçlanır ve bilinenin aksine sinüs taşikardisi ve hipertansiyon görülebilir. Toksisitenin ciddileşmesiyle artmış parasempatik tonusa bağlı bradikardi, PR uzaması, atriyoventriküler bloklar, ve koroner kan akımında azalma görülebilir. Miyokard hücrelerinin değişken uyarılmaları QT mesafesinde uzama ve takiben torsades de pointes ile sonuçlanabilir (7).

Direkt miyokardiyal hasar, kolinerjik etkileşimden bağımsız bir şekilde de etkisini gösterebilir. Kalp, innervasyonunu, otonom sinir sisteminin sempatik ve parasempatik dalından alır. Hem sempatik hem de parasempatik aşırı aktivite miyokardiyal hasara neden olur. Zehirlenmenin her iki sisteme olan akut etkisi ile fonksiyonel dengenin bozulduğu öne sürülmektedir (49). Papiller kaslarda infarkt alanları ile kalp dokusunda benekleşme ve koyulaşma bildirilmiştir. Benzer olarak atropinin hayatta kalmayı arttırması yanında, myokard hasarını da önlediği rapor edilmiş olup (52), bir başka çalışmada bildirilen “parasempatik aşırı uyarılma ile salınan ACh miyokardiyal hasara neden olur” hipotezi birbirlerini desteklemektedirler (53). Otonomik sistemin her iki dalının kardiyak hasarlanma patogenezinde rol oynadığına dair deliller vardır. Katekolamin ile oluşturulan sempatik aşırı aktivitenin miyokardiyal hasara neden olduğu bildirilmiştir ve bu durumun sempatik antagonistlerle önlendiğinin gösterildiği çalışmalar vardır (47). Sağlıklı yada aterosklerotik koroner arter hastalığı olan erişkinlerde, intrakoroner ACh injeksiyonunun koroner vazokonstriksiyona neden olduğu bildirilmiştir ve akut dönemdeki EKG'deki ST-T değişiklikleri ile bağlantılı olabileceği ileri sürülmüştür (54). Histopatolojik olarak hücre morfolojisinin bozulması; kalsiyum iyonlarının ACh reseptörlerine yüksek oranda bağlanma özelliğine bağlı

olarak kalsiyum iyonunun serbest kalmasına ve bunun sonucunda sitoplazmaya aşırı kalsiyum girişinin meydana gelmesi ile izah edilmiştir (49).

2.4. Myokard Hasarının Belirlenmesinde Biyokimyasal Göstergeler

İdeal bir kardiyak enzim yada miyokardda yüksek konsantrasyonda bulunmalı, miyokard hasarı ile erken yükselip yeterli süre serumda ölçülebilir seviyede bulunmalıdır. Ancak tekrarlayan miyokard hasarının saptanmasını engelleyecek kadar uzun kalmaması da önemlidir. Seviyesi miyokard hasarının derecesi ile orantılı olarak artmalıdır. Ölçüm yöntemi ucuz, kolay, hızlı ve kantitatif olmalıdır. Ancak bu özelliklerin tamamını içeren bir kardiyak enzim veya protein henüz tanımlanmamıştır (55).

2.4.1. Kardiyak Belirteçler

Miyoglobin (Mb), kalp ve iskelet kasında bol miktarda bulunan düşük molekül ağırlıklı (17.8 kDa) bir proteindir. Miyokard hasar için duyarlı bir belirteçtir, ancak özgüllüğü yoktur. Hasar sırasında miyokarddan hızla salınır ve böbreklerden hızlı itrah edilir. Hızlı kinetiği nedeniyle Mb, akut bir olayın başlangıcından sonra erken dönemde (ilk 1-3 saat içinde) yükselir ve bu nedenle, kardiyak hasarın erken saptanması ve/veya ekarte edilmesi açısından güvenilir bir belirteçtir. Özgüllüğü olmadığı için klinikte esas önemli olan pozitif prediktif değerinden ziyade, negatif prediktif değeridir. Semptomlar başladıktan sonraki 4-6 saat içerisinde Mb'de artış olmaması kardiyak hasarı ekarte etmek için çok değerli bir kriterdir. Bu da, acil servisler gibi hızlı triajın önemli olduğu ortamlarda çok önemli bir avantaj sağlamaktadır (56).

Kreatin Kinaz (CK), yüksek enerjili fosfatların ATP'den kreatine transferini sağlayan bir enzimdir. Kas hücrelerinde mitokondri ve sitozol içinde yer alır. M ve B zincirlerinden oluşan 3 farklı izoenzim şeklinde bulunur. CK-MM; tüm dokularda, CK-BB; beyin, böbrek ve gastrointestinal sistemde, CK-MB; kalp, iskelet kası ve az miktarda ince bağırsak, diyafram, uterus, dil ve prostatta bulunur (57). Miyokardda yer alan total CK'ın %20'si MB formundadır. İskelet kasında ise %5 oranında bulunur. Bu nedenle travma ve inflamasyonlarda seviyesinin yükselmesi özgüllüğünü azaltmaktadır. Serum CK ve CK-MB'nin plazma aktivitesi miyokard hasar başlangıcından 4-8 saat sonra normal sınırlarını aşar. 20-24 saatte pik yapar ve 48-72 saat içerisinde normal düzeylerine ulaşır. Total CK ve CK-MB düzeyleri enfarktüs büyüklüğü ile koreledir ve prognozun önemli bir belirteçidir. CK-MB seruma geçtikten sonra, MB1 ve MB2 olarak

ikiye ayrılır. MB2/ MB1 oranının ≥ 1.5 olması miyokard infarktüsü lehine yorumlanır. CK-MB alt grup analizi akut myokard infarktüsünün (AMI) ilk 6 saatteki tanısında %91 hassasiyet ve özgüllük sunmuştur. İlk 6 saatteki negatif prediktif değeri ise %97'dir. Aynı dönemde Mb'in negatif prediktif değeri %95'dir.

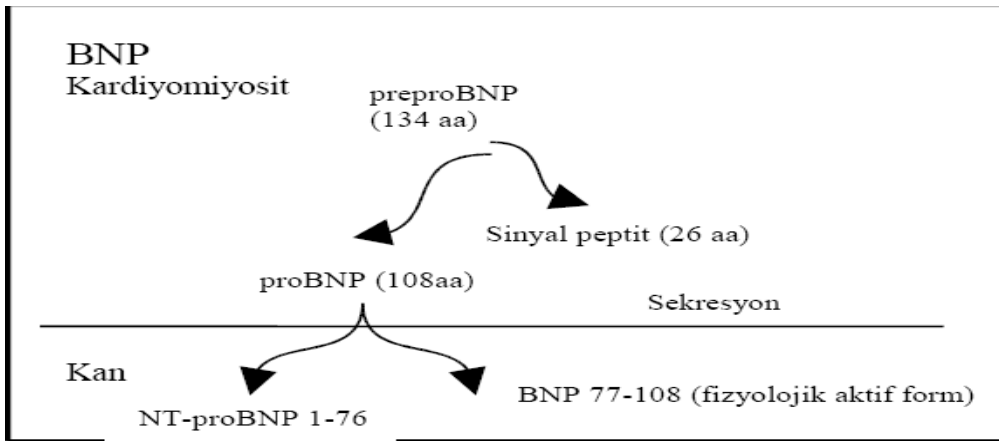
Kardiyak troponinler, troponin kompleksi troponin T, I ve C'den oluşmaktadır. Troponin C kalsiyumu bağlayarak kontraksiyon olayını başlatırken, troponin I (Tc-I) aktini bağlar ve istirahat sırasında aktin-miyozin etkileşimini inhibe eder. Troponin I ise troponin kompleksinin tropomiyozine bağlanmasını sağlar. Düz kas hücrelerinde kontraksiyonu düzenleyen bir troponin kompleksi ise yoktur (58). Her iki troponin de kontraktıl elemente bağlı olmasına rağmen troponin T'nin %6-8'i, troponin I'nın ise %2.8-4.1'i serbest olarak sitoplazmada bulunmaktadır. Troponin C iskelet kasında ve kalp kasında aynı genler tarafından kodlanmasına karşın troponin T ve I farklı genler tarafından kodlanmaktadır (59). Troponinlerin miyositlerdeki kontraktıl elementten troponin T-I-C olarak salındığı, bu üçlü kompleksin ise dolaşımda yıkıma uğrayarak ikili troponin I-C kompleksi ile serbest troponin T oluştuğu öne sürülmüştür. Özgüllüğü oldukça iyi olan T-I, kardiyak hasarlanmadan 4 ila 8 saat sonra yükselmeye başlar, 12-24 saatlerde zirve yapar ve dolaşımdaki bu düzeyini ortalama 5-7 gün devam ettirir (60). Miyokarddan troponin salınımı, geçici veya kalıcı miyokard hasarını gösterebilir. Bu hasar, iskemi, inflamasyon, infeksiyon, infiltrasyon, toksinler, artmış sol ventrikül duvar gerilimi, infiltratif hastalıklar gibi miyokarda olan her türlü etkiye bağlı olabilir ve çoğunlukla prognostik değer taşır (61).

BNP ve NT-proBNP, natriüretik peptid ailesi, benzer biyokimyasal yapıları olan dört molekülden oluşmaktadır; atrial natriüretik peptid (ANP), beyin natriüretik peptid (BNP), C-tipi natriüretik peptid (CNP), dendroaspis natriüretik peptid (DNP). Her biri için öncü hormon, ayrı bir gen tarafından kodlanmaktadır (62).

Dolaşımdaki BNP kalpten köken alır ve bu peptidin en yüksek konsantrasyonları ventrikül myokardı içinde bulunur. ANP, esas olarak atriyal dokuda üretilmekle beraber, az miktarda ventrikül, beyin, hipofiz anterior lobu, akciğer ve böbreklerde salgılanmaktadır. Ayrıca fetal ve neonatal ventrikül dokusunda ve hipertrofik ventriküllerde de tespit edilmiştir. CNP ise, vasküler endotel hücrelerinde, beyin, hipofiz anterior lobunda ve böbreklerde salgılanmaktadır (62,63). ANP ve BNP temelde dolaşımdaki kardiyak hormonlardır. CNP ise vasküler dokular üzerine vazorelaksan ve

antiproliferatif etkileri olan bir parakrin faktör olarak davranır. Henüz insanlarda DNP'nin endojen varlığının olup olmadığı kesin bilinmemektedir. Gastrointestinal sistem mukozasında su ve tuz transportundan sorumlu olduğu sanılmaktadır (64).

BNP'nin temel kökeni ventriküllerdir. Sol ventrikül gerilimi veya duvar gerginliği, BNP salınımı için primer düzenleyicilerdir. Miyosit içinde sentez edilen prepro-BNP, 134 aminoasitten oluşur. Pro-BNP oluşturmak üzere 26 aminoasitlik bir sinyal peptidi ayrılır. ProANP'nin aksine, proBNP (108 amino asit) granüllerde depolanmaz. Bu yüzden BNP sentezinin ve salgılanmasının akut düzenlenmesi, gen ekspresyonu seviyesinde meydana gelir. Sürekli bir ventriküler genişleme ve basınç artışı olduğunda, pro-BNP fizyolojik olarak aktif hormon olan BNP ile inaktif bir metabolit olan NT-proBNP'ye parçalanır (Şekil 2).



Şekil 2: BNP'nin sentez ve sekresyonu. (62,63)

Natriüretik peptidlerin bağlanmasından sonra, ligant-reseptör kompleksi internalize olur ve natriüretik peptidler enzimatik olarak yıkılır, ardından reseptör hücre yüzeyine geri döner. Natriüretik peptidleri temizleyen bir başka mekanizma ise, nötral endopeptidaz tarafından enzimatik yıkımdır. Nötral endopeptidaz; endotel hücreleri, düz kas hücreleri, kardiyak myositler, böbrek epitel hücreleri ve fibroblastlarda yoğun olmak üzere akciğer, adrenal bezler, sindirim sistemi ile beyinde bulunur. Bu enzime en yüksek afinitiyi CNP gösterir, onu ANP ve BNP izler (62,63).

Bununla birlikte, nötral endopeptidazın düzenlediği yıkımın BNP'nin baskın metabolik yolu olduğu görülmektedir. En kısa biyolojik yarı ömür, ANP için (yaklaşık 3 dakika) bildirilmiştir ve bunu 20 dakikalık yarılanma ömrüyle BNP izler. ANP ve BNP'nin N-terminali pro-ANP yaklaşık 1 saat, N-terminali pro-BNP halen net olarak bilinmemekte, 1-2 saat olarak tahmin edilmektedir (65). BNP ve NT-proBNP

ventriküler duvar stresindeki artışa cevap olarak kardiyak myositlerden salınırlar. Bir odadaki duvar stresi odanın çapı ve transmural basınçla direkt olarak ilişkilidir. Geniş MI sonrası, infarktüs ve infarktüs olmayan bölgelerdeki yapısal veya fonksiyonel değişiklikler sonucu sol ventrikülde genişleme ve kalp yetersizliğini ifade eden ventrikül remodellingi AMI'nın önemli bir komplikasyonudur (66).

BNP ve NT-proBNP arasındaki farklar

- NT-proBNP kan konsantrasyonu BNP'ye göre 20-50 kat daha yüksektir.
- NT-proBNP değerleri pozisyonla değişmez.
- NT-proBNP kan yarı ömrü daha uzundur.
- NT-proBNP için alınan daha az kan örneği ve oda sıcaklığında 3 gün stabil kalabilir.
- Ventriküler fonksiyon bozukluğunda NT-proBNP salınımı daha fazladır.
- Sol ventrikül fonksiyon bozukluğunda: NT-proBNP > BNP (2-10 kat)
- NT-proBNP, BNP'ye göre GFR'den daha fazla etkilenir

Ayrıca, pulmoner emboli, primer pulmoner hipertansiyon, kor pulmonale, konjenital kalp hastalıkları ve akut koroner sendrom, aort darlığı, hipertrofik kardiyomyopati, hipertansiyon, restriktif kardiyomyopati gibi durumlarda arttığı rapor edilmiştir (67).

2.4.2. Oksidan-antioksidanlar

Organizmada serbest radikallerin oluşum hızı ile bunların ortadan kaldırılma hızı bir denge içerisinde ve bu durum oksidatif denge olarak adlandırılır. Oksidatif denge sağlandığı sürece organizma, serbest radikallerden etkilenmemektedir. Bu radikallerin oluşum hızında artma ya da ortadan kaldırılma hızında bir düşme bu dengenin bozulmasına neden olur. 'Oksidatif stres' olarak adlandırılan bu durum özetle: serbest radikal oluşumu ile antioksidan savunma mekanizması arasındaki ciddi dengesizliği göstermekte olup, sonuçta doku hasarına yol açmaktadır (68). Biyolojik sistemlerdeki reaktif oksijen türleri (ROS), süperoksit anyonu (O_2^-), hidroksil radikali (HO.), nitrik oksit (NO.), peroksil radikali (ROO.), ve radikal olmayan hidrojen peroksit (H_2O_2) gibi serbest radikaller oksidatif stresin en önemli nedenlerinden birini oluştururlar (69). Serbest radikal zincir reaksiyonları genellikle, moleküllerden H'nın uzaklaştırılmasıyla başlar. Serbest oksijen radikalleri (SOR) oldukça reaktif ve stabil olmayan metabolitler olup, protein, lipid ve nükleik asitler gibi önemli biyomolekülleri değiştirme kapasitesine sahiptirler. Sağlıklı kişilerde bu metabolitlerin zararlı etkileri

antioksidanlarla sınırlanmaktadır, böylece oksidatif hasara bağlı olarak ortaya çıkan doku hasarı en aza indirilmektedir (70).

Lipid peroksidasyonu (LPO), serbest radikallerin hücre membranında bulunan poliansatüre yağ asitlerini (PUFA) etkilemesi sonucu meydana gelen zincirleme bir reaksiyondur (71). Üç ya da daha fazla çift baş içeren yağ asitlerinin peroksidasyonu ile malonildialdehit (MDA) oluşur. MDA düzeyi lipid peroksidasyonunun yaygınlığı ile korelasyon gösterir. Organofosfat bileşiklerinin kalpte histopatolojik ve immünohistokimyasal değişikliklere lipid peroksidasyonu artışı ile neden olduğu tespit edilmiştir (72). Ayrıca, akut tübüler nekroz ve nöbet gelişiminde lipid peroksidasyonu ve SOR'nin bağlantılı olabileceği ileri sürülmüştür. Yine bir OB olan metidationun ve diazinonun akut verilmesi ile, sıçanların kalp dokusunda, antioksidan enzimlerin aktivitelerinde yaptığı değişiklikler sonucu kalpte hasara neden olduğu ve bu hasarın temelinde MDA artışının önemli rol oynadığı iddia edilmiştir (73).

Antioksidanlar; endojen ve eksojen kaynaklı olabilen antioksidanlar, hücrenin hem sıvı hem de membran kısmında bulunurlar (74). Antioksidanlar, serbest radikallerin oluşumunu ve verebilecekleri zararı önlemek için varolan moleküllerdir (75). Süperoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz, katalaz, glutatyon transferaz, mitokondrial sitokrom oksidaz sistemi ve glutatyon redüktaz enzimatik antioksidanlardır. E-vitamini, β -karoten, askorbik asid, melatonin, ürik asit, bilirubin, glutatyon, seruloplazmin, albumin, transferin, ferritin ise diğer bazı antioksidan maddelerdir. Glutatyon, metabolizmada önemli rol oynayan ve glutamik asit, sistein ve glisin aminoasitlerinden oluşan bir tripeptittir. Sentezi ATP kullanılan iki basamaklı bir reaksiyonla gerçekleşir (71). En önemli işlevleri; hücre zarlarından aminoasitlerin hücre içine taşınması, koenzim olarak enzim yapısına katılmak, proteinlerdeki sülfidril gruplarını korumak, peroksit, serbest radikaller ve reaktif toksik ara maddelerin etkisizleştirilmesidir (76). Ayrıca ksenobiyotik ve karsinojenler gibi birçok endojen ve eksojen zararlı bileşikleri de etkisizleştirmede önemli rol oynayan anahtar antioksidanlardandır. Oksidatif hasarı önlemesi, glutatyonun serbest radikallerle direkt reaksiyona girme, disülfidleri direkt olarak indirgeme ve glutatyon peroksidaza kofaktör olabilmesi ile gerçekleşir (77). Serum glutatyon seviyelerinin, insan zehirlenme vakalarında OB'ne maruziyet sonrası azaldığı bildirilmiştir (78). Başka bir çalışmada

balıkların kas, karaciğer ve serumunda diklorvosa bağlı olarak serum glutatyon düzeylerinin azaldığı öne sürülmüştür (79).

Nitrik oksit (NO); Otokrin ve parakrin bir hücrel ajan olan NO, normal fizyolojik koşullar ile bir çok patofizyolojik durumda homeostazın sürdürülmesinde önemli bir etkidir. Endotel kaynaklı vazodilatör faktörün NO olduğu belirlendikten sonra, bu molekülün beyin ve daha bir çok hücre ve organ sistemlerinde üretilerek fizyolojik ve patofizyolojik olaylarda etkili olduğu ileri sürülmüştür (80). Nitrik oksit, membranları kolayca geçebilme özelliği olan, oldukça lipofilik bir moleküldür. NO sentezleyen enzimlerin (NOS) katalize ettiği bir dizi reaksiyon sonucunda L-arginin, L-sitrullin ve NO'ya dönüşür (81,82) (Şekil 1). Bu reaksiyon için ortamda oksijen ve bazı diğer kofaktörlerin (nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH), flavin adenin dinükleotid (FAD), flavin mononükleotid (FMN), tetrahidrobiopterin ve kalmodulin) bulunması gerekir (81,83,84). Nitrik oksit sentezleyen enzimin 3 farklı izoformu vardır. Bu izoenzimlere özgü genler kromozom 7 (endotelyal NOS-eNOS), 12 (nöral NOS-nNOS) ve 17 (indüklenebilen NOS-iNOS) üzerinde bulunmuştur (85,86). Nitrik oksit sentezleyen enzim-I yada nNOS ve NOS-III yada eNOS sürekli, ancak az miktarda ve kalsiyuma bağımlı olarak (enzim aktivasyonu için hücre içi kalsiyumun artması gerekir) salınır. Nöral dokularda NOS-I ve vasküler endotelde ise NOS-III bulunur. Solunum yolu epitelinde ve çeşitli diğer hücrelerde NOS-II yada iNOS bulunur (kalsiyuma bağımlı değildir). Özgül sitokinlerin indüklemesi sonrasında fazla miktarda salgılanır. interferon-g, IL-1 b, TNF-a, endotoksin veya egzotoksinlerce indüklenmesi sonucunda NOS-I ve NOS-III'ten (ikisi birlikte, constitutive NOS-cNOS olarak adlandırılmaktadır) 1000 kat daha fazla NO sentezleyebilmektedir. Glukokortikosteroidler bu indüksiyonu ve NO sentezini inhibe eder (85-87). NO, suda ve yağda çözünebilen, solüsyon içinde yarılanma ömrü 30 saniye olan, nitrit ve nitrate okside olabilen renksiz ve stabil bir gazdır. Tiol grupları ile reaksiyona girerek gerektiği zamanlarda kullanılmak üzere depolanır (80). Nitrik oksit, özellikle nöronlar ve damar düz kas hücre membranında bulunan guanilat siklazı aktive eder. Guanilat siklaz ise GTP'den bir ikincil haberci olan siklik GMP (cGMP) oluşumunu artırır. cGMP kendine uyan (kas gevşemesi, sinapstan uyarı geçişi gibi) hücre içi proseslerini regüle eder (88). Oluşan bu biyokimyasal olaylar düz kas kasılması, vasküler tonüs ve kan akışının düzenlenmesinde önemli rol oynar. NO aynı zamanda trombositler içindeki çözülebilir guanilat siklaz aktivitesini de

artırarak trombosit adhezyon ve agregasyonunu azaltır. Ayrıca mikroorganizmaların mitokondrial proteine bağlı demir bileşikleriyle reaksiyona girip DNA sentezini bozarak ölmelerine yol açar ve savunma sisteminde rol oynar. Guanozin 3.5-siklik monofosfat, böbrekler ile beyinde atrial natriüretik faktör, sinirlerden uyarı geçişi, düz kasların gevşemesi, retinada fototransdüksiyon ve enterotoksinlerle ilişkili olarak ince bağırsağa sıvı salınımını etkiler. NO demir sülfür içeren ve trikarboksilikasit siklusunun enzimi olan cis-akonitaz ile gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenazın tiyol (SH) gruplarına bağlanır (80).

Taşıdığı çiftleşmemiş elektron nedeni ile NO, bir serbest radikal olarak tanımlanabilir ve serbest radikallerden farklı olarak, diğerleri her konsantrasyonda hücreler için zararlı iken, NO'nun aşırı sentezi hücreler için zararlıdır. Düşük konsantrasyonlarda ise çok önemli fizyolojik işlevlerde rol almaktadır. Ancak aşırı ve kontrolsüz NO sentezi hücreler için zararlı olmaktadır. Bu özelliği ile NO, çok önemli fizyolojik haberci molekülü özelliği kazanmaktadır (89). Ayrıca organizmada peroksinitrit anyonu ve hidroksil radikali gibi çok etkin radikallerin üretilmesine neden olur. Bu radikaller dokulara zarar verebilir, kalpte kontraktıl fonksiyonu bozabilir, çeşitli iyon pompalarını etkisiz kılarak iletim bozukluklarına yol açabilir. Öte yandan NO'nun doğrudan doğruya mitokondriyal solunum zincirini inhibe ettiği de bilinmektedir. Kalpteki miyositlerin üçte birini mitokondriler oluşturur. Dolayısıyla, mitokondriyal solunum zincirindeki bozukluklar kontraktıl fonksiyonu bozar ve dokuda hasara neden olur (90).

Nitrik oksit, MSS'de hafıza oluşumu, denge, koku alma gibi birçok fonksiyonları destekleyen bir nöotransmitter olarak fonksiyon görmektedir. Periferik sinir sisteminde ise nonadrenerjik ve nonkolinerjik sinirleri etkileyerek vazodilatasyon, solunum, genitoüriner ve mide barsak fonksiyonlarının düzenlenmesine katkı sağlar (91). Dolaşım sisteminde, daha önce bahsedilen trombosit agregasyonunun ve adezyonun engellenmesi, kalp kasılmasının idamesi gibi olaylara katkıda bulunarak sistemik dolaşımın düzenlenmesinde rol oynar, ayrıca kalp, karaciğer ve beyinde lokal dolaşımı düzenler (92). Vazoregülan bir molekül olan NO, damarlarda yeterli miktarda sentezlenemezse, vazodilatasyon azalmakta, antioksidan vitamin düzeyleri düşmekte, ateroskleroz ve vaskülopatilerin gelişmesi kaçınılmaz olabilmektedir (93). Sonuç olarak sağlıklı endotelde denge, NO'ya bağlı vazodilatasyon yönündedir diyebiliriz. Endotel

disfonksiyonu, sağlıklı endotelin antienflamatuvar, antikoagulan ve vazoaaktif etkilerinin yetersizliği ile sonuçlanır. Endotel disfonksiyonu kardiyovasküler etkilenmelerin çoğu ile birlikte olup, hipertansiyon, hiperglisemi, kalp yetmezliği örnek olarak gösterilebilir (94). Ayrıca NO, miyokardiyumda pozitif inotropik, kronotropik ve lusinotropik etki göstermektedir. Paradoksal olarak mitokondriyal metabolizmayı inhibe ederek oksijen gereksinimini azaltır. Kardiyak NO salınımı değişkendir ve salınımı erken diyastolik dolum fazında artar. Ön yük arttığında, salınımı artan NO'nun, Frank-Starling mekanizmasında etkili olduğu bildirilmiştir (95).

2.5. Myokard Hasarının Belirlenmesinde Histopatolojik Göstergeler

Organofosfat bileşiklerinin sıçanlarda pankreas, karaciğer, testis, beyin, vasküler duvar, böbrek ve kalpte histopatolojik değişikliklere neden olmaktadır. Bir çalışmada metidation'a bağlı olarak kalp hücrelerinde miyositolizis şeklinde dejeneratif değişikliklerin olduğu (73), bir başka klinik çalışmada ise malation zehirlenmesinin miyokardiyal nekroz alanları oluşturduğu bildirilmiştir (96). Diklorvosun da sıçanlarda endometrial histopatolojik değişikliklere neden olduğu rapor edilmiştir (97).

İndüklenebilir nitrik oksit sentaz (iNOS), kalp myositleri, karaciğer hücresi, nöronlar, mikroglial hücreler, nötrofiller, vasküler endotel ve kas hücrelerinde bulunur. Travma, stres, akut enflamasyon gibi durumlarda salınan iNOS, hem doku koruyucu hem de zarar verici bir etkiye sahiptir. Normalde hücrelerde olmayan iNOS, özgül sitokinlerin indüklemesi sonrasında fazla miktarda salgılanır. İnterferon-gama, IL-1, TNF-alfa, endotoksin veya egzotoksinlerce indüklenmesi sonucunda, NOS-I ve NOS-III'ten (ikisi birlikte, constitutive NOS-cNOS olarak adlandırılmaktadır) 1000 kat daha fazla NO sentezleyebilmektedir. Glukokortikosteroidler iNOS uyarılmasını ve NO sentezini inhibe ederler (87).

Kalp yetmezliğinde, kalp hücresinde iNOS aktivitesinin arttığı bilinmekte olup, iNOS'un dilate kardiyomiyopati, organ reddi ve miyokard infarktüsünde uyarıldığı rapor edilmiştir (98). Kalp yetmezlikli hastalarda iNOS ve nNOS'daki artış ile oksidatif stresteki artışın uyumlu olduğu bildirilmiştir (99). Kalpte iNOS'ın sentez artışına bağlı olarak, sentezi artan NO'in negatif inotrop, kronotrop ve beta adrenerjik uyarılmada azalma yönünde etkisi ortaya çıkmaktadır. İndüklenebilir NOS inhibitörleri verilmesi ile

iskemiye bağlı kalp yetmezliği olan hastalarda myositte hipertrofi, infarkt büyüklüğü ve mortalitede önemli azalmalar olduğu rapor edilmiştir (100).

Soman zehirlenmesinde, arginin (NOS substratı) ve iNOS inhibitörü olan NG-nitro-L-arginin methyl ester (NAME)'in etkisi araştırılmış ve arginin ile artmış mortalite görülürken, NAME ile mortalitenin azaldığı rapor edilmiştir (101). Ayrıca OB ile oluşturulan zehirlenmelerde, nöbetleri önlemek için NOS inhibitörlerinin etkin olduğu ve bu nöbetlerin NO ile ilişkili olabileceği ifade edilmiştir (102).

Apoptosis; (programlı hücre ölümü), çok hücreli organizmaların genetik şifrelerinde bulunan “hücre intiharı” programlarının gelişimsel ve/veya çevresel uyarımlarla etkinleşmesi sonucu ortaya çıkan, gelişim ve farklılaşma sırasında organ yapısı ve işlevlerinin aktif değişimini sağlayan fizyolojik hücre ölümü olarak tanımlanmaktadır (103). Bir başka deyişle, bazı hücrelerin, geri kalanın iyiliği için herediter olarak kendilerinde varolan intihar programını devreye sokarak hayatlarını sonlandırmalarıdır. Literatürde ilk kez “mitozun karşıt anlamı” olarak kullanılan apoptosis, “ağaçların yapraklarını dökmesi” anlamına gelir (104). Apoptosis, nekrozdan oldukça farklıdır. Nekrozda akut hücre hasarını takiben hücre ve organellerinin şişip lizise uğradığı pasif ve patolojik bir hücre ölümü söz konusudur. Dış etki ile koruyucu mekanizmaların devreye girmesine fırsat vermeyecek şekilde gelişen nekrozda, zarar gören esas hedef organel, hücrenin enerji kaynağı olan mitokondridir. Apoptosis ise aktif işlev gerektiren genetik kontrollü bir süreç olup, hücre büzüşür ve bir saatten kısa bir sürede hacminin %30'nu kaybeder. Mitokondri morfolojik olarak sağlamdır, ancak burada esas hasarlanan hedef organel, hücre çekirdeğidir. Apoptosis, embriyogenezis, immünolojik reaksiyonlar gibi birçok fizyolojik olayda yer almakla birlikte (103), farklı çevresel uyarılar da apoptozisi başlatabilir. İnflamatuvar sitokinler, immuno regülatuvar sitokinler, oksidatif stres, mekanik stres apoptozisi başlatabilmektedir (105). Reaktif oksijen radikalleri veya antioksidan enzimlerin azalması ile de uyarılabilir (104).

Apoptotik hücredeki morfolojik değişiklikleri saptamak için ışık mikroskobu ve elektron mikroskobu kullanılmaktadır. Bu morfolojik değişikliklerin saptanması sitoplazmik farklılıklar (kaspaz aktivitesi, hücreye kalsiyum akışı, mitokondri disfonksiyonu), membran değişikliklerinin belirlenmesi (membran geçirgenliği), apoptoz sürecindeki görevli çeşitli proteinlerin serum veya dokuda ölçülmesi (Bcl2/Bax), DNA parçalanmasının çeşitli özel immünohistokimyasal boyalarla

gösterilmeleri ile yapılmaktadır. En sık kullanılan yöntemler *DNA agarose gel electrophoresis* ve *TUNEL* (terminal deoxytransferase mediated bio-dUTP nick end labeling) boyası ile formalinde fikse edilmiş materyalin mikroskopik incelenmesidir (106).

Apoptozis sıklıkla, hücre siklusunda progresyon gösteren hücrelerde olur. Bu nedenle kardiyak hücrelerde oluşmayacağı düşünülmüştür. Ancak miyokarda da apoptozisin görülebileceği bildirilmiş olup, farklı kardiyak ve vasküler hastalıklarda apoptozis mekanizmalarında bozukluklar gösterilmiştir (103). Örnek olarak fokal apoptotik bir odağın, nekrotik hücrelerde olduğu gibi ileti sistemini etkileyerek disritmi veya bloklara yol açabildiği rapor edilmiştir. Yine hafif iskemi, miyositlerde apoptosise yol açarken, ağır iskemi nekrozla sonuçlanmaktadır. Miyokard infarktüsünde ise infarktüs bölgesinde her iki hücre ölüm tipi de bir arada görülmekte olup, apoptozis en yoğun olarak infarktüsü sınırlayan bölgede izlenmektedir. Kalp yetersizliğinde apoptozis en yoğun araştırılan konulardan biri olup, hem post-mortem hem de biyopsi çalışmalarında gösterilmiştir (107).

Sıçanlarda parakson ve malation'un sırası ile lenfosit ve fibroblastlarda kaspaz-3 aktiviteni baskılayarak apoptosise neden olduğu, sarinin ise serebellum purkinje hücreleri, hipokampus ve serebral korteks nöronlarında apoptotik hücre ölümüne yol açtığı rapor edilmiştir (106). Ayrıca diklorvos ile sıçanlarda endometrial apoptotik değişiklikler bildirilmiştir (72).

3. MATERYAL VE METOD

Bu çalışma, Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurul'undan (Etik kurul onay tarihi: 14.05.2007 ve karar No: 05-2007/13) onay alındıktan sonra, Tıp Fakültesi Acil Tıp, Farmakoloji, Biyokimya ve Patoloji Anabilim Dalları'nın işbirliği ile gerçekleştirildi. Farmakoloji laboratuvarında yapılan deneylerde, 200-400 gram ağırlığındaki erkek Wistar Albino cinsi sıçanlar kullanıldı. Deney hayvanları dört gruba ayrıldı:

3.1. Deney Hayvanları

Sıçanlar Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Laboratuvarı'ndan temin edildi. Çalışma gününe kadar deney hayvanları laboratuvarında, 22°C' de, normal yem ve su ile beslenerek 12 saat gündüz 12 saat gece olacak şekilde barındırıldı. Deneyden hemen önce sıçanlar tartılarak ağırlıkları kaydedildi. Ağırlıklarına göre ilaç dozları hesaplanarak not edildi. Sakrifikasyon işlemine kadar yukarıda belirtilen ortamda 6 saat tutuldular. Bu süre içerisinde ölenler kaydedildi, 6 saatten önce ölenlerden kan ve doku örnekleri alınmadı.

3.2. Deney Protokolü

Mısır yağı kontrol grubu (M grubu)

Kilograma 30 mg olarak verilmesi planlanan diklorvos için hesaplanan hacimde mısır yağı intraperitoneal (i.p.) olarak toplam 9 sıçana verildi. Altı saat sonra i.p. olarak verilen tiyopental sodyum (120 mg/kg) ile anestezi sağlandı. Kan örnekleri alınarak sakrifiye edildi, daha sonra kalp doku örneği alındı.

Diklorvos 30 mg/kg grubu (D grubu)

Toplam 13 sıçana, diklorvos mısır yağında 1:20 oranında çözündürülerek, 30 mg/kg dozunda i.p. olarak verildi (108). Hayatta kalan sıçanlara, 6 saat sonra i.p. olarak verilen tiyopental sodyum (120 mg/kg) ile anestezi sağlandı. Kan örnekleri alınarak sakrifiye edildi, daha sonra kalp doku örneği alındı.

Y-27632 (10 mg/kg) ve diklorvos 30 mg/kg (Y10 grubu)

Deney hayvan laboratuvarından alınan 9 sıçan kullanıldı. Sıçana önce 10 mg/kg dozunda Y-27632 (109) ve hemen sonrasında 30 mg/kg diklorvos i.p. olarak verildi. Hiçbir sıçanda kolinerjik semptom ve mortalite gözlenmedi. Yaklaşık 6 saat sonra sıçanlar 120 mg/kg tiyopental ile anestezi sağlanarak sakrifiye edildi.

Y-27632 (1 mg/kg) ve diklorvos 30 mg/kg (Y1 grubu)

Deney hayvan laboratuvarından alınan 9 sıçana önce 1 mg/kg dozunda Y-27632 (109) i.p. olarak uygulandı. Y-27632 verildikten sonra yine i.p. diklorvos 30 mg/kg dozunda verildi. Yaklaşık 6 saat sonra sıçanlar 120 mg/kg tiyopental ile anestezi sağlanarak sakrifiye edildi.

Toksik belirtilerin ve kas fasikülasyonunun gözlenmesi; Sıçanlar diklorvos verildikten 6 saat sonra gözlendi. Kas fasikülasyonu, Zhou ve ark., (111) daha önceden tanımladıkları kalitatif evreleme sistemine göre değerlendirildi:

Evre 0, anormal fasikülasyon yok; evre 1, eklemlerde hareket olmaksızın yüz ve dalların hafif tremoru; evre 2, eklemlerin horizontal hareketi ve dalların hafif fasikülasyonu; evre 3, eklemlerin vertikal hareketi ve dalların kas fasikülasyonu.

Serum ve doku örneklerinin elde edilmesi; Anestezi verildikten sonra, sol parasternal torakotomi yapıldı ve kalp çevre dokularından ayrıldı. Sağ ventrikülden kan alınmasını takiben, ölmek üzere olan sıçanların, kalpleri özenle çıkarıldı. Alınan kanlar 4500 devirde (rpm) 4°C'de 15 dakika santrifüj edildi (Eppendorf, Centrifuge 5810R, Almanya) ve ependorf tüplerine alındı. Tüm serumlar soğutucuda -20 °C'de muhafaza edildi. Çıkarılan kalpler serum fizyolojik içerisinde horizontal şekilde ikiye ayrıldı ve ventrikül tarafı homojenizasyon işlemi için boş tüplere konarken (çalışma gününe kadar -20°C'de saklandı), kalan kısım histopatolojik çalışma için %10'luk formaldehid içeren tüplere kondu.

İlaçlar ve kimyasal maddeler

Diklorvos'un mililitresinde 550 mg etken madde içeren piyasada bulunan preparatı (DDVP insektisit, İMPA Tarım-Veteriner İlaç Sanayi Ltd. Şti. İstanbul) kullanıldı. Bu maddenin 1 ml'si 19 ml mısır yağında (Aymar, Aymar Yağ ve Gıda San. Tic. A.Ş., Tekirdağ) çözdürüldü (11). Elde edilen karışım 27.5 mg/ml diklorvos içermekteydi.

Bir flakon tiyopental sodyum (Pental Sodyum enjektabl flakon 0.5 g, İ.E. Ulagay İlaç Sanayi Türk A.Ş., İstanbul) 10 ml serum fizyolojik çözdürülerek hazırlandı. Çözelti 50 mg/ml etken madde içermekteydi. Y-27632 dihidroklorid (Tocris Cookson Ltd. Bristol, İngiltere) 10ml serum fizyolojik ile çözüldü. 3.8mg/ml olarak hazırlandı ve kullanıldı.

Deneylerde kullanılan triklorasetik asit (TCA), 2-tiyobarbitürik asit (2-TBA), butile hidroksitoluen kristal (BHT), sodyum hidroksit (NaOH) anhidroz, 5,5'-ditiyo-bis (2-nitrobenzoik asit) (DTNB), sodyum sitrat, trizma hidroklorür (tris HCl), sodyum klorür (NaCl), potasyum klorür (KCl), potasyum dihidrojen fosfat (KH₂PO₄), disodyum EDTA ve vanadyum (III) klorür Sigma-Aldrich Chemical Co (St Louis, MO, ABD) firmasından, disodyum hidrojen fosfat (Na₂HPO₄), AppliChem firmasından (Biochemica, Darmstadt, Almanya), Y-27632 dihidroklorid Tocris Cookson Ltd. firmasından (Bristol, İngiltere) ve saf etanol, Merck (Darmstadt, Almanya) firmasından sağlanmıştır.

3.3. Biyokimyasal Çalışmalar

3.3.1. Serumdaki Ölçümler

Serum kolinesteraz ölçümü; R1 şişesi fosfat tamponu (pH 7.7= 50 mmol/L), 5.5-DTNB 0.25 mmol/L; R2 şişesi butiriltiyokolin (7 mmol/ L) ayıracını içermektedir. Ayıraçlar hazırlanarak, birinci ayıracın çözülmesi için 50 ml serum fizyolojik (WR1), ikinci ayıraç için ise 3 ml soğuk steril distile su ile eklendi (WR2). Şişelerin kapakları kapatılarak çözülen içerik yavaşça karıştırıldı ve serum örnekleri ½ oranında serum fizyolojikle dilüe edildi. Hem ayıraçlar hem de serum örneği karıştırıldı ve 30 dakika bekletildi. 37°C'de 405 nm dalga boyunda otoanalizator sistemde (Prestige 24i, Tokyo Boeki Medical System, Japonya) kolinesteraz-CHE-Bi Kit (Spinreact, S.A., İspanya) kullanılarak kolorometrik-enzimatik yöntem ile ölçüldü (112). Normal cut-off değeri olarak 5599 (4599-6599) alındı.

Serum CK ve CK-MB ölçümü; Klinik Kimya Otoanalizatorü'nde (Prestige 24i, Tokyo Boeki Medical System, Japonya) CK, CK-MB kiti (Prestige 24 i LQ CK, CK-MB Diagnostic Kit) kullanılarak kolorometrik-enzimatik yöntem ile ölçüldü. CK için referans değerleri (25-200 U/L), CK-MB için referans değerleri (0-24 U/L) olarak kabul edildi.

Serum miyoglobin ölçümü; Miyoglobinin tayini için solid faz enzim bağlı immunosorbent analiz tekniği olan ELİZA yöntemi (DRG International, Inc., ABD) kullanıldı. Önceden santrifuj edilip hazırlanmış serum örneklerinde analiz gerçekleştirildi. Örneklerdeki miyoglobin konsantrasyonu direkt olarak oluşan renk yoğunluğu ile doğru orantılıydı. Absorbans spektrofotometrik olarak 450 nm'de ölçüldü (EL_X 800 Universal Microplate Reader. Bio-Tek Instruments Inc., Vermont, ABD). Söz konusu örneklerdeki miyoglobin konsantrasyonu standart eğriden elde edilen faktörle hesaplandı.

Serum Troponin I ölçümü; Troponin I'nın tayini için ELİZA kiti (DRG International, Inc., ABD) kullanıldı. Santrifuj edilerek hazırlanmış serum örneklerinde analiz gerçekleştirildi. Örneklerdeki T-I konsantrasyonu direkt olarak oluşan renk yoğunluğu ile doğru orantılıydı. Absorbans spektrofotometrik olarak 450 nm'de ölçüldü (EL_X 800 Universal Microplate Reader. Bio-Tek Instruments Inc., Vermont, ABD). Örneklerdeki T-I konsantrasyonu standart eğriden elde edilen faktörle hesaplandı.

Serum NT-proBNP aktivitesi tayini için ELİZA kiti (Diagnostic automation Inc., Calabasas, ABD) kullanıldı. Bu yöntem immünoreaktif NT-proBNP ölçmek için yarışmalı enzim immünassay analiz tekniği olup, örneklerdeki NT-proBNP konsantrasyonu oluşan renk yoğunluğu ile ters orantılıydı. Absorbans spektrofotometrik olarak 450 nm'de ölçüldü (EL_X 800 Universal Microplate Reader. Bio-Tek Instruments Inc., Vermont, ABD). Örneklerdeki NT-proBNP konsantrasyonu standart eğriden elde edilen faktörle hesaplandı.

Serum NO ölçümü; Serum örneklerini deproteinize etmek için, 1:2 v/v oranında soğutulmuş (0°C) absolu etanol eklenerek serum vortekslendi. Örnekler 30 dakika 0°C'de inkübe edildikten sonra 10000 rpm'de 5 dakika santrifuj edildi. Elde edilen süpernatant, 95°C'deki vanadyum (III)-HCl içine enjekte edildi ve nitrat, nitrit ve S-nitroso bileşiklerinin NO'e indirgenmesi sonucu oluşan NO'in ölçümü, NO/ozon kemiluminesans tekniği ile NOA 280i (Sievers Instruments, Boulder, CO, ABD) NO analizörü kullanılarak yapıldı. Bütün örnekler iki kez çalışıldı. Standart eğri NaNO₃'ün dilüsyonları (0.1–100µM) kullanılarak gerçekleştirildi. Örneklerdeki NO konsantrasyonu standart eğri ile belirlendi ve serum örnekleri µM olarak hesaplandı. Ölçümlerde ve analizde NO AnalysisTM (version 3.21, Sievers, Boulder, CO, ABD) programı kullanıldı (113).

3.3.2. Dokudaki Ölçümler

Saklanan kalp dokuları çalışma günü tartıldı ve makasla kıyılarak küçük parçalara ayrıldı. Parçalanmış dokulara soğutulmuş 4 hacim TRIS HCl tamponu (50 µM, pH=7.4) eklenerek buz içinde ultrasonik homojenizatör (Branson sonifier 150, Dnabury, CT, ABD) ile doku homojenizasyonu sağlandı. Homojenize edilen tüm dokular 4500 rpm'de 30 dakikada santrifüj (Eppendorf, Centrifuge 5810R, Almanya) edilerek elde edilen süpernatantlar doku analizi (NO, glutasyon ölçümleri) için 4 farklı ependorf tüpüne alındı. Hem serum hem de dokuların hazırlanma aşamasındaki tüm işlemler (serum ayırma, dokuların homojenize edilmesi gibi) +4 °C'de yapıldı (114).

Doku nitrik oksit ölçümü; Kalp doku homojenizasyonundan elde edilen süpernatanta, serumda NO'yu ölçmek için kullanılan yöntemin aynısı uygulandı. Örneklerdeki NO miktarı µmol/g yaş doku olarak hesaplandı.

Doku glutasyon ölçümü; Modifiye Ellman metodu kalp dokusundan glutasyon analizi için kullanıldı. Homojenize edilen doku örneğinden elde edilen 1500 µl süpernatant, 18-20°C'de 3000 devirde 8 dakika santrifüj edildi. Bir ependorf tüpüne 1000 µl 0.3 M Na₂HPO₄ 2H₂O (0.3M Na₂HPO₄; 2H₂O 10.6549 g madde 200 ml'de, anhidraz ise 8.5176 g madde 200 ml distile suda çözünür), 125µl DTNB (40 mg DTNB (ditiyo-bis(2-nitrobenzoik asit) %1'lik 100 ml Na-sitratta çözülür), 250 µl süpernatant eklendi. Oda sıcaklığında 5-10 dakika beklendi. Oluşan numuneler spektrofotometrede 412 nm'de ölçüldü. Glutasyon düzeyleri 13600/M/cm katsayısı ile hesaplandı. Sonuçlar, numunenin optik dansitesi (absorbans) x 4.23/gramda doku ağırlığı ile hesaplanarak µmol/g olarak ifade edildi (115).

3.4. Histopatolojik Değerlendirme

Alınan kalp örneklerine aşağıdaki işlemler uygulanarak mikroskopik incelemeye hazır hale getirildi. Formalin (%10) içerisindeki doku örneklerinden, ince kesitler alınarak doku takip sepetlerine kondu ve doku takip cihazında saklandı. Doku takip cihazında otomatik sistemle bloklama işlemi (fiksasyon, dehidratasyon, şeffaflandırma ve sertleştirme işlemleri için sırasıyla %10 formolaldehid, %96 etil alkol, ksilol ve parafin kullanılarak) yapıldı. Mikrotomda (Leica RM 2145 mikrotom, Almanya) 4 µm kalınlığındaki parafinli kesitler dört farklı lama alındı. Lamlar 70 °C'de yarım saat deparafinizasyon işlemine tabi tutuldu, daha sonra ksilol içerisinde lamin

üzerindeki parafinin temizlenmesi sağlandı. Hazırlanan preparatlar, apoptosis ve iNOS için farklı metodlar kullanılarak değerlendirildi.

3.4.1. İmmünohistokimyasal analiz

İkinci preparat kardiyak hücrelerde iNOS aktivitesini değerlendirmek için kullanıldı. Parafin bloklara gömülmüş olan doku kesitleri ImmunoCruz™ Staining System (Santa Cruz Biotechnology, Inc, California, ABD) kullanılarak değerlendirildi. ImmunoCruz™ Staining System; serum blok, peroksidaz blok, biotinli ikincil antikor, HRP-Streptavidin ayırıcı, 50x peroksidaz substrat, 50x DAB (coloring substrat) kromojen ve 10x substrat tampon içermekte olup, bu ayıraçların her biri dilüe edildi ve üretici firmanın prosedürü doğrultusunda immünohistokimyasal boyamalar yapıldı (www.scbt.com, 2007). Hücre sitoplazmasının iNOS ile boyanma yoğunluğuna göre boyama yok (0), hafif (1), orta (2) ve fazla miktarda boyama (3) olmak üzere 4 tür skorlama tariflendi.

3.4.2. Apoptozisin değerlendirilmesi

Üçüncü ve son preparat ise kardiyak hücrelerde apoptozisin değerlendirilmesi için kullanıldı. Parafine gömülmüş doku kesitleri, TUNEL metodu kullanılarak in situ apoptosis ölçüm kiti (Takara Bio Inc., Otsu, Shiga, Japonya) ile değerlendirildi. Doku kesitleri deparafinize edilip rehidratasyona (distile su ile yıkanarak) tabi tutuldu ve oda sıcaklığında 15 dakika 10-20 µg/ml proteinaz K (Takara Bio Inc., Otsu, Shiga, Japonya) ile inkübe edildi. Endojen peroksidaz aktivitesinden arındırmak için, %3'lük hidrojen peroksit (H₂O₂) oda sıcaklığında 10 dakika uygulandı. Sonrasında terminal deoksinükleotidil transferaz (TdT) ve Labeling Safe Buffer ile 37 °C'de 1 saat nemlendirmeye tabi tutuldu ve oda sıcaklığında 30 dakika Anti-FITC HRP konjugat ile antikor reaksiyonu sağlandı. İşlem sonunda yıkama tamponu (PBS) ile doku örnekleri yıkandı. Devamında oda sıcaklığında 10-15 dakika DAB ile renk geliştikten sonra saf su ile arındırıldı. Daha sonra preparat, hematoksilen ile boyandı. Doku örnekleri %100 butanol ile dehidrate edildikten sonra ksilen ve Entellan (Merck Scientific Corporation, Fairlacon, N.J., ABD) uygulanarak ışık mikroskobu ile 10x40 ve 10x10 büyütme ile incelendi (www.takara-bio.com, 2007). Her bir preparatta TUNEL pozitif hücre nükleuslarının boyanma miktarlarına göre 4 tür skorlama tariflendi (Tablo 1).

Tablo 1: Apoptozis skorlaması

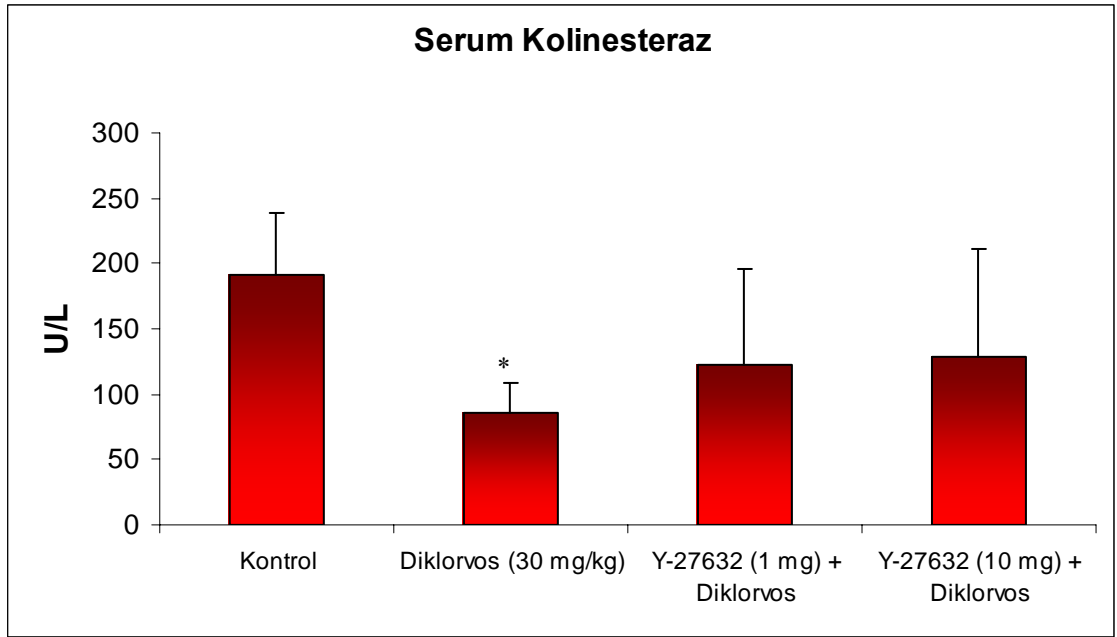
Skor	Apoptozis derecesi	Boyanma miktarı
0	Apoptozis yok	Boyanma yok
1	Hafif derecede apoptozis	Az miktarda boyanma (1-3)
2	Orta derecede apoptozis	Orta derecede boyanma (4-8)
3	Şiddetli apoptozis	Fazla miktarda boyanma (9+)

3.5. İstatistiksel Çalışmalar

Sonuçlar ortalama \pm standart sapma olarak verildi. İstatistiksel analiz GraphPad InStat (version 3.05) kullanılarak yapıldı. İki den fazla gruplar arasındaki karşılaştırmalarda tek yönlü varyans analiz testi (ANOVA) kullanıldı, anlamlılık tespit edildiğinde analize (post-hoc test) Student–Newman–Keuls testi ile devam edildi. Skorların istatistiksel analizinde Kruskal-Wallis testi kullanıldı. Gruplar arasındaki mortalite ve %95 güven aralıkları Fisher'in kesin Ki-kare testi ile değerlendirildi. Tüm karşılaştırmalar için 0.05'den küçük p değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

Deneyleyler, 200-400 gr ağırlığında erkek Wistar albino cinsi, 41 adet sıçan ile yapıldı. Mısır yağı (M, kontrol), diklorvos (D grubu, 30mg/kg), 1 mg/kg Y-27632 +diklorvos (Y1 grubu), 10 mg/kg Y-27632 +diklorvos (Y10 grubu) olmak üzere 4 grup oluşturuldu.



Şekil 3: M, D, Y1 ve Y10 gruplarındaki ChE değeri (*P<0.05 M grubuna göre)

Serum ChE düzeyleri, diklorvos ile belirgin olarak baskılandı (p<0.05), bu baskılanma Y-27632 maddesinin her iki dozu (1mg/kg ve 10 mg/kg) ile ortadan kalktı (Şekil 3; Tablo 2).

Diklorvos (30mg) verdiğimiz tüm ratlarda 3-5 dakika içinde kolinerjik semptomlar görüldü ve deneyin sonunda diklorvos verdiğimiz grubun 13'ünden 6 tanesinde ölüm görüldü. Çalışmamız süresince aşırı sekresyon, solunum yetmezliği, tremor, kas fasikülasyonları ve konvüzyon gibi belirtiler tespit edildi. Bu belirtiler iki saat içinde şiddeti azaldığı görüldü. Deneyin sonunda (6 saat sonra) toksik belirtiler tamamen kayboldu. Y-27632 verilmesi, kas fasikülasyonunun şiddetini ve toksik belirtilerin toplam skorunu azaltabilir (Tablo 2).

Tablo 2. Serum ChE düzeyleri , kas fasikülasyonun şiddeti ve zehirlenme belirtilerin toplam skoru

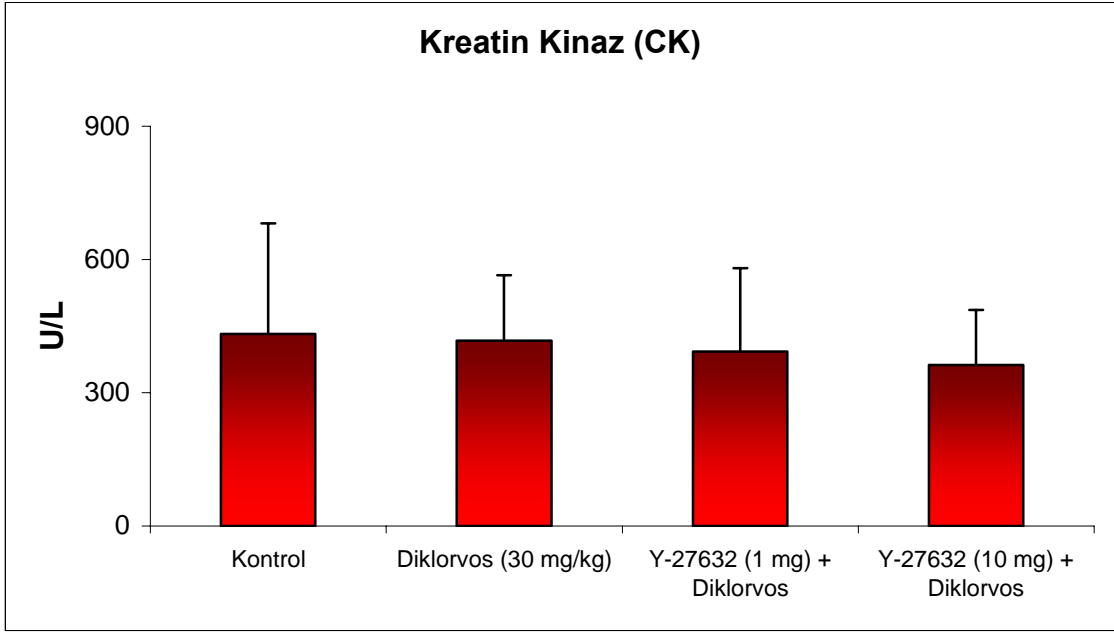
Gruplar	n	Serum ChE düzeyi (U/L)	Kas fasikülasyonun derecesi ^a	Zehirlenme belirtilerin toplam skoru ^b
Kontrol	9	191.8±47.7	0	1.0±0.3
Diklorvos	13	85.0±24.3 ⁺	3 ⁺	33.0±0.5 ⁺
Y1 grubu	9	121.7±73.5	1*	11.0±0.7*
Y10 grubu	9	129.2±81.5	1*	5.0±0.5*

^a Veriler ortalama olarak belirtildi. ^b Veriler sum ± SD olarak ifade edildi. ⁺p<0.05 kontrol grubuna göre. * p<0.05 diklorvos grubuna göre.

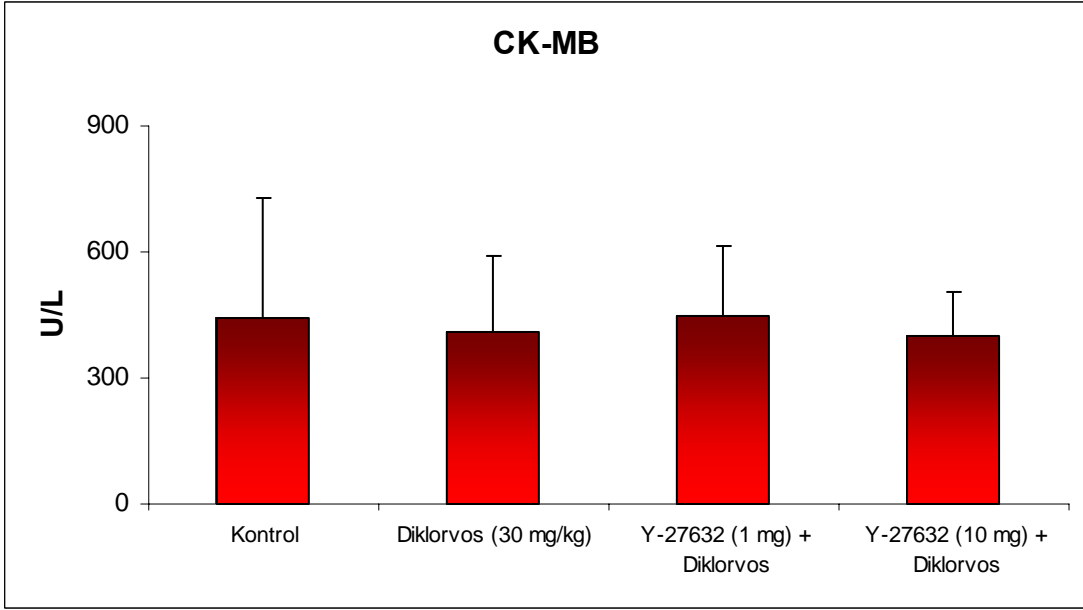
Tablo 3. Serumdaki CK, CK-MB, myoglobin, Tn-I and Nt-pro-BNP düzeylerine diklorvos ve Y-27632 etkileri.

Groups	n	CK (U/L)	CK-MB (U/L)	Myoglobin (ng/ml)	Tn-I (ng/ml)	Nt-proBNP (fmol/ml)
Kontrol	9	432.6±249.0	442.4±284.6	17.9±11.6	0.4±0.4	191.3±20.0
Diklorvos	13	417.4±147.1	407.7±183.5	15.1±10.4	1.1±0.8	221.5±27.2
Y1 grubu	9	392.8±187.3	447.3±167.2	7.6±5.1	1.4±0.5	173.2±70.0
Y10 grubu	9	362.1±124.0	400.1±107.0	10.4±6.3	1.5±0.8	235.4±82.5

Geleneksel olarak ölçülen kardiyak markırlardan CK, CK-MB değerlerinde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı belirgin bir değişiklik saptanmadı (Şekil 4-5; Tablo 3).

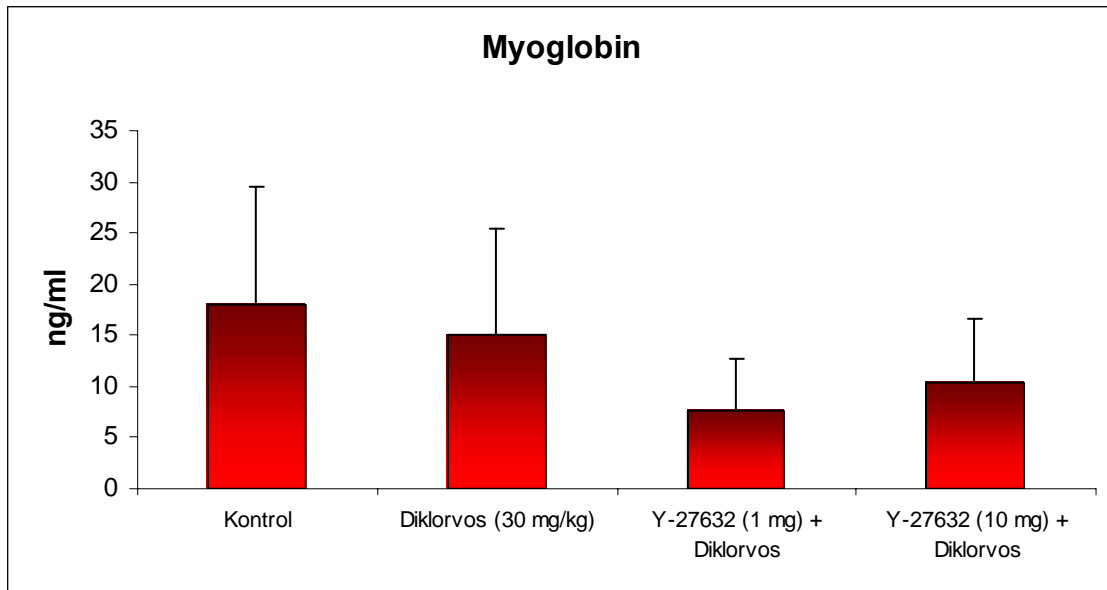


Şekil 4. Gruplardaki CK değerleri



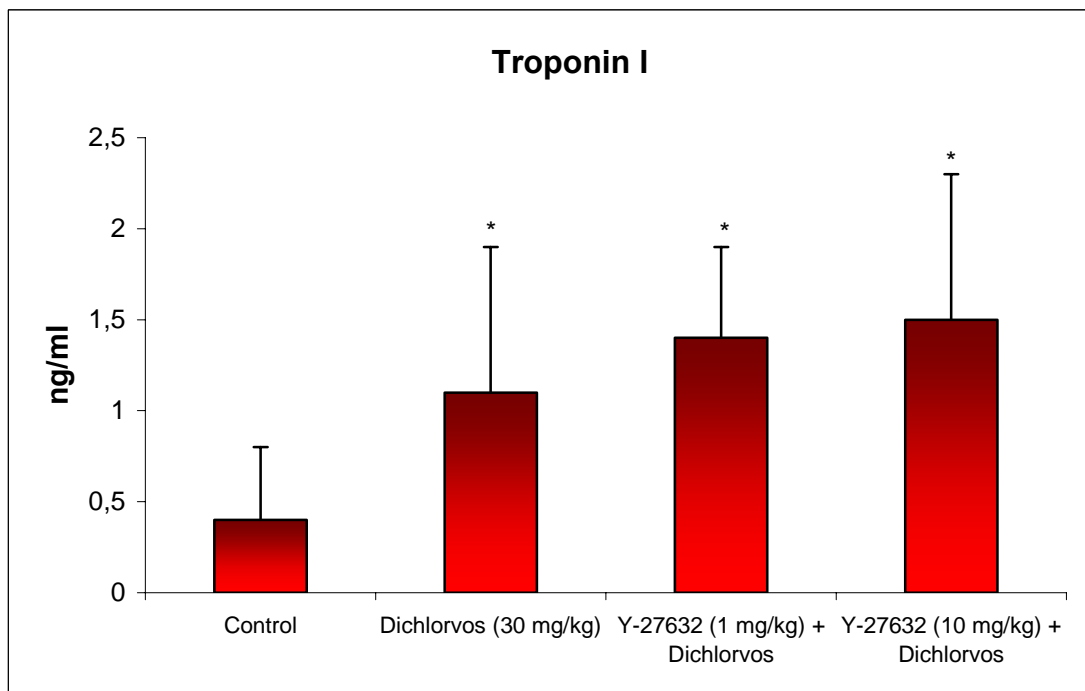
Şekil 5. Gruplardaki CK-MB değerleri

Myoglobin değerleri kontrol grubuna göre, diğer gruplarda azalmış gibi görünmekle birlikte, gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı olan bir farklılık ($p>0.05$) göstermedi (Şekil 6; Tablo 2).



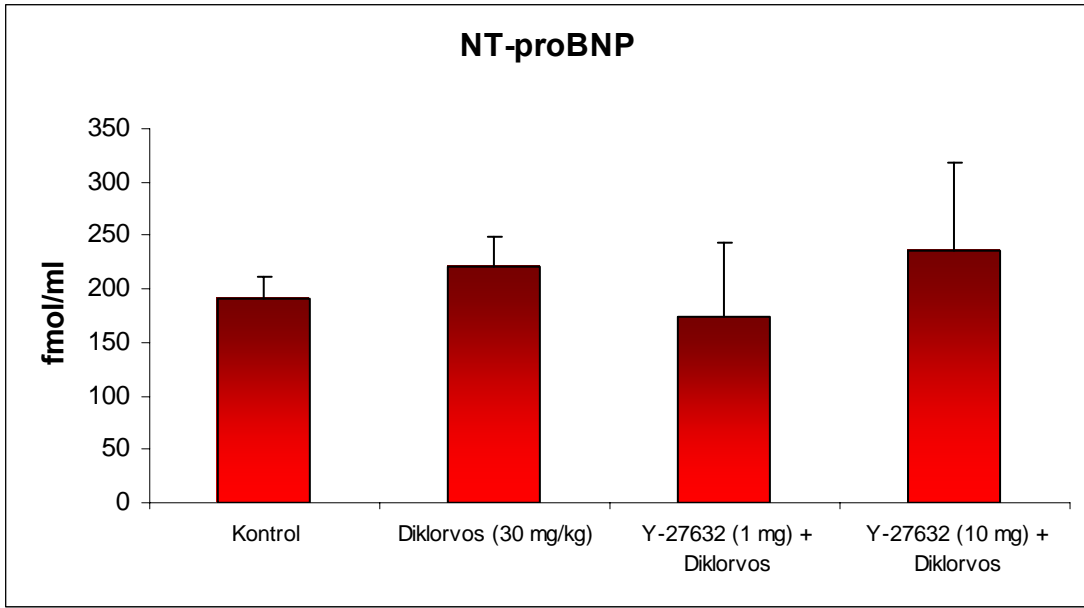
Şekil 6. Gruplardaki myoglobin değerleri

Tn-I düzeyleri D, Y1 ve Y10 gruplarında kontrol gruba göre anlamlı şekilde yükselmiştir ($p < 0.05$), ancak Tn-I düzeyleri Y1 ve Y10 gruplarında D grubuna göre artmış olmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı değildi (Şekil 7; Tablo 3).



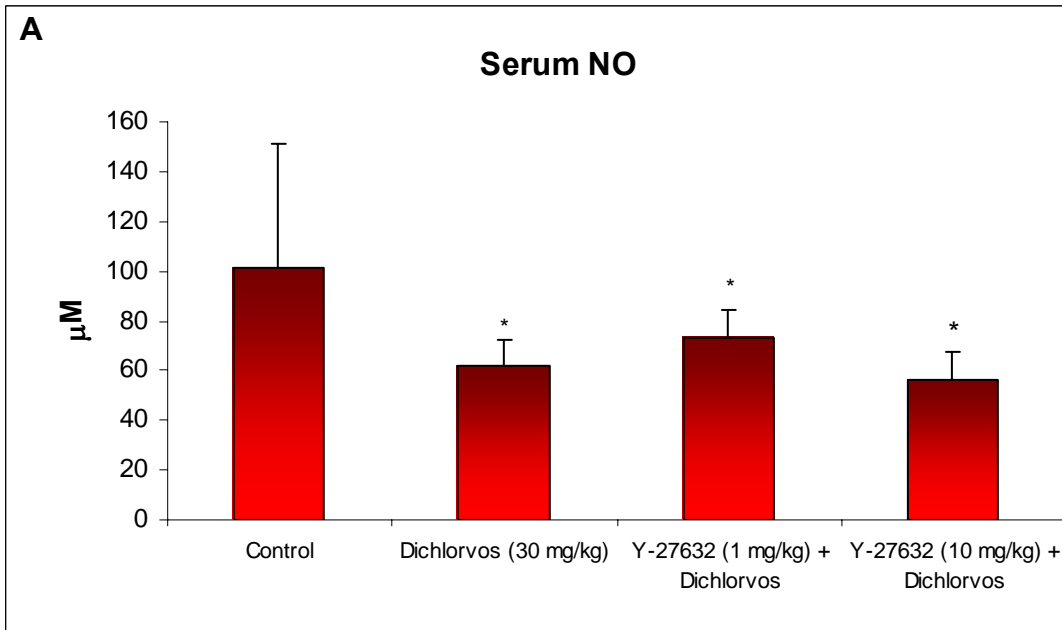
Şekil 7. Gruplardaki troponin-I değerleri (* $p < 0.05$ kontrole göre).

Yeni ve genelde kardiyak belirteç olarak kullanılan NT-proBNP, gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı ($p > 0.05$) değildi (Şekil 8; Tablo 3).

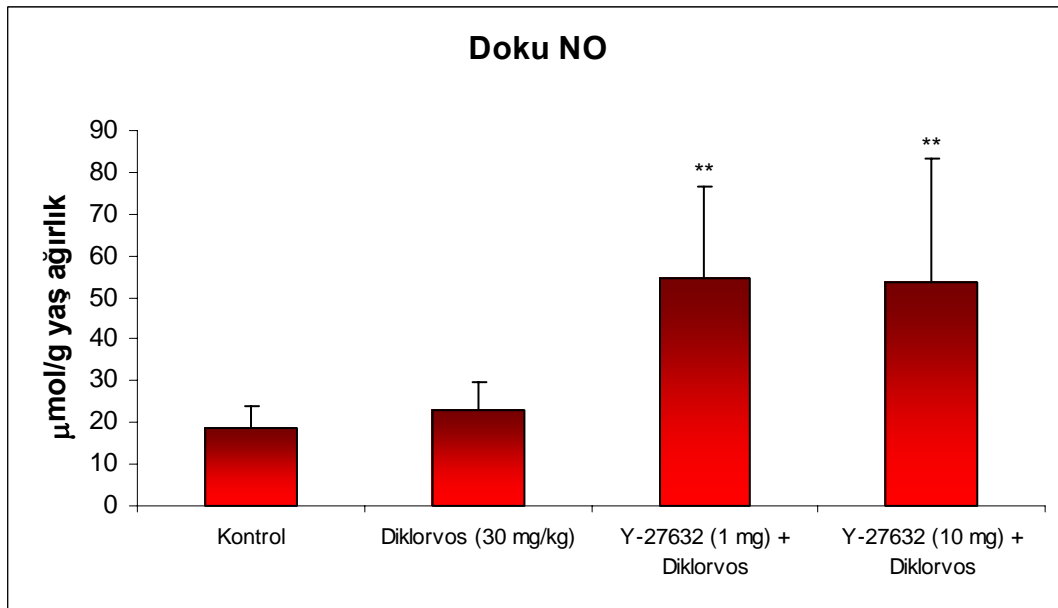


Şekil 8. Gruplardaki NT-proBNP değerleri

Serum NO düzeyleri, diklorvos grubunda kontrol grubuna göre karşılaştırıldığında belirgin olarak azaldı. Benzer olarak Y1 ve Y10 gruplarında da serum NO düzeyleri kontrol grubuna göre anlamlı şekilde azaldığı görüldü ($p < 0.05$; Şekil 9). Doku NO düzeylerine baktığımızda Y1 ve Y10 gruplarında, diklorvos ve kontrol gruplarından daha fazla artış tespit edildi ($p < 0.05$; Şekil 10). Nitrik oksit düzeyleri açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı olan farklılık gözlemlendi.

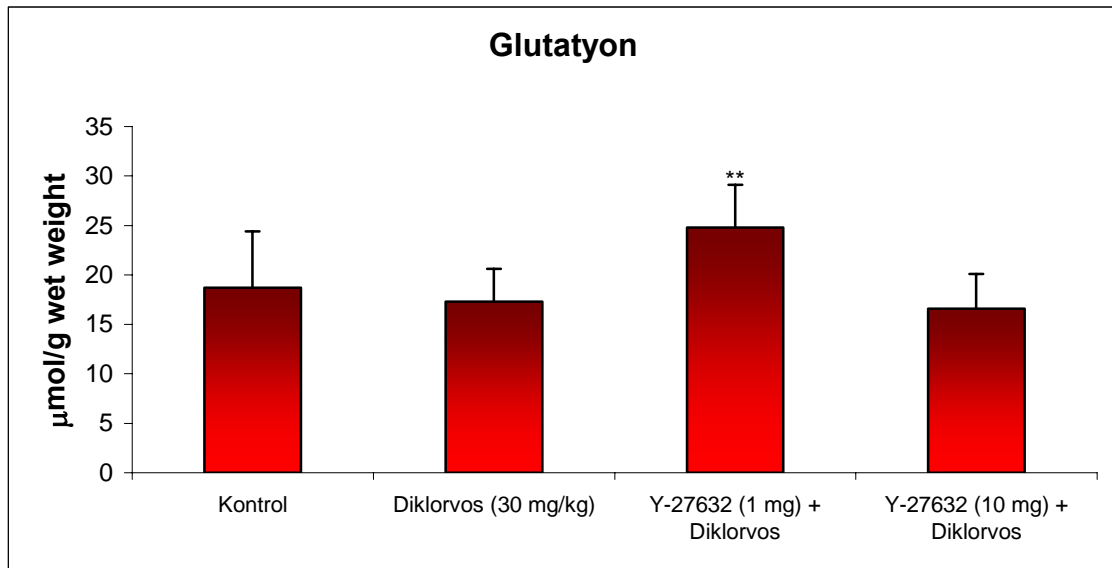


Şekil 9. Gruplardaki serum NO değerleri. (* $p < 0.05$ kontrol grubuna göre)



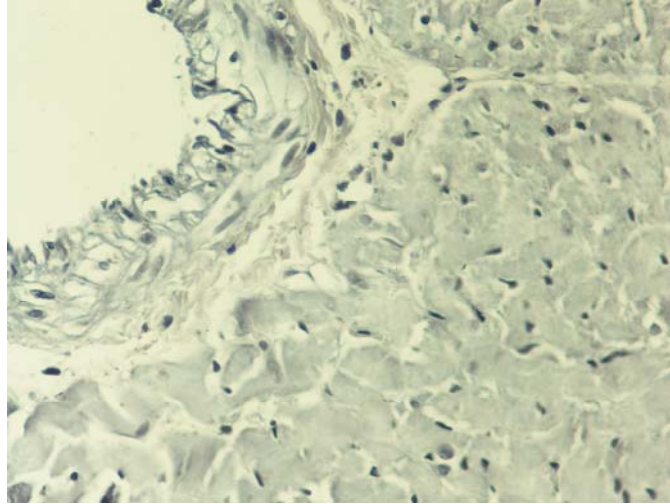
Şekil 10. Gruplardaki doku NO düzeyleri (**p<0.01 diklorvosa göre)

Diklorvos ve kontrol grubu karşılaştırıldığında diklorvosun kardiyak glutasyon düzeylerini etkilemediği tespit edildi. Fakat kardiyak glutasyon düzeyi, Y1 grubunda diklorvos grubuna göre anlamlı şekilde artmıştır (p<0.01). Bu anlamlı artış Y10 grubunda saptanmadı (Şekil 11). Bu durumun doz ile ilişkili olmadığını düşünmekteyiz.



Şekil 11. Gruplardaki doku glutasyon değerleri. **p<0.01 Diklorvosa göre

Grupların hiçbirisinde apoptotik değişiklik izlenmedi, diğer bir ifade ile grupların hepsinde apoptosis skoru 0 olarak bulundu (Resim 1).

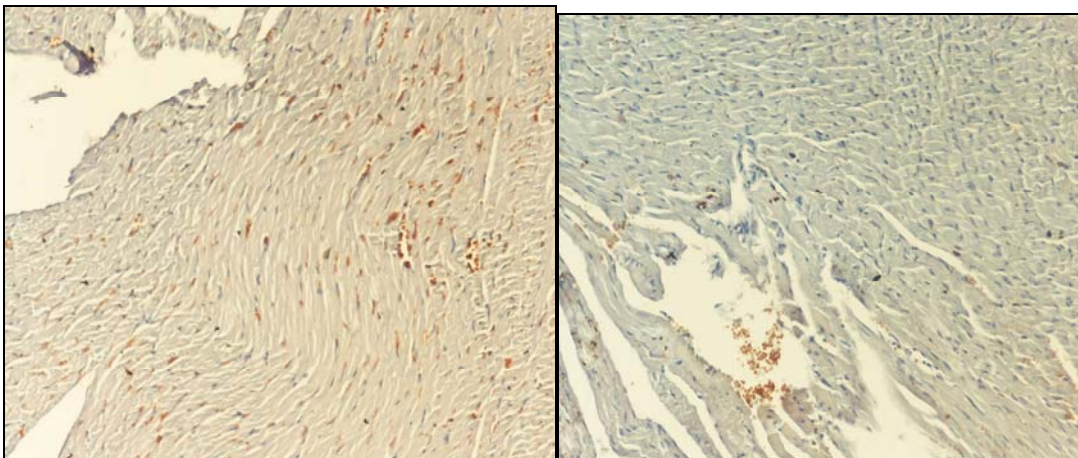


Resim 1: Sıçan kalbinde TUNEL yöntemi ile apoptozis için yapılan boyama (skor 0) (x 40)

Tablo 4. Grupların iNOS skorları

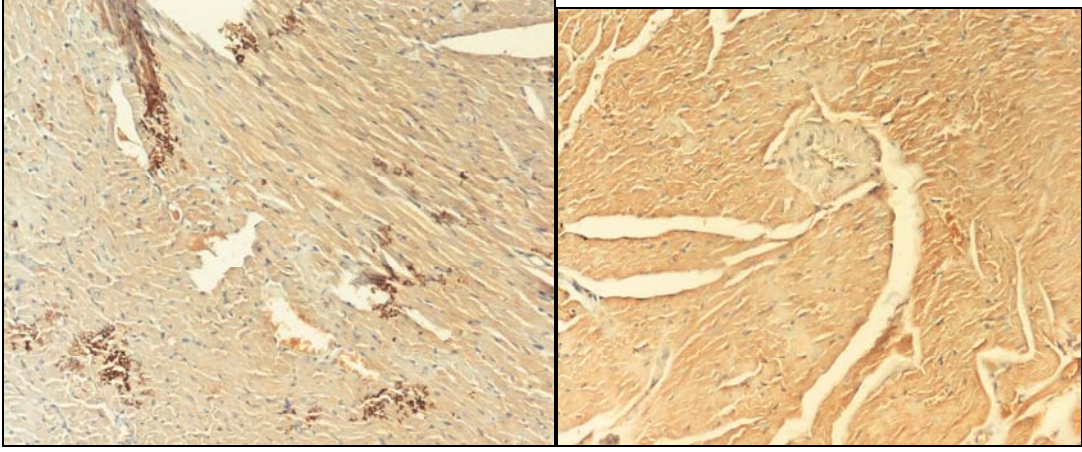
Gruplar	n	Histopatolojik evrelemesi
Kontrol (M grubu)	9	9.0±1.0
Diklorvos (D grubu)	13	11.0±0.8
Y1 grubu	9	7.0±0.7
Y10 grubu	9	8.0±1.1

İndüklenebilir NOS 'un immunohistokimyasal analizinde gruplar arasında anlamlı bir fark saptanmadı. ($p>0.05$). Gruplarda 0'dan 3'e kadar olan skorlar görüldü (Tablo 4). Sıçan kalbinde iNOS immunohistokimyasal boyaması (skor 0, 1, 2, 3) ile değerlendirilmiştir (Resim 2–5).



Resim 2: Skor 0 (x 40)

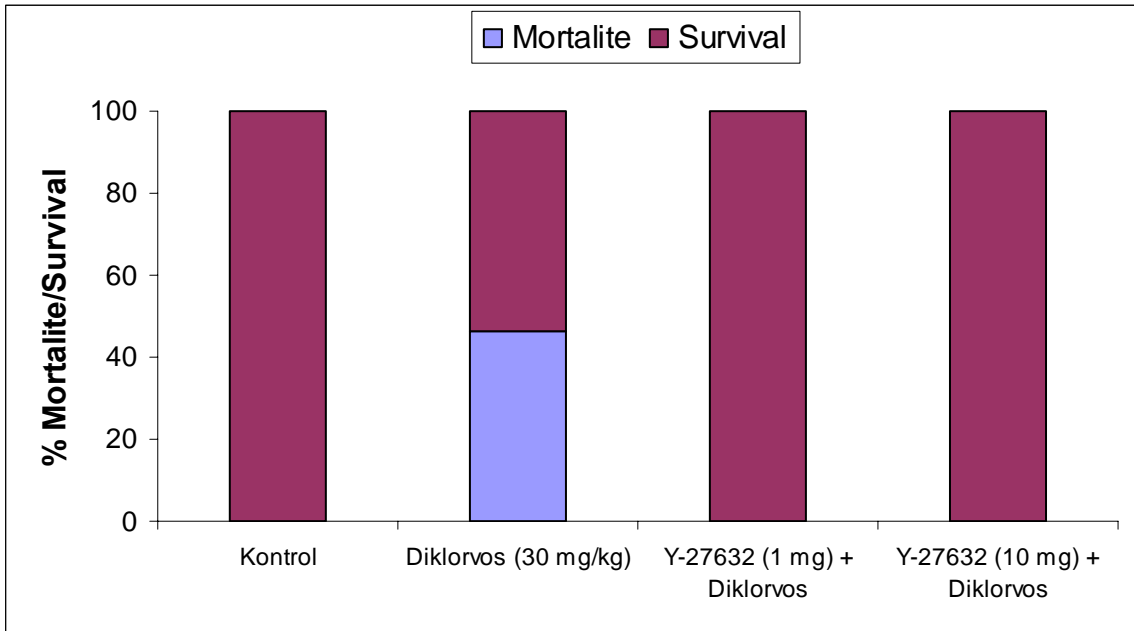
Resim 3: Skor 1 (x 40)



Resim 4: Skor 2(x 40)

Resim 5: Skor 3 (x 40)

Kontrol, Y1, Y10 gruplarında mortalitenin olmadığı görülürken, diklorvos grubunda 13 sıçandan 7 (%46.6) sıçanda ölüm görüldü ($p<0.05$). Diklorvos ile istatistiksel olarak anlamlı olan mortalite görülürken, Y1 ve Y10 gruplarında bu mortalitenin yine istatistiksel olarak anlamlı şekilde azaldığı tesbit edildi ($p<0.05$). (Şekil 12). Y-27632 kullandığımız grublarda hayatta kalma oranı %100 olarak saptandı.



Şekil 12. Grublardaki mortalite/survival oranları

TARTIŞMA

Organofosfat bileşikleri, ACh birikimi ile MSS, somatik sinirlerde, parasempatik sinir sonlarında ve ter bezlerinde kolinerjik sinapsların aşırı stimülasyonu ile sonuçlanan AChE'in güçlü bir inhibitörüdür. OB ile zehirlenmenin tanısı; alım veya maruziyet sonrasında klinik belirtiler ve ChE düzeylerinin (PChE ve AChE) ölçülmesi sonucunda düşük bulunması ile yapılmaktadır (116). Buna paralel olarak bizim çalışmamızda bir OF olan diklorvos verdiğimiz gruplarda M (kontrol) grubuna göre ChE düzeyleri ölçülmüş ve baskılanmış olduğu bulunmuştur. Dolayısıyla bu inhibisyon D grubunda kontrol grubuna göre (M grubu) daha anlamlı olduğu görüldü. Serum ChE düzeyleri, diklorvos ile belirgin olarak baskılandı, bu baskılanma Y-27632 maddesinin her iki dozu (1mg/kg ve 10 mg/kg) ile ortadan kalktı. Diklorvos verdiğimiz tüm ratlarda 3-5 dakika içinde kolinerjik semptomlar görüldü ve deneyin sonunda diklorvos verdiğimiz grubun 13'ünden 6 tanesinde ölüm görüldü. Çalışmamız süresince aşırı sekresyon, solunum yetmezliği, tremor, kas fasikülasyonları ve konvüzyon gibi belirtiler tespit edildi. Bu belirtilerin iki saat içinde şiddetinin azaldığı görüldü. Deneyin sonunda (6 saat sonra) toksik belirtiler tamamen kayboldu. Bu sonuçlar 30 mg/kg diklorvos dozu ile sıçanlarda toksik etkilerin ortaya çıktığını göstermiştir.

Organofosfat bileşikleri ile zehirlenmelerde atropin tedavinin standart ilacı ve ACh'nın muskarinik reseptörlerin kompetitif bir antagonistidir ve muskarinik sinapslarda artmış ACh'a bağlı ortaya çıkan kolinerjik semptomların geri çevrilmesi için kullanılır. PAM ise OB ile inhibe olmuş AChE'nin reaktivatörüdür. Ancak bazı çalışmalarda atropin ve PAM, OB zehirlenmesinin klasik ajanları olmakla birlikte mortalite ve morbiditeyi önlemede yetersiz oldukları görülmüştür (117). Deney hayvanlarında, OB zehirlenmesinde PAM'ın etkisinin yetersiz olduğunu gösteren bazı bulgular da mevcuttur. Bu nedenle son zamanlarda OF zehirlenmesinin tedavisinde destek ve spesifik tedavisi (atropin, PAM) yanında alternatif tedaviler araştırma ihtiyacı doğmuştur. Bizde Rho kinaz inhibitörü olan Y-27632'nin OF zehirlenmesinin

tedavisinde yeri olup olmadığını araştırdık. Bizim verilerimiz, serum ChE düzeylerinin diklorvosla belirgin şekilde azaldığı ve bu azalmaların Y-27632 tedavisi ile ortadan kalktığı göstermiştir. Çalışmamız Rho kinaz inhibisyonun, sıçanlarda diklorvosa bağlı zehirlenmeye karşı koruyucuğunu gösteren ilk çalışmadır.

Muskarinik reseptörler OF'ların santral ve periferel sinir sistem etkilerinden sorumlu olduğu görülmektedir (4,118). Muskarinik ACh bağlayan G protein reseptörlerinin uyarılması, RhoA ve onun alt sistem düzenleyicisi Rho kinazı içeren sinyal uyarı yolu ile ilişkili olabileceği yeni bilinen bir kanıttır (119,120). ACh gibi agonistlerle Rho/Rho kinaz yolunun aktive edilmesi miyozin hafif zincirin fosforilasyonuna ve intracelller Ca^{+2} konsantrasyonunu artışına neden olabilir. Bundan dolay, diklorvosa bağlı ACh reseptörlerinin aktivasyonu Rho kinazı uyarabilmesi olasıdır. Y-27632 ile spesifik Rho kinaz inhibisyonu kültüre edilmiş tavuk atriyal miyositlerinde M_2 ilerleyici aktiviteyi ve M_2 reseptör geçişini inhibe ettiği gösterildi (121). Rho kinaz inhibisyonu M_3 muskarinik ACh reseptörü yolu ile fosforilaz D uyarılmasını inhibe edebilir. Ancak M_3 muskarinik ACh reseptörü kültür hücrelerinde belirgin olarak Rho kinazı aktive eder (120). Bizim verimiz, Rho kinaz inhibisyonun muskarinik reseptör sinyal transdüksiyon yolağını inhibe edebildiği ve diklorvos zehirlenmesinde yararlı etkileri oluşturabileceğini göstermesi ile bu raporları destekleyebilir.

Kolinerjik sinirlerden ACh salınımı üzerinde Rho kinaz inhibitör etkilerinin çalışılmamasına rağmen ve bizim çalışmamızda da Y-27632 kolinerjik sinirlerden nörotransmitter salınımını artırdığı gösterilmiştir (122). Y-27632, kolinerjik sinirlerden radyoaktivitenin salınımını indükleyerek elektriksel aktiviteyi belirgin olarak artırdığı bulundu (122). Ancak Y-27632 yüksek konsantrasyonlarda kolinerjik sinirlerden nörotransmitter salınımını azaltabileceğine ayrıca kanıt vardır (123).

Diklorvos ile ciddi OF zehirlenmesinden erken ölüm santral ama periferel olamayan sinir sistem etkilerinin aracılık ettiği önerilmektedir (124). Bu etki, hem santral hem periferel olarak antimuskarinik ilaç rolü oynaması ile atropine benziyor. Sadece atropin ve sadece periferik olarak rol oynamayan antimuskarinik ilaçlardan olan glikopirolat veya ipratropium bromid tedavisi diklorvos ile intoksikasyonunda fareleri devam eden 10 dk'da ölümden koruyor olduğu gösterildiğinden beri diklorvosun santral etkilerini antogonize etmesiyle özellikle önemlidir (124,125).

Y-27632'in etki yerinin periferik, santral sinir sistem veya bu çalışmada her ikisinde olup olmadığı bilinmemesine rağmen, Y-27632 i.p olarak verilmesi farelerde antinosiseptif etki oluşturabildiği kanıtı vardır (110). Bundan başka, oral olarak verilmiş Rho kinaz inhibitörü fasudil kesinlikle klinik kullanımı için kullanışlıdır ve Japonya'da subaraknoid hemorajili hastalarda vazospazmı engellemek için uygun görülmüştür. (25). Bizim çalışmada, 1 ve 10 mg/kg dozlarındaki Y-27632, kas fasikülasyonların yoğunluğunu, kolinerjik belirtileri ve diklorvosa bağlı ölümü önledi. Tüm bu sonuçlar bir araya getirildiğinde, Rho kinaz inhibitörlerinin SSS'de rol oynayabildiğini önerilebilir.

OB ile zehirlenmede kardiyak komplikasyonlar eşlik edebilir ve bunlar ciddi ve ölümcül olabilir. Bu komplikasyonlar eğer erken tanımlanır ve uygun tedavi edilirse önenebilir potansiyele sahiptir. Literatüre baktığımızda sempatik tonus artışı ile taşikardi, parasempatik uyarılmaya bağlı bradikardi, AV iletim bozukluğuna bağlı ventriküler fibrilasyon, Torsades de Pointes, atrioventriküler tam blok dahil ritm bozuklukları, idioventriküler ritm, ventriküler ektopik atım, EKG'de ST-T değişiklikleri, QT uzaması ve histopatolojik olarak çeşitli değişiklikler bildirilmiştir (2). Ayrıca organofosfat zehirlenmesinde hipertansiyon-hipotansiyon, non-kardiyojenik ödem, sempatik ve parasempatik aşırı aktivitesi sonucu miyokardiyal hasar (koroner arter spazm, miyokardiyal infarktüs, diffüz miyokardit) da rapor edilmiştir (2,47). OB zehirlenmelerinde kardiyak komplikasyon oranı Karki ve ark. (2), tarafından %62.2 olarak saptanmıştır. Finkelstein ve ark. (126), ise kardiyak aritmi oranını %41.5 olarak belirtmiştir. Sıçanlarda yapılan bir çalışmada (127) sarin ve somon gazlarının QT interval uzaması ve kardiyak lezyonlara neden olduğu gösterilmiştir. Sarin gazı kullanılarak Matsumoto şehrinde yapılan terör saldırısında etkilenen bazı ağır hastalarda ise MSS bulguları, kardiyomiyopati, aritmi ve kardiyak kontraksiyonda azalma saptandığı belirtilmiştir (128). OB zehirlenmelerinin kardiyak etkilerinden bir diğeri de miyokardiyal nekrozdur. OB, musküler hücrelerde dejenerasyon, musküler fiberlerde nekroz ve buna sekonder kardiyak ve respiratuvar hasar oluşturabilir (129). Miyokardiyal nekroz, 1997 yılında Brezilya'daki bir hastada da bildirilmiştir (96). Malation zehirlenmesi olan bu hastanın EKG'sinde inferior duvarda subendokardiyal nekroz bulguları, diffüz ventriküler repolarizasyon değişiklikleri ve QT interval uzaması saptanmıştır. Kardiyak enzimleri yüksek olarak rapor edilmiş ve kalbinin histopatolojik

değerlendirmesinde miyokardiyal nekroz alanları bulunmuştur. Özyurt ve ark. (130) bildirdiği olgu sunumunda da OB zehirlenmesinde miyokardiyal defekt oluşturduğu belgelenmiştir. Hastaya OB maruziyetinden 5 gün sonra miyokardiyal sintigrafi yapıp anterolateral duvarda perfüzyon defekti gösterilmiştir. OB toksisitesine bağlı değişik kardiyak etkiler içinde en az bildirilen komplikasyonlar akut iskemik komplikasyonlardır. Bu komplikasyon ile ilgili bilgiler sınırlıdır. Saadeh ve ark. (47) çalışmasına göre ST segment yükselmesi olan 11 hastanın beşinde kardiyak enzimlerden CK ve LDH parametreleri yüksek olarak saptanmıştır. Her ne kadar Saadeh ve ark. (47) ST segment yükselmesi ile birlikte CK ve LDH parametre yüksekliğini göstermişlerse de, Tn-I ve miyogloblin gibi daha spesifik parametrelerden söz etmemişlerdir. Yine Karki ve ark. (2) çalışmasında ST segment yükselmesi bulunmuş ise de bu çalışmada da kardiyak enzimlerden bahsedilmemiştir. Benzer olarak Brezilya'dan (96) ve Türkiye'den (130) bildirilen miyokardiyal nekrozu olan olgu raporlarında da kardiyak spesifik TnI yüksekliği ile ilgili bir bilgiye rastlanmamıştır. Sadece Karcioğlu ve ark. (131) bildirdikleri OB ile zehirlenme ile birlikte akut MI vakasında tüm kardiyak enzimler (CK, CK-MB, miyogloblin ve TnI) yüksek olarak saptamışlardır. Ancak CK enzimi OB zehirlenmesinin MSS'ni etkilemesine bağlı yükselmiş, miyogloblin enzimi ise kas fasikülasyonlarına bağlı yükselmiş olabilir. Geleneksel olarak ölçülen kardiyak markırlardan CK, CK-MB değerlerinde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı belirgin bir değişiklik saptanmadı. Myogloblin değerleri kontrol grubuna göre, diğer gruplarda azalmış gibi görünmekle birlikte, gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı olan bir farklılık göstermedi. Geleneksel olarak kullanılan kardiyak markırlar (CK, CK MB ve Mb) Y-27632 tedavisi ile etkilenmedi, hem CK hem de CK MB, ilk 6 saatte dichlorvos bağlı kardiyak hasarda etkilenmediğini göstermektedir. Kardiyak Tn-I akut koroner sendromun erken saatlerinde miyokard hasarı tanısında ve ekartasyonunda önemli bir yere sahiptir (132). Tn-I düzeyleri D, Y1 ve Y10 gruplarında kontrol gruba göre anlamlı şekilde yükselmiştir, ancak Tn-I düzeyleri Y1 ve Y10 gruplarında D grubuna göre artmış olmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı değildi. Böylece, mevcut çalışmanın sonuçları, (CK, CK MB, Mb hariç), cTI OF zehirlenmesine bağlı kardiyotoksinin değerlendirilmesinde dikkate alınabileceğini göstermektedir.

Kardiyak hastaların takibi, tedavilerinin düzenlenmesi, nörohumoral kompensasyon durumlarının değerlendirilmesi, tarama testi olarak asemptomatik sol ventrikül disfonksiyonunun saptanması ve akut koroner sendromda sağladığı önemli prognostik veriler bakımından BNP ve NT-proBNP kardiyojide önemli bir yere sahiptir (67). Ancak sol ventrikül fonksiyonun altın standart belirteci olarak kabul edilen NT-proBNP ve geleneksel kardiyak belirteçlerin OB zehirlenmesinde erken dönemde kardiyak hasarlanma için bir belirteç olarak kullanılıp kullanılmayacağını araştıran bir çalışma bulunmamaktadır. Bazı zehirlenmelerde NT-proBNP düzeyinin kardiyotoksik etkinin erken tanısında katkıda bulunabileceği ve belirteç olarak kullanılabilirliği bildirilmiştir (133). Yeni ve genelde kardiyak belirteç olarak kullanılan NT-proBNP, gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı değildi. Bizim verimiz, serum Nt proBNP düzeylerini ölçmenin, sıçanlarda dichlorvos bağlı kardiyotoksitenin erken teşhisine katkıda bulunmayabildiğini akla getirir.

Kalp dokusu miyositlerinde oksijen ve poliansature yağ asitlerinin varlığına bağlı olarak oksidatif değişikliklerden etkilenebilir. Kardiyak hasarlanmanın patogeneğinde; serbest radikal oluşumunun, antioksidan enzimlerde azalmanın ve lipid peroksidasyonunda artmanın rol oynadığı rapor edilmiştir. Genelde doku hasarı patogeneğinde sorumlu tutulan serbest radikaller süperoksit, hidroksil radikalleri ve nitrik oksittir (90,134). Çeşitli redoks sistemlerin arasında eritrosit ve lenfositlerde bulunan glutasyon önemli yer tutar. Glutasyon, ilaç ve ksenobiyotiklerin toksisitesine karşı antioksidan olarak rol oynadığı bildirilmiştir. Bu çalışmaların çoğu deneyseldir. Mevcut çalışmaların sonuçları, insan eritrositlerinde hücrel antioksidan savunma sisteminde bulunan glutasyona bağlı enzimlerin, pestisidlere (OB, karbamat, organoklorinler, piretiroidler) maruziyetten sonra etkilendiğini göstermektedir. Yapılan toksikasyon ile ilgili çalışmalarda serumda MDA üretiminin arttığı ve kanda glutasyon seviyesinde azalma olduğu tespit edilmiştir (78). Diklorvos, başlıca iki enzimatik yol ile sıçan karaciğerinde metabolize edilir: Biri, glutasyon bağlı yol (desmetildiklorvos üretmek), diğeri, dimetilfosfat ve dikloroasetaldehidle sonuçlanan glutathione bağımsız yol (135). Bu yüzden, glutasyonun varlığı, diklorvos eliminasyonu için sınırlayıcı bir faktörle sonuçlanabilir. Glutasyon, oksidatif hasardan hücre zarlarını koruyan ve hem de azaltılan formda birçok proteinin sulfidril gruplarını sürdürmeye yardım eden her yerde olan thiol-içeren bir tripeptidedir. Glutasyon, hastalık ve toksiteye karşı organizmaları

korumakta kritik bir faktördür (136). Glutasyon deplesyonu ve oksidasyonu OB ve sinir gazlarına maruz kalmış sıçanların beyin, karaciğer ve kanında; insan lenfosit ve serumunda gözlenmiştir. İnsan zehirlenme vakalarında, lindan (organoklorin) ve malation (OB) kan glutasyon düzeyi de azalmıştır (137). Diklorvos ve kontrol grubu karşılaştırıldığında diklorvosun kardiyak glutasyon düzeylerini etkilemediği tespit edildi. Fakat kardiyak glutasyon düzeyi, Y1 grubunda diklorvos grubuna göre anlamlı şekilde artmıştır. Bu anlamlı artış Y10 grubunda saptanmadı. Bu durumun doz ile ilişkili olmadığını düşünmekteyiz. Bizim sonuçlarımız, Y-27632'in, kardiyak glutasyonun, düşük dozu ile artırabildiğini gösterdi ve bu etki de, sıçanlarda diklorvos zehirlenmesine karşı korumaya katkıda bulunabilir.

Serum NO düzeyleri, diklorvos grubunda kontrol grubuna göre karşılaştırıldığında belirgin olarak azaldı. Benzer olarak Y1 ve Y10 gruplarında da serum NO düzeyleri kontrol grubuna göre anlamlı şekilde azaldığı görüldü. Doku NO düzeylerine baktığımızda Y1 ve Y10 gruplarında, diklorvos ve kontrol gruplarından daha fazla artış tespit edildi. NO düzeyleri açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı olan farklılık gözlemlendi. Kalp hasarının bu ürünleri arasında dolaşımdaki süperoksit radikali ve NO arttığı tespit edilmiştir (134). Son zamanlarda endotel disfonksiyonundaki ilerlemenin NOS ve süperoksit aşırı üretimi ve bunun sonucu olarak da peroksinitrit oluşumunda bir artışla bağlantılı olduğu ileri sürülmüştür (134). iNOS tarafından oluşturulan NO ve daha sonra oluşturulan peroksinitrit in vivo sitokinlerin oluşturduğu miyokardiyal disfonksiyonun patogenezinde önemli bir rol oynar (134). NO'nun sitoprotektif etkisi yanında (138), NO'dan oluşan peroksinitrit ve süperoksit antioksidan ve kardiyak koruyucu etki oluşturduğu (139) bilinmektedir. NO ve peroksinitrit sıçanlarda diklorvosa bağlı zehirlenmede miyokardiyumda koruyucu bir etkiyi üretebilir. Kalpte, miyokardiyumun çeşitli hücre tiplerinde NOS tüm üç izoformu bulunmaktadır (140). Kalsiyum-bağımsız NOS (iNOS), stres koşullarının altında inflamatuvar sitokinlere yanıt olarak infiltre olmuş myocardiumda inflamatuvar hücreler ve kardiyomiyositlerde oluşur (140). NO düzeylerindeki bu değişimden muhtemelen iNOS ekspresyonundaki artış ile ilişkili değildir, çünkü immunohistokimyasal olarak incelenen iNOS skorunda gruplar arasında bir değişiklik saptanmamıştır. NO düzeylerindeki bu değişim eNOS veya nNOS ile ilişkili olabilir.

Yine de, Rho kinaz inhibitörü Y27632'in, sıçanlarda in vivo endotelial NOS fonksiyonunu geliştirebildiği kanıt vardır (141).

Organofosfat bileşiklerinin (özellikle de diklorvos, fosfomadion, triklorfon, fention, fosalon, diazinon ve metidation) sıçanların pankreas, karaciğer, testis, beyin, vasküler duvar, böbrek ve kalp gibi farklı dokularında histopatolojik değişikliklere neden olduğu yapılan bazı çalışmalarda tespit edilmiştir (73,96). Yavuz ve ark. (73) subkronik metidationun kardiyomiyositlerin miyositolizisi ve dejeneratif değişikliklere yol açarak kardiyak hasara neden olduğunu tespit etmişlerdir. Brezilya'daki malation zehirlenmesi olan bir hasta kalbinin histopatolojik değerlendirmesinde miyokardiyal nekroz alanları bulunduğu bildirilmiştir (96). Oral ve ark. (72) subkronik diklorvos toksisitesinin endometrumda histopatolojik ve immünohistokimyasal değişikliklere neden olduğu ve nonenzimatik antioksidanlar (C ve E vitamini) tedavisi ile hasarın azaldığı, ancak tamamen düzelmediğini rapor etmişlerdir. Paraoksonun lenfositlerde ve nonkolinerjik dozlarında malationun fibroblastlarda sitotoksitesinin kaspaz-3 aktivasyonuna neden olduğu mitokondriyal disfonksiyon süresince in vitro olarak apoptoze sebep olduğu tespit edilmiştir. OB, serbest radikallerin üretimi sonucu olarak oluşan aşırı SOR aktivitesi, yüksek oksidatif stres oluşturabilir, bu da kaspazları aktive ederek apoptozis ile hücre ölümüne neden olur (79). Oral ve ark. (72) (immünohistokimyasal olarak apoptoz kaspaz-3 ve kaspaz 9'un doku lokalizasyonu ile ilgili yapılan çalışmada endometrial apoptosisin indüksiyonuna neden olduğu ve antioksidanların direkt etki ile serbest radikal aracılığıyla oluşan apoptosisi düzelttiklerini bildirmişlerdir. Dichlorvos insan lenfoblastoid AHH-1 hücrelerinde apoptosise neden olabilmesine rağmen (142), apoptosiz bizim in vivo akut zehirlenme modelinde kanıt değildi. Bunun sonucunda da grupların hiçbirisinde apoptotik değişiklik izlenmedi, diğer bir ifade ile grupların hepsinde apoptosiz skoru 0 olarak bulundu. Yine buna bağlı olarak iNOS skoru, D ve Y maddesi gruplarında yüksek olmakla birlikte, gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık görülmedi.

Sonuç olarak, bizim sonuçlarımız, Rho kinazın, diklorvos zehirlenmesinde yer aldığını gösterir ve Y-27632 ile Rho kinaz inhibisyonu, farklı hedef odaklarını etkileyen, diklorvos zehirlenmesi için tamamlayıcı bir antidot olarak kullanılabilir. Mevcut sonuçlar, Rho kinaz inhibisyonunun OF'a bağlı zehirlenmelerin tedavisinde faydalı

olabileceğini göstermektedir. Rho-kinaz inhibitörünün verilmesi ratlarda diklorvos zehirlenmesine karşı koruyucu etkiler oluşturabilir. Bu bulgular organofosfat zehirlenmesinin tedavisi için yeni alternatif tedaviler sağlayabilir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

1. Çalışmamızdaki sonuçlar 30 mg/kg diklorvos dozu ile sıçanlarda toksik etkilerin ortaya çıktığını göstermiştir.
2. Çalışmamız Rho kinaz inhibisyonun muskarinik reseptör sinyal transdüksiyon yolunu inhibe edebildiği ve diklorvos zehirlenmesinde yararlı etkileri oluşturabileceğini gösteren ilk çalışmadır.
3. Bizim çalışmada, 1 ve 10 mg/kg dozlarındaki Y-27632, kas fasikülasyonların yoğunluğunu, kolinerjik belirtileri ve diklorvosa bağlı ölümü önledi. Tüm bu sonuçlar bir araya getirildiğinde, Rho kinaz inhibitörlerinin SSS'de rol oynayabildiğini önerilebilir.
4. Mevcut çalışmanın sonuçları, (CK, CK MB, Mb, NT-proBNP hariç), cTI OF zehirlenmesine bağlı kardiyotoksitenin erken değerlendirmesinde dikkate alınabileceğini göstermektedir.
5. Bizim verilerimiz, serum Nt proBNP düzeylerini ölçmenin, sıçanlarda diklorvos bağlı kardiyotoksitenin erken teşhisine katkıda bulunmayabildiğini akla getirir.
6. Y-27632'in, kardiyak glutasyonun, düşük dozu ile artırabildiğini gösterdi ve bu etki de, sıçanlarda diklorvos zehirlenmesine karşı korumaya katkıda bulunabilir.
7. NO ve peroksinitrit sıçanlarda diklorvosa bağlı zehirlenmede miyokardiyumda koruyucu bir etkiyi üretebilir.
8. Organofosfat zehirlenmesinin iNOS ve apoptosis üzerinde belirgin etkisi yoktur.
9. Sonuç olarak, Rho kinazın, diklorvos zehirlenmesinde yer aldığını ve Y-27632 ile Rho kinaz inhibisyonu OF bağlı zehirlenmelerin tedavisinde faydalı olabileceğini göstermektedir. Bu bulgular organofosfat zehirlenmesinin tedavisi için yeni alternatif tedaviler sağlayabilir.

7. KAYNAKLAR

1. Eddleston M, Szinicz L, Eyer P, Buckley N. Oximes in acute organophosphorus pesticide poisoning: a systematic review of clinical trials. *Q J Med.* 2002;95(5):275-83.
2. Karki P, Ansari JA, Bhandary S, Koirala S. Cardiac and electrocardiographical manifestations of acute organophosphate poisoning. *Singapore Med J.* 2004;45(8):385-9.
3. Sungur M, Guven M. Intensive care management of organophosphate insecticide poisoning. *Crit Care.* 2001;5(4):211-215.
4. Kwong TC. Organophosphate pesticides: biochemistry and clinical toxicology. *Ther Drug Monit.* 2002;24(1):144-9.
5. Tafuri J, Roberts J. Organophosphate poisoning. *Ann Emerg Med.* 1987;16:193-202.
6. Kara İH, Güloğlu C, Karabulut A. Sociodemographic, clinical, and laboratory features of cases of organic phosphorus intoxication who attended the emergency department in the Southeast Anatolian Region of Turkey. *Environ Res Section A.* 2002;88(2):82-8.
7. Brill O, Maisel A, Prabhu R. Polymorphic ventricular tachycardia and other complex arrhythmias in organophosphoro insecticide poisoning. *J Electrocardiol.* 1984;17:97-102.
8. Noma K, Oyama N, Liao JK. Physiological role of ROCKs in the cardiovascular system. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2006;290(3):C661-8.
9. Shi J, Wei L. Rho kinase in the regulation of cell death and survival. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz).* 2007;55(2):61-75.

10. Demiryurek S, Kara AF, Celik A, Tarakcioglu M, Bagci C, Demiryurek AT. Effects of Y-27632, a selective Rho-kinase inhibitor, on myocardial preconditioning in anesthetized rats. *Biochem Pharmacol.* 2005;69(1):49-58.
11. Choudhary S, Verma SK, Raheja G, Kaur P, Joshi K, Gill KD. The L-type calcium channel blocker nimodipine mitigates cytoskeletal proteins phosphorylation in dichlorvos-induced delayed neurotoxicity in rats. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2006;98(5):447-55.
12. Saydam CK, Sozmen B, Aslan SL. Organofosfor zehirlenmelerine yaklaşım. *Türkiye Klin J Med Sci.* 2006;26(1):73-77.
13. Aaron CK, Howland MA. Insecticides: Organophosphates and carbamates. Goldfrank LR, Flomenbaum NE, Lewin NA, Goldfrank's Toxicologic Emergencies. 6th ed Stamford Connecticut: Appleton-Lange. 2000:1429-1449.
14. Robey WC, Meggs WJ. Insecticides, herbicides, rodenticides. Tintinalli JE, Kalen GD, Stapczynski JS. *Emergency Medicine.* 6th ed. New York; McGraw-Hill Companies. 2004:1134-1143.
15. Karalliedde L. Organophosphorus poisoning and anaesthesia. *Anaesthesia.* 1999;54: 1073–1088.
16. Alpay NR, Satar S, Sebe A. Organofosfat zehirlenmeleri. *Çukurova Üniversitesi Arşiv Dergisi.* 2004;13:469-479.
17. Singh S, Sharma N. Neurological syndromes following organophosphate poisoning. *Neurol India.* 2000;48(4):308-13.
18. Debleecker JL. The intermediate syndrome in organophosphate poisoning: An overview of experimental and clinical observation. *J Toxicol Clin Toxicol.* 1995; 33(6):683-6.
19. Yılmazlar A, Özyurt G. Brain involvement in organophosphate poisoning. *Environ Res.* 1997;74:104.
20. Minton NA, Murray VSG. A review of organophosphate poisoning. *Med Toxicol.* 1988;3:350-75.

21. Bosse GM, Matyunas NJ. Delayed toxidromes. *J Emerg Med.* 1999;17:679-690.
22. Kocak A, Senol E, Kok HO, Aktas EÖ. Organofosfat (tamaron) zehirlenmesi sonrasında gelişen nöropati. *Turkiye Klin J Foren Med.* 2005;2(3):109-11.
23. Sivangnanam S. Potential therapeutic agents in the management of organophosphate poisoning. *Critical Care.* 2002;6:260-261.
24. Guven M, Sungur M, Eser B. The effect of plasmapheresis on plasma cholinesterase levels in a patient with organophosphate poisoning. *Hum Exp Toxicol.* 2004;23: 365-368.
25. Shimokawa H, Seto M, Katsumata N, Amano M, Kozai T, Yamawaki T, et al. Rho-kinase-mediated pathway induces enhanced myosin light chain phosphorylations in a swine model of coronary artery spasm. *Cardiovasc Res.* 1999 Sep;43(4):1029-39.
26. Fukata Y, Amano M, Kaibuchi K. Rho-Rho-kinase pathway in smooth muscle contraction and cytoskeletal reorganization of non-muscle cells. *Trends Pharmacol Sci.* 2001;22(1):32-9.
27. Hirata K, Kikuchi A, Sasaki T, Kuroda S. Involvement of rho p21 in the GTP enhanced calcium ion sensitivity of smooth muscle contraction. *J Biol Chem.* 1992;267:8719-8722.
28. Mc Vary K. Lower urinary tract symptoms and sexual dysfunction: epidemiology and pathophysiology. *BJU-Int.* 2006;96(suppl 2):23-28.
29. Somlyo AP, Somlyo AV. Signal transduction by G-proteins, Rho-kinase and protein phosphatase to smooth muscle and non smooth muscle myosin II. *J Physiol.* 2000;522:177-85.
30. Casey PJ, Seabra MC. Protein prenyl transferases. *J Biol Chem.* 1996;271:5289-5292.
31. Ark M, Yılmaz N, Yazıcı G, Kubat H, Aktaş S. Rho-associated protein kinase-II (rock-II) expression in normal and preeclamptic human placentas. *Placenta.* 2005;26:81-84.

32. Dhanasekaran N, Dermott JM. Signaling by the G12 class of G proteins. *Cell Signal*. 1996;8:235-245.
33. Ito M, Nakano T, Erdodi F, Hartshorne DJ. Myosin phosphatase: Structure, regulation and function. *Mol Cell Biochem*. 2004;259:197-209.
34. Takemoto M, Sun J, Hiroki J, Shimokawa H, Liao JK. Rho-kinase mediates hypoxia-induced downregulation of endothelial nitric oxide synthase. *Circulation*. 2002;106(1):57-62.
35. Rikitake Y, Liao JK. Rho GTPases, statins and nitric oxide. *Circ Res*. 2005;97:1232-1235.
36. Mueller BK, Mack H, Teusch N. Rho-kinase, a promising drug target for neurological disorders. *Nat Rev Drug Discov*. 2005;4:387-398.
37. Shimokawa H, Rashid M. Development of Rho-kinase inhibitors for cardiovascular medicine. *Trends Pharmacol Sci*. 2007;28:296-302.
38. Mills TM, Lewis RW, Wingard CJ, Linder AE, Jin L, Webb RC. Vasoconstriction, RhoA/Rho-kinase and the erectile response. *Int J Impot Res*. 2003;15 Suppl 5:S20-4.
39. Miao L, Dai Y, Zhang J. Mechanism of RhoA/Rho kinase activation in endothelin-1-induced contraction in rabbit basilar artery. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2002;283:983-989.
40. Mukai Y, Shimokawa H, Mataba T, Kandabashi T, Satoh S, Hiroki J, et al. Involvement of Rho-kinase in hypertensive vascular disease: a novel therapeutic target in hypertension. *FASEB J*. 2001;15(6):1062-4.
41. Bao W, Hu E, Tao L, Boyce R, Mirabile R, Thudium DT, et al. Inhibition of Rho-kinase protects the heart against ischemia/reperfusion injury. *Cardiovasc Res*. 2004;61(3):548-58.

42. Schaafsma D, Gosens R, Zaagsma J, Halayko AJ, Meurs H. Rho kinase inhibitors: a novel therapeutical intervention in asthma? *Eur J Pharmacol.* 2008;585(2-3):398-406.
43. Nikolic M. The role of Rho GTPases and associated kinases in regulating neurite outgrowth. *Int J Biochem Cell Biol.* 2002;34:731-745.
44. Luo L. Rho GTPases in neuronal morphogenesis. *Nat Rev Neurosci.* 2000;1:173-180.
45. Mueller BK, Mack H, Teusch N. Rho kinase, a promising drug target for neurological disorders. *Nat Rev Drug Discov.* 2005;4(5):387-98.
46. Hessler R. Cardiovascular Principles. Goldfrank FR, Flomenbaum NE, Levin NA, eds. *Goldfrank's Toxicologic Emergencies.* 6th ed. Stamford Connecticut: Appleton-Lange 2000; 21:353-378.
47. Saadeh AM, Farsakh NA, al-Ali MK. Cardiac manifestations of acute carbamate and organophosphate poisoning. *Heart.* 1997;77:461-4.
48. Rubinshtein R, Bar-Meir E, Grubstein A, Bitterman H. Early onset of ventricular tachyarrhythmias in organophosphate intoxication. *Isr Med Assoc J.* 2002;4:63-4.
49. Roth A, Zellinger I, Arad M, Atsmon J. Organophosphates and the heart. *Chest.* 1993;103:576-82.
50. Ludomirsky A, Klein HO, Sarelli P, Becker B, Hoffman S, Taitelman U, et al. Q-T prolongation and polymorphous ("torsade de pointes") ventricular arrhythmias associated with organophosphorus insecticide poisoning. *Am J Cardiol.* 1982;49(7): 1654-8.
51. Chuang FR, Jang SW, Lin JL, Chern MS, Chen JB, Hsu KT. QTc prolongation indicates a poor prognosis in patients with organophosphate poisoning. *Am J Emerg Med.* 1996;14(5):451-3.
52. Manning GW, Hall GE, Banting FG. Vagus stimulation and the production of myocardial damage. *Can Med Assoc J.* 1937;37:314-8.

53. Hall GE, Ettinger GH, Banting FG. An experimental production of coronary thrombosis and myocardial failure. *Can Med Assoc J.* 1936;34:9–15.
54. Ludmer PL, Selwyn AP, Shook TL, Wayne RR, Mudge GH, Alexander RW, et al. Paradoxical vasoconstriction induced by acetylcholine in atherosclerotic coronary arteries. *N Engl J Med.* 1986;315(17):1046-51.
55. Collinson PO. Troponin T or troponin I or CK-MB (or none?). *Eur Heart J.* 1998;19(Suppl N):16-24.
56. Çengel A, Tavil Y. Miyokard hasarının biyokimyasal belirteçleri. *Türkiye Klinikleri Kardiyoloji* 2004;17(2):81-85.
57. Jaffe AS, Davidenko J. Diagnosis of acute myocardial ischemia and infarction. Crawford MH, DiMarco JP (eds): *Cardiology.* 1st edition. Mosby International Ltd. England, 2003.
58. Dean KJ. Biochemistry and molecular biology of troponin I and T. In Wu AHB (ed.): *Cardiac markers.* Totowa NJ: Humana 1998:193-204.
59. Rottbauer W, Greten T, Müller-Bardorff M, Remppis A, Zehelein J, Grünig E, et al. Troponin T: a diagnostic marker for myocardial infarction and minor cardiac damage. *Eur Heart J* 1997;17(Suppl F):3-8.
60. Habif S. Kardiyak Troponinler. *T Klin Tıp Bilimleri.* 2003; 23(1):74-80.
61. Hamm CW, Giannitsis E, Katus HA. Cardiac troponin elevations in patients without acute coronary syndrome. *Circulation.* 2002;106(23):2871-2.
62. Levin ER, Gardner DG, Samson WK. Natriuretic Peptides. *N Engl J Med.* 1998;339:321-28.
63. Stein BC, Levin RI. Natriuretic peptides: physiology therapeutic potential and risk stratification in ischemic heart disease. *Am Heart J.* 1998;135: 914-23.
64. Christian H. Essential biochemistry and physiology of (NT-pro)BNP. *Eur J Heart Fail* 2004;6:257-60.

65. Mair J, Friedl W, Thomas S, Pushendorf B. Natriüretic peptides in asseement of left ventricular dysfunction. *Scand J Clin Lab Invest Suppl.* 1999;59:132-142.
66. Pfeffer MA, Braunwald E. Ventricular remodelling after myokardial infarction: Experimental observations and clinical implications. *Circulation* 1990;81:1161-72.
67. Duygu H, Turk U, Zoghi M, Nalbantgil S. Plazma B-tipi natriüretik peptid düzeylerinin kardiyovasküler hastalıklardaki yeri ve önemi. *Anadolu Kardiyol Derg.* 2005;5(4):305-11.
68. Serafini M, Del Rio D. Understanding the association between dietary antioxidants, redox status and disease: is the total antioxidant capacity the right tool?. *Redox Report.* 2004;9(3):145-152.
69. Babior BM. Phagocytes and oxidative stress. *Am J Med.* 2000;109(1):33-44.
70. Woo J, Leung SS, Lam CW, Ho SC, Lam TH, Janus ED. Plasma total antioksidant capacity in an adult Hong Kong Chinese population. *Clin Biochem.* 1997;30:553-7.
71. Akkuş I. Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri. Mimoza yayınları, Konya, 1995:75-87.
72. Oral B, Guney M, Demirin H, Ozguner M, Giray SG, Take G, et al. Endometrial damage and apoptosis in rats induced by dichlorvos and ameliorating effect of antioxidant vitamins E and C. *Reprod Toxicol.* 2006;22(4):783-90.
73. Yavuz T, Altuntas I, Delibas N, Yıldırım B, Candır O, Cora A, et al. Cardiotoxicity in rats induced by methidathion and ameliorating effect of Vitamins E and C. *Hum Exp Toxicol.* 2004;23(7):323–9.
74. Southorn PA. Free Radicals in Medicine I. Chemical Nature and Biological Reactions. *Mayo Clin Proc.* 1998;63:381-389.
75. Halliwell B. Antioxidant characterization. Methodology and mechanism. *Biochem Pharmacol.* 1995;49(10):1341-8.

76. Meister A. Glutathione, ascorbate, and cellular protection. *Cancer Res.* 1994;54:1969-1975.
77. Angel MF, Ramasastry SS, Swartz WM, Basford RE, Futrell JW. Free Radicals; Basic Concepts Concerning Their Chemistry, Pathophysiology and Relevance to Plastic Surgery. *Plast Reconstr Surg.* 1987;79:990-997.
78. Banerjee BD, Seth V, Bhattacharya A, Pasha ST, Chakraborty AK. Biochemical effects of some pesticides on lipid peroxidation and free-radical scavengers. *Toxicol Lett.* 1999;107:33-47.
79. Pena-Llopis S, Ferrando MD, Pena JB. Fish tolerance to organophosphate-induced oxidative stress is dependent on the glutathione metabolism and enhanced by N-acetylcysteine. *Aquat Toxicol.* 2003;65(4):337-60.
80. Davies MG, Fulton GJ, Hagen PO. Clinical biology of nitric oxide. *Br J Surg.* 1995;82:1598-610.
81. Moncada S, Higgs A. The L-Arginine-Nitric Oxide Pathway. *N Engl J Med.* 1993;329:2002-11.
82. Ozkan M, Yuksekol İ. Nitrik Oksit ve Akciğerler. *Toraks Dergisi.* 2003;4(1):88-94.
83. Kobzik L, Bredt DS, Lowenstein CJ, Drazen J, Gaston B, Sugarbaker D, et al. Nitric oxide synthase in human and rat lung: immunohistochemical and histochemical localization. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1993;9:371-7.
84. Schulz R, Kelm M, Heusch G. Nitric oxide in myocardial ischemia/ reperfusion injury. *Cardiovasc Res.* 2004;61(3):402-13.
85. Marsden PA, Heng HH, Scherer SW, Stewart RJ, Hall AV, Shi XM, et al. Structure and chromosomal localization of the human constitutive endothelial nitric oxide synthase gene. *J Biol Chem* 1993;268:17 478-88.

86. Chartrain NA, Geller DA, Koty PP, Sitrin NF, Nussler AK, Hoffman EP, et al. Molecular cloning, structure, and chromosomal localization of the human inducible nitric oxide synthase gene. *J Biol Chem*. 1994;269:6765-72.
87. Llorens S, Jordan J, Nava E. The nitric oxide pathway in the cardiovascular system. *J. Physiol. Biochem*. 2002;58 (3):179-188.
88. Snyder SH. Nitric oxide: First in a new class of neurotransmitters. *Science*. 1992;257:494-6.
89. Lowenstein CJ, Dinerman JL, Snyder SH. Nitric oxide: A physiologic messenger. *Ann Intern Med*. 1994;120: 227-37.
90. Gaballa MA. Effects of endothelial and inducible nitric oxide synthases inhibition on circulatory function in rats after myocardial infarction. *Cardiovas Res*. 1999;42:627-635.
91. Turkoz Y, Ozerol E. Nitrik oksit'in etkileri ve patolojik rolleri. *İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*. 1997;4(4):453-461.
92. Loscalzo J, Welch G. Nitric oxide and its role in the cardiovascular system. *Prog Cardiovasc Dis*. 1995;38(2):87-104.
93. Kuyumcu A, Duzgun AP, Ozmen MM, Besler HT. The role of nitric oxide in trauma and infection. *Ulusal Travma Dergisi*. 2004;10(3):149-59.
94. Malinski T. Understanding nitric oxide physiology in the heart: A nanomedical approach. *Am J Cardiol*. 2005;96:13-24.
95. Damy T, Ratajczak P, Shah AM, Camons E, Marty I, Hasenfuss G, et al. Increased neuronal nitric oxide synthase-derived NO production in the failing human heart. *Lancet*. 2004;363:1365-7.
96. Pova R, Cardoso SH, Luna Filho B, Ferreira Filho C, Ferreira M, Ferreira C. Organophosphate poisoning and myocardial necrosis. *Arq Bras Cardiol*. 1997;68:377-80.

97. Oral B, Guney M, Demirin H, Ozguner M, Giray SG, Take G, et al. Endometrial damage and apoptosis in rats induced by dichlorvos and ameliorating effect of antioxidant vitamins E and C. *Reprod Toxicol*. 2006; 22(4): 783-90.
98. Wildhirt SM, Suzuki H, Horstman D, Weismuller S, Dudek RR, Akiyama K, et al. Selective modulation of inducible nitric oxide synthase isozyme in myocardial infarction. *Circulation*. 1997;96(5):1616-23.
99. Paulus WJ, Bronzwaer JG. Myocardial contractile effects of nitric oxide. *Heart Fail Rev*. 2002;7:371-83.
100. Gealekman O, Abbasi Z, Rubinstein I, Winaver J, Binah O. Role of myocardial inducible nitric oxide synthase in contractile dysfunction and beta-adrenergic hyporesponsiveness in rats with experimental volume-overload heart failure. *Circulation*. 2002; 105: 236-43.
101. Wang YX, Sun MJ. Nitric oxide and soman poisoning. *Zhongguo Yao Li Xue Bao*. 1998;19(5):470-2.
102. Abou-Donia MB. Organophosphorus ester-induced chronic neurotoxicity. *Arch Environ Health*. 2003;58(8):484-97.
103. Alles A, Alley K, Barrett JC, Buttyan R, Columbano A, Cope FO, et al. Apoptosis. a general comment. *FASEB J*. 1991;5:2127-8.
104. Kultursay H, Kayikcioglu M. Apoptosis and cardiovascular disease. *Anadolu Kardiyol Derg*. 2002;2(4):323-9.
105. Saikumar P, Dong Z, Mikhailov V, Denton M, Weinberg JM, Venkatachalam MA: Apoptosis: definition, mechanisms, and relevance to disease. *Am J Med*. 1999;107: 489-506.
106. Kumar D, Lou H, Singal PK. Oxidative stress and apoptosis in heart dysfunction. *Herz*. 2002;27(7):662-8.
107. James TN. Apoptosis in cardiac disease. *Am J Med*. 1999;107:606-20.

108. Purshottam T, Srivastava RK. Effect of high-fat and high-protein diets on toxicity of parathion and dichlorvos. *Arch Environ Health*. 1984;39(6):425-30.
109. Kobayashi N, Horinaka S, Mita S, Nakano S, Honda T, Yoshida K, et al. Critical role of Rho-kinase pathway for cardiac performance and remodeling in failing rat hearts. *Cardiovasc Res*. 2002;55(4):757-67.
110. Büyükaşar K, Yalçın I, Kurt AH, Tiftik RN, Sahan-Firat S, Aksu F. Rho-kinase inhibitor, Y-27632, has an antinociceptive effect in mice. *Eur J Pharmacol*. 2006;10;541(1-2):49-52.
111. Zhou Z, Dai X, Gu X, Sun Y, Zheng G, Zheng J. Memantine alleviates toxicity induced by dichlorvos in rats. *J Occup Health*. 2005;47(2):96-101.
112. Whittaker M, Britten JJ, Dawson PJ. Comparison of a commercially available assay system with two reference methods for the determination of plasma cholinesterase variants. *Clin Chem*. 1983;29(10):1746-51.
113. Alasehirli B, Demiryurek S, Arica E, Gursoy S, Demiryurek AT. No evidence for an association between the Glu298Asp polymorphism of the endothelial nitric oxide synthase gene and fibromyalgia syndrome. *Rheumatol Int*. 2007;27:275–280.
114. Yildirim Z, Sogut S, Odaci E, Iraz M, Ozyurt H, Kotuk M, et al. Oral erdosteine administration cisplatin-induced renal tubular damage in rats. *Pharmacol Res*. 2003;47:149-156.
115. Tuncayengin A, Biri H, Onaran M, Sen I, Tuncayengin O, Polat F, et al. Cavernosal tissue nitrite, nitrate, malondialdehyde and glutathione levels in diabetic and non-diabetic erectile dysfunction. *Int J Androl*. 2003;26(4):250-4.
116. Singh S. Organophosphate poisoning: An evidence based approach. *MJAFI*. 2004; 60:2-4.
117. Pajoumand A, Shadnia S, Rezaie A, Abdi M, Abdollahi M. Benefits of magnesium sulfate in the management of acute human poisoning by organophosphorus insecticides. *Hum Exp Toxicol*. 2004;23(12):565-9.

118. Silveira CL, Eldefrawi AT, Eldefrawi ME. Putative M₂ muscarinic receptors of rat heart have high affinity for organophosphorus anticholinesterases. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1990;103(3):474-81.
119. Ding X, Murray PA. Regulation of pulmonary venous tone in response to muscarinic receptor activation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2005;288(1):L131-40.
120. Schmidt M, Voss M, Weernink PA, Wetzel J, Amano M, Kaibuchi K, Jakobs KH. A role for rho-kinase in rho-controlled phospholipase D stimulation by the m3 muscarinic acetylcholine receptor. *J Biol Chem.* 1999;274(21):14648-54.
121. Park HJ, Ward SM, Desgrosellier JS, Georgescu SP, Papageorge AG, Zhuang X, et al. Transforming growth factor beta regulates the expression of the M₂ muscarinic receptor in atrial myocytes via an effect on RhoA and p190RhoGAP. *J Biol Chem.* 2006;281(29):19995-20002.
122. Fernandes L, D'Aprile A, Self G, McGuire M, Sew T, Henry P, et al. A Rho-kinase inhibitor, Y-27632, reduces cholinergic contraction but not neurotransmitter release. *Eur J Pharmacol.* 2006;550(1-3):155-61.
123. Buyukafsar K, Levent A. Involvement of Rho/Rho-kinase signalling in the contractile activity and acetylcholine release in the mouse gastric fundus. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003;303(3):777-81.
124. Bird SB, Gaspari RJ, Dickson EW. Early death due to severe organophosphate poisoning is a centrally mediated process. *Acad Emerg Med.* 2003;10(4):295-8.
125. Sivilotti ML, Bird SB, Lo JC, Dickson EW. Multiple centrally acting antidotes protect against severe organophosphate toxicity. *Acad Emerg Med.* 2006;13(4):359-64.
126. Finkelstein Y, Kushnir A, Raikhlin-Eisenkraft B, Taitelman U. Antidotal therapy of severe acute organophosphate poisoning: A multihospital study. *Neurotoxicol Teratol.* 1989;11:593-6.
127. Abraham S, Oz N, Sahar R, Kadar T. QTc prolongation and cardiac lesions following acute organophosphate poisoning in rats. *Proc West Pharmacol Soc.* 2001;44:185-6.

128. Okudera H. Clinical features on nerve gas terrorism in Matsumoto. *Clin Neurosci*. 2002;9:17-21.
129. Cavaliere MJ, Calore EE, Perez NM, Puga FR. Organophosphate-induced myotoxicity. *Rev Saude Publica*. 1996;30:267-72.
130. Ozyurt G, Yilmazlar A, Tamgac F, Kaplan N. The myocardium and brain SPECT findings in organophosphate poisoning. *Eur J Emerg Med*. 1997;4:29-31.
131. Karcıoğlu O, Colak N, Topacoğlu H, Unverir P. Akut miyokard infarktüsünün eşlik ettiği organofosfat zehirlenmesi. *Genel Tıp Dergisi*. 2006;16(1):37-42.
132. Lindahl B. Markers of myocardial damage in acute coronary syndromes therapeutic implications. *Clin Chim Acta*. 2001;311:27-32.
133. Davutoglu V, Gunay N, Kocoglu H, Gunay NE, Yildirim C, Cavdar M, et al. Serum levels of NT-ProBNP as an early cardiac marker of carbon monoxide poisoning. *Inhal Toxicol*. 2006;18(2):155-8.
134. Bkaily G, D'orleans-Juste P. Cytokine-induced free radicals and their roles in myocardial disfunctions. *Cardiovasc Res*. 1999; 42(3):576-7.
135. Dicowsky L, Morello A. Glutathione-dependent degradation of 2,2 dichlorovinyl dimethyl phosphate (DDVP) by the rat. *Life Sci II*. 1971;10(18):1031-7.
136. Pastore A, Federici G, Bertini E, Piemonte F. Analysis of glutathione: implication in redox and detoxification. *Clin Chim Acta*. 2003;333(1):19-39.
137. Monteiro DA, de Almeida JA, Rantin FT, Kalinin AL. Oxidative stress biomarkers in the freshwater characid fish, *Brycon cephalus*, exposed to organophosphorus insecticide Folisuper 600 (methyl parathion). *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*. 2006;143(2):141-9.

138. Wink DA, Mitchell JB. Chemical biology of nitric oxide: Insights into regulatory, cytotoxic, and cytoprotective mechanisms of nitric oxide. *Free Radic Biol Med.* 1998;25(4-5):434-56.
139. Altug S, Demiryurek AT, Ak D, Tungel M, Kanzik I. Contribution of peroxynitrite to the beneficial effects of preconditioning on ischaemia-induced arrhythmias in rat isolated hearts. *Eur J Pharmacol.* 2001;415(2-3):239-46.
140. Massion PB, Pelat M, Belge C, Balligand JL. Regulation of the mammalian heart function by nitric oxide. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.* 2005;142(2):144-50.
141. Versteilen AM, Korstjens IJ, Musters RJ, Groeneveld AB, Sipkema P. Rho kinase regulates renal blood flow by modulating eNOS activity in ischemia-reperfusion of the rat kidney. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2006;291(3):F606-11.
142. Mattiuzzo M, Fiore M, Ricordy R, Degrassi F. Aneuploidy-inducing capacity of two widely used pesticides. *Carcinogenesis.* 2006;27(12):2511-8.