



**GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ**

**ANESTEZİYE SIÇANDA TRİMETAZİDİNİN  
MYOKARDİYAL ÖNKOŞULLAMAYA ETKİSİ**

**TIP FAKÜLTESİ  
FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI**

**UZMANLIK TEZİ**

**Araş.Gör.Dr.ALİ FUAD KARA**

**Ekim 2004**

**ANESTEZİYE SIÇANDA TRİMETAZİDİNİN  
MYOKARDİYAL ÖNKOŞULLAMAYA ETKİSİ**

**Uzmanlık Tezi**

**Araş.Gör.Dr.Ali Fuad KARA**

**Ekim 2004**

**ÖZ****ANESTEZİYE SIÇANDA TRİMETAZİDİNİN  
MYOKARDİYAL ÖNKOŞULLAMAYA ETKİSİ****KARA, Ali Fuad**

Uzmanlık Tezi, Farmakoloji Anabilim Dalı

Tez Yöneticisi: Prof. Dr. A.Tuncay DEMİRYÜREK

Ekim 2004, 99 sayfa

Trimetazidin hücrel antiiskemik ilaç olarak klinik kullanıma girmiş olmasına karşın anesteziye sıçanlarda myokardiyal önkoşullamaya etkisini araştıran bir çalışma bugüne kadar yapılmamıştır. Biz bu çalışmamızda anesteziye sıçanlarda trimetazidin'in iskemik önkoşullama ve karbakol önkoşullaması üzerine etkilerini araştırmayı hedefledik. Koroner arterin 5 dk oklüzyonu ve ardından 5 dk reperfüzyonu ile oluşturulan iskemik önkoşullama, 30 dk'lık iskemi döneminde ventriküler taşikardi insidansını azaltırken, ventriküler fibrilasyonu ise ortadan kaldırdı. Tek başına trimetazidin (10 mg/kg, i.v.) aritmi parametrelerinde azalma sağladı. Karbakol infüzyonu ile oluşturulan önkoşullama ventriküler taşikardi insidansı, kalp atım hızı ve ortalama arteryel kan basıncında azalmaya neden oldu. İskemik önkoşullama ve karbakol önkoşullamasında aritmi parametrelerindeki anlamlı azalma trimetazidin varlığında da korundu. İskemik önkoşullama ve karbakol önkoşullaması gruplarında aritmi skoru ve myokardiyal infarkt alanında anlamlı azalma görüldü ve trimetazidin bu azalmayı inhibe etmedi. Bu sonuçlar trimetazidin'in, iskeminin neden olduğu aritmilere karşı kalbi koruduğunu, myokardiyal infarkt alanını azalttığını, iskemik önkoşullama ve farmakolojik önkoşullamanın etkilerini koruduğunu ve anesteziye sıçanlarda iskemik önkoşullamayı taklit edebildiğini göstermektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Aritmi, karbakol, infarkt alanı, önkoşullama, trimetazidin.

**ABSTRACT****EFFECTS OF TRIMETAZIDINE ON MYOCARDIAL  
PRECONDITIONING IN ANESTHETIZED RATS**

KARA, Ali Fuad

Residency Thesis, Department of Pharmacology

Supervisor: Prof. Dr. A. Tuncay DEMİRYÜREK

October 2004, 99 page

Trimetazidine is a widely used anti-ischemic agent, but its effect on myocardial preconditioning in anesthetized animals has not been investigated. The aim of this study was to examine the effects of trimetazidine on ischemic preconditioning and carbachol preconditioning in anesthetized rats. Ischemic preconditioning, induced by 5-min of coronary artery occlusion and 5-min of reperfusion, decreased the incidence of ventricular tachycardia and abolished the occurrence of ventricular fibrillation during 30-min of ischemia. Trimetazidine (10 mg/kg, i.v.) alone attenuated these parameters of arrhythmia. Carbachol infusion induced preconditioning with a marked depression of mean arterial blood pressure, heart rate and ventricular tachycardia. The marked reductions in parameters of arrhythmia induced by ischemic preconditioning and carbachol preconditioning were preserved in the presence of trimetazidine. Arrhythmia scores and myocardial infarct size were significantly reduced with ischemic preconditioning or carbachol preconditioning and were not inhibited by trimetazidine. These results show that trimetazidine protects the heart against ischemia-induced arrhythmias, reduces myocardial infarct size, preserves the effects of ischemic preconditioning and pharmacological preconditioning, and is able to mimic ischemic preconditioning in anesthetized rats.

**Keywords:** Arrhythmias, carbachol, infarct size, preconditioning, trimetazidine

## ÖNSÖZ

Eğitimim ve tez çalışmalarım boyunca bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşmaktan çekinmeyerek beni yönlendiren, her konuda sorularıma yanıt bulmamda bana yardımcı olan, ilgisi ve yakınlığı ile desteğini her zaman yanımda hissettiğim değerli hocam Prof. Dr. A.Tuncay DEMİRYÜREK'e,

Anabilim dalında göreve başladığım günden itibaren gülen yüzleri ve tatlı dilleri ile bana her zaman destek olan değerli ablalarım Yrd.Doç.Dr.Belgin ALAŞEHİRLİ ve Yrd.Doç.Dr.Mehtap ÖZKUR'a ,

Bana tez çalışmalarım sırasında yardımını esirgemeyen ve çalışmalarımda beni asistse eden sayın Şeniz DEMİRYÜREK'e,

Deney hayvanlarına alışmamda tecrübesi ile yol gösteren Deney Hayvanları Merkezi personeli İsmail ŞAHİN'e,

Her konuda yardımlarına başvurduğum kıymetli arkadaşlarım Bülent GÖĞEBAKAN, Yusuf Ziya İGÇİ ve Şenay GÖRÜCÜ'ye,

Biyokimya parametrelerini hızlı ve titiz bir şekilde çalışıp en kısa sürede sonuçlandıran Arş.Gör.Dr.Ahmet ÇELİK'e

Ve burada ismini yazamadığım bir çok kişiye TEŞEKKÜR EDERİM.

## İÇİNDEKİLER

ÖZ.....	i
ABSTRACT .....	ii
ÖNSÖZ.....	iii
TABLO LİSTESİ.....	vii
ŞEKİL LİSTESİ.....	viii
KISALTMALAR.....	ix
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER .....	4
2.1. Önkoşullama.....	4
2.1.1. Myokardiyal iskemi .....	4
2.1.2. İskemik önkoşullama .....	5
2.1.3. Önkoşullamanın fazları.....	7
2.1.4. Önkoşullamanın hücrel sinyal ileti mekanizmaları .....	8
2.1.4.1. Tirozin kinazlar .....	11
2.1.4.2. Mitojen ile aktive protein kinazlar.....	12
2.1.5. İskemik önkoşullamanın tetikleyicileri.....	12
2.1.5.1. Reseptör bağımlı tetikleyiciler.....	12
2.1.5.1.1. Adenozin .....	12
2.1.5.1.2. Bradikinin .....	14
2.1.5.1.3. Opioidler .....	16
2.1.5.1.4. Prostaglandinler, norepinefrin, anjiyotensin ve endotelin.....	17
2.1.5.2. Reseptörden bağımsız tetikleyiciler .....	17
2.1.5.2.1. Nitrik oksit .....	17
2.1.5.2.2. Reaktif oksijen türleri (ROS).....	18
2.1.5.2.3. Kalsiyum.....	20
2.1.6. İskemik önkoşullamanın intraselüler mediyatörleri .....	20
2.1.6.1. Protein kinaz C .....	20

2.1.6.2. K <sub>ATP</sub> kanalları .....	22
2.1.7. Gecikmiş önkoşullama .....	23
2.1.8. Gecikmiş önkoşullamanın mediyatörleri ve son efektörleri .....	23
2.1.9. İskemik önkoşullamanın klinik uygulamaları .....	24
2.1.10. İnsanda kardiyak önkoşullama .....	25
2.1.11. Kardiyovasküler sistem .....	27
2.1.11.1. Kardiyak enerji metabolizması .....	27
2.1.11.2. İskemide kalpte oluşan metabolik değişiklikler .....	28
2.1.11.3. İskemi esnasında kalbin otonomik kontrolünde oluşan değişiklikler .....	29
2.1.12. Kardiyovasküler sistem ve trimetazidin .....	30
2.1.12.1. Kardiyovasküler bozukluklarda kullanılan farmakolojik ajanlar .....	30
2.1.12.2. Trimetazidin .....	31
2.1.12.3. Deneysel kardiyak iskemi-reperfüzyon çalışmalarında trimetazidin .....	32
2.1.12.4. Trimetazidinin inflamasyona etkileri .....	33
2.1.12.5. Trimetazidinin membran fosfolipidleri üzerine etkileri .....	34
2.1.12.6. Trimetazidinin kardiyak enerji metabolizması üzerine etkileri .....	34
2.1.12.7. Klinik çalışmalarda trimetazidinin iskemik kalp hastaları üzerindeki etkileri .....	36
2.1.12.8. Trimetazidin ve myokardiyal önkoşullama .....	37
2.1.13. İstatistiksel analiz .....	38
3. MATERYAL VE METOD .....	39
3.1. Materyal .....	39
3.1.1. Deney hayvanları .....	39
3.1.2. Kimyasal maddeler ve hazırlanışları .....	39
3.1.3. Araç ve gereçler .....	40
3.2. Metod .....	41
3.2.1. İskemi ve önkoşullama oluşturulması .....	42
3.2.2. İlaç uygulama şekilleri .....	42
3.2.3. Deney protokolleri .....	43
3.2.4. Değerlendirilen parametreler .....	46
3.2.5. Biyokimyasal analizler .....	50
3.2.6. Risk altındaki kardiyak alan ve infarkt bölgesinin tayini .....	51
4. BULGULAR .....	52
4.1. Hemodinamik .....	52
4.2. İskemi aritmileri .....	52

4.3. Biyokimyasal analizler .....	59
4.4. Risk alanı ve infarkt bölgesi .....	64
5. TARTIŞMA.....	66
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....	72
7. KAYNAKLAR.....	73



**TABLO LİSTESİ**

Tablo 1. Anesteziye sıçanlarda yapılan deney gruplarında ölçülen ortalama arteriyel kan basıncı (mm Hg) değerleri .....	54
Tablo 2. Anesteziye sıçanlarda yapılan deney gruplarında ölçülen kalp atım hızı (atım/dk) değerleri .....	55
Tablo 3. Anesteziye sıçanlarda yapılan deney gruplarında oluşan aritmiler. ....	56
Tablo 4. Anesteziye sıçanlarda yapılan deney gruplarında oluşan aritmi süreleri ve aritmi skoru. ....	58

## ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1. İskemik hücrel hasarın gelişiminin şematik gösterimi.....	5
Şekil 2. İskemik önkoşullamada salıverilen mediyatörler ve PKC stimülasyonu.....	7
Şekil 3. İskemik önkoşullamanın erken ve geç fazları.....	8
Şekil 4. İskemik önkoşullamanın önerilen mekanizmasının şematik gösterimi.....	10
Şekil 5. Gecikmiş önkoşullamada protein sentezi.....	11
Şekil 6. Adenozin metabolizma yolları.....	13
Şekil 7. Kalpte yağ asidi ve karbonhidrat metabolizması.....	27
Şekil 8. Aerobik ve iskemik durumda kardiyak enerji metabolizması.....	28
Şekil 9. Trimetazidinin kimyasal yapısı.....	31
Şekil 10. Trimetazidinin yağ asidi metabolizmasına etkisi.....	35
Şekil 11. Deney protokolleri.....	45
Şekil 12. Orijinal VEA kayıt görüntüleri.....	47
Şekil 13. Orijinal VT kayıt görüntüleri.....	48
Şekil 14. Orijinal VF kayıt görüntüleri.....	49
Şekil 15. Anesteziye sıçanlarda yapılan deney gruplarında plazma laktat seviyelerine trimetazidinin etkisi.....	60
Şekil 16. Anesteziye sıçanlarda yapılan deney gruplarında plazma MDA seviyelerine trimetazidinin etkisi.....	61
Şekil 17. Anesteziye sıçanlarda yapılan deney gruplarında plazma troponin T seviyelerine trimetazidinin etkisi.....	62
Şekil 18. Anesteziye sıçanlarda yapılan deney gruplarında plazma CK-MB seviyelerine trimetazidinin etkisi.....	63
Şekil 19. Anesteziye sıçanlarda yapılan deney gruplarında trimetazidinin risk alanı ve infarkt bölgesi üzerine etkisi.....	65

## KISALTMALAR

3-KAT .....	3-ketoaçil koenzim A tiolaz
5'-ND.....	5'-nükleotidaz
5-HD .....	5-hidroksidekanoat
ADA.....	Adenozin deaminaz
ADE.....	Anjiyotensin dönüştürücü enzim
ADP .....	Adenozin difosfat
AMI .....	Akut myokard infarktüsü
AMP .....	Adenozin monofosfat
ATP.....	Adenozin trifosfat
CABG .....	Koroner arter bypass greft cerrahisi
CK-MB.....	Kreatin kinaz MB
COX.....	Siklooksijenaz
CSA .....	Siklosporin A
DAG.....	Diaçilgliserol
DNP .....	Dinitrofenol
eNOS .....	Endotelyal NOS
ERK .....	Ekstraselüler sinyal düzenleyici kinazlar
GİK .....	Glukoz insülin potasyum infüzyonu
HSP-72 .....	Isı stres proteini
iNOS .....	İndüklenebilir NOS
K <sub>ATP</sub> .....	ATP duyarlı K <sup>+</sup> kanalı
MAPK.....	Mitojenle ile aktive olan protein kinaz
MAPKAP2 .....	MAPK ile aktive olan protein kinaz2
MDA.....	Malondialdehit
MitoK <sub>ATP</sub> .....	Mitokondriyal K <sub>ATP</sub> kanalı
MKK.....	MAPK kinaz
Mn SOD.....	Mangan süperoksit dismutaz

MPG .....	N-2 merkaptopropiyonil glisin
MPO .....	Myeloperoksidaz
NF- B .....	Nükleer faktör B
NO .....	Nitrik oksit
NOS .....	Nitrik oksit sentaz
PKC .....	Protein kinaz C
PLC .....	Fosfolipaz C
PLD .....	Fosfolipaz D
PTCA .....	Perkutanöz koroner anjiyografi
ROS .....	Reaktif oksijen türleri
SAH .....	S-adenozilhomosistein
SAM .....	S-adenozilmetionin
sGMP .....	Siklik guanozin monofosfat
SOD .....	Süper oksitdismutaz
TTC .....	Trifeniltetrazolium klorid
VEA .....	Ventriküler ektopik atım
VF .....	Ventriküler fibrilasyon
VT .....	Ventriküler taşikardi

## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

İlk kez 1986 yılında Murry ve arkadaşları tarafından yapılan kısa süreli tekrarlanan iskeminin kalbi daha uzun süreli iskemiye karşı koruyucu etki oluşturduğu gösterilmiş ve kalpte endojen olarak ortaya çıkan bir koruyucu mekanizmanın varlığı ortaya konmuştur (1). İskemik önkoşullama adı verilen endojen savunma mekanizması iskemi sonrası myokard fonksiyonlarının geri kazanılmasını hızlandırır, nekrotik alanı ve oluşan aritmilerin şiddetini azaltır (2, 3). Bu mekanizma kalpte aritmiler ve infarkt alanı yanında, kontraktıl ve koroner endotel fonksiyonunda da koruma oluşturmaktadır (2). Daha sonra yapılan çalışmalarda, iskemik önkoşullamanın iki faz içerdiği ortaya konmuştur. Bunlardan ilki korumanın birinci penceresi, klasik faz, erken faz, ilk faz veya akut faz iken, diğeri saatler sonra ortaya çıkan geç faz, gecikmiş faz veya korumanın ikinci penceresidir. Her iki faz için de koruyucu mekanizmanın aydınlatılmasına yönelik çeşitli çalışmalar yapılmıştır (4, 5). Yapılan çalışmalarda, iskemik önkoşullamada serbest oksijen radikallerinin yanında adenozin, bradikinin, katekolaminler, opioid peptidler ve nitrik oksit (NO) gibi endojen mediyatörlerin rolü olduğu gösterilmiştir (6-8). Önkoşullamanın hücre sel sinyal ileti mekanizmasını aydınlatmaya yönelik bugüne kadar yapılan çalışmalarda adenozin trifosfat (ATP)-duyarlı potasyum kanalları ( $K_{ATP}$ )'nın, protein kinaz C (PKC)'nin, mitojen ile aktive olan protein kinazlar (MAPK)'ın, siklooksijenazın, aldoz redüktazın, nükleer faktör  $\kappa B$  (NF- $\kappa B$ )'nin, ısı-şok proteinlerinin ve tirozin kinaz gibi enzimlerin önkoşullamada rol oynadığı gösterilmiştir. Önkoşullamanın kontraktıl fonksiyonunun akut iyileşmesi üzerindeki olumlu etkisi muhtemelen iskemik hücre ölümü gecikmesinden dolayıdır. Önkoşullama uyarımından 12 saat sonra başlayan 24 saat sonra maksimuma ulaşan ve yaklaşık 72. saate kadar süren korumanın ikinci fazının varlığı farklı türlerde gösterilmiştir. Bu zaman periyodu korumanın ikinci fazının sitoprotektif proteinleri kodlayan genlerin (ısı-şok proteinleri ve antioksidan enzimleri gibi) aktivasyonu aracılığıyla olduğu görüşüyle tutarlıdır (9).

Kloner ve arkadaşları (10) tarafından yapılan TIMI-4 çalışmasında anginal hastalarda anginasız hastalara göre akut myokard infarktüs (AMI)'ünden sonra 48 saat içinde daha düşük ölüm yüzdesi ve daha düşük infarkt alanlarının olduğunu, daha az komplikasyon sıklığı gösterdiklerini saptamışlardır. Bu preinfarktüs angina tarafından meydana getirilen önkoşullamanın, myokardın daha sonraki uzun süreli iskemik olaylara karşı dirençli olmasını sağladığını göstermektedir.

Önkoşullama neden önemlidir? AMI, ölümcül hastalıkların en sık rastlanan nedenleri arasında olmaya devam etmektedir. T.C. Sağlık Bakanlığı'nın yayınladığı Sağlık İstatistikleri 2002 verilerine göre; kardiyak kökenli hastalıklar nedeni ile 2001 yılı içerisinde hastanelere başvuran toplam 338.936 hastanın; 322.426'sı taburcu edilmiş, 16.510 kişi ise hayatını kaybetmiştir. Bu hastaların 2001 yılı içerisinde hastanede kaldıkları gün sayısı ise 1.908.516'dır. İskemik kalp hastaları ise; 147.478 kişi ile toplam başvuruların %44'ünü, 142.217 kişi ile taburcu edilmiş hastaların %44'ünü ve 5.261 kişi ile hayatını kaybedenlerin %32'sini oluşturmaktadır. İskemik kalp hastalarının 2001 yılı içerisinde hastanede kaldıkları gün sayısı ise 855.568'dir ve bu toplam kalp hastalarının %45'ini oluşturur (11). AMI'nın oluşması esas olarak doku hasarı ile gösterilir. İlk hasar iskemi sonucu meydana gelir, sonraki reperfüzyona bağlıdır. Farmakolojik manipülasyonla iskemik önkoşullamada yer alan yolların direkt aktivasyonu, iskemik önkoşullama hasarına gereksinim olmadan myokard korumasına neden olacaktır. İskemik önkoşullamanın sağladığı korumayı taklit edebilecek birçok farmakolojik ajan vardır. Bu, faydalı ve klinik olarak gözlenebilen myokardiyal korumanın olabileceğine dair iyimser bir temel sağlamaktadır.

Trimetazidin klinikte antiiskemik etkileri nedeni ile antianginal olarak kullanılmaktadır. Trimetazidin myokardiyal önkoşullama üzerine etkisini inceleyen çok kısıtlı sayıda araştırma bulunmaktadır. Daha önce trimetazidin önkoşullamanın sinyal ileti mekanizmalarında rol oynayan adenozinin plazma düzeyini artırdığı klinik bir çalışmada gösterilmiş ancak *in vivo* olarak deneysel modellerde oklüzyon aritmileri, nekrotik alan ve iskemik önkoşullama üzerindeki etkileri henüz araştırılmamıştır (12). Bu çalışmanın amacı trimetazidin oklüzyon aritmileri, nekrotik alan ve iskemik önkoşullama üzerine etkilerinin anesteziye sıçanda araştırılmasıdır. *In vivo* olarak trimetazidin

etkilerinin araştırılması klinik kullanımındaki mekanizmaların aydınlatmasında katkıda bulunabilecektir.

## 2. GENEL BİLGİLER

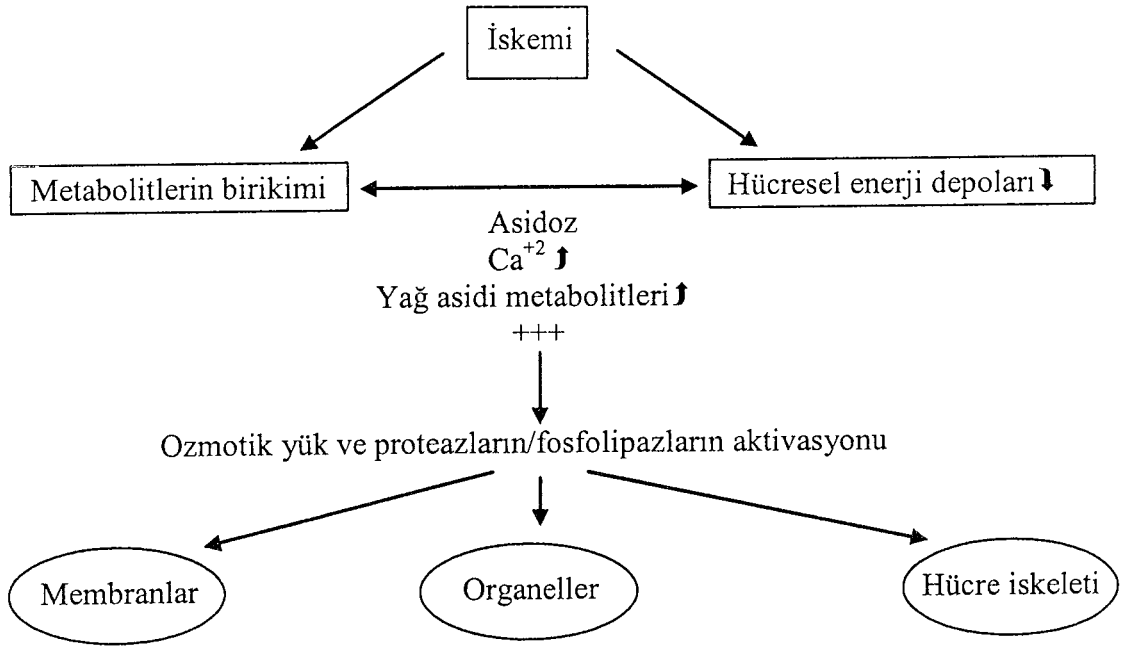
### 2.1. Önkoşullama

#### 2.1.1. Myokardiyal iskemi

Bir organın arteryel beslenmesinin herhangi bir nedenle bozulması iskemiye yol açar. Kan akımındaki azalmanın iki yönü vardır. 1- myokardiyuma hem oksijen hem de metabolik substratların sağlanması sınırlanmıştır, 2- iyonların ve metabolitlerin ortamdaki uzaklaştırılması azaltılmıştır. Kalp kasındaki iskemik yanıtlar, myokardiyal oksijen tüketiminde azalma, aerobik metabolizmadan anaerobik metabolizmaya geçiş, kasılmanın sıklığında ve amplitüdünde azalma ile karakterizedir. Enerji üretimindeki azalma hücrel enerji depolarının (ATP, kreatin fosfat) yıkımına yolaçar. Azalan perfüzyon ile birlikte bu da metabolik ürünlerinin birikimine neden olur. Enerji bağımlı iyon pompalarının (ATPaz) fonksiyonu bozulur ve intraselüler  $\text{Na}^+$  ve  $\text{Ca}^{+2}$  konsantrasyonu artarken,  $\text{K}^+$ 'nın hücreden çıkışı gerçekleşir (13).

Çeşitli mekanizmalar, hücre membranı, hücre iskeleti, intraselüler organeller gibi yapılara hasar verirler (Şekil 1). Doğrudan zararlı etkiler intraselüler enzimlerin aktivasyonu ile oluşabilir. Proteazlar hücre iskeletindeki proteinleri, lipazlar da hücre membranındaki fosfolipidleri etkilerler. Lipidlerin güçlü deterjan etkisi, serbest yağ asidi metabolitleri ve süperoksit radikal oluşumu da ilave hasar oluşturabilir. Sonuç olarak, hücre membranının hasarı hücre ölümüne neden olur. Kalıcı iskemi, bir süre sonra dokunun nekrozu ile sonlanır (13).





Şekil 1. İskemik hüresel hasarın gelişiminin şematik gösterimi (13).

### 2.1.2. İskemik önkoşullama

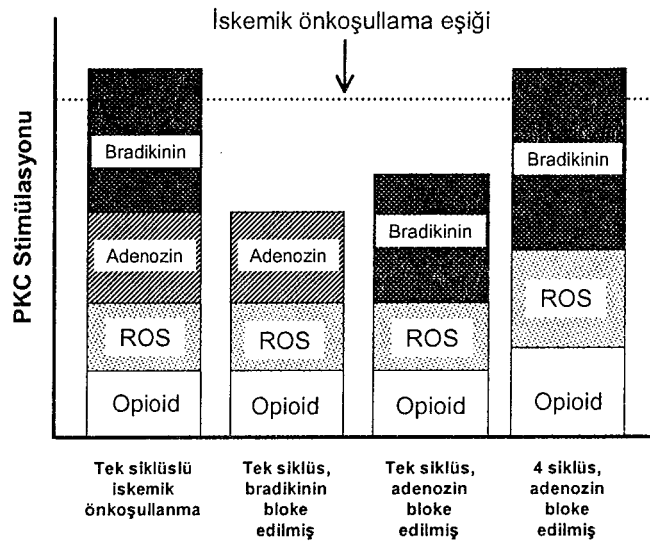
İskemik önkoşullama, tek veya tekrarlayan kısa süreli iskemik periyodun daha uzun süreli iskemik periyodlarda organ, doku ve hücrelerde nekroz gelişimine karşı belirgin bir direnç oluşturması ile gerçekleşen koruyucu bir mekanizmadır. Önkoşullama, nekrotik ve apoptotik hücre ölümünü inhibe etmesi yanında vasküler fonksiyonu korur ve antiaritmik etki ortaya çıkarır. İskemik önkoşullama ilk kez 1986 yılında Murry ve arkadaşları tarafından köpek kalbinde yapılan araştırma ile gösterilmiştir (1). Bu mekanizmanın, insanlarda da bulunduğu yapılan bazı klinik çalışmalarda ortaya konmuştur. Ayrıca insan izole myositlerinde ve insan kas dokusunda yapılan deneysel çalışmalarda da bu mekanizmanın varlığı gösterilmiştir (9, 14, 15). Değişik hayvan türleri üzerinde yapılan deneysel çalışmalarda beyin, retina, akciğer, böbrek, karaciğer, ince barsak, spinal kord ve iskelet kasında iskemik önkoşullamanın oluşturduğu koruma ortaya konmuştur (16-18). Bununla birlikte önkoşullama ile ilgili yapılan çalışmalar özellikle kalp dokusu üzerinde yoğunlaşmış ve konuyla ilgili bilgilerin çoğunluğu kalpte yapılan araştırmalardan elde edilmiştir. Kardiyak iskemik önkoşullama ile görülen koruma, şimdiye kadar gözlenen en

kuvvetli infarkt oluşumunu önleyici etkidir. İskemik önkoşullamanın myokarda en önemli özelliği koroner arter oklüzyonuna bağlı olarak gelişen nekrozun azalmasını sağlamasıdır. Önkoşullama, iskemi ve reperfüzyonun yol açtığı endotel disfonksiyonuna karşı da korunma sağlamakta (19) ve enerji bağımlı hücre ölümünü (apoptozis) azaltmaktadır (20). Önkoşullamanın, iskeminin erken dönemlerinde enerji metabolizmasını yavaşlattığı, reperfüzyon aritmilerini azalttığı, post-iskemik disfonksiyonun iyileşmesini geliştirdiği, izole atrial trabekül kaslarında post-iskemik gerimi artırdığı ve iskeminin yanısıra hipoksik hasara karşı da direnci artırdığı gösterilmiştir (9).

Bir organın iskemi ve reperfüzyonu ile oluşturulan önkoşullama, başka bir arterin beslediği organı da önkoşullayarak bu organ üzerinde koruyucu etki oluşturabilir. Buna uzak organ önkoşullaması denilmektedir (21). Sıçanlarda ince barsak veya böbrek iskemi ve reperfüzyonu ile (22), tavşanda da gastrokinemius kasının önkoşullaması ile myokardiyumun önkoşullanabileceği ortaya konmuştur (23). Uzak organ önkoşullamasının mekanizması kesin olarak bilinmemektedir. Bu konuda bradikin (24), adenozin (25),  $K_{ATP}$  kanalları (25) ve opioid peptidlerin (26) rol oynadığına ilişkin bulgular vardır.

İskemik önkoşullamanın koruyucu etkisi çalışılan tüm türlerde gösterilmiştir. Koruyucu etki türe özgü değildir. Yaşlanmayla önkoşullamanın azaldığını gösteren çalışmalar da vardır (27). Önkoşullama, 3-5 dk kadar iskemiye takiben minimal 5 dk reperfüzyon ile oluşturulabilir, fakat 1-2 dk önkoşullama iskemisini takiben reperfüzyonun koruyucu etkisi yoktur (28). Tek bir iskemi siklusu önkoşullama oluşturması için gereklidir (29), fakat kısa süreli iskeminin tekrarlı siklusları da etkilidir (30). İskeminin süresi ve siklusların sayısından ayrı olarak reperfüzyonun süresi de önemlidir (31). Önkoşullamanın karakteristik bir özelliği hafızadır. Strese maruz bırakılan hücreler hatırlar ve sonraki stres uyarılarına karşı daha dirençli olurlar. Önkoşullamanın hep veya hiç fenomeni olduğu da öne sürülmüştür. Ya hücreler önkoşullanır veya önkoşullanmaz (32). Alternatif olarak stres stimulusun derecesi, büyüyen bir cevaba yol açabilir. Hep veya hiç cevabı, kaç tane hücrenin etkilendiğine dayalı olarak artabilir (33). İskemik önkoşullamada birden fazla tetikleyici aynı anda rol oynamaktadır. İskemik önkoşullamanın gerçekleşebilmesi için bu tetikleyicilerin belli bir eşik düzeyine erişmesi gerekir. Bir mediyatörün blokajı ile diğer mediyatörlerin eşik düzeyine ulaşımı engellenebilir (Şekil 2). Önkoşullama ile gözlenen

koruma, önkoşullama periyodlarının sayısına ve süresine bağlıdır. Birden fazla iskemik siklus, ortama salıverilen mediyatörlerde kümülatif olarak artışa yol açar. Çoklu siklularda bir mediyatör bloke edilse de, ortamdaki diğer mediyatörler iskemik önkoşullamanın eşik düzeyine erişilebilirler (34) (Şekil 2). Adenozin, bradikinin ve opioid reseptörlerinin aynı anda aktivasyonları ve kısa süreli iskemi-reperfüzyon boyunca oksijen radikallerinin ortama salıverilmesi iskemik önkoşullamayı tetiklemeye katkıda bulunur (35).

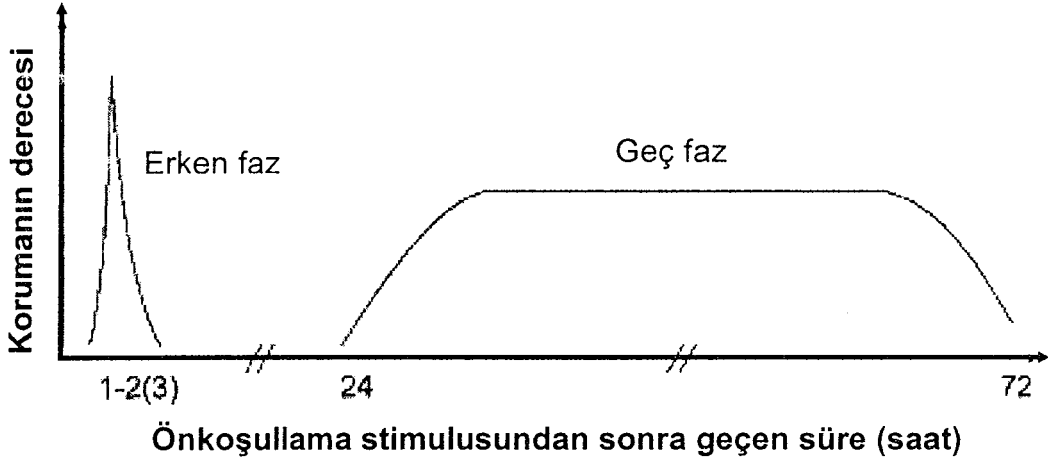


**Şekil 2.** İskemik önkoşullamada salıverilen mediyatörler ve PKC stimülasyonu. Bu mediyatörlerin hiçbirisi tek başına koruma oluşturmada PKC'yi aktive etmek için yeterli değildir. Tek siklül iskemik önkoşullamada bu mediyatörlerin tümü aynı anda salıverilip kümülatif bir etki oluşturarak PKC stimülasyonunu eşik düzeyine ulaştırabilir. Bu mediyatörlerden herhangi biri antagonize edildiğinde eşik düzeyine ulaşamaz ve iskemik önkoşullama ile oluşan koruma ortadan kalkar. Ortamdaki konsantrasyonu artan bir mediyatör, antagonize edilenin yerine geçerek eşik düzeyine ulaşımı sağlayabilir (35, 36).

### 2.1.3. Önkoşullamanın fazları

Önkoşullama iki farklı faz ile koruma sağlamaktadır. İlk faz (erken faz, akut faz, klasik faz, korumanın birinci penceresi) iskemiden sonra dakikalar içinde oluşmakta ve 1-3

saat kadar sürmektedir. İlk faz geçici ancak önemli bir korunma sağlarken protein sentezine gereksinim göstermez. Geç faz (geçikmiş faz, korumanın ikinci penceresi) ise önkoşullamadan 24 saat sonra belirgin hale gelir (Şekil 3).



Şekil 3. İskemik önkoşullamanın erken ve geç fazları (13).

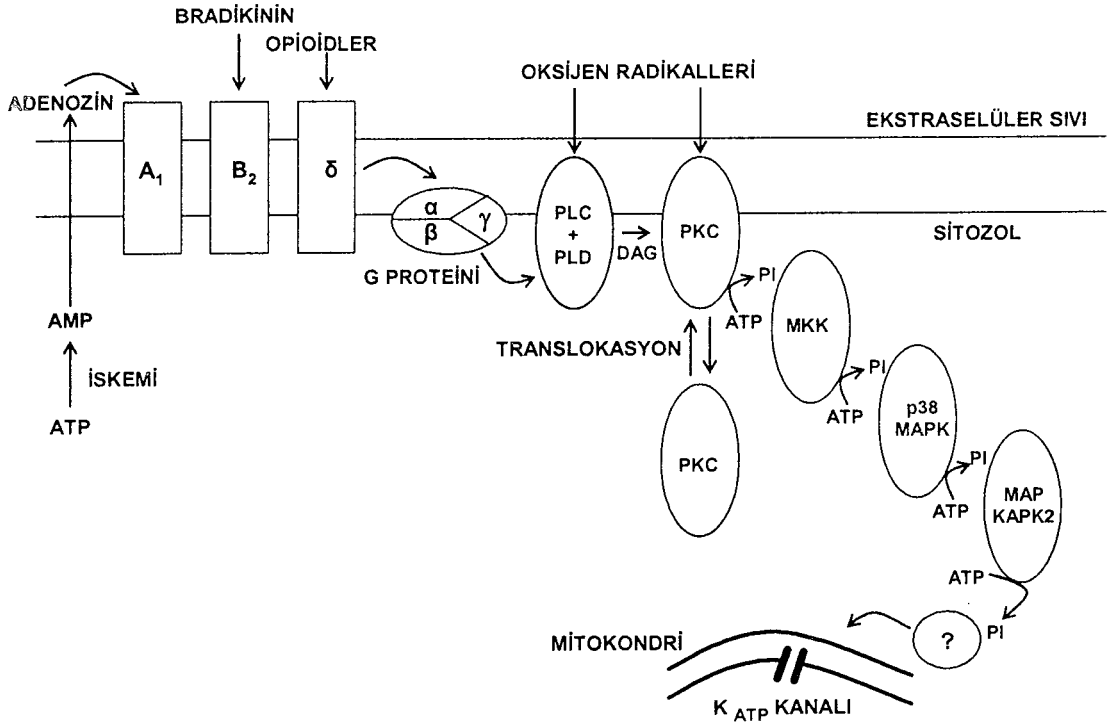
Geç fazın koruyucu etkisi 72-96 saate kadar sürebilir ve bu faz protein sentezine gereksinim gösterir (5, 37, 38). Erken ve gecikmiş önkoşullamanın kısmen aynı hücrel sinyal ileti sistemlerini kullandığı görülmektedir. Her iki fazın kendine özgü farklı koruma etkileri olabilir. Örneğin önkoşullamanın erken fazı miyokardiyal donakalmaya (stunning) karşı koruma sağlamazken, geç fazı koruma sağlamaktadır (5). İnfarkt alanını azaltma açısından geç fazın, erken faza göre daha az potent olduğu gösterilmiştir (39). Günümüzde önkoşullamanın genel adaptif bir fenomen olduğu düşünülmektedir.

#### 2.1.4. Önkoşullamanın hücrel sinyal ileti mekanizmaları

Önkoşullamanın hücrel sinyal ileti mekanizmasını aydınlatmaya yönelik yoğun çalışmalar sürmektedir. Liu ve arkadaşları (40) 1991 yılında intraselüler sinyal ileti mekanizmalarının olası aktivasyonuna yönelik ilk çalışmayı yapmışlardır. Hücre içerisindeki sinyal yollarının stimülasyonu, bir veya daha fazla son-efektörü aktive eden bir veya daha fazla mediyatörleri uyaran tetikleyiciler tarafından yapılır. İnhibitör G

proteinleriyle ( $G_i$ ) eşleşen reseptörlere bağlanan (adenozin, bradikinin, epinefrin, opioid-peptidler, asetilkolin) agonistler tetikleyici olarak önemli bir rol oynarlar. Diğer endojen maddeler; reaktif oksijen ve nitrojen türleri,  $Ca^{+2}$ , metabolik ürünler, araşidonik asit metabolitleri, anjiotensin II, endotelin, kalsitonin geni ile ilişkili peptid ve sitokinlerdir (8). Bugüne kadar yapılan çalışmalar, membran reseptörlerinin aktivasyonunun,  $K_{ATP}$  kanallarının, PKC'nin, NF- $\kappa$ B'nin, ısı-şok proteinlerinin, tirozin kinaz enziminin rolü olduğunu ortaya koymuştur (41). Önkoşullama iskemisinin kısa periyodunda ve reperfüzyon sırasında salıverilen mediyatörler reseptörlerine bağlandığında G-proteinleri aracılığıyla fosfolipazları aktive ederler. Fosfolipaz C (PLC) ve/veya fosfolipaz D (PLD)'nin aktivasyonu ile salıverilen diaçilgliserol (DAG), PKC'nin aktivasyonunu ve translokasyonunu indükler.  $\epsilon$ -PKC,  $\alpha$ -PKC sarkolemmaya transloke olurken,  $\delta$ -PKC mitokondrial membranlara transloke olur (42). DAG ayrıca diğer kinazları da aktive eder (özellikle p38 mitojenle aktive protein kinaz, (MAPK)) ve MAPK ile aktive olan protein kinaz2 (MAPKAPK2)'nin fosforilasyonunu da indükler. Bu sonuncu sıradaki enzim ısı şok proteinini de (HSP 27) fosforile eder. Ayrıca bu akışın yine son zinciri olduğu düşünülen  $K_{ATP}$  kanallarının aktivasyonu ile miyokardiyal koruyucu etki oluştuğu düşünülmektedir (35) (Şekil 4).

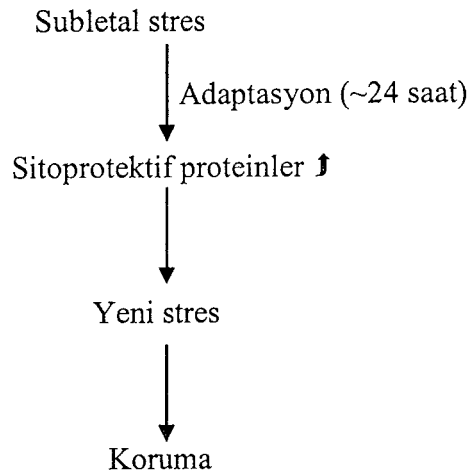
$K_{ATP}$ 'nin tam olarak nasıl aktive olup koruyucu etki oluşturduğu bilinmemektedir. Fakat mitokondriyal membran üzerindeki değişen iyon gradiyenti ve elektrokimyasal potansiyel ile artan  $K^+$  çıkışı,  $Ca^{2+}$ 'un daha az birikimi, hücresel enerji depolarının ve/veya serbest radikallerin üretimi rol oynayabilir (43, 44). Kardiyak iskemik önkoşullamada, adenzin, asetilkolin, katekolaminler, anjiotensin II, bradikinin, endotelin, prostaglandinler, NO ve opioidler gibi birçok nöroendokrin ve parakrin tetikleyicilerin rolü olduğu belirlenmiştir. Ayrıca ventriküler pacing, hipoksi, sıcaklık stresi, volüm yüklenmesi (stretching) ve egzersiz gibi fiziksel stres stimuluslarının da miyokarda önkoşullama oluşturduğu gösterilmiştir (10, 18, 34, 37, 45).



**Şekil 4.** İskemik önkoşullamanın önerilen mekanizmasının şematik gösterimi. İskemi, PLC ve/veya PLD'nin yeterli düzeyde stimülasyonunu sağlayacak adenosin, bradikinin, opioid peptidler ve serbest radikallerin salıverilmesine yol açar. Adenosin  $A_1$  reseptörü, bradikinin  $B_2$  reseptörü ve opioidler  $\delta$  reseptörü üzerinden koruyucu etkiyi ortaya çıkar. PLC (ya da PLD) stimülasyonu PLC'nin translokasyonunu stimüle ederek kompleks kinaz kaskadının aktivasyonunu sağlar. Bu aktivasyon MAPK kinaz (MKK), p38 MAPK ve MAPKAPK-2 aktivasyonu sonucunda mitokondriyal  $K_{ATP}$  (mito $K_{ATP}$ ) kanallarının açılmasıyla sonuçlanır. Bu aşamadaki basamakların çoğu henüz bilinmemektedir (35).

Adenosin, bradikinin, opioid peptidler ve serbest radikaller aracılığıyla PKC stimülasyonu ve  $K_{ATP}$  kanallarının açılmasının akut önkoşullamanın başlatılmasında kritik bir role sahip olduğu gözükmemektedir (46). Erken iskemik önkoşullama, protein sentez inhibitörlerinin varlığında da oluşmaktadır (47). Önkoşullamanın erken fazı sırasında hücrel hafızanın PKC'nin sitozolden hücrel membrana translokasyonu ile ilgili olduğuna inanılmaktadır. Bu uzayan iskemik periyod sırasında PKC'nin daha hızlı aktivasyonuna neden olur. Bir süre sonra PKC sitozole tekrar transloke olur ve hafıza ortadan kaybolur (48). Gecikmiş önkoşullamada ise, antioksidan enzimler, nitrik oksit

sentaz (NOS), siklooksijenaz-2 (COX-2), aldoz redüktaz ve ısı-şok proteinleri gibi yeni proteinlerin sentezine bağlı değişiklikler rol oynamaktadır (34, 37, 46). Farklı stres uyarıları çeşitli hücrel proteinlerin ekspresyonuna yol açabilir (49). Ani erken genler (c-fos, c-myc, Egr-1, jun-B) ve NF- $\kappa$ B gibi transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonu, gen transkripsiyonunun regülasyonuna katkıda bulunur (50). Önkoşullamanın geç fazında, hücrel hafızanın protein sentezi ile ilgili olduğuna inanılmaktadır (51). Isı şok proteinlerinin sentezi de yaygın olarak tartışılmıştır (52). Bu, diğer hücrel proteinlerin fonksiyonunda ve tutulmasında yani hücre iskeletinin stabilizasyonunda rol oynayan 'chaperon' proteinlerinin (HSP27, HSP60, HSP70, HSP90) bir ailesidir (53). Çeşitli antioksidan enzimlerin üretimi (mangan-superoksit dismutaz (MnSOD)), katalaz, glutatyon peroksidaz/redüktaz, alkil hidroperoksit redüktaz) oksidatif strese karşı hücreleri koruyabilir (54). NOS enzimi de önemli rol oynar (55). Diğer enzimler/proteinler, COX-2, hem oksijenaz-1, metabolik enzimler, sarkoplazmik retikulumdaki  $Ca^{+2}$  regülasyonunda yer alan proteinler ve anjiogenetik büyüme faktörleri rol oynayabilir (Şekil 5).



**Şekil 5.** Gecikmiş önkoşullamada protein sentezi.

#### 2.1.4.1. Tirozin kinazlar

Serin/treonin kinazlar olan PKC'lerden farklı olan tirozin kinazlar, proteinleri tirozin rezidüleri üzerinden fosforile ederler. Tirozin kinazların sinyal ileti yolağının anahtar elemanı olabileceği görüşüne dayanan çalışmalar 1980 yılında başlamıştır. Tirozin kinazlar

başlıca iki gruba ayrılırlar: 1- Reseptör tirozin kinazlar (trombosit kaynaklı büyüme faktörü reseptörü, insülin reseptörü, endotelial büyüme faktörü), 2- Non-reseptör/sitozolik tirozin kinazlar (pp60<sup>src</sup> kinazlar). Tirozin kinazların önkoşullama sırasında hem PKC aktivatörleri ile paralel hareket ettiği (56) hem de PKC reaksiyonu sonrası (downstream) lokalize olduğu (57) düşünülmektedir. Kalp üzerinde yapılan çalışmalar uygulanan önkoşullama protokolünün tek sikluslu ya da çoklu sikluslu olmasına bağlı olarak bunun değiştiğini göstermektedir. Şöyle ki; PKC blokörleri tek sikluslu önkoşullamadaki koruyucu etkiyi önleyebilirken, çok sikluslu önkoşullamadaki koruyucu etki ancak PKC ve tirozin kinaz inhibitörlerinin kombinasyonu ile tamamen önlenebilmiştir (35).

#### **2.1.4.2. Mitojen ile aktive protein kinazlar**

MAPK'lar serin/treonin kinaz ailesinin bir üyesidir. Bu enzimler, reseptör tirozin kinazlar, PKC, G-proteini bağlı reseptörler ve farklı hücrel stresler ile aktive olabilmektedir. Kalpte tanımlanan 3 majör MAPK yolağı mevcuttur. Ekstraselüler sinyal düzenleyici kinazlar (ERK) ve 2 tane de stresle aktive olan MAPK (c-Jun N-terminal kinazlar ve p38/reaktive edici kinazlar)'dır (35). MAPK ailesinin alt tiplerinin her biri (ERK, JNK ve p38)'nin iskemik önkoşullama ile oluşan kardiyoprotektif etkide rol oynayabilecekleri ileri sürülmüştür. Tüm MAPK'lar, bir MAPK kinaz ile serin ve treonin rezidülerinin fosforilasyonu ile aktive edilir. Aktivasyonu takiben, MAPK'lar tıpkı PKC'ler gibi hücre içinde fiziksel olarak hareket edebilirler ve nukleusa transloke olabilirler (p38 ve ERK) (58) (Şekil 4).

#### **2.1.5. İskemik önkoşullamanın tetikleyicileri**

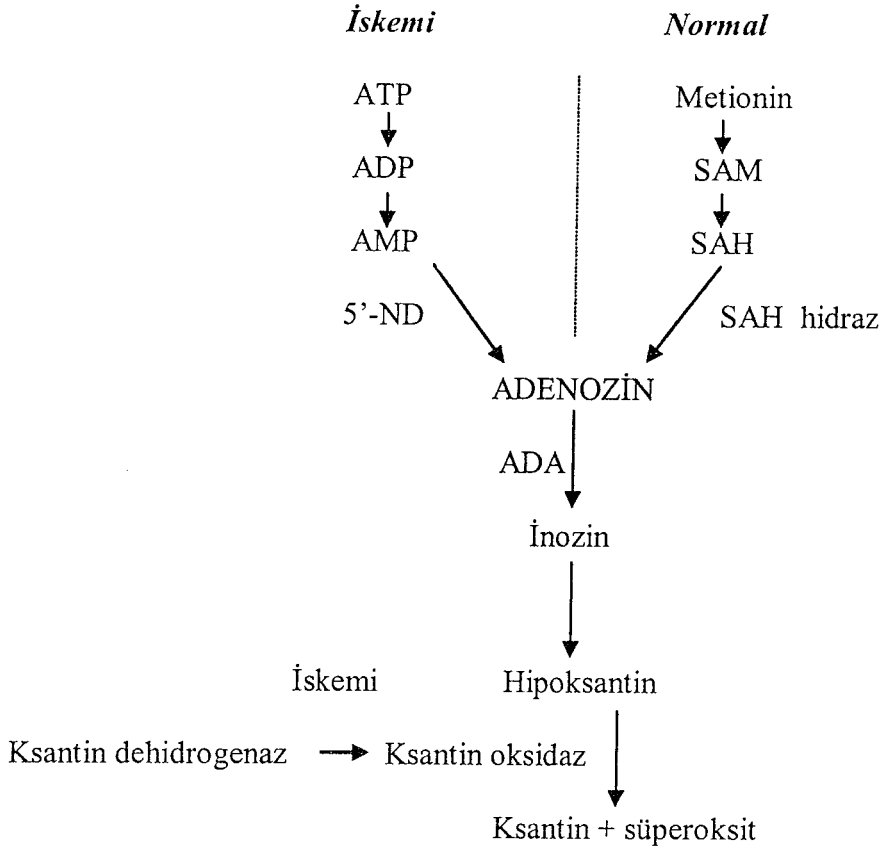
##### **2.1.5.1. Reseptör bağımlı tetikleyiciler**

###### **2.1.5.1.1. Adenozin**

Önkoşullama mekanizmasında tanımlanan ilk sinyal ileti elementi adenozindir. Adenozin, iskemik hücrelerde ATP'nin yıkım ürünü olarak oluşmaktadır. Önce ATP iki yüksek enerjili fosfatını kaybederek adenozin mono fosfat (AMP)'a yıkılır, daha sonra



AMP'de 5'-nükleotidaz (5'-ND) enzimi ile defosforilasyon sonucu serbest adenoziini oluşturur (40) (Şekil 6).



**Şekil 6.** Adenosin metabolizma yolları. 5'-ND; 5'-nükleotidaz, SAH; S-adenozilhomosistein, SAM; S-adenozilmetionin, ADA; adenosin deaminaz (59, 60).

Serbest sitozolik AMP ve adenosin konsantrasyonları sırayla 0.3-0.6 $\mu$ mol/L ve 0.8  $\mu$ mol/L'dir. Sitolde oluşan adenosin hücre membranından interstisyel alana nükleosid taşıyıcıları ile geçer. Hücresel adenosin oluşumu ya doku metabolizma hızı arttığında ya da doku kan akımı veya sunulan oksijen azaldığında artmaktadır (61). Myokardiyal hipoperfüzyon sırasında adenosin myokardiyal oksijen talebini azaltarak inotropiyi azaltır. Liu ve arkadaşları (40) 1991 yılında adenosinin iskemik önkoşullamada önemli rolü olduğunu, adenosin A<sub>1</sub> reseptör antagonisti ile tavşan kalbinde önkoşullamayla oluşan korumanın ortadan kalktığını ortaya koymuştur. Önkoşullama iskemisi sırasında, myokardiyal interstisyel adenosin düzeylerindeki artış sıçanlarda (62), tavşanlarda (63, 64), köpeklerde (65, 66) ve domuzlarda (67) yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. Adenosin,

iskemik önkoşullamada majör tetikleyicidir. Şimdiye kadar 4 adenozin reseptör alttipi ( $A_{1A}$ ,  $A_{2A}$ ,  $A_{2B}$  ve  $A_3$ ) tanımlanmış ve klonlanmıştır. Hücre membran yüzeyinde bulunan adenozin reseptörleri, G-proteini ile ilişkili reseptör ailesinin üyeleridir.  $A_1$  ve  $A_3$  reseptör alt tipleri, adenilat siklazın inhibisyonuna aracılık eden G proteinleri ( $G_0$ ,  $G_i$ ) ile ilişkilidirler.  $A_2$  reseptör alt tipleri ise adenilat siklaza stimulator G-proteini ( $G_s$ ) aracılığıyla bağlıdır (68). Adenozinin kardiyak etkileri  $A_1$ ,  $A_2$  ve  $A_3$  adenozin reseptörleri ile farklı şekillerde ortaya çıkar.  $A_1$  ve  $A_3$  reseptörlerinin blokajı hemen hemen tamamen tavşanlardaki önkoşullamanın etkisini azaltırken,  $A_2$  reseptörlerinin blokajı önkoşullamayı etkilemez (69). Dolayısıyla korumanın başlatılmasında  $A_1$  ve  $A_3$  reseptörlerinin rolü olduğu düşünülmektedir. Adenozin ile veya bir adenozin agonistiyle adenozin  $A_1$  reseptörünün stimülasyonu, myokardiyal iskemik hasara karşı toleransı artırır (70). Bu çalışmalar, adenozinin kısa süreli iskeminin koruyucu etkilerinde rol aldığını gösterir. Tavşanda adenozinle oluşan myokardiyal infarkt alanındaki azalma PKC inhibitörleri ile ortadan kaldırılmaktadır (71) (Şekil 3). Adenozin ve asetilkolin gibi pek çok endojen mediyatörün iskemik önkoşullamayı  $K_{ATP}$ 'ye bağımlı mekanizma ile oluşturduğu gösterilmiştir (72, 73).  $A_1$  adenozin reseptörü ve  $K_{ATP}$  kanalı arasındaki bağlantının G-protein sistemi aracılığıyla olduğu gösterilmiştir (74). Önkoşullama sikluslarının artırılması muhtemelen adenozin ve diğer mediyatörlerin düzeyini artırmaktadır (32). Adenozin regüle edici ajan olan akadezin, iskemi sırasında adenozin salıverilmesini artırır ve önkoşullama için gerekli eşiği düşürür (75). Adenozin transport inhibitörü dipiridamol verilmesi de benzer etkiyi oluşturur (76).

#### 2.1.5.1.2. Bradikinin

Myokardiyal iskemi sırasında bradikinin salıverilmesinde artış olmaktadır (6). İntrakoronar olarak verilen bradikininin iskemi-reperfüzyon aritmilerine karşı oluşturduğu olumlu etki, NOS inhibitörü olan L-NAME varlığında ortadan kalkmaktadır (77). Önkoşullamada bradikininin rolü, selektif  $B_2$  reseptör blokleri olan HOE-140 (ikatibant) kullanılarak anestezi altındaki köpekte gösterilmiştir (78). HOE-140'ın hem önkoşullama öncesinde hem de önkoşullama sırasında verilmesi ile önkoşullamanın olumlu etkilerinin ortadan kalkması, bradikininin önkoşullamada hem mediyatör hem de tetikleyici olarak görev aldığı şeklinde yorumlanmıştır (6, 78). İzole perfüze sıçan kalbinde ise HOE-140 ile

bu etki gösterilememiştir (79). Wall ve arkadaşları (80) anestezi altındaki tavşanda eksojen verilen bradikininin kalpde infarkt büyüklüğünü iskemik önkoşullama gibi azalttığını ve HOE-140 verilmesinin de önkoşullamanın olumlu etkilerini ortadan kaldırdığını göstermişlerdir. Tavşanda benzer bir bulgu Goto ve arkadaşları (32) tarafından da ortaya konmuştur. Eksojen verilen bradikinin izole sıçan kalbinde de önkoşullamaya benzer olumlu etkiler göstermiştir. İskemiden önce verilen bradikinin, nitrik oksit (NO) ve prostasiklin aracılığıyla kalbi korumaktadır (6). Ayrıca myokardiyal iskemi, koroner sinüste kan akımını 10-20 kat artıran bradikinin salınımına yol açar (81). Akımın sınırlanması sırasında pH'nın azalması, hem plazmada hem kardiyak dokuda kallikreini uyarıp kinin yıkımını azaltarak, bradikinin sentezini stimüle eder (32). Bradikinin, Akt ve/veya sAMP-bağımlı kinaz stimülasyonu ile Ser-1177'nin fosforilasyonu ile endotelial NOS (eNOS)'u upregüle edebilir (82). Tavşanda bradikininle oluşan koruma, PKC inhibitörleri ile ortadan kalkmaktadır (32). Anestezi altındaki tavşanda anjiyotensin dönüştürücü enzim (ADE) inhibitörü olan kaptopril uygulamasıyla (83) ve insan atriyum trabekül hücrelerinde (84), yine birer ADE inhibitörü olan lizinopril ve kaptopril uygulanması ile bradikininin önkoşullamada sağladığı korumaya benzer etkiler gözlenmiştir. Morris ve Yellon'un (84) bu çalışmasında HOE-140, bradikininin olumlu etkilerini ortadan kaldırmıştır. Bradikininin önkoşullama ve infarkt büyüklüğünü azaltıcı etkileri göz önüne alındığında, ADE inhibitörleri ile gözlenen kardiyak koruyucu etkinin bir kısmının bradikininin koruyucu etkisinden kaynaklanabileceği ortaya çıkmaktadır.

Çeşitli çalışmalarda, bradikininin iskemik önkoşullamada infarkt alanını azalttığı gösterilmiştir. Bradikinin domuzlarda önkoşullama iskemisi sırasında salıverilir (66) ve tavşanlarda önkoşullamanın tetikleyicileri arasındadır (32). Domuzda yapılan bir çalışmada interstisyel bradikinin konsantrasyonundaki artışın interstisyel adenozin konsantrasyonundaki artıştan daha erken oluştuğu göstermiştir. Önkoşullama protokolündeki iskemi süresi kısa tutulduğunda bradikininin rolü ön plana çıkarken, bu süre daha uzun tutulduğunda adenozinin rolü ön plana çıkmaktadır (66). Fakat, birden fazla sikluslu iskemik önkoşullamada adenozin daha büyük bir rol oynar (32, 66). Adenozin ve bradikininin sinerjik şekilde önkoşullamanın tetikleyicileri gibi rol oynaması mümkündür (32).

### 2.1.5.1.3. Opioidler

Opioid reseptörler, santral sinir sisteminde, periferik olarak otonomik presinaptik sinir sonlanmalarında ve kardiyak myositlerde lokalizedirler. Sıçanlardan izole edilen ventriküler myositlerde  $\delta$  ve  $\kappa$  reseptörleri tanımlanmıştır (85). Endojen opioid peptid prekürsörlerinin büyük kısmı myokardiyal dokuda bulunur. Kalp, enkefalin, dinorfin ve endorfinleri içeren 3 majör opioid peptidleri sentezleyebilme yeteneğine sahiptir (86). İskemik önkoşullamanın tetikleyicisi ve/veya mediyatörleri olarak opioidler, iskemi sırasında myositlerden salınarak, otokrin fonksiyon gibi işlev görürler ve opioid reseptörleriyle etkileşerek hücre hasarını azaltırlar (87). Opioid reseptör antagonisti olan naloksonun, sıçanda infarktüse karşı iskemik önkoşullamanın oluşturduğu koruyucu etkiyi bloke etmesi, sıçan kalbinde opioidlerin başlıca endojen tetikleyici olduğunu düşündürmektedir (88). Tavşanlar üzerinde yapılan bir araştırmada, naloksonun çoklu önkoşullama siklusu ile değil de tek siklus ile oluşan korumayı bloke etmesi, opioidlerin adozin ve bradikinin ile birlikte etki gösterdiğini ortaya koymaktadır (89).  $\delta$ -reseptörü bu korumada rol oynayan opioid reseptörü olarak tanımlanmıştır. Ancak izole sıçan kalbinde yapılan bir çalışmada,  $\kappa$ -opioid agonisti bremazokinin infarkt alanını arttırdığı, selektif  $\kappa_1$ -opioid antagonisti nor-binaltorfimin (BNI) ile bu etkinin ortadan kalktığı gözlenmiştir (90). Yine başka bir çalışmada, selektif  $\delta_1$ -reseptör antagonisti (7-benzilidenenaltrekson, BNTX) iskemik önkoşullamadaki koruyucu etkiyi gölgelerken,  $\delta_2$ -antagonistinin (naltriben) etkisiz kalması, iskemik önkoşullamadaki infarkt alanındaki azalmaya  $\delta_1$ -reseptörlerinin aracılık ettiğini göstermiştir (66). Pyle ve arkadaşları (91)  $\kappa$ -opioid reseptör agonisti U50448H'nin miyositlerdeki aktin-miyozin eşleşme hızını düşürdüğünü izole sıçan kalbinde göstermişlerdir. Bu etki, iskemi sırasında ATP'nin korunmasına neden olur ve kardiyoprotektif etki oluşturur. Bu etki kısmen PKC aktivasyonu ile gelişir ve aktomyozin kaynaklı ATP tüketimini azaltır. Tavşanda opioidler ile oluşan koruma PKC inhibitörleri ile ortadan kalkmaktadır (89). Önkoşullamada  $\kappa$ -opioid reseptörünün aktivasyonunun önemi, hala tartışmalıdır. Aitchison ve arkadaşları (90) ve Wang ve arkadaşlarının (92) ihtilafli sonuçlarına dayanarak opioid reseptörlerinin akut kardiyoprotektif etkisi ve önkoşullamadaki rolü hakkında farklı hayvan türlerinde yapılacak çalışmalara gereksinim vardır (93).

#### 2.1.5.1.4. Prostaglandinler, norepinefrin, anjiotensin ve endotelin

Sıçanda tavşan kalbinde aspirin ile siklooksijenaz enziminin blokajının iskemik önkoşullamanın oluşturduğu infarkt alanındaki azalma ile etkileşmemesi, endojen prostaglandinlerin önkoşullama ile oluşan korumaya katılmadığını düşündürmüştür. Bununla birlikte, lipooksijenaz ürünlerinin korumaya katıldıklarına dair veriler mevcuttur (94, 95). İskemik önkoşullamanın başlamasında prostaglandinlerin rolü tartışmalıdır; aspirin ile siklooksijenazın blokajı sıçanlarda (96) ve tavşanlarda önkoşullamayla oluşturulan infarkt büyüklüğündeki azalmayı etkilememiştir (97). Post-iskemik kontraktıl kalp disfonksiyonundaki gelişme izole sıçan kalbinde 12-lipooksijenaz inhibitörleri baikalein ve fenidon ile hemen hemen ortadan kaybolmuştur (94).

Aynı zamanda anjiotensin AT<sub>1</sub>,  $\alpha_1$ -adrenerjik ve endotelin ET<sub>1</sub> reseptör aktivasyonunun iskemik önkoşullamadaki koruyucu etkiyi taklit ettikleri bulunmuştur. Ancak bu reseptörlerin blokajı önkoşullama için gerekli eşik düzeyini artırmamıştır. Dolayısıyla, tavşan kalbinde yapılan bu çalışmalar sonucu bunların endojen tetikleyiciler olmadığı görülmektedir (41).  $\alpha_1$ -adrenerjik, anjiotensin AT<sup>1</sup> ve endotelin ET<sup>1</sup> reseptörleri de PKC ile bağlantılıdır ve önkoşullama ile oluşan korumayı taklit edebilirler, ancak bu reseptörlerin antagonistleri tavşanda iskemik önkoşullamayı etkilememiştir (35). Dolayısıyla bunların, en azından tavşanda, önkoşullamada endojen tetikleyici olmadıkları görülmektedir.  $\alpha$ -adrenerjik (98), anjiotensin (99) ve endotelin (100) reseptörlerinin iskemik önkoşullamada etkisi olmadığı ileri sürülmüştür.

#### 2.1.5.2. Reseptörden bağımsız tetikleyiciler

##### 2.1.5.2.1. Nitrik oksit

İskeminin erken döneminde eNOS aktivitesindeki artış nedeniyle kardiyak NO üretiminin arttığı kabul edilir (101). İskemik önkoşullamada endojen NO'nun rolü tartışmalıdır. NOS'un blokajı sıçanlarda iskemik önkoşullamanın etkisini azaltır (95), buna karşın endojen NO'nun, erken önkoşullamada tetikleyici veya mediyatör olmadığı ileri sürülmüştür (34). Buna karşın, eNOS knockout farelerde de kardiyak iskemik önkoşullama

oluşabilmektedir (102). Muscari ve arkadaşları (103) yaptıkları çalışmada, erken önkoşullamada iskemi-reperfüzyonla oluşan eNOS protein kaybının tamamıyla önlendiği ve eNOS aktivitesinin arttığı bildirilmiştir. NO'nun etkisiyle sGMP düzeylerindeki artış, myokardiyal oksijen talebini azaltır ve hem enerji korunması hem de myokardiyal kontraktilitenin modülasyonu ile kardiyoprotektif etkiye katkıda bulunur (104). NO donörü S-nitroso-N-asetilpenisilamin (SNAP) ile tavşan izole kalbinde (34) veya eNOS knockout fare kalbinde (102) önkoşullama oluşturmak mümkündür.

Gecikmiş önkoşullamada NO, eNOS'dan ziyade iNOS'dan kaynaklanır, bu durum, spesifik iNOS inhibitörleri uygulandığında kardiyoprotektif etkinin kaybı ile ve iskemi reperfüzyon hasarına yanıtta artan iNOS ekspresyonu ve aktivitesi ile gösterilmiştir (105, 106). Tavşanlara NO donörü dietilentriamin/NO (DETA/NO) veya SNAP infüzyonu gecikmiş önkoşullama oluşturabilmektedir (105). Bulgular daha sonra iNOS knockout faredeki gecikmiş önkoşullamanın ortaya çıkmaması ile doğrulanmıştır (107, 108). Gecikmiş iskemik önkoşullamada NO sadece bir tetikleyici değil, fakat gerekli bir mediyatördür ve eNOS kaynaklı NO üretimi iNOS aktivasyonuna yol açar (feed-forward mekanizması; eNOS-bağımlı iNOS-indüksiyonu) ve daha sonra NO saliverilmesi myokardiyal korumada rol oynar (37, 109).

#### **2.1.5.2.2. Reaktif oksijen türleri (ROS)**

Yüksek konsantrasyonlardaki serbest radikaller hücre membranında lipid peroksidasyonunu indükleyerek hücre bütünlüğünü bozar ve membran permeabilitesini artırır. Serbest radikallerin diğer önemli etki yerleri de hücre homeostazisi sağlayan iyon transportu ile ilişkili membran proteinleridir (özellikle sülfidril grubu içeren proteinler) (110).

Yapılan ilk araştırmalarda, Iwamoto ve arkadaşları (111) anestezi altındaki tavşanda süperoksit dismutaz (SOD) ve katalaz kombinasyonu ile 4 kez 5'er dakikalık periyodlarla oluşturulan önkoşullamada etkisiz olduğunu göstermişlerdir. Richard ve arkadaşları (112) anestezi altındaki sıçanda intraselüler antioksidan olan N-2-merkaptopropiyonil glisin (MPG) kullanarak yaptıkları çalışmada benzer bulgular elde etmişlerdir. Tanaka ve

arkadaşları (113) ise tavşan kalbinde yaptıkları çalışmada, Iwamoto ve arkadaşlarının (111) bulgularına zıt sonuçlar elde etmişler ve yararlı etkinin SOD veya MPG verilmesi ile ortadan kaldırılabileceğini göstermişlerdir. Benzer bir bulgu da Baines ve arkadaşları (114) tarafından gösterilmiş ve MPG, tavşan kalbinde tek siklüs ile yapılan önkoşullamanın koruyucu etkisini tamamen ortadan kaldırmıştır. MPG, önkoşullama için 4 kez iskemi-reperfüzyon uygulaması yapıldığında ise korunmayı engelleyememiştir. Serbest oksijen radikalleri oluşturmak amacı ile yapılan hipoksantin/ksantin infüzyonu önkoşullamayı taklit etmiş ve infarkt büyüklüğünü azaltmıştır. Tavşanlarda oluşan koruma PKC inhibitörü polimiksin B varlığında ortadan kaldırılmıştır (114). Dolayısıyla, diffüze olabilen bir antioksidan olan MPG ve bir radikal temizleyicisi olan dimetiltiyöüre infüzyonunun iskemik önkoşullamadaki koruyucu etkiyi bloke etmesi serbest radikallerin sadece kardiyak myositlerde hasar oluşturmadığını, aynı zamanda düşük konsantrasyonlarda iskemik önkoşullamayı da tetikleyebileceklerini göstermiştir (115). ROS, tavşan kalbinde reseptöre bağımlı olmayan tetikleyici olarak görev almaktadırlar (34), ancak önkoşullama için birden fazla iskemi-reperfüzyon periyodu kullanıldığında adenozin, bradikinin, opioid peptidler gibi tetikleyiciler de koruma oluşturabilecek konsantrasyonlarda oluşmakta ve ortamda ROS olmamasına karşın koruma görülmektedir. Benzer bir durum yine tavşanda bradikinin için gösterilmiştir (32). PKC aktivasyonu önkoşullamada sinyal ileti yolağında önemli bir basamaktır ve ROS farklı mekanizmalarla PKC aktivasyonuna yol açabilirler. ROS, PKC'yi direkt olarak da uyarabilirler (116). PLD yine ROS tarafından aktive edilebilmekte ve PLC gibi PKC aktivasyonuna yol açmaktadır (114). PKC aktivasyonu yanında, serbest radikaller G-proteinlerini ve  $K_{ATP}$ 'yide aktive edebilirler (115). ROS'un sinyal ileti yolağında PKC'de bulunmaktadır (114) (Şekil 4). Önkoşullamanın sinyal iletiminde  $mitoK_{ATP}$ 'nin açılması, ROS'un mitokondriyal üretiminde artışa yol açar (117).  $mitoK_{ATP}$  kanallarının açılması vasküler düz kas hücrelerinde ve perfüze kalpte mitokondriyal ROS üretiminde artışa yol açtığı gösterilmiştir (118).

Süperoksit radikali ve nitrik oksitin reaksiyon ürünü olan peroksinitritin düşük konsantrasyonlarda izole sıçan kalbinde direkt olarak önkoşullama oluşturduğu ilk kez Altuğ ve arkadaşları (119, 120) tarafından gösterilmiştir. Önkoşullama sırasında peroksinitrit oluşumu nitrotirozin ölçümü yapılarak belirlenmiştir (121). Peroksinitrit önkoşullamasında tirozin kinazın rolü bulunmaktadır (122). Ayrıca, önkoşullama ile oluşan

gecikmiş fazdaki koroner endotel korunmasında NO'nun değil de peroksinitin başlıca tetikleyici olduğunu ortaya konmuştur (123). Bu sonuçlar, peroksinitritin hem akut hem de gecikmiş fazdaki korumada rol oynadığını göstermektedir.

İskemi-hipoperfüzyon sırasında myositler içerisinde serbest radikallerin miktarı artar. Serbest radikaller, iskemik önkoşullamanın tetikleyicisi olarak rol oynarlar (114, 115). Serbest radikallerin myokardiyal önkoşullamadaki etki mekanizması tam olarak bilinmese de serbest radikallerin G-proteinlerini (124), protein kinazları ve  $K_{ATP}$  kanallarını aktive edebildiği gösterilmiştir (125).

### **2.1.5.2.3. Kalsiyum**

Geçici olarak intraselüler kalsiyumun artması daha sonraki iskemiye karşı kalbi korumaktadır (126-128). Kalsiyum kanal blokörü amlodipin, diltiazem ve verapamil kullanan hastalardan alınan atrial trabeküllerde iskemik önkoşullama oluşturulamamıştır (129, 130). Buna karşın kalsiyum antagonisti nisoldipin kullanılarak anesteziye domuzlarda yapılan iskemik önkoşullamanın inhibe olmadığı da bulunmuştur (131). Bu çalışmalar, L-tipi kalsiyum kanallarından kalsiyum akımının iskemik önkoşullamada tetikleyici olduğu konusunu tartışmalı hale getirmiştir (130).

### **2.1.6. İskemik önkoşullamanın intraselüler mediyatörleri**

İskemik önkoşullamanın koruyucu etkisinin intraselüler mediyatörler nedeniyle olduğu düşünülmektedir ki bunlar: PKC'nin spesifik formu(ları) ve diğeri de  $K_{ATP}$ 'dir.

#### **2.1.6.1. Protein kinaz C**

PLC aktivasyonu membran lipidlerinden DAG oluşumuna aracılık eder. Oluşan DAG'de PKC'nin düzenleyici alt ünitesine bağlanır ve PKC'yi aktive eder. PKC tavşan kalbinde çoğu mevcut olan en az 12 adet serin/treonin kinaz içeren bir kinaz ailesidir. Bunlar 3 grup altında toplanabilir (35);



- 1- Klasik yada konvansiyonel PKC'ler:  $\alpha$ ,  $\beta_1$ ,  $\beta_2$ ,  $\gamma$ ; aktivasyonları için  $Ca^{+2}$ , DAG ve fosfolipidlere gereksinim duyar.
- 2- Non-klasik veya yeni PKC'ler:  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\eta$  ve  $\theta$ ;  $Ca^{+2}$  bağlayıcı bölge içermezler. Bu yüzden aktivasyonları  $Ca^{+2}$ 'dan bağımsızdır. Aktiviteleri sadece fosfatidilserin ve DAG bağımlıdır.
- 3- Atipik PKC'ler:  $\zeta$ ,  $\tau$ ,  $\lambda$  ve  $\mu$ ; bu grup PKC'lerin aktivasyonları DAG ve  $Ca^{+2}$ 'a bağımlı değildir.

PKC izoenzimleri hücrede rastgele olarak dağılmış halde bulunmazlar, yapıya ve kompartmana spesifiktirler. PKC izoenzimleri için bir alışılmamış özellik de aktive oldukları zaman hücrede hareket edebilmeleridir. Mackay ve Mochly-Rosen (132) immunofloresans tekniği kullanarak inaktif PKC izoenzimlerini nukleus ve perinükleer bölgede olduğunu bulmuşlar ve aktivasyonlarını takiben çizgili yapılar (kontraktil elementler) ve hücre-hücre kontakt bölgelerine transloke olduklarını göstermişlerdir. Son yıllarda yapılan çalışmalar, önkoşullama stimulusuna cevap olarak izoenzim-selektif PKC translokasyonu olduğunu ortaya koymaktadır. Örneğin, sıçan neonatal kardiyomyositlerinde, hipoksik önkoşullama sonucu izoenzime spesifik antikolar kullanarak, PKC- $\alpha$ , - $\delta$  ve - $\epsilon$ 'un transloke olduğu gösterilmiştir (133). PKC aktivasyonu ayrıca iskemik önkoşullama sırasında zaman bağımlı etki göstermektedir. Bir PKC antagonisti olan staurosporinin önkoşullama iskemisi sırasında verilip takip eden uzun süreli iskemi sırasında ortamdan yıkanması izole tavşan kalbinde korumayı önlemek için yetersiz kalmıştır. Bununla birlikte PKC inhibitörünün uzun süreli iskemi öncesinden başlayarak bu süre boyunca verilmesi infarkt alanındaki azalmayı tamamen bloke etmiştir (134). Bu veriler de bize PKC'nin kinaz aktivitesinin önkoşullama periyodu sırasında değil de, uzun süreli iskemi sırasında gerekli olduğunu göstermektedir. Adenozin, reseptörüne bağlandığında G proteini aracılıklı olarak PKC'yi aktive eder. PKC'nin önkoşullamada majör rol oynadığı bilinmektedir. PKC, sarkolemmal veya mitoK<sub>ATP</sub> kanalının fosforilasyonunu sağlayabilir. Polimiksin veya staurosporin ile PKC'nin inhibisyonu iskemik önkoşullamayı önler (48) buna karşın, forbol esterleri ile PKC'nin aktivasyonu insan ve tavşan kalplerinde kardiyomyositlerin korunmasını sağlar (135). Bazı türlerde, örneğin domuzlarda, PKC sadece mediyatör değildir ve tirozin kinaz (Src ve Lck) ile birlikte etki eder. PKC'nin yalnızca epsilon- $\epsilon$  izoformunun iskemik önkoşullamada rol oynadığı ileri sürülmüştür (136).

PKC, önkoşullama iskemisi sırasında veya reperfüzyon döneminde mitokondride oluşan ROS ile aktive edilebilir (137). İskemik önkoşullamadan 10 dk sonra, sitozolde PKC aktivitesi azalır, buna karşın, nükleus, mitokondri ve membranlar gibi bölümlerde artar. PKC- $\delta$  translokasyonu mitokondriyal  $K_{ATP}$  kanallarının aktivasyonundan ve PKC- $\epsilon$ 'un translokasyonu ise nükleer hedefleri fosforilleyerek gecikmiş önkoşullamanın oluşumundan sorumlu olabileceği düşünülmektedir (138).

### 2.1.6.2. $K_{ATP}$ kanalları

Kardiyomyositlerde 2 farklı  $K_{ATP}$  kanalı vardır, sarkolemmada ve mitokondride olmak üzere lokasyonları farklıdır.  $K_{ATP}$  kanalının blokajı iskemik önkoşullamanın koruyucu etkisini elimine eder (118). Bu durum, sulfonilüre grubu ilaçlarla tip II diyabetiklerde hiperglisemi tedavisinin kardiyoprotektif etkiyi ortadan kaldırmasıyla da gösterilmiştir (139).  $K_{ATP}$  kanallarının önkoşullamanın sinyal iletimindeki rolünü anlamada ve sulfonilüre ilaçlarının etkilerini açıklamada bazı güçlükler vardır. Mitokondriyal  $K_{ATP}$  kanalları diazoksit ile oldukça spesifik olarak açılır ve 5-hidroksidekanoat (5-HD)'nin düşük konsantrasyonlarıyla bloke edilir. Bazı çalışmalarda, diazoksit ön uygulamasının, sıçan veya tavşan kalplerinde önkoşullama oluşturduğu ve infarkt alanını azalttığı gösterilirken (117), diazoksitin kullanıldığı diğer bazı çalışmalarda infarkt alanını azaltmada yetersiz kaldığı da bildirilmiştir (140). Köpeklerde sarkolemmal ve mitokondriyal  $K_{ATP}$  kanalının blokajı, iskemik önkoşullamanın infarkt alanını azaltıcı etkisini tamamen ortadan kaldırmak için gereklidir (30). Son çalışmalar, mitokondriyal  $K_{ATP}$  kanal aktivasyonunun bir mediyatörden daha ziyade bir tetikleyici gibi rol oynadığını göstermektedir (141).  $K_{ATP}$  kanalları intraselüler ATP düzeyleri düştüğünde açılır.  $K_{ATP}$  kanallarının blokajı, bir çok türde ve insanlarda iskemik önkoşullamayı ortadan kaldırmaktadır (46). Buna karşılık  $K_{ATP}$  kanallarını açan bir ajan olan bimakalim, iskemik önkoşullamayı taklit etmekte (142) veya uyarılması için gerekli eşiği azaltmaktadır (143). Mitokondriyal  $K_{ATP}$  kanallarını selektif olarak bloke eden 5-HD, diazoksitin  $K^+$  kanallarını açarak oluşturduğu korumayı tersine çevirebilmektedir (144).

### 2.1.7. Gecikmiş önkoşullama

Korumanın erken fazı (klasik önkoşullama) oldukça etkilidir fakat nispeten kısa ömürlüdür, buna karşın gecikmiş önkoşullama, iskemi ile önkoşullamayı takiben yaklaşık olarak 24 saat sonra belirginleşir, korumanın derecesi genellikle klasik önkoşullamadan daha düşüktür fakat süresi oldukça uzundur. Gecikmiş önkoşullama iki ayrı grup tarafından ilk kez 1993'te tanımlandı (38, 51). Tavşanda önkoşullamayla korumanın 24 saatten 3 güne kadar uzadığı, iskemik önkoşullamadan yaklaşık 96 saat sonra infarkt alanındaki azalmanın kaybolduğu gösterildi (145). Önkoşullamanın erken fazının aksine, geç fazı kalbi sadece myokardiyal infarkta karşı korumaz, aynı zamanda myokardiyal donakalmaya (stunning), akut iskemi ile ilişkili olan kontraktilitede azalmaya karşı da korur (5). Geç önkoşullama, insan kardiyak hücrelerini de içeren çeşitli türlerde (43) ve insan atriyal myosit kültürlerinde gösterilmiştir (146). Geç iskemik önkoşullama, iskemiden ayrı olarak, ısı stresi (147), hızlı ventriküler pacing (148), hipoksi ve egzersiz (149) gibi stimuluslarla da oluşturulabilir. Isı şoku (42°C'de 15 dk) korumanın geç fazını indükleyebilir (51). Fiziksel egzersizin kısa süreli periyodlarının, deney hayvanlarında (150) ve insanlarda (151) myokardiyal iskemik toleransı artırdığı bildirilmiştir. Elektromanyetik alana maruz bırakılan myositler de, anoksiye karşı tolerans artmıştır (152). Ayrıca, endotoksinler, NO donörleri, adenosin agonistleri, opioid agonistleri, sitokinleri de içeren uyarımlarla gecikmiş önkoşullama oluşturulabilir (37).

### 2.1.8. Gecikmiş önkoşullamanın mediyatörleri ve son efektörleri

Korumanın ikinci penceresinin geç başlangıcı ve korumanın uzun süresi, myokardiyumdaki protein aktivitesindeki değişikliklerle ilişkilidir. HSP-72 myositte stres, hipertermi ve iskemi ile oluşturulur. Myokardiyumda HSP-72'nin yüksek düzeyleri, myokardiyal hasar ve infarkta karşı korumada rol oynadığı bildirilmiştir (51). Mn SOD gibi antioksidan enzimler muhtemelen gecikmiş önkoşullamada rol oynar. Sıçan izole kardiyomyositlerinde hipoksik önkoşullama ile oluşan myokardiyal koruma, 24 saat sonrasında Mn SOD'un aktivitesinde artmaya neden olur (153). iNOS'da geç önkoşullamada majör role sahiptir. iNOS anahtar bir komponent olmasına rağmen (105), upregülasyonu ile ilişkili biyolojik mekanizma net değildir. Son çalışmalar, COX-2

inhibitörlerinin gecikmiş önkoşullamanın koruyucu etkilerini ortadan kaldırdığını göstermiştir (154). Sonuç olarak, geç önkoşullama çeşitli proteinlerin sentezini gerektiren kompleks bir fenomendir.

### 2.1.9. İskemik önkoşullamanın klinik uygulamaları

İnsanlarda iskemik önkoşullamanın koruyucu etkisi kalp, akciğer, beyin, böbrek, iskelet kası ve karaciğerde gösterilmiştir. Önkoşullamanın mekanizmasının daha iyi aydınlatılması, farmakolojik önkoşullamanın klinik kullanım için pratiğe girmesine yol açması beklenmektedir. Bu da insanlarda iskemik hastalıkların tedavisinde önemli bir gelişme sağlayabilir. İnsanlarda iskemik önkoşullama ile ilgili çalışmaların sayısı sınırlı olmakla beraber farklı organlardaki koruyucu etkisi gösterilmiştir. İnsanda iskemik önkoşullamanın mekanizmasına yönelik çalışmalarda adenozin (155),  $K_{ATP}$  kanalları (15, 156), katekolaminler (157), bradikinin (158) ve opioidlerin (159) rolünün olduğunu gösterilmiştir. İnsan myosit kültüründe hücrelerin önkoşullama mekanizması deney hayvanlarında gözlenenlere benzerdir (160). Diğer türlerdeki gibi insan kardiyak atrial trabekül dokusunda (161), adenozin reseptör aktivasyonu,  $K_{ATP}$  kanal açıcısı kromakalim uygulanması veya PKC'nin stimülasyonu postiskemik fonksiyonda iyileşme sağlar. İnsanlarda *in vitro* çalışmalara ilaveten *in vivo* olarak iskemik önkoşullama ile ilgili bulgular vardır (162). İnsanlardaki iskemik önkoşullama kollateral oluşumundan bağımsızdır. Teoh ve arkadaşları (163) kısa süreli aortik çapraz-klempin sol ventrikülü önkoşullayabildiğini gösterdiler. Perkutanöz koroner anjiyoplasti sırasında balon inflasyonu (iskemi) ve deflasyonunun (reperfüzyon) kısa aralıklarını takiben iskemik önkoşullama gösterilmiştir (162). İlk balon inflasyonu ile kıyaslandığında daha sonraki inflasyonlar daha az anjinal ağrı, daha az ST segment elevasyonu ve daha az laktat üretimi ile bağlantılıdır. Önkoşullamanın, stabil olmayan anjinada ve koroner arter bypass greft cerrahisinin (CABG)'de ventriküler taşikardi (VT)'lerin gelişmesine karşı kalbi koruduğu da gösterilmiştir (164). Önkoşullamanın koruyucu etkileri yaşlılarda da ortaya çıkabilmektedir (165). Abete ve arkadaşları (27), yaşlılarda düzenli fiziksel aktivitenin anjinada kardiyoprotektif etkiyi koruduğunu bulmuşlardır. Çeşitli çalışmalar akut koroner sendromunun yaşlılarda artan frekansının, iskemik önkoşullama korumasının kaybı nedeniyle olabileceğini önermektedir.

### 2.1.10. İnsanda kardiyak önkoşullama

Önkoşullamanın insanda da oluşabileceği fikri Yellon ve arkadaşları (14) tarafından ortaya atılmıştır. Koroner bypass ameliyatı olan hastalarda geçirilen geçici iskemik atak sayısının artması ile, ventriküler fibrilasyon (VF) sonrası ventriküler ATP düzeylerinin korunduğunu bulunmuştur. Daha sonra da farklı araştırmacılar, infarktüs öncesi geçirilen anjina krizinin myokard infarktüsü üzerindeki koruyucu etkisini göstermişlerdir (10). Koroner arter hastalığı olan olgularda, egzersiz testlerinde ilk testin ardından geçen kısa bir süreden sonra yapılan ikinci testte daha az anjina ile egzersizi tolere edebildikleri biliniyordu. Egzersiz ile ortaya çıkan anjinal ağrının ileriki dönemlerde aynı egzersiz yapıldığında giderek azaldığı, iskemik parametrelerde ve ST segment değişimlerinde azalma saptandığı yapılan araştırmalarda gözlenmiştir (166). İnsan atrial veya ventrikül trabeküllerinde, ventriküler myosit hücre kültürlerinde yapılan *in vitro* çalışmalar ile önkoşullama oluşabileceği ortaya konmuştur (159). Mentzer ve arkadaşları (167) açık kalp ameliyatı geçirecek hastalara farklı dozlarda adenozin uygulamışlar ve bu hastaların postoperatif periyodu daha rahat geçirdiklerini ve kalp fonksiyonlarının daha çabuk düzeldiğini göstermişlerdir. İskemik önkoşullama kollateral kan akımına bağlı değildir (168), az ya da hiç kollateral sirkülasyonu olmayan deney hayvanlarında da meydana gelmektedir (169). Bazı kardiyovasküler ilaçlar iskemik önkoşullamayı modifiye etmektedirler. Uzun süreli oral antidiyabetik ilaç kullanan diyabetik hastalardan alınan myokard dokusunda önkoşullama ile oluşan korumanın ortaya çıkmadığı gösterilmiştir (170). Östrojen, myokardiyal  $K_{ATP}$  kanallarını aktive ederek farmakolojik önkoşullama oluşturabilmektedir (156). Kalsiyum kanal blokörleri insan kalp dokusunda iskemik önkoşullamayı bloke edebilmektedir (129, 130).

Koroner arter bypass veya valvular cerrahi geçiren hastaların kalbi, operasyon sırasında sıklıkla iskemi-reperfüzyona maruz kalmaktadır ve iskemik önkoşullama bu durumlarda doku hasarında azalma sağlayabilir. İskemik önkoşullamanın, aortik çapraz klemp tekniği uygulanan operasyonlarda ATP yıkımını ve troponin T sızmasını azalttığı bulunmuştur (14, 171). İzofluran anestezisinin iskemik önkoşullamayı taklit ettiği ve CABG yapılan hastalarda koruma oluşturduğu gösterilmiştir (172).

Deutsch ve arkadaşları (173) 90 saniyelik iki balon oklüzyonundan ikincisinde anjinal rahatsızlığın, ST segment kaymasının ve ortalama pulmoner arter basıncının daha düşük olduğunu, hız-basınç ürününün, koroner ven akımının ve myokardiyal laktat oluşumunun daha az olduğunu ortaya koymuşlar ve ilk kez anjiyoplasti ile iskemik önkoşullamanın oluştuğunu göstermişlerdir. Bu semptom ve belirtilerin azalması anjioplasti öncesi bir  $K_{ATP}$  kanal blokeri olan glibenklamid verilerek önlenmiştir (15). Benzer çalışmalar da insanda anjioplasti ile önkoşullama oluştuğunu göstermiştir (155-157, 159, 174). 1999 yılında Noda ve arkadaşları (175) iskemik önkoşullamanın geç fazının insanda da ortaya çıktığını ilk kez gösterdiler.

Nikorandil post-iskemik kontraktıl disfonksiyonunun iyileşmesini geliştirmiş ve hem hayvan modellerinde hem de insanda infarkt alanını azaltmıştır. Nikorandil,  $mitoK_{ATP}$ 'yi açar, fakat sarkolemmal  $K_{ATP}$  kanallarını etkilemez (176). Lee ve arkadaşları (156) 120 sn balon oklüzyonu geçiren yaşlı hastalarda iskemik önkoşullama kaybının nikorandil ile düzeltilebileceğini buldular. Nikorandilin koruyucu etkisi,  $K_{ATP}$  kanallarını bloke eden bir sülfonilüre olan glibenklamid ile ortadan kalkmıştır. COX-2 inhibitörünün myokardiyal infarktı artırabileceği ve bunun geç önkoşullamaya aracılık eden COX-2'nin bloke edilmesinden kaynaklanabileceği gösterildi (154). Hem COX-1'i hem de COX-2'yi bloke eden yüksek doz aspirinin, bilinçli tavşanlarda geç önkoşullamadaki myokardiyal donakalmayı inhibe edilebileceği gösterilmiştir (177). İskemik önkoşullamaya yol açan veya iskemik önkoşullamayı artıran ilaçların kronik kullanımı veya akut iskemik olay zamanında kullanımı, myokardiyal hasarı, hücre ölümünü azaltabilir, ventriküler fonksiyonu koruyabilir ve mortaliteyi azaltabilir. Bu gibi ajanlar arasında adenzin, adenzin agonistleri, PKC agonistleri,  $K_{ATP}$  kanal açıcıları ve NO donörleri sayılabilir.

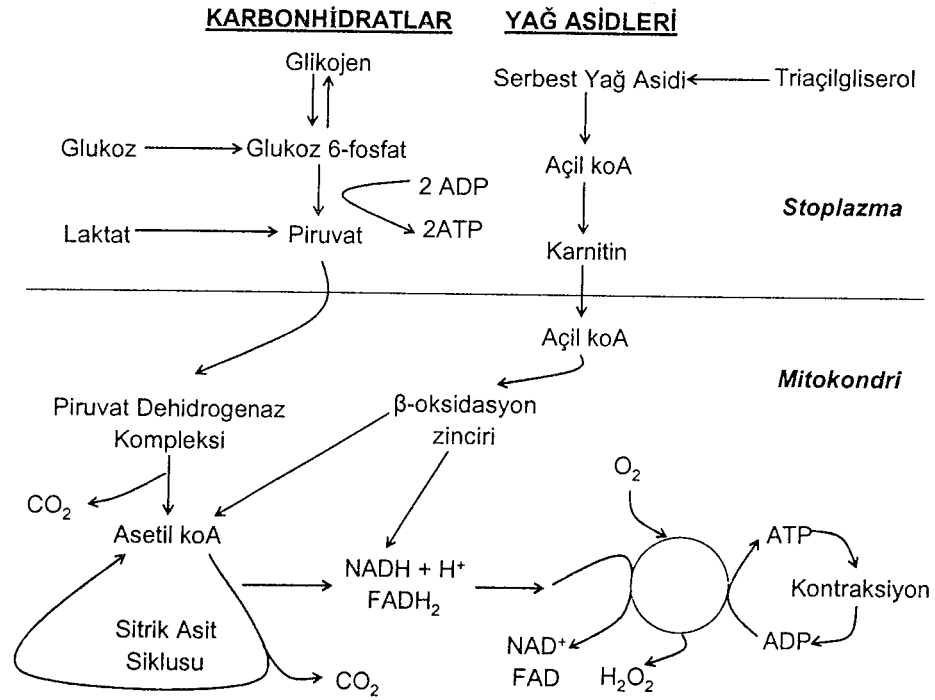
Diyabetiklerde, non-diyabetiklerle kıyaslandığında koroner hastalık mortalitesinin daha yüksek olması iskemik önkoşullamanın sülfonilürelerle blokajına bağlı olabileceğini düşündürmektedir (178). Maksimum yarar sağlayabilmek için, önkoşullama oluşturan ajanların akut iskemik ataktan önce uygulanması zorunludur. Adenzinin terapatik gücü hızlı metabolizma ve istenmeyen kardiyovasküler yan etkiler nedeniyle sınırlıdır. Adenzin, bradikardiye ve hipotansiyona neden olan kardiyovasküler yan etkilere sahiptir (60). Ayrıca, iskemiye karşı koruyucu yanıtı stimüle eden veya gelişimini hızlandıran

adenozin A1 reseptör agonistleri gibi bazı spesifik ajanlara karşı taşıflaksinin gelişmesi söz konusudur (179).

### 2.1.11. Kardiyovasküler sistem

#### 2.1.11.1. Kadiyak enerji metabolizması

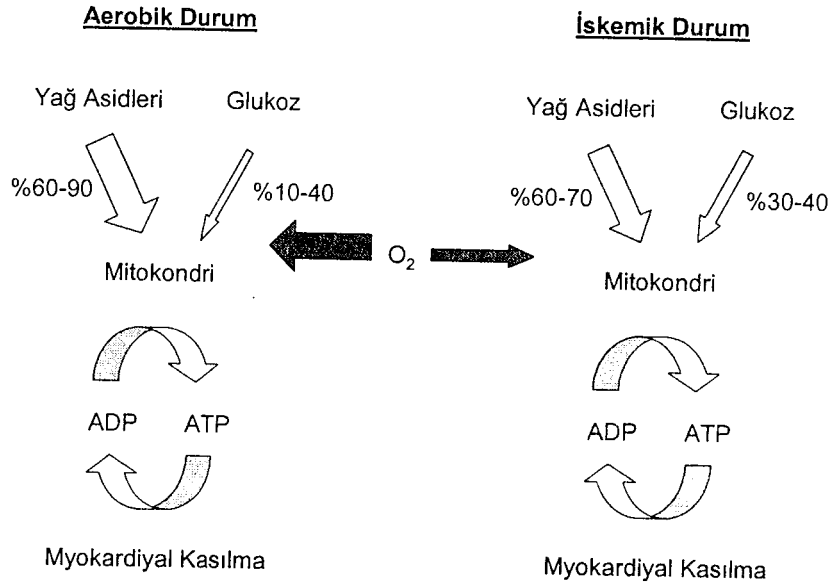
Kalpte kontraktıl fonksiyonların sürdürülebilmesi için ATP'nin hidrolize edilmesi gereklidir, kalbin ATP ihtiyacı primer olarak yağ asidlerinden ve karbonhidrat metabolizmasından üretilmektedir (180) (Şekil 7).



Şekil 7. Kalpte yağ asidi ve karbonhidrat metabolizması (180).

Glukoz metabolizması kalpte enerji kaynağı olarak önemli bir yere sahiptir ve bunun glikolizis ile glukoz oksidasyonu olmak üzere iki komponenti vardır. Glikolizis; glukoz metabolizmasının ilk kısmını oluşturur. Glikolizis normal olarak oksijenlenen bir kalpte toplam ATP üretiminin %5-10'unu karşılamaktadır, glikolitik ATP üretimi myositlerde iyon homeostazisinde spesifik bir role sahiptir. Glukoz metabolizmasının diğer komponenti

glukoz oksidasyonudur, glikoliziste üretilen pirüvat, mitokondride öncelikle pirüvat dehidrogenaz kompleksinde dekarboksile edilir. Bu enzim kompleksinde asetil koenzim A üretilir, bu daha sonra mitokondride metabolize edilir ve sonunda ATP üretilmiş olur. Mitokondriye asetil koenzim A sağlayan major kaynak ise yağ asidlerinin  $\beta$ -oksidasyonudur. Yağ asidlerinin metabolizması, kalbin ATP üretiminde major öneme sahip olan kaynaktır. Yağ asidlerinden enerji oluşumunda glukoz ile elde edilen eşit miktardaki ATP için harcanandan çok daha fazla oksijen gerekmektedir. Bu yüzden iskemi gibi yağ asidlerinin metabolizması için yeterli oksijenin olmadığı durumlarda enerji kaynağı olarak glukoz kullanılır. İskemi dışındaki durumlarda yağ asidlerinin asetil koenzim A üretimine katkısı glukozun katkısından fazladır (180) (Şekil 8).



**Şekil 8.** Aerobik ve iskemik durumda kardiyak enerji metabolizması (181).

### 2.1.11.2. İskemide kalpte oluşan metabolik değişiklikler

İskemi durumunda hücrede oksijen miktarı hızlı bir şekilde azalma gösterir. Hipoksi sonucunda oksidatif fosforilasyon engellenir ve hücre içinde ATP konsantrasyonunda hızlı bir azalma gözlenir, geçici olarak artan ADP'nin indirgenmesi sonucu aşırı derecede fosfat birikimi olur. Mitokondride ATP sentezi yapılamayınca kısa sürede dengeyi sağlamak için anaerobik glikolizise yönelme olur, artan laktat sonucunda doku pH'sı azalır. İskeminin



şiddetine bağlı olarak glikojen depoları azalır ve laktat birikmesinde artış gözlenir. Hipoksik koşulların devam etmesi durumunda, ATP konsantrasyonu belirgin olarak azalır ve  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPaz inhibe olur, stoplazmada  $\text{Na}^+$  konsantrasyonu devamlı olarak artar ve buna ekstraselüler  $\text{K}^+$  artışı eşlik eder. Stoplazmada  $\text{Na}^+$  konsantrasyonunun artışı  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{+2}$  ve  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  değişimini aktive eder ve hücre içinde  $\text{Ca}^{+2}$  ve proton birikimi olur. Hücre içinde  $\text{Na}^+$ 'in artması sonucunda hücre membranı depolarize olur ve geçici olarak açılan voltaj bağımlı  $\text{Ca}^{+2}$  kanalları ile hücre içine  $\text{Ca}^{+2}$  akışı meydana gelir (182). Büyük miktarlarda tüketilen ATP gereksiniminin üretildiği glikolitik yoldan oluşan laktat ve protonların temizlenemeyip birikmesi; kontraktıl fonksiyonların bozulması ve kardiyak verimliliğin azalması gibi çok tehlikeli sonuçlara neden olur (180).

Hipoksik durumda, myokardiyal hücreler hafif iskemiye karşı kalsiyum homeostazisini ve iyonik gradiyenti sürdürebilmek için glukoz uptake'ini artırarak yeterli ATP üretimini sağlamaya çalışırlar. Şiddetli iskemilerde ise; koroner kan akımı miktarı ve kardiyak dokunun oksijen gereksinimi arasında dengesizlik hızlı bir şekilde gelişir, bunun sonucunda fonksiyonel, metabolik ve morfolojik değişiklikler olur; ventriküler aritmiler, kontraktilite kaybı ve elektrofizyolojik anormallikler ortaya çıkar. Hücre düzeyinde ise, glukoz uptake'i azalır, piruvatın laktata dönüşümü artar ve hücre içinde laktat düzeyi hızla yükselir. Serbest yağ asidi yolağında yavaşlar ve sonuç olarak ATP üretimi azalır. Bu durum metabolik hasara yol açarak hücrenin homeostazisini bozar, membran yapısını değiştirir ve en sonunda hücrenin ölümüne yol açar. (183).

### 2.1.11.3. İskemi esnasında kalbin otonomik kontrolünde oluşan değişiklikler

AMI başladığında, kardiyovasküler sistemin otonomik kontrolünde çeşitli değişiklikler meydana gelir (184). Yapılan tartışmalarda artmış sempatik aktivitenin zararlı etkiler meydana getirdiği, vagal aktivite artışının ise koruyucu nitelikte olduğu sonucuna varılmıştır (185-187).

Gecikmiş potansiyellerin oluşumu ve kalp atımı değişkenliğinde azalmayla ilişkili olarak AMI'nın ardından ani kardiyak ölüm riskinde artış görülmektedir (188, 189). AMI'ı takiben kalp atım hızındaki değişkenliğin azalması; sol ventrikül ejeksiyon

fraksiyonundaki azalma ve gecikmiş potansiyellerin varlığı gibi benzer diğer etkenlerden bağımsız olarak kötü prognoz göstergesidir (190, 191).

Daha önceki çalışmalarda myokardiyal iskeminin lokal olarak oluşan kısa aksiyon potansiyelleri ile bağlantılı olduğu gösterilmiştir (192). İnfarktı olan hastalarda QT intervalinin maksimum düzeyde uzaması ile yaygın QT'lerde artış gözlenmesi fibrotik alanlardaki gecikmiş lokal depolarizasyonların bir yansımasıdır (193).

## **2.1.12. Kardiyovasküler sistem ve trimetazidin**

### **2.1.12.1. Kardiyovasküler bozukluklarda kullanılan farmakolojik ajanlar**

Kardiyovasküler bozuklukları olan hastaların tedavisinde terapötik yöntemlerin bir çoğu bugün hekimler tarafından kullanılmaktadır. Myokardiyal oksijen tüketimini azaltmak, koroner kan akımını artırmak, konstrüktif perikardit gelişimini önlemek, ventriküler gevşemeyi sağlayarak kan dolaşımının devamlılığını sürdürmek, kollateral kan akımını artırmak ve periferel rezistansı azaltmak için bir çok farmakolojik ajan kullanılmaktadır. Bu ajanlardan bazıları olan;  $\beta$ -blokörler, kalsiyum kanal antagonistleri ve uzun etkili nitratlar hemodinamik ilaçlar olarak sınıflandırılırlar. Hemodinamik etkili bu ilaçların kabul görmüş birçok terapötik etkileri vardır, etkilerinin üst düzeyde gözlendiği dönem plato fazıdır. Bu ilaçlar; kalp atım hızını yavaşlatarak ve vazodilatasyon yaparak kardiyodepresan etki gösterirler, iskemiye karşı koruyucu etkileri vardır, hastalarda kontrol semptomlarını azaltırlar ve sonuçta birçok hastada myokardiyal revaskülarizasyon sağlanmasına yardımcı olurlar (183).

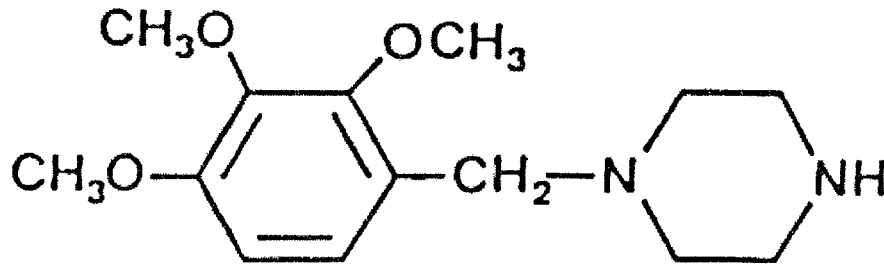
Metabolik ajanlar ise ne oksijen tüketimini azaltırlar ve ne de koroner kan akımında artış yaparlar. Bu sınıftaki ilaçlardan biri 3-ketoaçil KoA thiolaz (3-KAT) enzim inhibitörü olan trimetazidindir. Trimetazidin yağ asidi oksidasyonunu azaltır ve glukoz oksidasyonunu stimüle eder, böylece kalbin enerji kaynaklarını direkt olarak modifiye eder. Sonuç olarak metabolik ajanlar iskemi esnasında kardiyak performansı düzeltirler ve iskemik hasarı azaltırlar. Klinik olarak kalp atım hızını, kan basıncını ve hız-basınç ürününü, ne istirahat ve ne de egzersiz esnasında değiştirmemektedirler (183).

Myokardiyal iskemi esnasında meydana gelen metabolik bozukluk, ATP ve kreatin fosfat gibi yüksek enerjili moleküllerde ve glukoz oksidasyonunda azalma ile ilişkilidir. Bu metabolik hedefi değiştirmek suretiyle, iskemide ve birbiri ardına iskemi-reperfüzyonda hücrel koruma oluşturulması hedeflenmektedir, trimetazidin bu yönü ile iskemik kalp hastalarının tedavi yönetiminde farklı bir yaklaşım sunmaktadır (194).

Diğer metabolik ajanlar; glukoz insülin potasyum infüzyonu (GİK), adenozin ve agonistleri, ranolizin, etomoksir, oksfenisin, dikloroasetat, L-karnitin, perheksilin ve niasindir (183).

#### 2.1.12.2. Trimetazidin

Trimetazidin kimyasal yapısı 1-[2,3,4-trimetoksibenzil] piperazindir ve 1978'den beri bilinmektedir (Şekil 9).



Şekil 9. Trimetazidin kimyasal yapısı (195).

Trimetazidin, hemodinamik etkisi olmayan güvenilir bir hücrel antiiskemik olarak birçok ülkede pazarlanmaktadır (180). Bu ilaç, koroner kan akımını ve myokardiyal O<sub>2</sub> tüketimini etkilememektedir (196). Anesteziye köpeklerde yapılan bir çalışmada intravenöz olarak verilen trimetazidin kalp atım hızı, kardiyak atım miktarı, ortalama arteryel basınç, femoral kan akımı, koroner kan akımı, sol ventrikül sistolik basınç ve sol ventrikül diyastol sonu basıncı üzerine etkisinin olmadığı bildirilmiştir (197). 20 hasta üzerinde yapılan klinik bir çalışmada perkutanöz transluminal koroner anjiyografi (PTCA) esnasında intrakoroner olarak verilen trimetazidin kalp atımı, sistemik ve intrakoroner basınç üzerine etkilerinin plasebo ile benzer olduğu bildirilmiştir (198).

Trimetazidin Avrupa'da birçok klinik çalışmada antianginal olarak kullanılmıştır. Trimetazidinin antiiskemik etkisinin moleküler mekanizması tam olarak aydınlatılamamıştır. Bu konuda farklı hipotezler öne sürülmüştür. Bu hipotezlerdeki ortak nokta trimetazidinin farklı *in vivo* ve *ex vivo* myokardiyal ve karaciğer iskemi modellerinde enerji metabolizmasını ve ATP sentezini düzenleyici olarak rol oynadığıdır (182).

Trimetazidinin aktivitesi kardiomyositlerle sınırlı değildir, endotelial hücreleri, düz kas hücrelerini, trombositleri ve inflamatuvar hücreleri de etkiler. Trimetazidin kardiyak infarkt alanını küçültür, infarkt alanına lökosit akımını sınırlar, trombosit agregasyonunu azaltır. Trimetazidin; AMI'da rekanalizasyonun ardından infarkt bölgesinin genişlemesinin sınırlandırılmasında, iskemi-reperfüzyon hasarının tamirinde yararlı etki oluşturur (183).

Trimetazidin stabil anjinanın tedavisinde tek başına veya diğer antianjinal ilaçlarla kombine edilerek kullanılabilir (194). Trimetazidin kardiyak koruyucu etkiyi artırdığından diğer kardiyak durumların tedavisinde de uygulanabilir (180). Bir çok çalışmada; sol ventrikül disfonksiyonunda, CABG'de, PTCA'da, AMI ataklarında ve şiddetli kardiomyopatilerde trimetazidinin etkili olduğu gösterilmiştir (183).

### **2.1.12.3. Deneysel kardiyak iskemi-reperfüzyon çalışmalarında trimetazidin**

Yapılan deneysel çalışmalarda elde edilen veriler ışığında trimetazidin hakkında aşağıdaki sonuçlara ulaşılmıştır. Trimetazidin;

- 1- Hücre içi asidozisi sınırlamaktadır,
- 2- Hücre içinde sodyum ve kalsiyum birikimini sınırlamaktadır,
- 3- Hücre içi ATP düzeyini korur ve azalan kreatin fosfokinazın yeniden sentezlenmesini artırmaktadır,
- 4- Mitokondriyal fonksiyonları korumaktadır,
- 5- Mitokondriyal yağ asidi oksidasyonunu azaltmaktadır,
- 6- Myokardiyal glukoz metabolizmasını artırmaktadır,
- 7- ROS'ye bağlı oluşan membran hasarına karşı koruyucu özellik göstermektedir ve
- 8- Nötrofil infiltrasyonunu azaltmaktadır (195).

İskemi-reperfüzyona maruz bırakılan izole sıçan kalplerinde trimetazidinin; iskemik kontraksiyonları geciktirdiği ve post-iskemik sol ventrikül disfonksiyonunu düzelttiği ileri sürülmüştür (199).

Drake-Holland ve arkadaşları (200) tavşanlarda yaptıkları bölgesel iskemi-reperfüzyon çalışmasında trimetazidinin infarkt alanını azalttığını bulmuşlardır.

İzole erişkin sıçan myositlerinde yapılan bir çalışmada; trimetazidinin reoksijenasyonun oluşturduğu strese karşı sarkolemmal rezistansı artırdığı gösterilmiştir (201).

#### **2.1.12.4. Trimetazidinin inflamasyona etkileri**

Moleküler oksijen hücrede metabolize edilirken toksik ara ürünlere dönüşür. Oldukça reaktif oksijen içeren türlerin oluşumu çeşitli biyokimyasal reaksiyonların bir sonucudur. Trimetazidinin antioksidan etkinliği kadriyak koruyucu etkisinde önemlidir. Trimetazidin hidrojen peroksit'in ve bilinen diğer güçlü oksidanların oluşumunu azaltmaktadır (202, 203). Bu mekanizmanın bir kısmını SOD'nin tükenmesini engellemesi ve myeloperoksidaz (MPO) aktivitesini azaltması ile açıklamak mümkündür. Trimetazidin aynı zamanda glutatyon düzeyini de korumaktadır (204). Trimetazidin, hücre içi asidozisi azaltarak hücre fonksiyonları ve membran yapısını korur, inflamatuvar reaksiyonu inhibe eder, transmembranal iyon değişimindeki bozukluğu düzelterek aşırı  $Ca^{+2}$  birikimini önlediği gibi fazla miktarda serbest radikal oluşumunu da önler (183). Williams ve arkadaşları (205) tavşanlarda yaptıkları çalışmada trimetazidinin myokardiyal iskemide polimorfonükleer lökosit infiltrasyonunu azalttığını ve myokardiyal metabolizmayı koruduğunu göstermişlerdir. Trimetazidin muhtemelen sistemik inflamatuvar mediyatörlerin salınımını ve nötrofiller üzerine güçlü kemotaktik etki gösteren ajanları inhibe etmektedir (204).

### 2.1.12.5. Trimetazidinin membran fosfolipidleri üzerine etkileri

İskemide ve çeşitli kardiyak patolojilerde bilinmeyen bazı nedenlerle fosfolipidlerin hızlı bir şekilde azalması sonucu kardiyak hücre membranında bir kısım hasarlar meydana gelmektedir (206). Kardiyak fonksiyonların devamlılığında membran fosfolipidlerinin çok önemli role sahip olduğu bilinmektedir, trimetazidinin membran homeostazisinde düzenleyici rol oynadığı, membranın korunmasına katkıda bulunduğu ve serbest yağ asidlerinin utilizasyonunu tekrardan düzenleyerek  $\beta$ -oksidasyondan membran fosfolipid sentezine kaydıracağı ileri sürülmüştür. Bu dönüşüm ile, yağ asidi miktarı azalmakta, enerji üretimi mevcut olan lipid olmayan substratların utilizasyonuna kaymaktadır (207).

Sentex ve arkadaşları *in vitro* olarak neonatal kardiyomyositlerde ve izole perfüze kalp modellerinde (208, 209), *in vivo* olarak sıçan myokardiyumunda (210) yaptıkları çalışmalarda trimetazidin etkisi ile fosfolipid sentezinde büyük miktarlarda artış olduğunu ve bunun sonucunda yağ asidlerinin doku lipidlerine katılımının ciddi oranda arttığını göstermişlerdir.

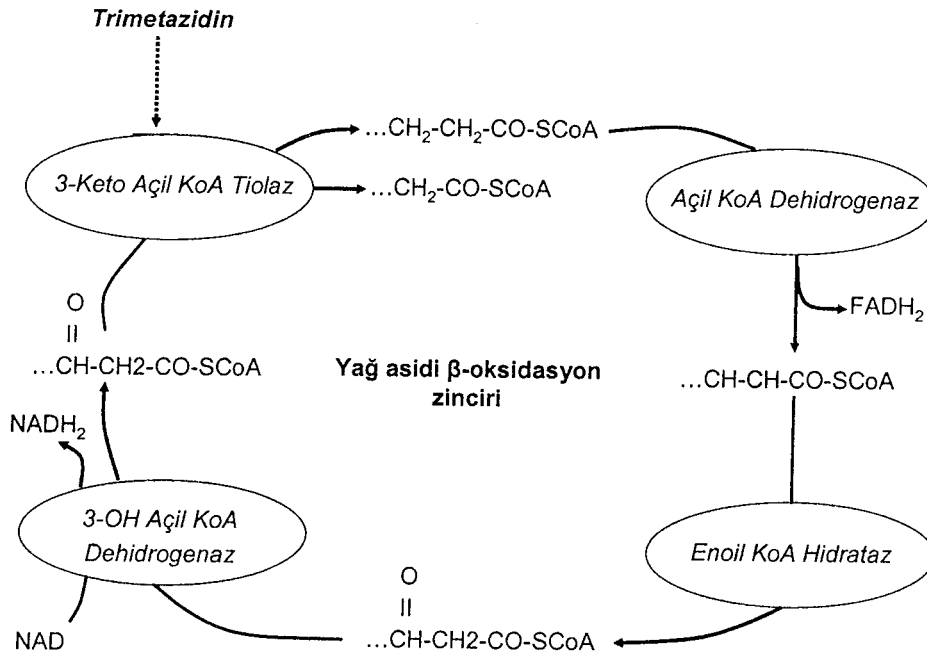
Bütün lipid gruplarında ortak prekürsör olan gliserol radyoaktif olarak işaretlenerek, neonatal sıçan ventrikül myosit kültüründe yapılan çalışmada trimetazidinin doz bağımlı olarak fosfolipid sentezini artırdığı gösterilmiştir (207).

### 2.1.12.6. Trimetazidinin kardiyak enerji metabolizması üzerine etkileri

Trimetazidinin yağ asidi ve glukoz metabolizması üzerine etkileri *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarda araştırılmıştır. Trimetazidin uygulamasının kalpte antiiskemik etki meydana getirdiği, glukoz metabolizmasını piruvat dehidrogenaz seviyesinde etkileyerek artırdığı ve  $\beta$ -oksidasyonu azalttığı gösterilmiştir. Piruvat dehidrogenaz glukoz yolağının hız kısıtlayıcı basamağını oluşturur, aynı zamanda yağ asidi oksidasyonunda yüksek oranda inhibe eder. Trimetazidin enerji üretiminde substrat tercihi üzerinde meydana getirdiği bu değişiklik sonucu ATP üretimini artırmaktadır. Buna serbest yağ asidi oksidasyonunda görevli olan uzun zincirli 3-KAT enzimini selektif olarak inhibe etmesinde önemli katkısı vardır. 3-KAT,  $\beta$ -oksidasyon zincirinin son enzimidir (183) (Şekil 10).

Mody ve arkadaşlarının (211) köpeklerde *in vivo* olarak yaptıkları myokardiyal iskemide çalışmada trimetazidinin total glukoz utilizasyonunu artırdığı 2-[<sup>18</sup>F] floro-2-deoksi-D-glukoz kullanılarak pozitron emisyon tomografisi ile gösterilmiştir. Trimetazidin mitokondrinin O<sub>2</sub> ihtiyacını azaltmakla birlikte glikolizis ile glukoz oksidasyonuna yönelimi artırarak ATP düzeyinin azalmasını önlenmektedir. Sonuç olarak ekstraselüler ortamdan hücresel kompartmana asidik protonların hücre membranından transferini azaltarak aşırı H<sup>+</sup> birikimine bağlı intraselüler asidozis, aşırı Ca<sup>+2</sup> birikimine bağlı elektrolit anormallikleri ve hücre içinde artmış olan Na<sup>+</sup>'nın zararlı etkileri trimetazidin tarafından inhibe edilmektedir (212).

İskemi-reperfüzyona maruz bırakılan izole sıçan kalplerinde trimetazidinin; fosfokreatinin yeniden sentezini ve mitokondriyal oksidatif fosforilasyonu hızla düzenlediği bildirilmiştir (213).



Şekil 10. Trimetazidinin yağ asidi metabolizmasına etkisi (183, 214).

### 2.1.12.7. Klinik çalışmalarda trimetazidinin iskemik kalp hastaları üzerindeki etkileri

AMI esnasında trimetazidinin etkilerinin olumlu olduğu yapılan klinik çalışmalarda rapor edilmiştir. Bu çalışmalarda trimetazidinin myokardiyal infarktüs esnasında; sol ventrikül fonksiyonlarını koruduğu, gecikmiş potansiyelleri azalttığı, reperfüzyonun neden olduğu ventriküler aritmileri ortadan kaldırdığı ve trombolitik tedavi almayan hastalarda mortaliteyi azalttığı bildirilmiştir (189, 215-217).

Trimetazidin, AMI sonrası, iskemik myokarda ve elektriksel olarak inaktif fibröz dokuda oluşan farklı depolarizasyonları azaltmaktadır, iskemiye maruz kalmış myositlerin yaşam süresini iyileştirme özelliğine sahiptir ve iskemik myokardiyal metabolizmayı optimum seviyede tutmaktadır (218, 219).

AMI geçiren hastalarda trimetazidin uygulamasının parasempatik aktiviteyi artırarak sempato-vagal dengeyi parasempatik sistem lehine değiştirdiği bildirilmiştir (220).

Myokardiyal iskemi geçirmiş olan hastalarda yapılan bir çalışmada kontrol grubunda QT intervalinin uzamış olduğu saptanmasına karşın trimetazidin verilen grupta ise QT intervalinin ortalama değerinin kısaldığı bulunmuştur (221).

Antianginal ajan olan trimetazidin iskemiye karşı hücrel toleransı artırmaktadır. Çeşitli klinik çalışmalarda trimetazidinin tek başına veya diğer antianginal ilaçlarla kombinasyonunun efor anginalı hastalarda iskemi eşikini artırdığı ve egzersiz toleransını önemli ölçüde artırdığı bulunmuştur (222-225). Anginası olan hastalarda yapılan klinik bir çalışmada trimetazidin ve nifedipin karşılaştırılmıştır. Bu çalışmada her iki grupta ilaçların etkilerinin benzer olduğu saptanmış ve hastalarda anginal atak sıklığının azaldığı, egzersiz toleransının arttığı bildirilmiştir (223). Benzer bir çalışma Detry ve arkadaşları (224) tarafından trimetazidin ve propranolol kullanılarak yapılmıştır. Buradada her iki ilacın etkilerinin benzer olduğu ve anginal atak sıklığında azalma olduğu, egzersiz toleransının arttığı, hastaların nitrogliserin ihtiyacının azaldığı bildirilmiştir. Anginalı hastalarda yapılan bir diğer klinik çalışmada diltiazem+trimetazidin kombinasyonu diltiazem+plasebo



ile karşılaştırılmıştır. Diltiazem+trimetazidin grubunda diğer gruba oranla anginal atak sıklığının azaldığı, egzersiz toleransının arttığı ve hastaların nitrogliserin ihtiyacının azaldığı bildirilmiştir (226).

Koroner arter hastalığı stabil olan hastalarda yapılan klinik bir çalışmada, heparin uygulaması ile iskemi eşiğinin azaldığı saptanmıştır. Trimetazidinin, heparinin bu etkisini azalttığı bulunmuş ve trimetazidinin bu etkisi kardiyak enerji metabolizmasını yağ asidi oksidasyonundan glukoz metabolizmasına kaydırmak suretiyle oksidatif fosforilasyonu artırmasına bağlanmıştır. Aynı çalışmada trimetazidinin NO salıverilmesini etkilemediği, endotelin-1 salıverilmesini ise azalttığı gözlenmiştir, trimetazidinin bu etkisi endoleyal metabolizmayı düzeltilmesine bağlanmıştır (227).

Myokard infarktüsü geçirmiş olan hastalarda yapılan klinik bir çalışmada sol inen koroner artere uygulanan PTCA'da balonun şişirilmesi sırasında oluşan ST segment değişikliklerinin trimetazidin ile azaldığı gösterilmiştir (198).

Papadapoulos ve arkadaşları (216) trimetazidinin trombolizis tedavisi alan hastalarda reperfüzyonun neden olduğu post-AMI aritmilerini azalttığını öne sürmüşlerdir.

Bununla birlikte akut koroner sendrom döneminde trimetazidin kullanımına yönelik klinik veriler yeterli değildir. EMIP-FR grubunun yapmış olduğu çalışmalarda, AMI geçiren hastalara trimetazidinin erken dönemde verilmesinin kısa ve uzun dönemde mortalite üzerine etki etmediği, trombolitik tedavi ile birlikte eş zamanlı olarak trimetazidin başlanan post-AMI hastalarında sol ventrikül kontraktilitesinin global olarak etkilemeksizin diskinetik bölgelerin azaldığı bildirilmiştir (215, 217).

#### **2.1.12.8. Trimetazidin ve myokardiyal önkoşullama**

Trimetazidinin myokardiyal önkoşullama üzerine olan etkilerini araştıran sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Anjina pektoris olan hastalarda yapılan klinik bir çalışmada oral trimetazidinin doz bağımlı olarak plazma adenosin düzeyini artırdığı böylece myokardiyal iskemide koruyucu etki gösterdiği ileri sürülmüştür. Adenosinin plazma

seviyesinin trimetazidin ile aynı dönemde üçüncü saatte doruk konsantrasyona ulaştığı ve sekizinci saatte trimetazidinin plazma konsantrasyonunun düşüşüne paralel olarak azalmaya başladığı belirlenmiştir. Bu çalışma süresince trimetazidin verilen hastaların nitrogliserin ihtiyacı olmadığı bildirilmiştir (12).

Minners ve arkadaşları (228) izole sıçan kalplerinde yapmış oldukları bölgesel iskemi çalışmasında; iskemik önkoşullama, DNP, CSA ve adenozin kullanılan gruplarda nekrotik alanın kontrol grubuna oranla anlamlı şekilde azaldığı belirlenmiştir. Trimetazidinin iskemik önkoşullamanın etkisini azalttığını ancak diğer gruplardaki anlamlı azalmayı tamamen kaldırdığını bildirmişlerdir.

### **2.1.13. İstatistiksel analiz**

Sonuçlar ortalama  $\pm$  ortalamanın standart hatası olarak veya % insidans olarak verilmiştir. İki den fazla gruplar arasındaki karşılaştırmalarda tek yönlü varyans analizi (ANOVA) kullanılmış, anlamlılık tesbit edildiğinde analize Student-Newman-Keuls testi ile devam edilmiştir. VT ve VF insidanslarındaki anlamlı farklılığı saptamada Fisher'in kesin ki kare testi kullanılmıştır. Aritmi skorlarının istatistiksel değerlendirilmesinde Mann-Whitney U testi kullanılmıştır. Bütün testlerde 0.05'den küçük P değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

### 3. MATERYAL VE METOD

#### 3.1. Materyal

##### 3.1.1. Deney hayvanları

Deneylede Gaziantep Üniversitesi hayvan bakım ve üretim ünitesinde üretilen,  $21\pm 1^{\circ}\text{C}$  oda sıcaklığında 12 saat aydınlık 12 saat karanlık periyodundaki aydınlatma ile senkronize edilen standart laboratuvar hayvan yemi ve musluk suyu ile beslenen 250-320 g ağırlığındaki Wistar cinsi erkek sıçanlar kullanılmıştır. Bu çalışma ile ilgili olarak Gaziantep Üniversitesi Lokal Etik Kurulu'ndan gerekli izin alınmıştır.

##### 3.1.2. Kimyasal maddeler ve hazırlanışları

Tiyopental sodyum (Pental, İ.E. Ulagay, İstanbul, Türkiye) 10 ml %0.9 NaCl (Eczacıbası-Baxter, İstanbul, Türkiye) ile çözülerek hazırlanmış ve  $+4^{\circ}\text{C}$ 'de muhafaza edilmiştir.

Trimetazidin (Servier, Fransa) %0.9 NaCl ile 100 mg/ml olarak çözülmüş, kullanılmadan hemen önce taze olarak hazırlanmıştır.

Heparin 5000 İÜ/ml (Nevparin, Mustafa Nevzat, İstanbul, Türkiye), 1/10 oranında %0.9 NaCl ile dilüe edilerek kullanılmıştır.

Evans mavisi (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, A.B.D.) 2 mg/ml olacak şekilde distile su ile çözülerek hazırlanmıştır.

TTC (2,3,5-triphenyltetrazolium chloride) (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, A.B.D.), fosfat tamponu (20 mM,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ : 3.56 g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ : 2.72 g, pH: 7.4: Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, A.B.D.) içinde çözülerek %1'lik solüsyonu hazırlanarak

kullanılmıştır.

### 3.1.3. Araç ve gereçler

Bilgisayarlı veri kayıt sistemi (MP30 Data Acquisition System, BIOPAC Systems, Inc., Kaliforniya, A.B.D.), sisteme bağlı adaptörler:

Vücut sıcaklığı takibi için rektal prop (TSD202A)

Sol karotid arter kanülasyonu ile basınç ölçümü için polietilen kateter (PE 50) ve buna bağlı basınç ölçeri (BPT 300)

Standart EKG ekstremite elektrotları

Biopac bilgisayar yazılımı (BSL PRO 3.6.7, BIOPAC Systems, Inc., Kaliforniya, A.B.D.)

Sol juguler ven kanülasyonu ile ilaç infüzyonu için polietilen kateter (PE 50)

Solunum pompası (SAR-830, IITC Life Science, Kaliforniya, A.B.D.)

Spektrofotometre (UV-1601, SHIMADZU, Kyoto, Japonya)

İnfüzyon pompası (74900 series, Cole-Parmer, Illinois, A.B.D.)

İpek iplikli yuvarlak atravmatik cerrahi iğne (6/0, 10 mm, Doğsan, Trabzon, Türkiye)

Cerrahi malzeme (makas, pens, v.b.) (Aygün A.Ş., Samsun, Türkiye)

pH metre (3020 pH Meter, Jenway Ltd, Essex, İngiltere)

Laktat kiti (Vitros LAC Kit, Ortho-Clinical Diagnostics, Rochester, A.B.D.)

Troponin T kiti (Elecsys Troponin T Kit, Roche Diagnostics, Mannheim, Almanya)

Kreatin kinaz-MB kiti (CK-MB Kit, Roche Diagnostics, Mannheim, Almanya)

### 3.2. Metod

Erkek sıçanlar tiyopental sodyum 120 mg/kg dozunda intraperitoneal olarak verilerek anesteziye edilmiştir.

Boyun bölgesinde cilt insizyonunun ardından tiroid dokusu lateralize edilerek kas tabakaları kesilmiş ve trakea izole edilmiştir. Trakea insizyonu ile endotrakeal tüp yerleştirilmiştir.

İlaçların i.v. olarak uygulanabilmesi için sol juguler ven kanüle edilmiş ve kanülün bağlı olduğu enjektör infüzyon pompasına yerleştirilmiştir

Sol karotid arter kanüle edilerek intraarteriel kan basıncı ölçümü gerçekleştirilmiştir

Kanülasyon öncesinde kanüller heparin ile yıkanmıştır

EKG adaptörüne bağlı ekstremita elektrotları cilt altına yerleştirilmiştir.

Rektal sıcaklık probu anüsten yaklaşık 3 cm ilerletilerek yerleştirilmiş ve vücut sıcaklığı deney süresince izlenerek ısıtıcı lamba ile 37°C'de sabit olarak tutulmaya çalışılmıştır.

Endotrakeal tüp solunum pompasına bağlanmıştır. Anesteziye sıçanlar solunum pompası (15 ml/kg, 70 kez/dk) aracılığıyla oda havası ile solutulmuştur (229, 230).

Torakal kasların insizyonunun ardından 4. ve 5. kostalar midklaviküler hattın kesilerek toraks boşluğu açılmıştır.

Perikardiyum temizlendikten sonra insizyonun iki ucu pens yardımı ile genişletilerek abdome doğru basınç oluşturulmuş ve kalp toraks dışına çıkartılmıştır.

Sol inen koroner arter orjinine yakın bölgeden 10 mm'lik yuvarlak uçlu atravmatik 6/0 ipek ile sütüre edilmiş ve ardından kalp toraksa geri yerleştirilmiştir.

İpek sütür materyalinin iki ucu plastik bir tüp (15 mm uzunluğunda, 1 mm yarıçapında) içerisinden geçirilerek sıkıştırılmadan bırakılmıştır. Bu iplik klips ile sıkıştırılarak iskemi, gevşetilerek reperfüzyon yapılmıştır.

Hazırlık döneminin ardından deney protokolüne geçilmiştir.

### **3.2.1. İskemi ve önkoşullama oluşturulması**

Bu çalışmalarda kullanılan deney protokolleri 11. şekilde gösterilmiştir. 20 dk'lık stabilizasyon periyodunun ardından 5 dk iskemi periyodunu izleyen 5 dk'lık reperfüzyon periyodu ile iskemik önkoşullama oluşturulmuş ve sonra 30 dk'lık iskemi uygulanmıştır. İskemi ile birlikte arteriyel kan basıncında %20-30 civarındaki bir düşüş başarılı oklüzyonun göstergesi olarak kabul edilmiştir (231). Reperfüzyonda da arteriyel kan basıncının iskemi öncesindeki değerine yükselmesi başarılı bir reperfüzyonun göstergesi olarak kabul edilmiştir.

### **3.2.2. İlaç uygulama şekilleri**

Trimetazidin uygulaması i.v. bolus (10 mg/kg) ve i.v. infüzyon (2 mg/kg/dk 5dk süre ile) olmak üzere iki farklı şekilde yapılmıştır (232, 233).

#### *Trimetazidin Kontrol*

Trimetazidin bu deneylerde iskemiden 20 dk önce 10 mg/kg i.v. bolus tarzında uygulanmıştır.

#### *Trimetazidin Önkoşullaması*

Trimetazidin bu deneylerde iskemiden 10 dk önce i.v. infüzyon tarzında 2 mg/kg/dk hızında 5 dk süre ile uygulanmıştır.

#### *Karbakol Önkoşullaması*

Karbakol bu deneylerde iskemiden 10 dk önce infüzyon tarzında 4 µg/kg/dk hızında 5 dk süre ile uygulanmıştır (234).

### **3.2.3. Deney protokolleri**

Bütün deneylerde cerrahi işlemler bittikten 15 dk sonra deney protokollerine geçilmiştir.

Birinci grup deneylerde (protokol 1, *Kontrol*, n=27), 30 dk'lık stabilizasyon sonrası oklüzyon yapılarak 30 dk'lık iskemi döneminde aritmiler incelenmiştir.

İkinci grup deneylerde (protokol 2, *Trimetazidin kontrol*, n=10), oklüzyondan 20 dk önce 10 mg/kg i.v. bolus şeklinde trimetazidin uygulanmış ve bunun iskemi aritmileri üzerindeki etkileri 30 dk boyunca incelenmiştir.

Üçüncü grup deneylerde (protokol 3, *İskemik önkoşullama*, n=24), 20 dk'lık stabilizasyon periyodundan sonra 5 dk iskemi ve ardından 5 dk reperfüzyon ile önkoşullama yapılmış, sonrasındaki 30 dk'lık iskemi döneminde aritmiler incelenmiştir

Dördüncü grup deneylerde (protokol 4, *Trimetazidin + İskemik önkoşullama*, n=10), iskemik önkoşullamadan 10 dk önce trimetazidin 10 mg/kg i.v. bolus şeklinde uygulanmış ve iskemik önkoşullamanın ardından oklüzyon yapılarak 30 dk'lık iskemi döneminde aritmiler incelenmiştir. Bu gruptaki deneylerde trimetazidin, iskemik önkoşullama üzerine olan etkileri incelenmiştir

Beşinci grup deneylerde (protokol 5, *Karbakol önkoşullaması*, n=9), 20 dk'lık stabilizasyonun ardından karbakol 5 dk süreyle infüzyon tarzında 4 µg/kg/dk hızında

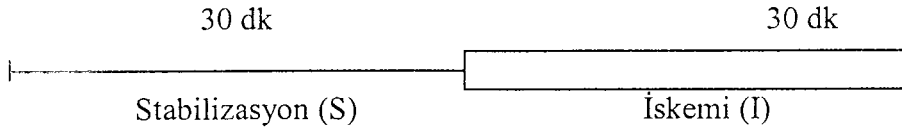
uygulanmış ve sonrasında ilacın diffüze olabilmesi için 5 dk beklenilmiş ve ardından oklüzyon yapılarak 30 dk'lık iskemi döneminde aritmiler incelenmiştir

Altıncı grup deneylerde (protokol 6, *Trimetazidin + Karbakol önkoşullaması*, n=10), karbakol önkoşullamasından 10 dk önce trimetazidin 10 mg/kg i.v. bolus şeklinde uygulanmış ve karbakol önkoşullamasının ardından oklüzyon yapılarak 30 dk'lık iskemi döneminde aritmiler incelenmiştir. Bu gruptaki deneylerde trimetazidin'in karbakol önkoşullaması üzerine olan etkileri incelenmiştir.

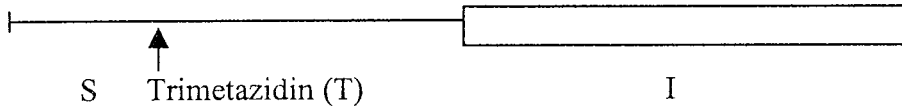
Yedinci grup deneylerde (protokol 7, *Trimetazidin infüzyon*, n=10), 20 dk'lık stabilizasyon periyodunun ardından trimetazidin 5 dk süreyle infüzyon tarzında 2 mg/kg/dk hızında uygulanmış ve sonrasında ilacın diffüze olabilmesi için 5 dk beklenilmiş ve ardından oklüzyon yapılarak 30 dk'lık iskemi döneminde aritmiler incelenmiştir. Bu grup deneylerde trimetazidin'in farmakolojik önkoşullama oluşturup oluşturmadığı araştırılmıştır.



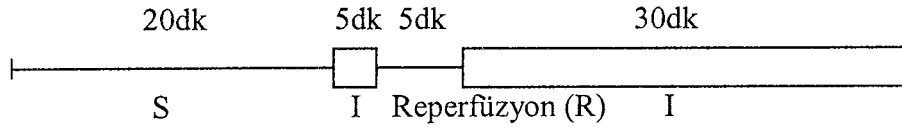
**Protokol 1: Kontrol**  
30 dk



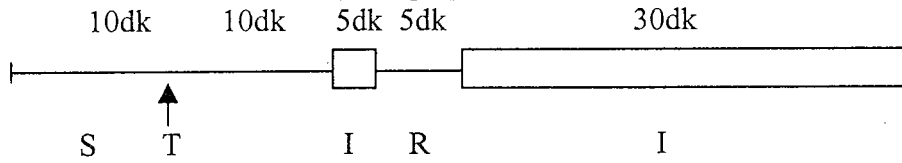
**Protokol 2: Trimetazidin kontrol (10 mg/kg i.v. bolus)**  
10dk 20dk 30dk



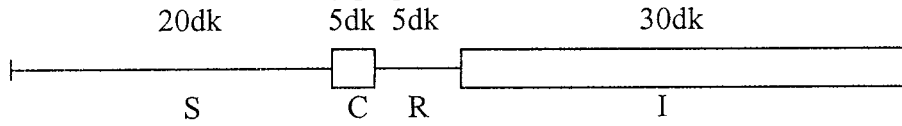
**Protokol 3: İskemik önkoşullama (IP)**



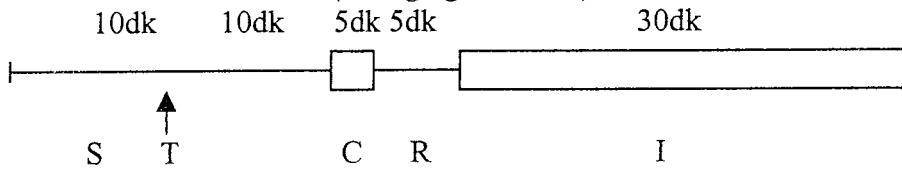
**Protokol 4: Trimetazidin (10 mg/kg i.v. bolus) + IP**



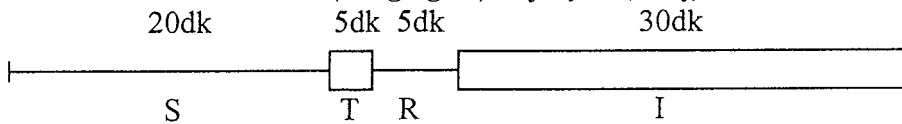
**Protokol 5: Karbakol (4 µg/kg/dk) önkoşullaması (CP)**



**Protokol 6: Trimetazidin (10 mg/kg i.v. bolus) + CP**



**Protokol 7: Trimetazidin (2 mg/kg/dk) infüzyon (T inf)**



Şekil 11. Deney protokolleri.

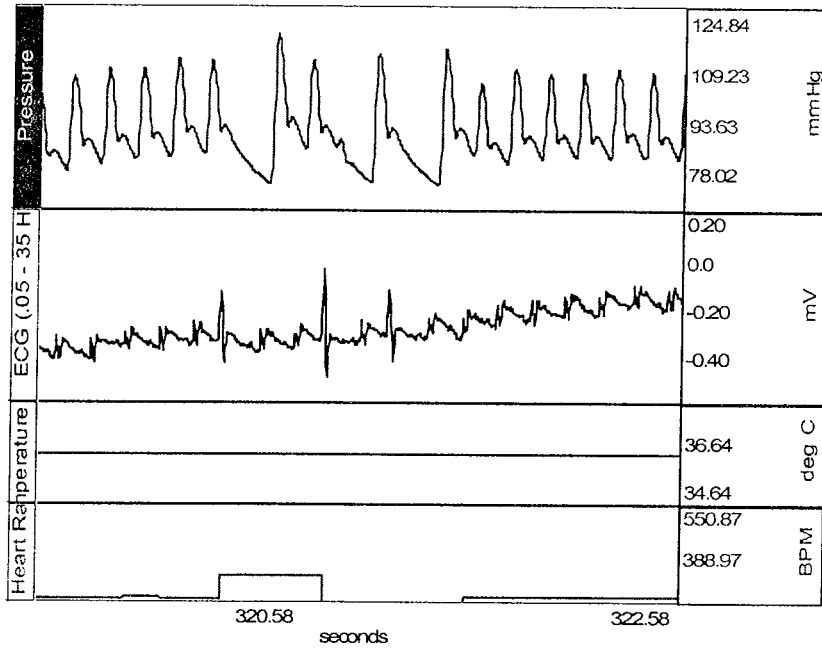
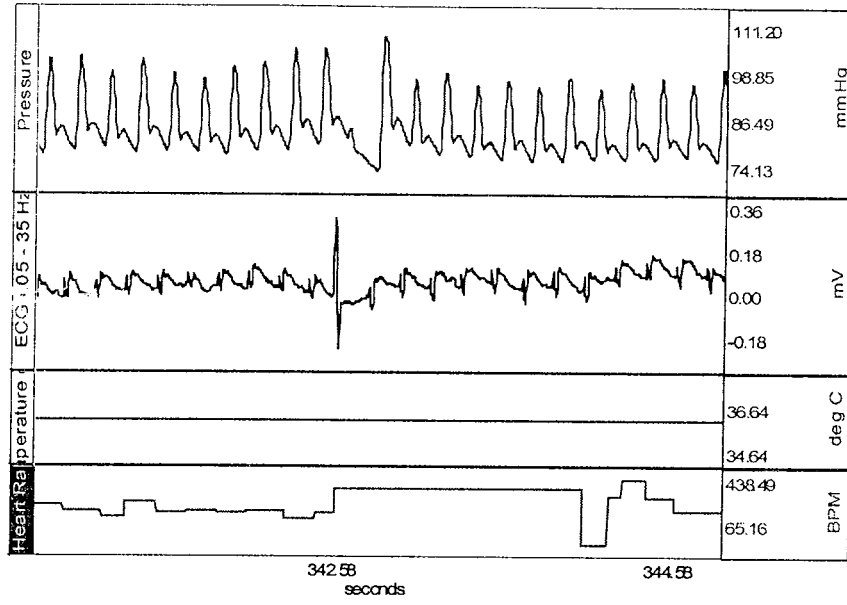
### 3.2.4. Değerlendirilen parametreler

Deney boyunca arteriyel kan basıncı, rektal sıcaklık, standart EKG verileri bilgisayar ortamında sürekli olarak kaydedilmiştir.

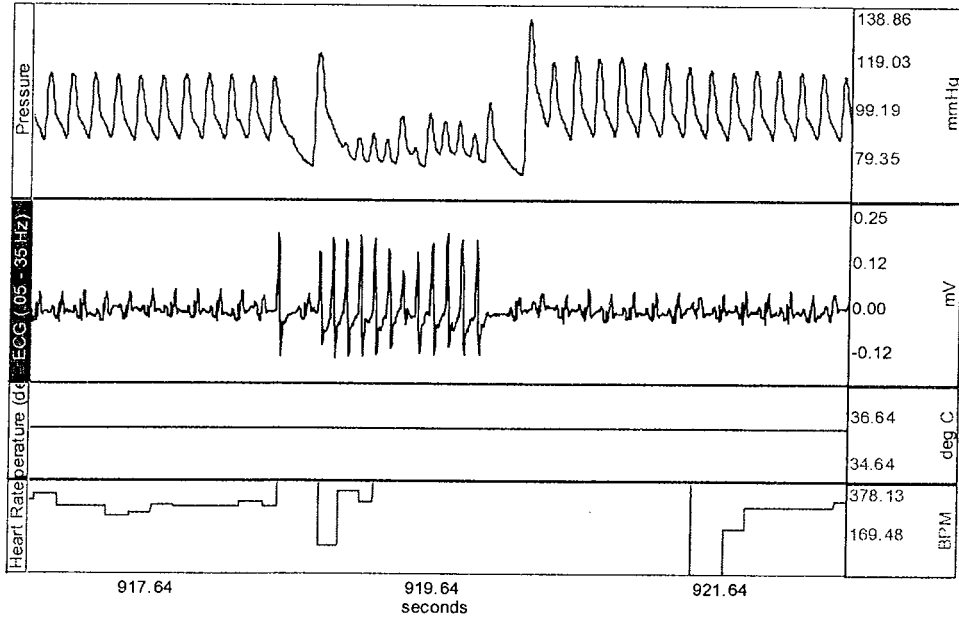
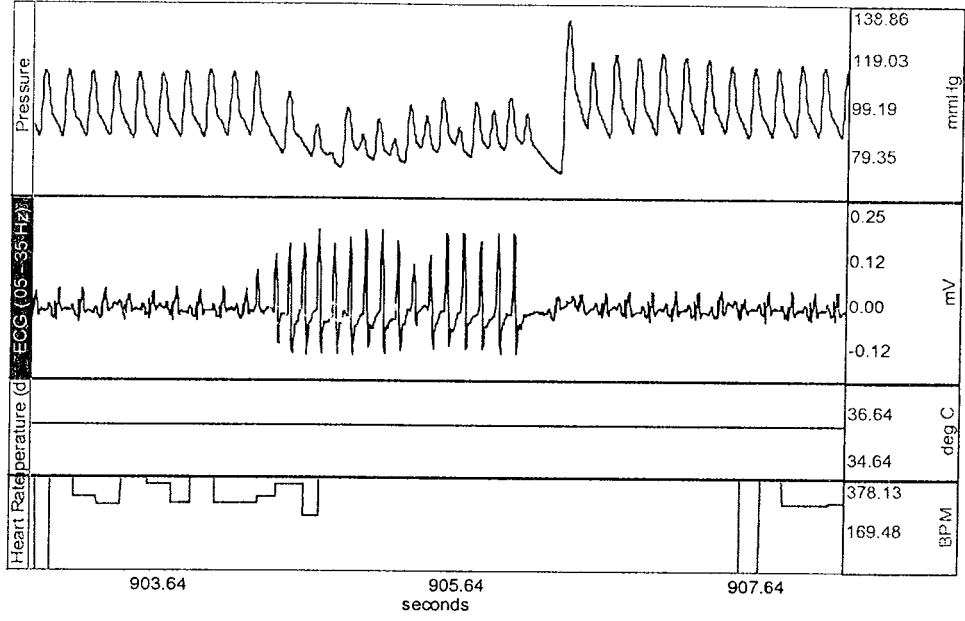
Bütün gruplarda elektrokardiyogramdan kaydedilen kalp hızı ve ölçülen aritmilerin insidansı Lambeth kurallarına (235) uygun olarak, VT, VF ve ventriküler ektopik atım (VEA)'lar olarak ölçülmüştür. Normal QRS kompleksinden önce gelen, gerek QRS kompleksi yapısındaki farklılıkları ve gerekse amplitüdlerindeki farklı görünüşleri ile göze çarpan atımlar VEA olarak teşhis edilmiştir (Şekil 12). Dört ve/veya daha fazla VEA'nın ard arda geldiği durumlar ise VT olarak teşhis edilmiştir. Normal EKG'ye göre QRS kompleksi görünümünün kaybolduğu, düzensiz aktivite gösteren ve azalmış amplitüdü EKG kayıtları ise VF olarak belirlenmiştir. Bigemini gibi kompleks formlar ise VEA'lar içerisinde değerlendirilmiştir. Sıçanlar VF geçirirken spontan olarak normal sinüs ritmine dönebilmektedirler. Başlangıcından itibaren 5 dk içerisinde normal sinüs ritmine dönmeyen VF'lar irreversibl VF olarak kabul edilmiştir.

Deneylerde aritmi skorları hesaplanırken daha önce yayınlanmış olan skala kullanılmıştır (236). Aritmi skoru değerlendirmeleri:

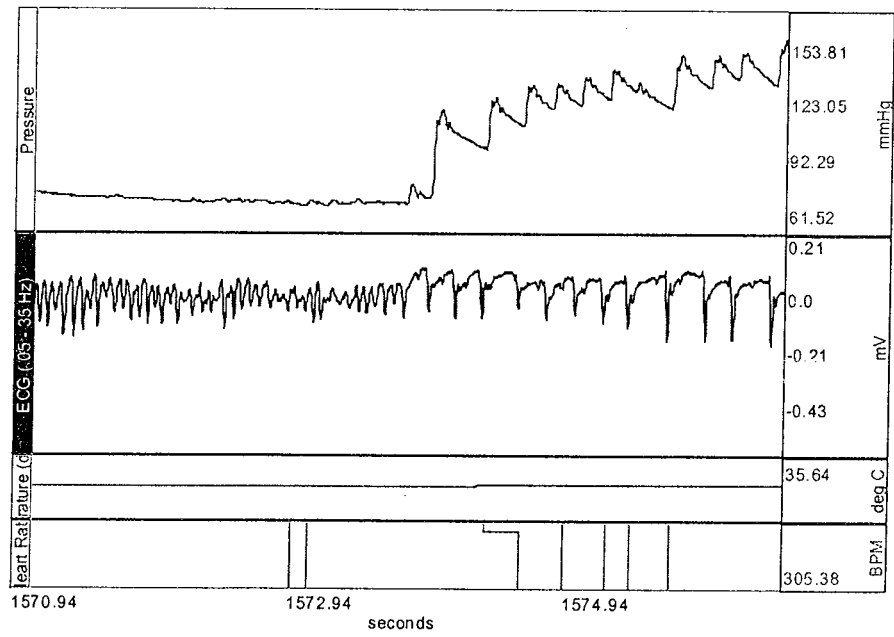
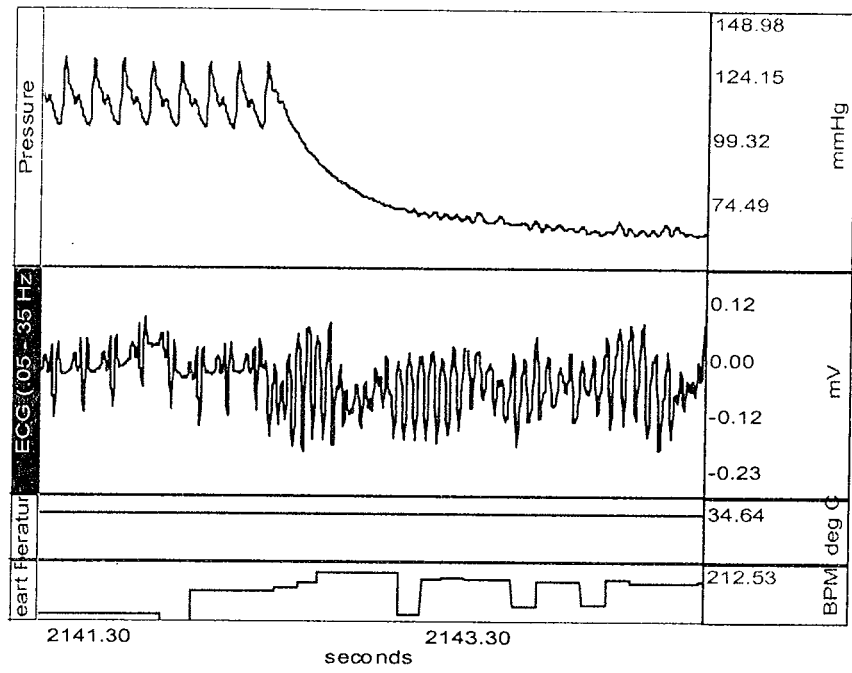
0. Gözlemlenen periyotta 0-50 arasında VEA olması, VT ve VF'ye rastlanmaması.
1. 50-500 arasında VEA olması.
2. 500'ün üzerinde VEA olması ve/veya bir kez spontan olarak sinüs ritmine dönen VT veya VF olması.
3. Spontan olarak sinüs ritmine dönen VT ve/veya VF atakları sayısının 2-30 arasında olması.
4. Spontan olarak sinüs ritmine dönen VT ve/veya VF atakları sayısının 30'un üzerinde olması.
5. İrreversibl VF görülmesi.



Şekil 12. Orijinal VEA kayıt görüntüleri.



Şekil 13. Orijinal VT kayıt görüntüleri.



Şekil 14. Orijinal VF kayıt görüntüleri.

### 3.2.5. Biyokimyasal analizler

DeneySEL protokollerin bitiminin ardından sağ ventrikülden kan örneği alınmıştır. Bu örnekler bekletilmeden 4°C’de, 5000 rpm’de, 15 dk süre ile santrifüj edilmiş, plazmaları ayrılmış ve -40°C’de saklanmıştır.

#### *Laktat ölçümü*

Laktat ölçümü için, kan örnekleri sodyum florid/potasyum oksalat içeren tüplere alınarak santrifüj edilmiştir. Plazma laktat konsantrasyonu ölçümü, Vitros LAC Kiti (Ortho-Clinical Diagnostics, Rochester, A.B.D.) kullanılarak Üniversitemiz Biyokimya Anabilim dalında yapılmıştır. Burada ölçülebilen en düşük plazma laktat düzeyi 0.5 mmol/L’dir.

#### *Kardiyak troponin T ölçümü*

Plazma kardiyak troponin T seviyesi ölçümü Elecsys Troponin T Kiti (Roche Diagnostics, Mannheim, Almanya) ile, Elecsys 2010 immunoanalyzer sistemi kullanılarak Üniversitemiz Biyokimya Anabilim dalında ölçülmüştür. Bu ölçüm kardiyak troponin-T için spesifik monoklonal antikolar kullanılarak, immünoassay yöntemlerle otomatik olarak yapılmıştır. Bu yöntemde ölçülebilir en düşük plazma kardiyak troponin-T düzeyi 0,01 ng/ml’dir.

#### *Kreatin kinaz MB (CK-MB) aktivitesi ölçümü*

Plazma CK-MB aktivitesi ölçümü otoanalizer sistem kullanılarak (Roche Hitachi Modular DP Systems, Mannheim, Almanya), CK-MB Kit (Roche Diagnostics, Mannheim, Almanya) ile Üniversitemiz Biyokimya Anabilim dalında yapılmıştır. Bu yöntemle ölçülebilir en düşük CK-MB aktivitesi düzeyi 5 U/L’dir.

#### *Malondialdehit (MDA) ölçümü*

Plazma MDA düzeyi ölçümü daha önce belirtilen yöntemle ölçülmüştür (237). MDA oluşumu, thiobarbitürik asitle reaksiyona giren maddelerin (TBARS) ölçümü ile değerlendirilmiştir. (% 8.1) sodyum dodesil sülfat 0.2 ml, % 20’lik asetik asit solüsyonundan 1.5 ml, % 0.8 TBA (pH:3.5)’dan 1.5 ml, 90 mM butillenmiş hidroksitoluenden 0.1 ml, (in vitro TBARS oluşumunu önlemek için) (238) ve 0.6 ml

distile su eklenmesiyle; n-butanol ve piridin içine ekstrakte edilen bir kromojenik ürün elde edildi. Organik tabaka uzaklaştırıldı ve MDA spektrofotometrede 532 nm'de okundu ve sonuçlar nmol/ml olarak gösterildi. TBARS'ın miktarı; 1,1,3,3-tetramethoksiopropan standardı kullanılarak MDA eşdeğeri olarak hesaplandı.

### 3.2.6. Risk altındaki kardiyak alan ve infarkt bölgesinin tayini

Kan örneği alındıktan sonra, ligatür kontrol edilerek tekrar sıkıştırılmış ve ardından juguler venden 2 ml Evans mavisi verilerek perfüze olan myokard alanı (iskemik olmayan bölge) ile perfüze olmayan myokard alanı (risk alanı) ayırt edilmiştir (230). Risk alanı dışındaki alanlar tamamen Evans mavisi ile boyanmıştır.

Boyama işlemi sonrası kalp atriyumlar ve büyük damar yapıları olmadan atriyoventriküler birleşim noktasından kesilerek çıkartılmıştır. Total kalp ağırlığı ölçüldükten sonra sol ventrikül serbest duvarı kesilerek çıkarılmış ve ağırlık ölçümü yapılmıştır. Sol ventrikül apeksten başlayarak atriyoventriküler hatta paralel olacak şekilde 3 mm'lik eşit parçalara bölünmüş ve risk alanı ile iskemik olmayan alan ayrıştırılarak ağırlıkları ölçülmüştür. Risk alanı %1'lik TTC boyasında 20 dk süre ile 37°C'de bekletilmiştir. TTC boyası dokuda dehidrogenaz enzimi ile reaksiyona girerek çökelti halinde birikim göstermektedir, bu reaksiyonun sonunda myokard dokusu tuğla kırmızısı rengini almaktadır. Myokardiyal infarkt bölgelerinde dehidrogenaz enzim düzeyi düşük olduğu için TTC'nin reaksiyona girmesi ve dokuda çökmesi azalmaktadır, bu yüzden boyanma göstermeyen bu bölgeler açık sarı renkte göze çarpar ve nekrotik alan olarak değerlendirilir. TTC boyasından çıkartılan doku örneklerinde nekrotik olan ve nekrotik olmayan alanlar ayrıştırılmış ve nekrotik olan alanların ağırlık ölçümü yapılmıştır.

## 4. BULGULAR

### 4.1. Hemodinamik

Bütün deney gruplarının ortalama arteriyel kan basıncı ve kalp atım hızları sırası ile Tablo 1 ve 2'de özetlenmiştir. İskemik önkoşullamanın 5 dakika iskemi döneminde ortalama arteriyel kan basıncında anlamlı derecede azalma oluştu ve 5 dakika reperfüzyon döneminde bu azalma düzeldi ve yaklaşık olarak bazal değerlere ulaştı. Trimetazidin ortalama arteriyel kan basıncında ve kalp atım hızında önemli değişikliklere neden olmadı. Karbakol infüzyonu ile ortalama arteriyel kan basıncında ve kalp atım hızında anlamlı derecede azalma meydana geldi, karbakol uygulanan grubun dışındaki diğer gruplarda kalp atım hızında anlamlı değişikliklere rastlanmadı (Tablo 2).

### 4.2. İskemi aritmileri

Anesteziye sıçanlarda, iskemik önkoşullamanın anlamlı derecede antiaritmik etki meydana getirdiği gözlemlendi (Tablo 3). 5 dakika iskemi ile önkoşullanan bu kalplerde 30 dakikalık uzun iskemi döneminde aritmilerde azalma olduğu gözlemlendi. İskemik önkoşullama grubunda toplam VEA sayısı ( $36 \pm 10$ ,  $n=24$ ,  $P<0,05$ ) kontrol grubu değerlerine göre ( $622 \pm 143$ ,  $n=27$ ) anlamlı derecede azaldı. İskemik önkoşullama grubunda VT insidansı (%100,  $n=27$  kontrol, %25,  $n=24$  iskemik önkoşullama,  $P<0,05$ ) anlamlı derecede azaldı ve VF ise tamamen önlendi.

Karbakol infüzyonu ile şiddetli aritmilerde azalma gözlemlendi ancak bu azalma istatistiksel olarak anlamlı değildi.



Trimetazdin ise VT ve VF insidansını ve toplam VEA sayısını azaltmasına karşın bu azalma istatistiksel olarak anlamlı değildi. Trimetazidin uygulamasının iskemik önkoşullamaya oranla aritmileri azaltmada daha az potent olduğu görülmektedir (Tablo 3).

**Tablo 1.** Anesteziye sıçanlarda yapılan deney gruplarında ölçülen ortalama arteriyel kan basıncı (mm Hg) değerleri.

	n	Stabilizasyon#	i.v. bolus trimetazidin		Önkoşullama ve ilaç infüzyonu		Reperfüzyon ve ilaçsız dönem		İskemi	
			1 min	20 min	1 min	5 min	1 min	5 min	1 min	30 min
Kontrol	27	138±5	-	-	-	-	-	-	108±5*	94±5*
T (10 mg/kg)	10	151±6	154±7	142±9	-	-	-	-	122±9	105±14*
IP	24	134±4	-	-	108±3*	101±4*	118±3*	124±3	103±4*	97±4*
T (10 mg/kg) + IP	10	157±5	158±5	153±5 <sup>+</sup>	138±5	134±7	132±6	138±6	127±6*	111±10*
CP	9	145±5	-	-	113±8*	103±7*	109±8*	113±5*	98±6*	87±6*
T (10 mg/kg) + CP	10	144±4	146±3	142±4 <sup>+</sup>	143±4	128±4	131±4	132±3	123±4*	106±6*
T inf (2 mg/kg/dk 5 dk süreyle)	10	139±6	-	-	137±6	135±6	134±6	134±6	121±4	103±8*

# İskemi veya ilaç uygulamasından 5 dk önce, <sup>+</sup> i.v. bolus trimetazidin uygulamasından 10 dk sonra, \*P<0.05 stabilizasyon dönemi değerleriyle karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı. n; deney hayvanı sayısı, T; trimetazidin, IP; iskemik önkoşullama, CP; karbakol önkoşullaması, T inf; trimetazidin infüzyonu.

**Tablo 2.** Anesteziye sıçanlarda yapılan deney gruplarında ölçülen kalp atım hızı (atım/dk) değerleri.

	n	Stabilizasyon#	i.v. bolus trimetazidin		Önkoşullama ve ilaç infüzyonu			Reperfüzyon ve ilaçsız dönem			İskemi	
			1 min	20 min	1 min	5 min	1 min	5 min	1 min	5 min	1 min	30 min
Kontrol	27	387±9	-	-	-	-	-	-	-	377±12	374±15	
T (10 mg/kg)	10	357±12	349±18	354±10	-	-	-	-	-	348±11	338±23	
IP	24	382±9	-	-	371±7	364±13	377±9	379±7	388±8	365±15		
T (10 mg/kg) + IP	10	351±12	340±20	353±18 <sup>†</sup>	355±22	354±12	377±22	359±11	357±11	362±20		
CP	9	396±10	-	-	368±11	206±18*	218±22*	299±13*	283±23*	303±29*		
T (10 mg/kg) + CP	10	353±8	313±11	348±12 <sup>†</sup>	351±13	213±17*	225±16*	279±16*	266±14*	236±30*		
T inf (2 mg/kg/dk 5 dk süreyle)	10	367±10	-	-	368±11	371±11	360±12	373±12	372±12	362±22		

# İskemi veya ilaç uygulamasından 5 dk önce, <sup>†</sup> i.v. bolus trimetazidin uygulamasından 10 dk sonra, \*P<0.05 stabilizasyon dönemi değerleriyle karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı. n; deney hayvanı sayısı, T; trimetazidin, IP; iskemik önkoşullama, CP; karbakol önkoşullaması, T inf; trimetazidin infüzyonu.

Tablo 3. Anesteziye sıçanlarda yapılan deney gruplarında oluşan aritmiler.

	n	Total Ventriküler Ektopik Atım (VEA) Sayısı	% Ventriküler Taşikardi (VT)	% Total Ventriküler Fibrilasyon (VF)	% İrreversibl VF
Kontrol	27	622±143 (27)	100 (27)	40.7 (11)	11.1 (3)
T (10 mg/kg)	10	283±161 (10)	50.0 (5)	10 (1)	0 (0)
IP	24	36±10* (19)	25.0* (6)	0* (0)	0 (0)
T (10 mg/kg) + IP	10	18±5* (10)	20.0* (2)	0* (0)	0 (0)
CP	9	289±161 (9)	66.7 (6)	11.1 (1)	0 (0)
T (10 mg/kg) + CP	10	252±65 (10)	60 (6)	0* (0)	0 (0)
T inf (2 mg/kg/dk 5 dk süreyle)	10	171±105 (9)	30.0 (3)	0* (0)	0 (0)

\*P<0.05 kontrol grubuyla karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı. Aritmi görülen hayvan sayısı parantez içinde belirtilmiştir. n; deney hayvanı sayısı, T; trimetazidin, IP; iskemik önkoşullama, CP; karbakol önkoşullaması, T inf; trimetazidin infüzyonu.

Trimetazidinin iskemik önkoşullama benzeri etki yapıp yapmadığını test edebilmek için 30 dakikalık iskemi öncesi 5 dakika süre ile infüzyon şeklinde uygulandı. Trimetazidin infüzyonu toplam VEA sayısını ( $171 \pm 105$ ,  $n=9$ ) ve VT insidansını (%30,  $n=3$ ) azalttı ve VF'yi ise tamamen önledi.

Trimetazidin + karbakol önkoşullaması grubunda da VF gözlenmedi.

İskemik önkoşullama, karbakol önkoşullaması ve trimetazidin gruplarında ilk aritmi çıkma süresi, VT ve VF süreleri ve aritmi skorları üzerine etkileri Tablo 4'te gösterilmiştir.

Trimetazidin + iskemik önkoşullama ve trimetazidin + karbakol önkoşullaması gruplarında ilk aritmi çıkma süresinin anlamlı derecede uzadığı saptandı ancak diğer gruplarda anlamlı bir değişiklik gözlenmedi. Bununla birlikte VT süreleri açısından anlamlı bir değişiklik saptanmadı, VF süresi ise iskemik önkoşullama, karbakol önkoşullaması ve trimetazidin uygulanan gruplarda anlamlı derecede azaldı.

Aritmi skorları açısından da kontrol grubu dışındaki tüm gruplarda anlamlı derecede azalma gözlemlendi. Aritmi skorlarında en büyük azalma iskemik önkoşullama ve trimetazidin + iskemik önkoşullama gruplarında gözlemlendi. Trimetazidin ve karbakolun tek başına uygulandığı gruplarda, aritmi skorlarında görülen azalma trimetazidin + karbakol önkoşullaması grubuna göre daha fazla olduğu saptandı (Tablo 4).

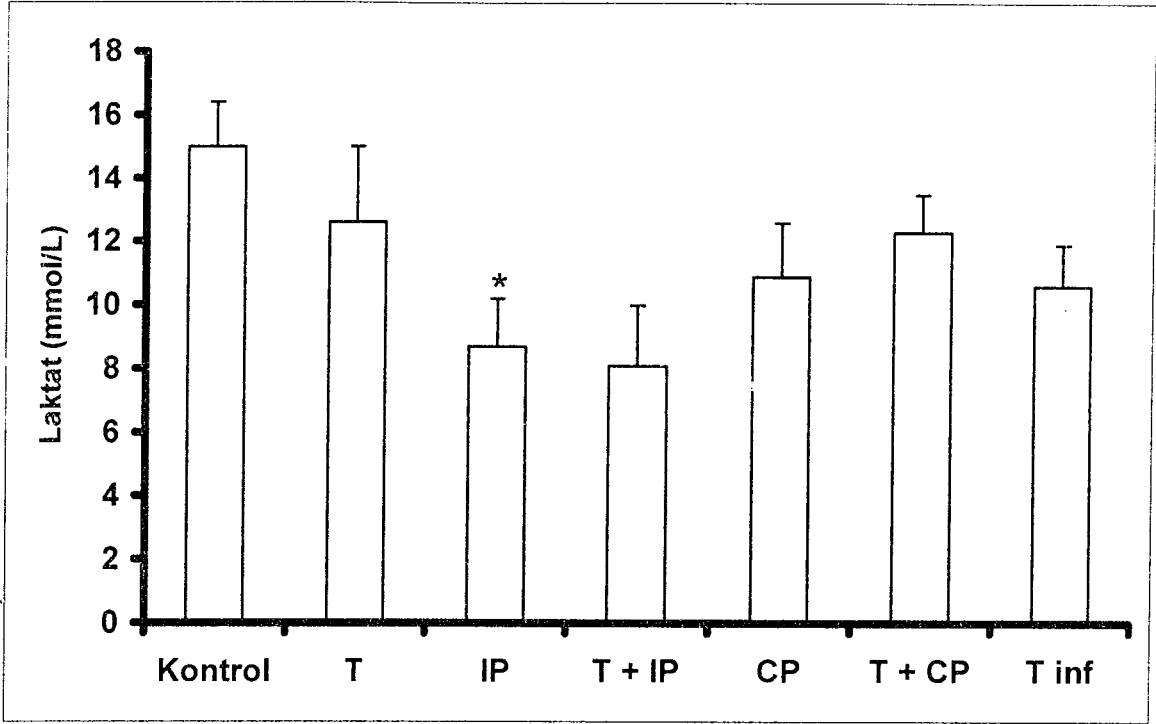
**Tablo 4.** Anesteziye sıçanlarda yapılan deney gruplarında oluşan aritmi süreleri ve aritmi skoru.

	n	İlk aritmi başlama zamanı (s)	VT süresi (s)	VF süresi (s)	Aritmi skoru
Kontrol	27	49.2±16.1	72.7±18.7	20.7±4.3	3.3±0.1
T (10 mg/kg)	10	237.0±55.9	50.8±42.9	4*	1.7±0.4*
IP	24	135.6±36.8	7.8±4.3	0*	0.6±0.2*
T (10 mg/kg) + IP	10	511.9±117.4* <sup>†</sup>	3.0±1.0	0*	0.5±0.3*
CP	9	32.4±12.7	35.4±20.4	37*	2.1±0.4*
T (10 mg/kg) + CP	10	286.8±65.2* <sup>‡</sup>	26.8±5.5	0*	2.2±0.3*
T inf (2 mg/kg/dk 5 dk süreyle)	10	240.6±70.2	49.0±43.0	0*	1.1±0.4*

\*P<0.05 kontrol grubuyla karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı. <sup>†</sup>P<0.05 iskemik önkoşullama grubuyla karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı. <sup>‡</sup>P<0.05 karbakol önkoşullaması grubuyla karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı. n; deney hayvanı sayısı, T; trimetazidin, IP; iskemik önkoşullama, CP; karbakol önkoşullaması, T inf; trimetazidin infüzyonu.

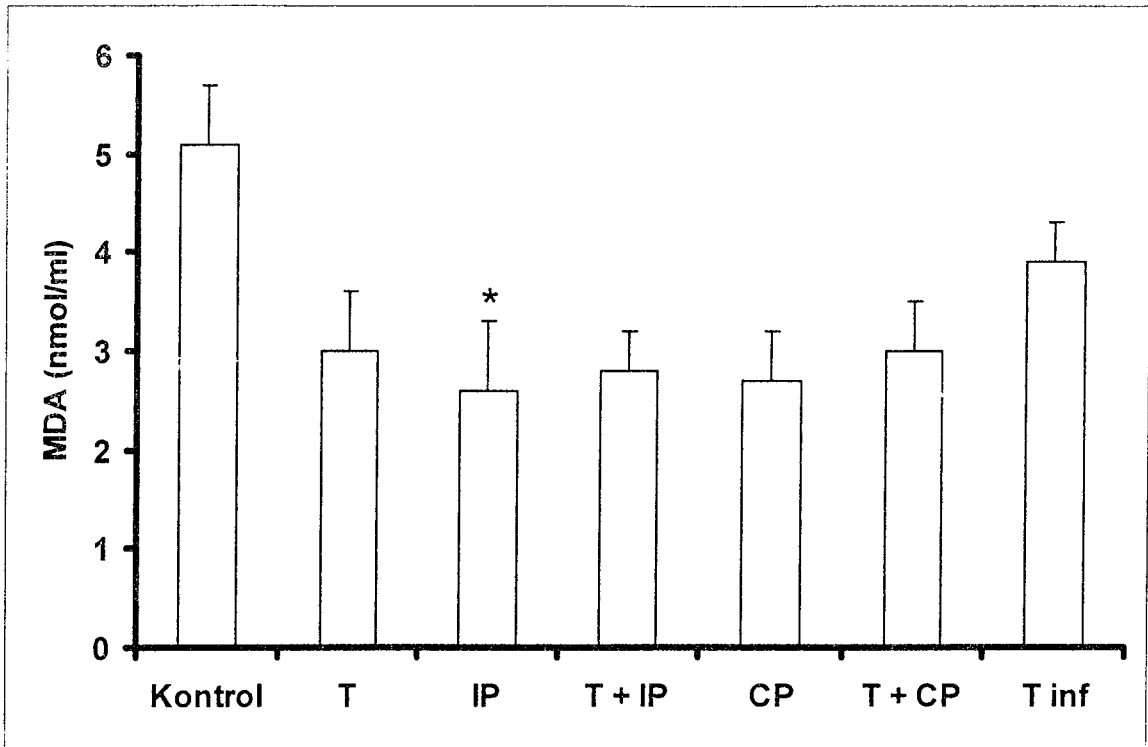
### 4.3. Biyokimyasal analizler

İskemik önkoşullama grubunda laktat ve MDA düzeylerinde anlamlı derecede azalma saptandı. Trimetazidin + iskemik önkoşullama grubunda da laktat ve MDA düzeylerinde azalma olmasına rağmen bu azalma istatistiksel olarak anlamlı değildi. Diğer gruplarda ise laktat ve MDA düzeylerinde anlamlı değişikliklere rastlanmadı. Bütün gruplarda troponin T düzeylerinde azalma eğilimi gözlemlendi fakat bu azalma istatistiksel olarak anlamlı değildi. Bütün gruplarda CK-MB düzeylerinde kontrol grubu değerlerine oranla herhangi bir fark gözlenmedi. (Şekil 15-18)

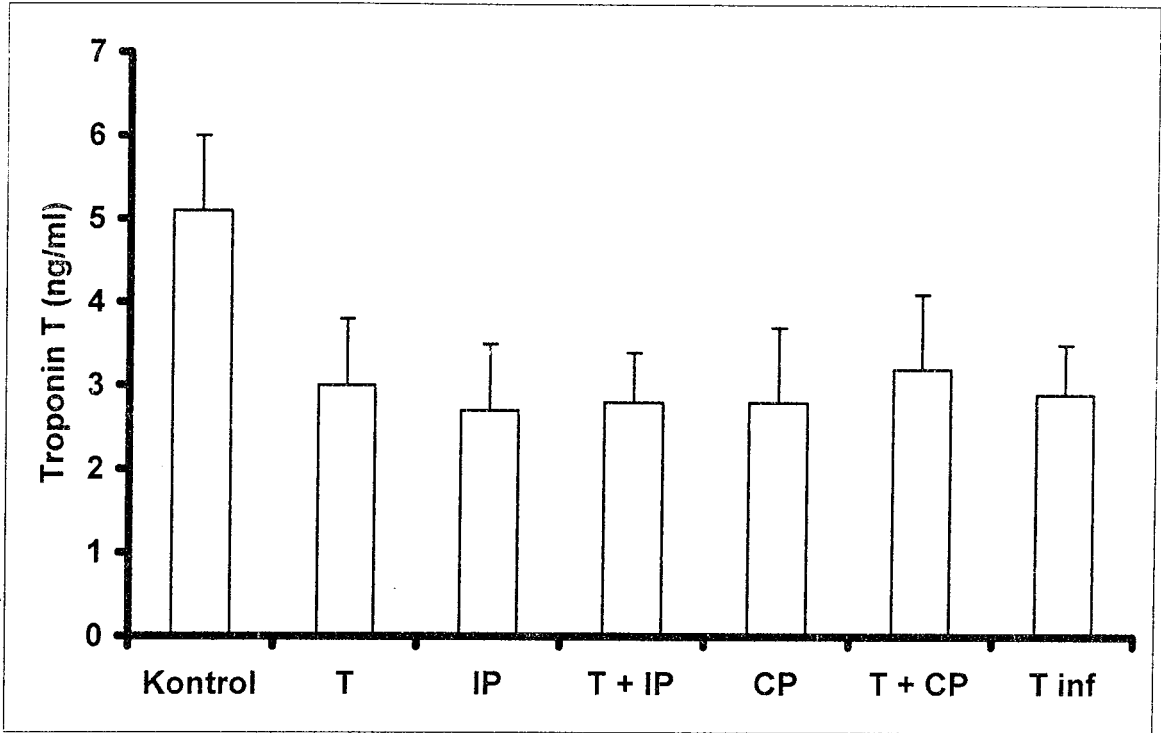


Şekil 15. Anesteziye sıçanlarda yapılan deney gruplarında plazma laktat seviyelerine trimetazidinin etkisi. Sonuçlar ortalama  $\pm$  ortalamanın standart hatası olarak verilmiştir, n=9-27. \*P<0.05 kontrol grubuyla karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı. <sup>†</sup>P<0.05 iskemik önkoşullama grubuyla karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı. n; deney hayvanı sayısı, T; trimetazidin, IP; iskemik önkoşullama, CP; karbakol önkoşullaması, T inf; trimetazidin infüzyonu.

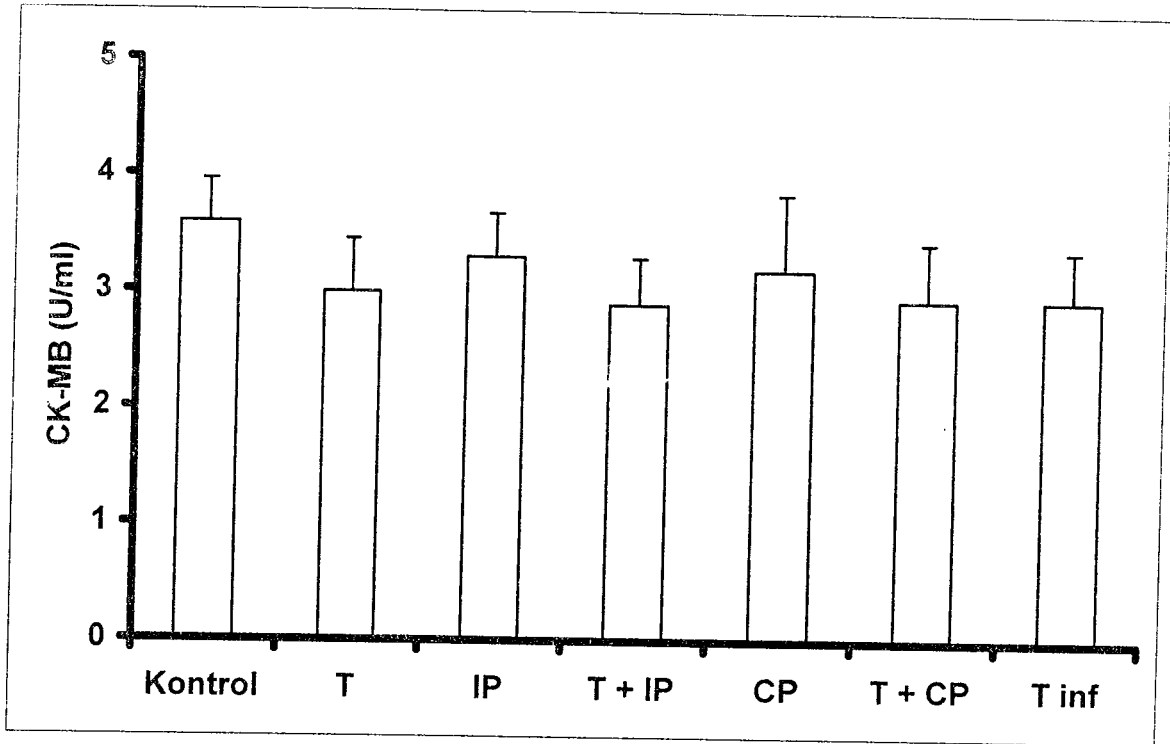




Şekil 16. Anesteziye sıçanlarda yapılan deney gruplarında plazma MDA seviyelerine trimetazidinin etkisi. Sonuçlar ortalama  $\pm$  ortalamanın standart hatası olarak verilmiştir, n=9-27. \*P<0.05 kontrol grubuyla karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı. <sup>+</sup>P<0.05 iskemik önkoşullama grubuyla karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı. n; deney hayvanı sayısı, T; trimetazidin, IP; iskemik önkoşullama, CP; karbakol önkoşullaması, T inf; trimetazidin infüzyonu.



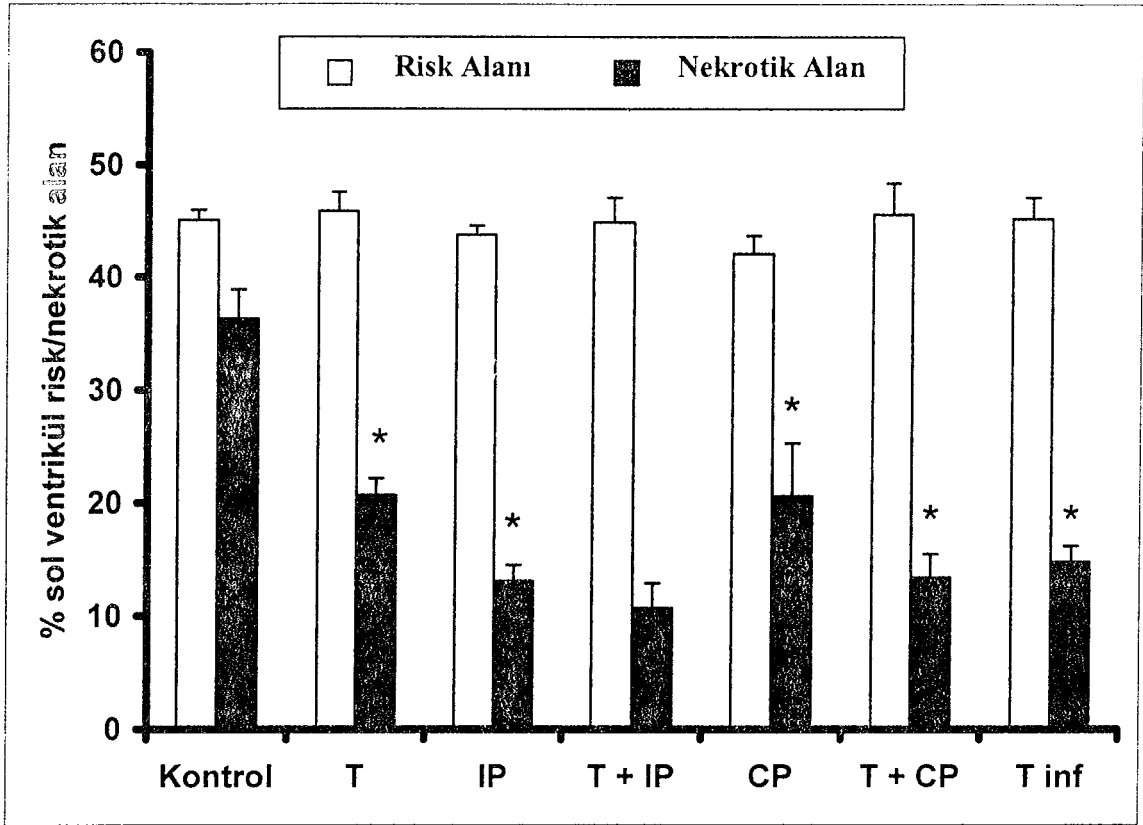
Şekil 17. Anesteziye sıçanlarda yapılan deney gruplarında plazma troponin T seviyelerine trimetazidinin etkisi. Sonuçlar ortalalama  $\pm$  ortalamanın standart hatası olarak verilmiştir, n=9-27. \*P<0.05 kontrol grubuyla karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı. <sup>†</sup>P<0.05 iskemik önkoşullama grubuyla karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı. n; deney hayvanı sayısı, T; trimetazidin, IP; iskemik önkoşullama, CP; karbakol önkoşullaması, T inf; trimetazidin infüzyonu.



Şekil 18. Anesteziye sıçanlarda yapılan deney gruplarında plazma CK-MB seviyelerine trimetazidinin etkisi. Sonuçlar ortalama  $\pm$  ortalamanın standart hatası olarak verilmiştir, n=9-27. \*P<0.05 kontrol grubuyla karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı. <sup>†</sup>P<0.05 iskemik önkoşullama grubuyla karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı. n; deney hayvanı sayısı, T; trimetazidin, IP; iskemik önkoşullama, CP; karbakol önkoşullaması, T inf; trimetazidin infüzyonu.

#### 4.4. Risk alanı ve infarkt bölgesi

Bütün gruplarda 30 dk iskeminin ardından yapılan 30 dk reperfüzyon sonrası risk alanı ve infarkt bölgesi değerlendirmeleri yapılmıştır. Gruplar arasında sol ventrikül risk alanında önemli bir fark gözlenmedi. İskemik önkoşullama, karbakol önkoşullaması ve trimetazidin gruplarında nekrotik alan büyüklüğünde anlamlı azalma olduğu saptandı. Trimetazidin, iskemik önkoşullama ve karbakol önkoşullamasının kardiyoprotektif etkilerine benzer potansiyele sahiptir. Trimetazidin infüzyonu yapılan grupta karbakol infüzyonunu yapılan gruba oranla nekrotik alanın daha küçük olduğu tespit edildi (Şekil 19).



Şekil 19. Anesteziye sıçanlarda yapılan deney gruplarında trimetazidinin risk alanı ve infarkt bölgesi üzerine etkisi. Risk alanının total sol ventriküle oranı ( risk alanı/total sol ventrikül  $\times$  100) ve nekrotik alanın risk alanına oranı (nekrotik alan/ risk alanı  $\times$  100) yüzde ağırlık olarak hesaplanmıştır. Sonuçlar ortalalama  $\pm$  ortalamasının standart hatası olarak verilmiştir, n=9-27. \*P<0.05 kontrol grubuyla karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı. †P<0.05 iskemik önkoşullama grubuyla karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı. n; deney hayvanı sayısı, T; trimetazidin, IP; iskemik önkoşullama, CP; karbakol önkoşullaması, T inf; trimetazidin infüzyonu.

## 5. TARTIŞMA

Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar; trimetazidinin anestezide sıçanlarda kalbi iskemik hasara karşı koruduğunu ve koroner arter oklüzyonu ile oluşan aritmilere karşı antiaritmik etkinlik gösterdiğini ortaya koymuştur. Trimetazidinin kalp atım hızında ve ortalama arteriyel kan basıncında değişikliğe neden olmadığı gözlemlendi. Deneylerde elde ettiğimiz bulgular trimetazidinin; karbokol önkoşullaması ve iskemik önkoşullamayı inhibe etmediğini, ayrıca kendisinde önkoşullama oluşturabileceğini göstermektedir. Bizim çalışmamızda trimetazidin aritmi ve infarkt bölgesi yanında biyokimyasal parametrelerde de azalma oluşturdu.

Trimetazidinin önkoşullamaya etkileri üzerine yayınlanan sınırlı sayıda çalışma vardır. Bu çalışmalardan birinde antiiskemik ajan olan trimetazidin, Langerdorff ile perfüze izole sıçan kalplerinde nekrotik alan üzerine iskemik önkoşullamanın koruyucu etkisini azaltmış, mitokondriyal fonksiyonları koruduğu bilinen ajanlarla elde edilen korumayı ise tamamen ortadan kaldırmıştır (228). Diğer bir çalışmada anginası olan hastalara oral olarak trimetazidin verilmesinin ardından plazma adenosin seviyesinde anlamlı olarak artış olduğu saptanmıştır (12). Biz anestezide sıçanlarda trimetazidinin karbokol önkoşullamasının ve iskemik önkoşullamanın kardiyoprotektif etkilerini azaltmadığını ve önkoşullamayı taklit eden bir ajan gibi fonksiyon gördüğünü gözlemledik. Bu çalışmanın sonuçları Minners ve arkadaşlarının (228) kısa süreli olarak verdikleri DNP, CSA ve adenosinin iskemik önkoşullamaya benzer şekilde infarkt alanında azalma oluşturduğu ve trimetazidinde iskemik önkoşullamanın koruyucu etkisini azaltırken DNP, CSA ve adenosinin izole sıçan kalplerindeki infarkt alanını azaltıcı etkilerini tamamen ortadan kaldırdığı bulguları ile uyum göstermemektedir. Bu karşıt bulguların nedeni belirli değildir, fakat kullanılan teknikler farklılıklar içermektedir, örneğin Minners ve arkadaşları (228) çalışmalarını izole sıçan kalplerinde yapmalarına karşın bizim çalışmamızda anestezide sıçanlar kullanılmıştır. Bununla birlikte bizim sonuçlarımız Blardi ve

arkadaşlarının (12) yaptıkları çalışmada adenozin salıverilmesinin, trimetazidinin kardiyoprotektif etkilerinin en azından bir kısmına aracılık ettiği rapor edilmiştir. Bizim sonuçlarımız Drake-Holland (200) ve Noble ve arkadaşlarının (239) çalışmaları ile uyuşmaktadır, bu araştırmacılar tavşanlarda yapmış oldukları çalışmalarda 3 mg/kg dozunda trimetazidin önuygulaması ile myokardiyal infarkt bölgesinin boyutlarında azalma olduğunu bildirmişlerdir. Buna ek olarak bizim sonuçlarımız, trimetazidin akut uygulaması ile sıçan kalplerinde iskemi esnasında bozulan kontraktıl fonksiyonların düzeldiğini gösteren çalışmaları desteklemektedir (240, 241).

Bizim çalışmamızda trimetazidin uygulaması ile kalp atım hızında ve ortalama arteryel kan basıncında önemli değişikliklere rastlamadık, bu bulgu trimetazidinin hemodinamik etkilerinin olmadığını gösteren daha önceki çalışmaları desteklemektedir (195). İzole kalp çalışmalarında trimetazidinin kalp atım hızı, kontraktılite ve koroner kan akımına etki etmediği bildirilmiştir, bizim sonuçlarımız *in vitro* çalışmalarda elde edilen bu bulgular ile uyuşmaktadır (195, 199, 212).

Bu çalışmada trimetazidinin önkoşullama esnasında antiaritmik etkileri ilk kez tanımlanmıştır. Trimetazidin varlığında karbakol önkoşullaması ve iskemik önkoşullamanın antiaritmik etkileri korunmuştur.

İskemi esnasında myokardiyal bölgelerde görülen kontraktıl fonksiyon kaybının, hücre içinde laktat ve proton miktarındaki artışa bağlı olarak pH azalması ile ilişkili olduğu görülmektedir. İskemide kardiyak etkinlik azalır, çünkü kontraktıl fonksiyonların devamlılığı ve hücre içi iyon homeostazisinin sürdürülebilmesi için yeterli ATP desteği sağlanamamaktadır. Bunun dışında biriken uzun zincirli yağ asitleri  $\beta$ -oksidasyon ürünlerinin iskemi esnasında aritmi eşiğini azalttığı daha önceki çalışmalarda gösterilmiştir (242). Plazmada esterleşmemiş yağ asitleri seviyesinin düşürülmesi, myokardiyal yağ asidi uptake ve oksidasyonunun azaltılması ile egzersiz anginası ve AMI esnasında oluşan ventriküler aritmi ve iskemik hasarın azaldığı gösterilmiştir (243-245).

*In vitro* iskemi modellerinde (246) yapılan çalışmalarda trimetazidinin kardiyoprotektif olduğu ve tavşan kalplerinde koroner arter oklüzyonu esnasında oluşan ST segment elevasyonunu azalttığı gösterilmiştir (247).

Anesteziye sıçanlarda trimetazidin 10 mg/kg dozunda koroner arter oklüzyon-reperfüzyon aritmi modelinde daha önce test edilmiştir (233). Bu yüzden biz deneylerimizde trimetazidini 10 mg/kg olarak tek doz halinde kullandık ve bu yüksek dozda infarkt bölgesi büyüklüğünde ve aritmilerde azalma saptadık. Bizim sonuçlarımız köpeklerde halotan-adrenalin aritmilerine karşı 10 mg/kg dozunda kullanılan trimetazidinin etkili olduğunu gösteren çalışmanın bulgularını desteklemektedir (232).

Kardiyoprotektif etkileri bilinmesine rağmen trimetazidinin etki mekanizması tamamen açıklanamamıştır. Trimetazidin etkisiyle sistemik ve koroner hemodinamide tespit edilebilir bir değişiklik şu ana kadar gözlenmemiştir. Trimetazidinin iskemik myokardiyumdaki etkisi muhtemelen hücresel düzeyde direkt sitoprotektif etkisine bağlıdır. Trimetazidinin hücre içi ATP içeriğinin azalmasını sınırlamak (240, 248, 249), hücre içi  $\text{Na}^+$  ve  $\text{Ca}^{+2}$  birikimini ve asidozisi önlemek suretiyle kardiyoprotektif etki gösterdiği rapor edilmiştir (212, 250, 251). Trimetazidinin diğer etkileri arasında antioksidan aktivite gösterdiği (252, 253), nötrofil birikimini inhibe ettiği (205) ve hücre membranını stabilize ettiği bildirilmiştir (254).

Trimetazidinin mitokondriyal uzun zincirli 3-KAT enziminin inhibisyonu suretiyle etki ettiği ileri sürülmüştür, bu enzimin inhibisyonu sonucunda yağ asidi  $\beta$ -oksidasyonu inhibe olurken glukoz oksidasyonuna yönelimde artış olmaktadır (255). Bununla birlikte trimetazidinin tanımlanan özellikleri arasında glikolitik yoldan bağımsız olarak iskemik kontraksiyonları inhibe etmesi (199), kardiyak  $\text{Na}^+$  akımına (256), fosfolipid sentez ve yapım-yıkımına direkt etki etmesi (208, 209), karnitin palmitoil transferaz-1 (CPT-1)'i zayıf olarak inhibe etmesi (257), adenozinin plazma düzeyini artırması (12), mitokondriyal solunum zincirinde kompleks-1'in aktivasyonunu artırması (258) ve mitokondriyal permeabilite porlarındaki (PTP) bağlanma bölgelerine yapışması (259) gibi etkiler sayılabilir. Ancak bu etkilerin trimetazidinin kardiyoprotektif özelliğine hangi mekanizmalar ile katkıda bulunduğu tam olarak açıklanamamıştır.

Mitokondriyal PTP'ler fonksiyonel  $\text{Ca}^{+2}$ , voltaj, pH, redoks geçişi ve CSA duyarlı kanalları içerir. Bu kanallar muhtemelen mitokondrinin iç ve dış membranı arasında yerleşmişlerdir. PTP esas olarak iskemi-reperfüzyon durumlarında, oksidatif stres ve  $\text{Ca}^{+2}$  birikiminde, ATP ve ADP'de azalma olduğunda ve fosfat konsantrasyonu arttığında açılır.



CSA, PTP'nin potent bir inhibitörüdür, iskemi-reperfüzyon hasarına karşı hücrel koruma meydana getirir (260). PTP iskemi-reperfüzyon esnasında hücrel hasara katkıda bulunmaktadır. Hücre ölümüne karşı korumada PTP inhibisyonu uygun bir farmakolojik hedef oluşturmaktadır. Son zamanlarda PTP'nin iskemik önkoşullamada son efektör olabileceği ve PTP açılmasının inhibe edilmesiyle myokardiyumun iskemik önkoşullamadaki gibi korunabileceği ileri sürülmüştür (261, 262). Trimetazidinin kardiyoprotektif etki mekanizması PTP'nin direkt olarak inhibisyonu ile ilişkili olabilir. Son zamanlarda [<sup>3</sup>H]trimetazidinin PTP'nin regülasyonunda görevli olan bölgelere düşük affinite ile bağlandığı bildirilmiştir (259, 263). Trimetazidinin mitokondriyal PTP kapalı iken mitokondriyal Ca<sup>+2</sup> akımından ve porlar açık iken kapanmasının indüklenmesi olmak üzere, mitokondriyal fonksiyonlar üzerine en azından iki farklı yol ile etki ettiği belirlenmiştir (259). Ca<sup>+2</sup>'nin yer değiştirmesi sonucu trimetazidin mitokondriyal PTP'nin açılmasını inhibe etmektedir (263, 264). Bunun sonucunda trimetazidinin etki mekanizması açık PTP'nin inhibisyonu ile iskemi-reperfüzyon hasarına karşı mitokondride koruma oluşturması şeklindedir.

Trimetazidin iskemiyeye bağlı oluşan hücre içi asidozisi, Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> değiş-tokuş aktivitesini azaltarak ve belkide Na<sup>+</sup> bağımlı diğer pH kontrol mekanizmalarını etkileyerek önlemektedir. Bu önkoşullamaya da yardım edebilir, çünkü kardiyak önkoşullamada Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> değiş-tokuşunun inhibe olduğu gösterilmiştir (265). Çeşitli verilerde trimetazidinin hücre içi Na<sup>+</sup> ve Ca<sup>+2</sup> birikimini ventriküler myosit düzeyinde azalttığı ve kardiyak hücrelerde H<sup>+</sup> birikimine karşı koruyucu özellik gösterdiği bildirilmiştir (212, 250).

Bu çalışmada troponin T düzeylerinde azalma yönünde bir eğilim gözlemlendi, fakat bu değişiklikler istatistiksel olarak anlamlı düzeye erişemedi. Bu, deney süremizin bu göstergelerde değişiklik meydana getirecek kadar uzun olmaması ile ilişkili olabilir, zira troponin T seviyesi myokardiyal hasarın başlangıcından birkaç saat sonra artmaya başlar ve birkaç gün boyunca yüksek seyreder (266). Fabiani ve arkadaşları (267) CABG geçiren hastalarda myoglobin, CK-MB ve MDA düzeyleri ile hemodinamik değişiklikleri ölçerek trimetazidinin kardiyoprotektif etkilerini araştırmışlardır. Bu çalışmada elde edilen bulgulara dayanarak trimetazidin ön uygulamasının kardiyoprotektif etkili olduğunu ancak postoperatif hemodinamiğin düzelmesine katkı sağlamadığını öne sürmüşlerdir. Tünerir ve arkadaşları (268) CABG geçiren hastalarda plaseboya oranla trimetazidin önuygulaması

yapılan hastalarda kardiyak troponin T düzeyinde anlamlı bir azalma olduğunu bildirmişlerdir.

Trimetazidin geçiş metalleri şelasyon özelliğinden dolayı etkileyebilmektedir. Bu özelliği onun lipid bariyerlerine nüfuz etme kapasitesini etkilemekle birlikte redoks aktif geçiş metalleri bağlanmasına ve inaktive olmasına neden olmaktadır, bu redoks aktif geçiş metalleri; sol inen koroner arter ve hücre zarında bulunan lipidlerle beraberdir (269). Her ne kadar trimetazidin nütrofil üzerine direkt etkisi bilinmiyorsa da Williams ve arkadaşları tavşanlarda yaptıkları iskemi-reperfüzyon çalışmasında koroner arter oklüzyonundan 10 dk önce 2.5 mg/kg dozunda i.v. olarak verilen trimetazidin risk alanındaki nütrofil sayısında anlamlı derecede azalmaya neden olduğunu göstermişlerdir (205). Ayrıca sıçanlarda yapılan intestinal iskemi-reperfüzyon modelinde trimetazidin tedavisinin ardından MPO aktivitesinde azalma olduğu rapor edilmiştir (270). Trimetazidin bu etkileri bizim çalışmamızdaki MDA düzeylerindeki azalmayı açıklayabilir.

İzole sıçan kalp mitokondrilerinde trimetazidin  $Ca^{+2}$  düzeylerini ve ATP sentezini artırdığı (271) ve bu yüksek ATP düzeylerinin varlığında  $mitoK_{ATP}$  kanallarının kapalı durumda kalma eğiliminde olduğu bildirilmiştir (228, 272). Buna rağmen, trimetazidin mitokondriyal PTP inhibisyonu (259), adozin salıverilmesi (12), mitokondriyal solunum zinciri kompleks-1 aktivitesinin artması (258) ve/veya muhtemelen  $Na^+/H^+$  değiş tokuşunun inhibisyonu gibi iskemik önkoşullamayı indükleyebilecek diğer etkilere sahip olabilir. Trimetazidin tedavisinin vagal aktivitedeki artış ile açıklanabilecek kalp atım hızı parametrelerinde olumlu etkilere sahip olduğu gözlenmiştir. Trimetazidin tedavisi sempatovagal dengeyi vagal aktivite yönünde değiştirir (220). Birand ve arkadaşları (273) PTCA'ya maruz kalan hastalarda trimetazidin tedavisinin sempatik aktiviteyi azalttığını ve vagal aktiviteyi artırdığını bildirmişlerdir. Trimetazidin bu etkisi *in vivo* koşullarda iskemik önkoşullamaya katkıda bulunabilir.

Sonuç olarak elde ettiğimiz bulgular trimetazidin anesteziye sıçanlarda iskemik önkoşullamayı indükleyebileceğini düşündürmektedir. Buna ek olarak bu çalışmanın sonuçları trimetazidin ile 3-KAT inhibisyonunun enerji substrat tercihinin yağ asidi

metabolizmasından glukoz metabolizmasına doğru kaydırılmasının iskemik önkoşullamayı indükleme veya koruma yaklaşımında etkili olabileceğini desteklemektedir.

## 6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

- 1- Trimetazidin ortalama arteriyel kan basıncında ve kalp atım hızında önemli değişikliklere neden olmadı.
- 2- Trimetazidin iskemide VT ve VF insidansını ve toplam VEA sayısını azaltarak antiaritmik etki gösterdi.
- 3- Trimetazidin ilk aritmi başlama süresinde uzamaya neden oldu.
- 4- Trimetazidin VT ve VF sürelerinde azalmaya neden oldu.
- 5- Trimetazidin aritmi skorunda anlamlı derecede azalmaya neden oldu.
- 6- Trimetazidin laktat, MDA, troponin T ve CK-MB'nin kan düzeylerinde azalmaya neden oldu.
- 7- Trimetazidin nekrotik alan büyüklüğünde anlamlı derecede azalmaya neden oldu.
- 8- Trimetazidin karbakol önkoşullamasının ve iskemik önkoşullamanın kardiyoprotektif etkilerini azaltmadığı gibi önkoşullamayı taklit eden bir ajan gibi etki gösterdi.
- 9- Trimetazidinin farklı dozları ile yapılacak yeni çalışmalarda etkinin doza bağı değişiklikleri incelenmelidir.
- 10- Trimetazidinin farklı hayvan türlerinde etkileri incelenerek kardiyoprotektif etkisinin tür bağımlı olup olmadığı ortaya konulmalıdır.
- 11- Trimetazidinin kronik uygulama sonrası etkilerinin incelenmesi gerekmektedir.
- 12- Trimetazidinin mitokondri üzerindeki etkilerinin incelenmesi için *in vitro* çalışmalara ihtiyaç vardır.

## 7. KAYNAKLAR

- 1- Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation* 1986; 74:1124-1136.
- 2- Parratt JR. Protection of the heart by ischaemic preconditioning: mechanisms and possibilities for pharmacological exploitation. *Trends Pharmacol Sci* 1994; 15:19-25.
- 3- Dekker LR. Toward the heart of ischemic preconditioning. *Cardiovasc Res* 1998; 37:14-20.
- 4- Baxter GF, Marber MS, Patel VC, Yellon DM. Adenosine receptor involvement in a delayed phase of myocardial protection 24 hours after ischemic preconditioning. *Circulation* 1994; 90:2993-3000.
- 5- Bolli R. The early and late phases of preconditioning against myocardial stunning and the essential role of oxyradicals in the late phase: an overview. *Basic Res Cardiol* 1996; 91:57-63.
- 6- Parratt JR, Vegh A. Endothelial cells, nitric oxide and ischaemic preconditioning. *Basic Res Cardiol* 1996; 91:27-30.
- 7- Yang BC, Mehta JL. Inhibition of nitric oxide does not affect reperfusion-induced myocardial injury, but it prevents lipid peroxidation in the isolated rat heart. *Life Sci* 1997; 61:229-236.
- 8- Yellon DM, Baxter GF, Garcia-Dorado D, Heusch G, Sumeray MS. Ischaemic preconditioning: present position and future directions. *Cardiovasc Res* 1998; 37:21-33.
- 9- Eisen A, Fisman EZ, Rubenfire M, Freimark D, McKechnie R, Tenenbaum A, et al. Ischemic preconditioning: nearly two decades of research. A comprehensive review. *Atherosclerosis* 2004; 172:201-210.

10- Kloner RA, Shook T, Przyklenk K, Davis VG, Junio L, Matthews RV, et al. Previous angina alters in-hospital outcome in TIMI 4. A clinical correlate to preconditioning? *Circulation* 1995; 1; 91:37-45.

11- Kılıç D, Kaya İ, Kamaş A, Sağlık İstatistikleri, Health Statistics, 2002. Sağlık Bakanlığı Yayınları, No: 653, Ankara, Kasım 2003.

12- Blardi P, de Lalla A, Volpi L, Auteri A, Di Perri T. Increase of adenosine plasma levels after oral trimetazidine: a pharmacological preconditioning? *Pharmacol Res* 2002; 45:69-72.

13- Sommerschild HT, Kirkeboen KA. Preconditioning - endogenous defence mechanisms of the heart. *Acta Anaesthesiol Scand* 2002; 46:123-137.

14- Yellon DM, Alkhulaifi AM, Pugsley WB. Preconditioning the human myocardium. *Lancet* 1993; 31; 342:276-277.

15- Tomai F, Crea F, Gaspardone A, Versaci F, De Paulis R, Penta de Peppo A, et al. Ischemic preconditioning during coronary angioplasty is prevented by glibenclamide, a selective ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel blocker. *Circulation* 1994; 90:700-705.

16- Aksoyek S, Cinel I, Avlan D, Cinel L, Ozturk C, Gurbuz P, et al. Intestinal ischemic preconditioning protects the intestine and reduces bacterial translocation. *Shock* 2002; 18:476-480.

17- Bonventre JV. Kidney ischemic preconditioning. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2002; 11:43-48.

18- Hawaleshka A, Jacobsohn E. Ischaemic preconditioning: mechanisms and potential clinical applications. *Can J Anaesth* 1998; 45:670-682.

19- Richard V, Kaeffer N, Tron C, Thuillez C. Ischemic preconditioning protects against coronary endothelial dysfunction induced by ischemia and reperfusion. *Circulation* 1994; 89:1254-1261.

20- Piot CA, Padmanaban D, Ursell PC, Sievers RE, Wolfe CL. Ischemic preconditioning decreases apoptosis in rat hearts in vivo. *Circulation* 1997; 2; 96:1598-1604.

- 21- Przyklenk K, Bauer B, Ovize M, Kloner RA, Whittaker P. Regional ischemic 'preconditioning' protects remote virgin myocardium from subsequent sustained coronary occlusion. *Circulation* 1993; 87:893-899.
- 22- Gho BC, Schoemaker RG, van den Doel MA, Duncker DJ, Verdouw PD. Myocardial protection by brief ischemia in noncardiac tissue. *Circulation* 1996; 1; 94:2193-2200.
- 23- Birnbaum Y, Hale SL, Kloner RA. Ischemic preconditioning at a distance: reduction of myocardial infarct size by partial reduction of blood supply combined with rapid stimulation of the gastrocnemius muscle in the rabbit. *Circulation* 1997; 2; 96:1641-1646.
- 24- Schoemaker RG, van Heijningen CL. Bradykinin mediates cardiac preconditioning at a distance. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2000; 278:H1571-H1576.
- 25- Pell TJ, Baxter GF, Yellon DM, Drew GM. Renal ischemia preconditions myocardium: role of adenosine receptors and ATP-sensitive potassium channels. *Am J Physiol* 1998; 275:H1542-H1547.
- 26- Patel HH, Hsu A, Gross GJ. Attenuation of heat shock-induced cardioprotection by treatment with the opiate receptor antagonist naloxone. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002; 282:H2011-H2017.
- 27- Abete P, Ferrara N, Cacciatore F, Madrid A, Bianco S, Calabrese C, et al. Angina-induced protection against myocardial infarction in adult and elderly patients: a loss of preconditioning mechanism in the aging heart? *J Am Coll Cardiol* 1997; 30:947-954.
- 28- Matsubara T, Minatoguchi S, Matsuo H, Hayakawa K, Segawa T, Matsuno Y, et al. Three minute, but not one minute, ischemia and nicorandil have a preconditioning effect in patients with coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol* 2000; 35:345-351.
- 29- Jennings RB, Sebbag L, Schwartz LM, Crago MS, Reimer KA. Metabolism of preconditioned myocardium: effect of loss and reinstatement of cardioprotection. *J Mol Cell Cardiol* 2001; 33:1571-1588.
- 30- Sandhu R, Diaz RJ, Mao GD, Wilson GJ. Ischemic preconditioning: differences in protection and susceptibility to blockade with single-cycle versus multicycle transient ischemia. *Circulation* 1997; 5; 96:984-995.

- 31- Burckhardt B, Yang XM, Tsuchida A, Mullane KM, Downey JM, Cohen MV. Adenosine extends the window of protection afforded by ischaemic preconditioning in conscious rabbits. *Cardiovasc Res* 1995; 29:653-657.
- 32- Goto M, Liu Y, Yang XM, Ardell JL, Cohen MV, Downey JM. Role of bradykinin in protection of ischemic preconditioning in rabbit hearts. *Circ Res* 1995; 77:611-621.
- 33- Grund F, Sommerschild HT, Kirkeboen KA, Ilebekk A. Preconditioning with ischaemia reduces both myocardial oxygen consumption and infarct size in a graded pattern. *J Mol Cell Cardiol* 1997; 29:3067-3079.
- 34- Nakano A, Liu GS, Heusch G, Downey JM, Cohen MV. Exogenous nitric oxide can trigger a preconditioned state through a free radical mechanism, but endogenous nitric oxide is not a trigger of classical ischemic preconditioning. *J Mol Cell Cardiol* 2000; 32:1159-1167.
- 35- Cohen MV, Baines CP, Downey JM. Ischemic preconditioning: from adenosine receptor of KATP channel. *Annu Rev Physiol* 2000; 62:79-109.
- 36- Yellon DM, Downey JM. Preconditioning the myocardium: from cellular physiology to clinical cardiology. *Physiol Rev* 2003; 83:1113-1151.
- 37- Bolli R. The late phase of preconditioning. *Circ Res* 2000; 24; 87:972-983.
- 38- Kuzuya T, Hoshida S, Yamashita N, Fuji H, Oe H, Hori M, et al. Delayed effects of sublethal ischemia on the acquisition of tolerance to ischemia. *Circ Res* 1993; 72:1293-1299.
- 39- Yang XM, Baxter GF, Heads RJ, Yellon DM, Downey JM, Cohen MV. Infarct limitation of the second window of protection in a conscious rabbit model. *Cardiovasc Res* 1996; 31:777-783.
- 40- Liu GS, Thornton J, Van Winkle DM, Stanley AW, Olsson RA, Downey JM. Protection against infarction afforded by preconditioning is mediated by A1 adenosine receptors in rabbit heart. *Circulation* 1991; 84:350-356.
- 41- Nakano A, Cohen MV, Downey JM. Ischemic preconditioning: from basic mechanisms to clinical applications. *Pharmacol Ther* 2000; 86:263-275.



- 42- Wang Y, Ashraf M. Role of protein kinase C in mitochondrial KATP channel-mediated protection against  $Ca^{2+}$  overload injury in rat myocardium. *Circ Res* 1999; 28; 84:1156-1165.
- 43- Carroll R, Gant VA, Yellon DM. Mitochondrial K(ATP) channel opening protects a human atrial-derived cell line by a mechanism involving free radical generation. *Cardiovasc Res* 2001; 51:691-700.
- 44- Cohen MV, Yang XM, Liu GS, Heusch G, Downey JM. Acetylcholine, bradykinin, opioids, and phenylephrine, but not adenosine, trigger preconditioning by generating free radicals and opening mitochondrial K(ATP) channels. *Circ Res* 2001; 3; 89:273-278.
- 45- Ovize M, Kloner RA, Przyklenk K. Stretch preconditions canine myocardium. *Am J Physiol* 1994; 266:H137-H146.
- 46- Oldenburg O, Cohen MV, Yellon DM, Downey JM. Mitochondrial K(ATP) channels: role in cardioprotection. *Cardiovasc Res* 2002; 15; 55:429-437.
- 47- Thornton J, Striplin S, Liu GS, Swafford A, Stanley AW, Van Winkle DM, et al. Inhibition of protein synthesis does not block myocardial protection afforded by preconditioning. *Am J Physiol* 1990; 259:H1822-H1825.
- 48- Ytrehus K, Liu Y, Downey JM. Preconditioning protects ischemic rabbit heart by protein kinase C activation. *Am J Physiol* 1994; 266:H1145-H1152.
- 49- Das DK, Maulik N, Moraru II. Gene expression in acute myocardial stress. Induction by hypoxia, ischemia, reperfusion, hyperthermia and oxidative stress. *J Mol Cell Cardiol* 1995; 27:181-193.
- 50- Baines CP, Liu GS, Birincioglu M, Critz SD, Cohen MV, Downey JM. Ischemic preconditioning depends on interaction between mitochondrial KATP channels and actin cytoskeleton. *Am J Physiol* 1999; 276:H1361-H1368.
- 51- Marber MS, Latchman DS, Walker JM, Yellon DM. Cardiac stress protein elevation 24 hours after brief ischemia or heat stress is associated with resistance to myocardial infarction. *Circulation* 1993; 88:1264-1272.
- 52- Joyeux-Faure M, Arnaud C, Godin-Ribuot D, Ribouot C. Heat stress preconditioning and delayed myocardial protection: what is new? *Cardiovasc Res* 2003; 1; 60:469-477.

53- Heads RJ, Yellon DM, Latchman DS. Differential cytoprotection against heat stress or hypoxia following expression of specific stress protein genes in myogenic cells. *J Mol Cell Cardiol* 1995; 27:1669-1678.

54- Yellon DM, Baxter GF. A "second window of protection" or delayed preconditioning phenomenon: future horizons for myocardial protection? *J Mol Cell Cardiol* 1995; 27:1023-1034.

55- Xuan YT, Tang XL, Banerjee S, Takano H, Li RC, Han H, et al. Nuclear factor-kappaB plays an essential role in the late phase of ischemic preconditioning in conscious rabbits. *Circ Res* 1999; 14; 84:1095-1109.

56- Horrigan MC, MacIsaac AI, Nicolini FA, Vince DG, Lee P, Ellis SG, et al. Reduction in myocardial infarct size by basic fibroblast growth factor after temporary coronary occlusion in a canine model. *Circulation* 1996; 15;94:1927-1933.

57- Seger R, Biener Y, Feinstein R, Hanoch T, Gazit A, Zick Y. Differential activation of mitogen-activated protein kinase and S6 kinase signaling pathways by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) and insulin. Evidence for involvement of a TPA-stimulated protein-tyrosine kinase. *J Biol Chem* 1995; 24;270:28325-28330.

58- Michel MC, Li Y, Heusch G. Mitogen-activated protein kinases in the heart. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2001; 363:245-266.

59- Obata T. Adenosine production and its interaction with protection of ischemic and reperfusion injury of the myocardium. *Life Sci* 2002; 20;71:2083-2103.

60- McCallion K, Harkin DW, Gardiner KR. Role of adenosine in immunomodulation: review of the literature. *Crit Care Med* 2004; 32:273-277.

61- Shryock JC, Belardinelli L. Adenosine and adenosine receptors in the cardiovascular system: biochemistry, physiology, and pharmacology. *Am J Cardiol* 1997; 19;79:2-10.

62- Kuzmin AI, Gourine AV, Molosh AI, Lakomkin VL, Vassort G. Effects of preconditioning on myocardial interstitial levels of ATP and its catabolites during regional ischemia and reperfusion in the rat. *Basic Res Cardiol* 2000; 95:127-136.

- 63- Lasley RD, Konyn PJ, Hegge JO, Mentzer RM Jr. Effects of ischemic and adenosine preconditioning on interstitial fluid adenosine and myocardial infarct size. *Am J Physiol* 1995; 269:H1460-H1466.
- 64- Miura T. Adenosine and bradykinin: are they independent triggers of preconditioning? *Basic Res Cardiol* 1996; 91:20-22.
- 65- Mei DA, Nithipatikom K, Lasley RD, Gross GJ. Myocardial preconditioning produced by ischemia, hypoxia, and a KATP channel opener: effects on interstitial adenosine in dogs. *J Mol Cell Cardiol* 1998; 30:1225-1236..
- 66- Schulz R, Post H, Vahlhaus C, Heusch G. Ischemic preconditioning in pigs: a graded phenomenon: its relation to adenosine and bradykinin. *Circulation* 1998; 8;98:1022-1029.
- 67- Schulz R, Rose J, Post H, Heusch G. Involvement of endogenous adenosine in ischaemic preconditioning in swine. *Pflugers Arch* 1995; 430:273-282.
- 68- Mubagwa K, Flameng W. Adenosine, adenosine receptors and myocardial protection: an updated overview. *Cardiovasc Res* 2001; 52:25-39.
- 69- McCully JD, Toyoda Y, Uematsu M, Stewart RD, Levitsky S. Adenosine-enhanced ischemic preconditioning: adenosine receptor involvement during ischemia and reperfusion. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001; 280:H591-H602.
- 70- Thornton JD, Liu GS, Olsson RA, Downey JM. Intravenous pretreatment with A1-selective adenosine analogues protects the heart against infarction. *Circulation* 1992; 85:659-665.
- 71- Miura T, Liu Y, Kita H, Ogawa T, Shimamoto K. Roles of mitochondrial ATP-sensitive K channels and PKC in anti-infarct tolerance afforded by adenosine A1 receptor activation. *J Am Coll Cardiol* 2000; 35:238-245.
- 72- Yao Z, Gross GJ. Glibenclamide antagonizes adenosine A1 receptor-mediated cardioprotection in stunned canine myocardium. *Circulation* 1993; 88:235-244.
- 73- Yao Z, Gross GJ. Acetylcholine mimics ischemic preconditioning via a glibenclamide-sensitive mechanism in dogs. *Am J Physiol* 1993; 264:H2221-H2225.

- 74- Kirsch GE, Codina J, Birnbaumer L, Brown AM. Coupling of ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels to A1 receptors by G proteins in rat ventricular myocytes. *Am J Physiol* 1990; 259:H820-H826.
- 75- Tsuchida A, Liu GS, Mullane K, Downey JM. Acadesine lowers temporal threshold for the myocardial infarct size limiting effect of preconditioning. *Cardiovasc Res* 1993; 27:116-120.
- 76- Miura T, Ogawa T, Iwamoto T, Shimamoto K, Iimura O. Dipyridamole potentiates the myocardial infarct size-limiting effect of ischemic preconditioning. *Circulation* 1992; 86:979-985.
- 77- Vegh A, Papp JG, Szekeres L, Parratt JR. Prevention by an inhibitor of the L-arginine-nitric oxide pathway of the antiarrhythmic effects of bradykinin in anaesthetized dogs. *Br J Pharmacol* 1993; 110:18-19.
- 78- Vegh A, Papp JG, Parratt J. Attenuation of the antiarrhythmic effects of ischaemic preconditioning by blockade of bradykinin B2 receptors. *Br J Pharmacol* 1994; 113:1167-1172.
- 79- Starkopf J, Bugge E, Ytrehus K, Preischemic bradykinin and ischaemic preconditioning in functional recovery of the globally ischaemic rat heart. *Cardiovasc Res* 1997; 33:63-70.
- 80- Wall TM, Sheehy R, Hartman JC. Role of bradykinin in myocardial preconditioning. *J Pharmacol Exp Ther* 1994; 270:681-689.
- 81- Parratt JR, Vegh A, Zeitlin IJ, Ahmad M, Oldroyd K, Kaszala K, et al. Bradykinin and endothelial-cardiac myocyte interactions in ischemic preconditioning. *Am J Cardiol* 1997; 4; 80:124A-131A.
- 82- Okruhlicova L, Ravingerova T, Pancza D, Tribulova N, Styk J, Stetka R. Activation of adenylate cyclase system in the preconditioned rat heart. *Physiol Res* 2000; 49:251-259.
- 83- Miki T, Miura T, Ura N, Ogawa T, Suzuki K, Shimamoto K, et al. Captopril potentiates the myocardial infarct size-limiting effect of ischemic preconditioning through bradykinin B2 receptor activation. *J Am Coll Cardiol* 1996; 15; 28:1616-1622.

- 84- Morris SD, Yellon DM. Angiotensin-converting enzyme inhibitors potentiate preconditioning through bradykinin B2 receptor activation in human heart. *J Am Coll Cardiol* 1997; 29:1599-1606.
- 85- Zhang WM, Jin WQ, Wong TM. Multiplicity of kappa opioid receptor binding in the rat cardiac sarcolemma. *J Mol Cell Cardiol* 1996; 28:1547-1554.
- 86- McLaughlin PJ, Wu Y. Opioid gene expression in the developing and adult rat heart. *Dev Dyn* 1998; 211:153-163.
- 87- Jackson KE, Farias M, Stanfill AS, Caffrey JL. Transient arterial occlusion raises enkephalin in the canine sinoatrial node and improves vagal bradycardia. *Auton Neurosci* 2001; 10; 94:84-92.
- 88- Schultz JE, Rose E, Yao Z, Gross GJ. Evidence for involvement of opioid receptors in ischemic preconditioning in rat hearts. *Am J Physiol* 1995; 268:H2157-H2161.
- 89- Miki T, Cohen MV, Downey JM. Opioid receptor contributes to ischemic preconditioning through protein kinase C activation in rabbits. *Mol Cell Biochem* 1998; 186:3-12.
- 90- Aitchison KA, Baxter GF, Awan MM, Smith RM, Yellon DM, Opie LH. Opposing effects on infarction of delta and kappa opioid receptor activation in the isolated rat heart: implications for ischemic preconditioning. *Basic Res Cardiol* 2000; 95:1-10; discussion 11.
- 91- Pyle WG, Lester JW, Hofmann PA. Effects of kappa-opioid receptor activation on myocardium. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001; 281:H669-H678.
- 92- Wang GY, Wu S, Pei JM, Yu XC, Wong TM. Kappa- but not delta-opioid receptors mediate effects of ischemic preconditioning on both infarct and arrhythmia in rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001; 280:H384-H391.
- 93- Gross GJ. Role of opioids in acute and delayed preconditioning. *J Mol Cell Cardiol* 2003; 35:709-718.
- 94- Chen W, Glasgow W, Murphy E, Steenbergen C. Lipoxygenase metabolism of arachidonic acid in ischemic preconditioning and PKC-induced protection in heart. *Am J Physiol* 1999; 276:H2094-H2101.

- 95- Lochner A, Marais E, Genade S, Moolman JA. Nitric oxide: a trigger for classic preconditioning? *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2000; 279:H2752-H2765.
- 96- Li Y, Kloner RA. Cardioprotective effects of ischaemic preconditioning are not mediated by prostanoids. *Cardiovasc Res* 1992; 26:226-231.
- 97- Liu GS, Stanley AW, Downey J. Cyclooxygenase products are not involved in the protection against myocardial infarction afforded by preconditioning in rabbit. Cyclooxygenase pathway's involvement in preconditioning. *Am J Cardiovasc Pathol* 1992; 4:157-164.
- 98- Moolman JA, Genade S, Tromp E, Lochner A. No evidence for mediation of ischemic preconditioning by alpha 1-adrenergic signal transduction pathway or protein kinase C in the isolated rat heart. *Cardiovasc Drugs Ther* 1996; 10:125-136.
- 99- Tanno M, Tsuchida A, Nozawa Y, Matsumoto T, Hasegawa T, Miura T, et al. Roles of tyrosine kinase and protein kinase C in infarct size limitation by repetitive ischemic preconditioning in the rat. *J Cardiovasc Pharmacol* 2000; 35:345-352.
- 100- Wang P, Gallagher KP, Downey JM, Cohen MV. Pretreatment with endothelin-1 mimics ischemic preconditioning against infarction in isolated rabbit heart. *J Mol Cell Cardiol* 1996; 28:579-588.
- 101- Komarov AM, Kramer JH, Mak IT, Weglicki WB. EPR detection of endogenous nitric oxide in postischemic heart using lipid and aqueous-soluble dithiocarbamate-iron complexes. *Mol Cell Biochem* 1997; 175:91-97.
- 102- Bell RM, Yellon DM. The contribution of endothelial nitric oxide synthase to early ischaemic preconditioning: the lowering of the preconditioning threshold. An investigation in eNOS knockout mice. *Cardiovasc Res* 2001; 52:274-280.
- 103- Muscari C, Bonafe' F, Gamberini C, Giordano E, Tantini B, Fattori M, et al. Early preconditioning prevents the loss of endothelial nitric oxide synthase and enhances its activity in the ischemic/reperfused rat heart. *Life Sci* 2004; 16; 74:1127-1137.
- 104- Matoba S, Tatsumi T, Keira N, Kawahara A, Akashi K, Kobara M, et al. Cardioprotective effect of angiotensin-converting enzyme inhibition against hypoxia/reoxygenation injury in cultured rat cardiac myocytes. *Circulation* 1999; 16; 99:817-822.

- 105- Takano H, Manchikalapudi S, Tang XL, Qiu Y, Rizvi A, Jadoon AK, et al. Nitric oxide synthase is the mediator of late preconditioning against myocardial infarction in conscious rabbits. *Circulation* 1998; 4; 98:441-449.
- 106- Xuan YT, Tang XL, Qiu Y, Banerjee S, Takano H, Han H, et al. Biphasic response of cardiac NO synthase isoforms to ischemic preconditioning in conscious rabbits. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2000; 279:H2360-H2371.
- 107- Bolli R, Dawn B, Tang XL, Qiu Y, Ping P, Xuan YT, et al. The nitric oxide hypothesis of late preconditioning. *Basic Res Cardiol* 1998; 93:325-338.
- 108- Guo Y, Jones WK, Xuan YT, Tang XL, Bao W, Wu WJ, et al. The late phase of ischemic preconditioning is abrogated by targeted disruption of the inducible NO synthase gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 28; 96:11507-11512.
- 109- Baker CS, Kumar S, Rimoldi OE. Effects of brief ischemia and reperfusion on the myocardium and the role of nitric oxide. *Heart Fail Rev* 2003; 8:127-141.
- 110- Halliwell B. Lipid peroxidation, antioxidants and cardiovascular disease: how should we move forward? *Cardiovasc Res* 2000; 18; 47:410-418.
- 111- Iwamoto T, Miura T, Adachi T, Noto T, Ogawa T, Tsuchida A, et al. Myocardial infarct size-limiting effect of ischemic preconditioning was not attenuated by oxygen free-radical scavengers in the rabbit. *Circulation* 1991; 83:1015-1022.
- 112- Richard V, Tron C, Thuillez C. Ischaemic preconditioning is not mediated by oxygen derived free radicals in rats. *Cardiovasc Res* 1993; 27:2016-2021.
- 113- Tanaka M, Fujiwara H, Yamasaki K, Sasayama S. Superoxide dismutase and N-2-mercaptopropionyl glycine attenuate infarct size limitation effect of ischaemic preconditioning in the rabbit. *Cardiovasc Res* 1994; 28:980-986.
- 114- Baines CP, Goto M, Downey JM. Oxygen radicals released during ischemic preconditioning contribute to cardioprotection in the rabbit myocardium. *J Mol Cell Cardiol* 1997; 29:207-216.
- 115- Das DK, Maulik N, Sato M, Ray PS. Reactive oxygen species function as second messenger during ischemic preconditioning of heart. *Mol Cell Biochem* 1999; 196:59-67.

- 116- Gopalakrishna R, Anderson WB.  $\text{Ca}^{2+}$ - and phospholipid-independent activation of protein kinase C by selective oxidative modification of the regulatory domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989; 86:6758-6762.
- 117- Pain T, Yang XM, Critz SD, Yue Y, Nakano A, Liu GS, et al. Opening of mitochondrial K(ATP) channels triggers the preconditioned state by generating free radicals. *Circ Res* 2000; 15; 87:460-466.
- 118- Garlid KD, Dos Santos P, Xie ZJ, Costa AD, Paucek P. Mitochondrial potassium transport: the role of the mitochondrial ATP-sensitive K(+) channel in cardiac function and cardioprotection. *Biochim Biophys Acta* 2003; 30; 1606:1-21.
- 119- Altug S, Demiryurek AT, Ak D, Tungal M, Kanzik I. Contribution of peroxynitrite to the beneficial effects of preconditioning on ischaemia-induced arrhythmias in rat isolated hearts. *Eur J Pharmacol* 2001; 16; 415:239-246.
- 120- Altug S, Demiryurek AT, Kane KA, Kanzik I. Evidence for the involvement of peroxynitrite in ischaemic preconditioning in rat isolated hearts. *Br J Pharmacol* 2000; 130:125-131.
- 121- Csonka C, Csont T, Onody A, Ferdinandy P. Preconditioning decreases ischemia/reperfusion-induced peroxynitrite formation. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 3; 285:1217-1219.
- 122- Soylemez S, Demiryurek AT, Kanzik I. Involvement of tyrosine kinase in peroxynitrite-induced preconditioning in rat isolated heart. *Eur J Pharmacol* 2003; 19; 464:163-169.
- 123- Laude K, Thuillez C, Richard V. Peroxynitrite triggers a delayed resistance of coronary endothelial cells against ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002; 283:H1418-H14123. Epub 2002 Jun 13.
- 124- Nishida M, Maruyama Y, Tanaka R, Kontani K, Nagao T, Kurose H. G alpha(i) and G alpha(o) are target proteins of reactive oxygen species. *Nature* 2000; 23; 408:492-495.
- 125- Tokube K, Kiyosue T, Arita M. Openings of cardiac KATP channel by oxygen free radicals produced by xanthine oxidase reaction. *Am J Physiol* 1996; 271:H478-H489.



- 126- Ashraf M, Suleiman J, Ahmad M.  $\text{Ca}^{2+}$  preconditioning elicits a unique protection against the  $\text{Ca}^{2+}$  paradox injury in rat heart. Role of adenosine. *Fixed. Circ Res* 1994; 74:360-367.
- 127- Meldrum DR, Cleveland JC Jr, Sheridan BC, Rowland RT, Banerjee A, Harken AH. Cardiac preconditioning with calcium: clinically accessible myocardial protection. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1996; 112:778-786.
- 128- Miyawaki H, Zhou X, Ashraf M. Calcium preconditioning elicits strong protection against ischemic injury via protein kinase C signaling pathway. *Circ Res* 1996; 79:137-146.
- 129- Cain BS, Meldrum DR, Cleveland JC Jr, Meng X, Banerjee A, Harken AH. Clinical L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channel blockade prevents ischemic preconditioning of human myocardium. *J Mol Cell Cardiol* 1999; 31:2191-2197.
- 130- Cain BS, Meldrum DR, Cleveland JC, Meng X, Banerjee A, Harken AH. L-type blockers inhibit myocardial preconditioning. *J Mol Cell Cardiol* 2000; 32:861-862.
- 131- Wallbridge DR, Schulz R, Braun C, Post H, Heusch G. No attenuation of ischaemic preconditioning by the calcium antagonist nisoldipine. *J Mol Cell Cardiol* 1996; 28:1801-1810.
- 132- Mackay K, Mochly-Rosen D. Localization, anchoring, and functions of protein kinase C isozymes in the heart. *J Mol Cell Cardiol* 2001; 33:1301-1307.
- 133- Yoshida K, Kawamura S, Mizukami Y, Kitakaze M. Implication of protein kinase C- $\alpha$ ,  $\delta$ , and  $\epsilon$  isoforms in ischemic preconditioning in perfused rat hearts. *J Biochem (Tokyo)* 1997; 122:506-511.
- 134- Yang XM, Sato H, Downey JM, Cohen MV. Protection of ischemic preconditioning is dependent upon a critical timing sequence of protein kinase C activation. *J Mol Cell Cardiol* 1997; 29:991-999.
- 135- Ikonomidis JS, Shirai T, Weisel RD, Derylo B, Rao V, Whiteside CI, et al. Preconditioning cultured human pediatric myocytes requires adenosine and protein kinase C. *Am J Physiol* 1997; 272:H1220-H1230.

- 136- Ping P, Zhang J, Cao X, Li RC, Kong D, Tang XL, et al. PKC-dependent activation of p44/p42 MAPKs during myocardial ischemia-reperfusion in conscious rabbits. *Am J Physiol* 1999; 276:H1468-H1481.
- 137- Novalija E, Kevin LG, Camara AK, Bosnjak ZJ, Kampine JP, Stowe DF. Reactive oxygen species precede the epsilon isoform of protein kinase C in the anesthetic preconditioning signaling cascade. *Anesthesiology* 2003; 99:421-428.
- 138- Kawamura S, Yoshida K, Miura T, Mizukami Y, Matsuzaki M. Ischemic preconditioning translocates PKC-delta and -epsilon, which mediate functional protection in isolated rat heart. *Am J Physiol* 1998; 275:H2266-H2271.
- 139- Brady PA, Terzic A. The sulfonylurea controversy: more questions from the heart. *J Am Coll Cardiol* 1998; 31:950-956.
- 140- Hale SL, Kloner RA. Effect of combined K(ATP) channel activation and Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchange inhibition on infarct size in rabbits. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2000; 279:H2673-H2677.
- 141- Downey JM, Cohen MV. Mitochondrial K(ATP)channel opening during index ischemia and following myocardial reperfusion in ischemic rat hearts. *J Mol Cell Cardiol* 2001; 33:651-653.
- 142- Mizumura T, Nithipatikom K, Gross GJ. Bimakalim, an ATP-sensitive potassium channel opener, mimics the effects of ischemic preconditioning to reduce infarct size, adenosine release, and neutrophil function in dogs. *Circulation* 1995; 1; 92:1236-1245.
- 143- Yao Z, Gross GJ. Activation of ATP-sensitive potassium channels lowers threshold for ischemic preconditioning in dogs. *Am J Physiol* 1994; 267:H1888-H1894.
- 144- Garlid KD, Paucek P, Yarov-Yarovoy V, Murray HN, Darbenzio RB, D'Alonzo AJ, et al. Cardioprotective effect of diazoxide and its interaction with mitochondrial ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels. Possible mechanism of cardioprotection. *Circ Res* 1997; 81:1072-1082.
- 145- Baxter GF, Goma FM, Yellon DM. Characterisation of the infarct-limiting effect of delayed preconditioning: timecourse and dose-dependency studies in rabbit myocardium. *Basic Res Cardiol* 1997; 92:159-167.

- 146- Ghosh S, Standen NB, Galinanes M. Preconditioning the human myocardium by simulated ischemia: studies on the early and delayed protection. *Cardiovasc Res* 2000; 14; 45:339-350.
- 147- Currie RW, Karmazyn M, Kloc M, Mailer K. Heat-shock response is associated with enhanced postischemic ventricular recovery. *Circ Res* 1988; 63:543-549.
- 148- Kaszala K, Vegh A, Papp JG, Parratt JR. Time course of the protection against ischemia and reperfusion-induced ventricular arrhythmias resulting from brief periods of cardiac pacing. *J Mol Cell Cardiol* 1996; 28:2085-2095.
- 149- Yamashita N, Hoshida S, Otsu K, Asahi M, Kuzuya T, Hori M. Exercise provides direct biphasic cardioprotection via manganese superoxide dismutase activation. *J Exp Med* 1999; 7; 189:1699-1706.
- 150- Taylor RP, Harris MB, Starnes JW. Acute exercise can improve cardioprotection without increasing heat shock protein content. *Am J Physiol* 1999; 276:H1098-H1102.
- 151- Powers SK, Quindry J, Hamilton K. Aging, exercise, and cardioprotection. *Ann N Y Acad Sci.* 2004 Jun;1019:462-70.
- 152- DiCarlo AL, Farrell JM, Litovitz TA. Myocardial protection conferred by electromagnetic fields. *Circulation* 1999; 16; 99:813-816.
- 153- Yamashita N, Hoshida S, Otsu K, Taniguchi N, Kuzuya T, Hori M. Involvement of cytokines in the mechanism of whole-body hyperthermia-induced cardioprotection. *Circulation* 2000; 25; 102:452-457.
- 154- Shinmura K, Tang XL, Wang Y, Xuan YT, Liu SQ, Takano H, et al. Cyclooxygenase-2 mediates the cardioprotective effects of the late phase of ischemic preconditioning in conscious rabbits. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 29; 97:10197-10202.
- 155- Claeys MJ, Vrints CJ, Bosmans JM, Conraads VM, Snoeck JP. Aminophylline inhibits adaptation to ischaemia during angioplasty. Role of adenosine in ischaemic preconditioning. *Eur Heart J* 1996; 17:539-544.

- 156- Lee TM, Su SF, Chou TF, Lee YT, Tsai CH. Loss of preconditioning by attenuated activation of myocardial ATP-sensitive potassium channels in elderly patients undergoing coronary angioplasty. *Circulation* 2002; 22; 105:334-340.
- 157- Tomai F, Crea F, Gaspardone A, Versaci F, Ghini AS, De Paulis R, et al. Phentolamine prevents adaptation to ischemia during coronary angioplasty: role of alpha-adrenergic receptors in ischemic preconditioning. *Circulation* 1997 ; 7; 96:2171-2177.
- 158- Leesar MA, Stoddard MF, Manchikalapudi S, Bolli R. Bradykinin-induced preconditioning in patients undergoing coronary angioplasty. *J Am Coll Cardiol* 1999; 34:639-650.
- 159- Tomai F, Crea F, Chiariello L, Gioffre PA. Ischemic preconditioning in humans: models, mediators, and clinical relevance. *Circulation* 1999; 3; 100:559-563.
- 160- Ikonomidis JS, Tumiati LC, Weisel RD, Mickle DA, Li RK. Preconditioning human ventricular cardiomyocytes with brief periods of simulated ischaemia. *Cardiovasc Res* 1994; 28:1285-1291.
- 161- Walker DM, Walker JM, Pugsley WB, Pattison CW, Yellon DM. Preconditioning in isolated superfused human muscle. *J Mol Cell Cardiol* 1995; 27:1349-1357.
- 162- Yellon DM, Dana A. The preconditioning phenomenon: A tool for the scientist or a clinical reality? *Circ Res* 2000, 29; 87:543-550.
- 163- Teoh LK, Grant R, Hulf JA, Pugsley WB, Yellon DM. A comparison between ischemic preconditioning, intermittent cross-clamp fibrillation and cold crystalloid cardioplegia for myocardial protection during coronary artery bypass graft surgery. *Cardiovasc Surg* 2002; 10:251-255.
- 164- Wu ZK, Pehkonen E, Laurikka J, Kaukinen L, Honkonen EL, Kaukinen S, et al. Ischemic preconditioning protects right ventricular function in coronary artery bypass grafting patients experiencing angina within 48-72 hours. *J Cardiovasc Surg (Torino)* 2002; 43:319-326.
- 165- Kloner RA, Przyklenk K, Shook T, Cannon CP. Protection Conferred by Preinfarct Angina is Manifest in the Aged Heart: Evidence from the TIMI 4 Trial. *J Thromb Thrombolysis* 1998; 6:89-92.

166- Maybaum S, Ilan M, Mogilevsky J, Tzivoni D. Improvement in ischemic parameters during repeated exercise testing: a possible model for myocardial preconditioning. *Am J Cardiol* 1996; 15; 78:1087-1091.

167- Mentzer RM Jr, Rahko PS, Molina-Viamonte V, Canver CC, Chopra PS, Love RB, et al. Safety, tolerance, and efficacy of adenosine as an additive to blood cardioplegia in humans during coronary artery bypass surgery. *Am J Cardiol* 1997; 19; 79:38-43.

168- Ovize M, Kloner RA, Hale SL, Przyklenk K. Coronary cyclic flow variations "precondition" ischemic myocardium. *Circulation* 1992; 85:779-789.

169- Meldrum DR. Mechanisms of cardiac preconditioning: ten years after the discovery of ischemic preconditioning. *J Surg Res* 1997; 73:1-13.

170- Cleveland JC Jr, Meldrum DR, Cain BS, Banerjee A, Harken AH. Oral sulfonylurea hypoglycemic agents prevent ischemic preconditioning in human myocardium. Two paradoxes revisited. *Circulation* 1997; 1; 96:29-32.

171- Jenkins DP, Pugsley WB, Alkhulaifi AM, Kemp M, Hooper J, Yellon DM. Ischaemic preconditioning reduces troponin T release in patients undergoing coronary artery bypass surgery. *Heart* 1997; 77:314-318.

172- Belhomme D, Peynet J, Louzy M, Launay JM, Kitakaze M, Menasche P. Evidence for preconditioning by isoflurane in coronary artery bypass graft surgery. *Circulation* 1999; 9; 100:II340-II344.

173- Deutsch E, Berger M, Kussmaul WG, Hirshfeld JW Jr, Herrmann HC, Laskey WK. Adaptation to ischemia during percutaneous transluminal coronary angioplasty. Clinical, hemodynamic, and metabolic features. *Circulation* 1990; 82:2044-2051.

174- Bolli R, Leeser MA, Stoddard M. Ischemic preconditioning during coronary angioplasty. *J Am Coll Cardiol* 1997; 29:469-470.

175- Noda T, Minatoguchi S, Fujii K, Hori M, Ito T, Kanmatsuse K, et al. Evidence for the delayed effect in human ischemic preconditioning: prospective multicenter study for preconditioning in acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 1999; 34:1966-1974.

- 176- Sato T, Sasaki N, O'Rourke B, Marban E. Nicorandil, a potent cardioprotective agent, acts by opening mitochondrial ATP-dependent potassium channels. *J Am Coll Cardiol* 2000; 35:514-518.
- 177- Shinmura K, Kodani E, Xuan YT, Dawn B, Tang XL, Bolli R. Effect of aspirin on late preconditioning against myocardial stunning in conscious rabbits. *J Am Coll Cardiol* 2003; 41:1183-1194.
- 178- Lee TM, Chou TF. Impairment of myocardial protection in type 2 diabetic patients. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88:531-537.
- 179- Dana A, Baxter GF, Walker JM, Yellon DM. Prolonging the delayed phase of myocardial protection: repetitive adenosine A1 receptor activation maintains rabbit myocardium in a preconditioned state. *J Am Coll Cardiol* 1998; 31:1142-1149.
- 180- Lopaschuk GD. Treating ischemic heart disease by pharmacologically improving cardiac energy metabolism. *Am J Cardiol* 1998; 82:14K-17K.
- 181- Lee L, Horowitz J, Frenneaux M. Metabolic manipulation in ischaemic heart disease, a novel approach to treatment. *Eur Heart J* 2004; 25:634-641.
- 182- Morin D, Hauet T, Spedding M, Tillement J. Mitochondria as target for antiischemic drugs. *Adv Drug Deliv Rev* 2001; 49:151-174.
- 183- Marzilli M. Cardioprotective effects of trimetazidine: a review. *Curr Med Res Opin* 2003; 19:661-672.
- 184- Malfatto G, Facchini M, Sala L, Branzi G, Bragato R, Leonetti G. Effects of cardiac rehabilitation and beta-blocker therapy on heart rate variability after first acute myocardial infarction. *Am J Cardiol* 1998; 81:834-840.
- 185- Vanoli E, De Ferrari GM, Stramba-Badiale M, Hull SS Jr, Foreman RD, Schwartz PJ. Vagal stimulation and prevention of sudden death in conscious dogs with a healed myocardial infarction. *Circ Res* 1991; 68:1471-1481.
- 186- Heart rate variability: standards of measurement, physiological interpretation and clinical use. Task Force of the European Society of Cardiology and the North American Society of Pacing and Electrophysiology. *Circulation* 1996; 93:1043-1065.

187- Adamson PB, Huang MH, Vanoli E, Foreman RD, Schwartz PJ, Hull SS Jr. Unexpected interaction between beta-adrenergic blockade and heart rate variability before and after myocardial infarction. A longitudinal study in dogs at high and low risk for sudden death. *Circulation* 1994; 90:976-982.

188- Sandrone G, Mortara A, Torzillo D, La Rovere MT, Malliani A, Lombardi F. Effects of beta blockers (atenolol or metoprolol) on heart rate variability after acute myocardial infarction. *Am J Cardiol* 1994; 15; 74:340-345.

189- Ozdemir R, Tuncer C, Aladag M, Guven A, Sezgin AT, Pekdemir H, et al. Effect of trimetazidine on late potentials after acute myocardial infarction. *Cardiovasc Drugs Ther* 1999; 13:145-149.

190- Kleiger RE, Miller JP, Bigger JT Jr, Moss AJ. Decreased heart rate variability and its association with increased mortality after acute myocardial infarction. *Am J Cardiol* 1987; 1; 59:256-262.

191- Bigger JT Jr, Fleiss JL, Rolnitzky LM, Steinman RC, Schneider WJ. Time course of recovery of heart period variability after myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 1991; 18:1643-1649.

192- Kleiman RB, Houser SR. Outward currents in normal and hypertrophied feline ventricular myocytes. *Am J Physiol* 1989; 256:H1450-H1461.

193- Teragawa H, Hirao H, Muraoka Y, Yamagata T, Matsuura H, Kajiyama G. Relation between QT dispersion and adenosine triphosphate stress thallium-201 single-photon emission computed tomographic imaging for detecting myocardial ischemia and scar. *Am J Cardiol* 1999; 15; 83:1152-1156.

194- Marzilli M. Clinical benefits of a metabolic approach in the management of coronary patients. *Rev Port Cardiol* 2000; 19:V25-V30.

195- McClellan KJ, Plosker GL. Trimetazidine. A review of its use in stable angina pectoris and other coronary conditions. *Drugs* 1999; 58:143-157.

196- Levy S. Combination therapy of trimetazidine with diltiazem in patients with coronary artery disease. Group of South of France Investigators. *Am J Cardiol* 1995; 24; 76:12B-16B.

- 197- Timour Q, Harpey C, Durr F, Faucon G. Is the antianginal action of trimetazidine independent of hemodynamic changes? *Cardiovasc Drugs Ther* 1991; 5:1043-1044.
- 198- Kober G, Buck T, Sievert H, Vallbracht C. Myocardial protection during percutaneous transluminal coronary angioplasty: effects of trimetazidine. *Eur Heart J* 1992; 13:1109-1115.
- 199- Boucher FR, Hearse DJ, Opie LH. Effects of trimetazidine on ischemic contracture in isolated perfused rat hearts. *J Cardiovasc Pharmacol* 1994; 24:45-49.
- 200- Drake-Holland AJ, Belcher PR, Hynd J, Noble MI. Infarct size in rabbits: a modified method illustrated by the effects of propranolol and trimetazidine. *Basic Res Cardiol* 1993; 88:250-258.
- 201- Ruiz-Meana M, Garcia-Dorado D, Julia M, Gonzalez MA, Inserte J, Soler-Soler J. Pre-treatment with trimetazidine increases sarcolemmal mechanical resistance in reoxygenated myocytes. *Cardiovasc Res* 1996; 32:587-592.
- 202- Clauser P, Harpey C. Antioxidant properties of an antiischaemic agent: trimetazidine. *Adv Exp Med Biol* 1990; 264:247-250.
- 203- Hauet T, Bauza G, Goujon JM, Caritez JC, Carretier M, Eugene M, et al. Effects of trimetazidine on lipid peroxidation and phosphorus metabolites during cold storage and reperfusion of isolated perfused rat kidneys. *J Pharmacol Exp Ther* 1998; 285:1061-1067.
- 204- Sucu N, Unlu A, Tamer L, Aytacoglu B, Coskun B, Bilgin R, et al. Effects of trimetazidine on tissue damage in kidney after hindlimb ischemia-reperfusion. *Pharmacol Res* 2002; 46:345-349.
- 205- Williams FM, Tanda K, Kus M, Williams TJ. Trimetazidine inhibits neutrophil accumulation after myocardial ischaemia and reperfusion in rabbits. *J Cardiovasc Pharmacol* 1993; 22:828-833.
- 206- Schwertz DW, Halverson J, Isaacson T, Feinberg H, Palmer JW. Alterations in phospholipid metabolism in the globally ischemic rat heart: emphasis on phosphoinositide specific phospholipase C activity. *J Mol Cell Cardiol* 1987; 19:685-697.



- 207- Tabbi-Anneni I, Lucien A, Grynberg A. Trimetazidine effect on phospholipid synthesis in ventricular myocytes: consequences in alpha-adrenergic signaling. *Fundam Clin Pharmacol* 2003; 17:51-59.
- 208- Sentex E, Helies-Toussaint C, Rousseau D, Lucien A, Ferrary E, Grynberg A. Influence of trimetazidine on the synthesis of complex lipids in the heart and other target organs. *Fundam Clin Pharmacol* 2001; 15:255-264
- 209- Sentex E, Sergiel JP, Lucien A, Grynberg A. Trimetazidine increases phospholipid turnover in ventricular myocyte. *Mol Cell Biochem* 1997; 175:153-162.
- 210- Sentex E, Sergiel JP, Lucien A, Grynberg A. Is the cytoprotective effect of trimetazidine associated with lipid metabolism? *Am J Cardiol* 1998; 3; 82:18K-24K.
- 211- Mody FV, Singh BN, Mohiuddin IH, Coyle KB, Buxton DB, Hansen HW, et al. Trimetazidine-induced enhancement of myocardial glucose utilization in normal and ischemic myocardial tissue: an evaluation by positron emission tomography. *Am J Cardiol* 1998; 3; 82:42K-49K.
- 212- El Banani H, Bernard M, Baetz D, Cabanes E, Cozzone P, Lucien A, et al. Changes in intracellular sodium and pH during ischaemia-reperfusion are attenuated by trimetazidine. Comparison between low- and zero-flow ischaemia. *Cardiovasc Res* 2000; 47:688-696.
- 213- Allibardi S, Chierchia SL, Margonato V, Merati G, Neri G, Dell'Antonio G, et al. Effects of trimetazidine on metabolic and functional recovery of postischemic rat hearts. *Cardiovasc Drugs Ther* 1998; 12:543-549.
- 214- Stanley WC, Marzilli M. Metabolic therapy in the treatment of ischaemic heart disease: the pharmacology of trimetazidine. *Fundam Clin Pharmacol* 2003; 17:133-145.
- 215- EMIP-FR Pilot Study Group. Free radicals, reperfusion and myocardial infarction therapy: European Myocardial Infarction Project--free radicals pilot study. *Eur Heart J* 1993; 14:48-51.
- 216- Papadopoulos CL, Kanonidis IE, Kotridis PS, Papayannis IL, Savatis SC, Missopoulou-Kokka AI, et al. The effect of trimetazidine on reperfusion arrhythmias in acute myocardial infarction. *Int J Cardiol* 1996; 26; 55:137-142.

- 217- The EMIP-FR Group. European Myocardial Infarction Project--Free Radicals. Effect of 48-h intravenous trimetazidine on short- and long-term outcomes of patients with acute myocardial infarction, with and without thrombolytic therapy; A double-blind, placebo-controlled, randomized trial. *Eur Heart J* 2000; 21:1537-1546.
- 218- Stilli D, Aimi B, Sgoifo A, Ciarlini P, Regoliosi G, Lagrasta C, et al. Dependence of temporal variability of ventricular recovery on myocardial fibrosis. Role of mechanoelectric feedback? *Cardiovasc Res* 1998; 37:58-65.
- 219- Naka M, Shiotani I, Koretsune Y, Imai K, Akamatsu Y, Hishida E, et al. Occurrence of sustained increase in QT dispersion following exercise in patients with residual myocardial ischemia after healing of anterior wall myocardial infarction. *Am J Cardiol* 1997; 15; 80:1528-1531.
- 220- Ulgen MS, Akdemir O, Toprak N. The effects of trimetazidine on heart rate variability and signal-averaged electrocardiography in early period of acute myocardial infarction. *Int J Cardiol* 2001; 77:255-262.
- 221- Kountouris E, Pappa E, Pappas K, Dimitroula V, Karanikis P, Tzimas T, et al. Metabolic management of coronary heart disease: adjunctive treatment with trimetazidine decreases QT dispersion in patients with a first acute myocardial infarction. *Cardiovasc Drugs Ther* 2001; 15:315-321.
- 222- Sellier P, Audouin P, Payen B, Corona P, Duong TC, Ourbak P. Acute effects of trimetazidine evaluated by exercise testing. *Eur J Clin Pharmacol* 1987; 33:205-207.
- 223- Dalla-Volta S, Maraglino G, Della-Valentina P, Viena P, Desideri A. Comparison of trimetazidine with nifedipine in effort angina: a double-blind, crossover study. *Cardiovasc Drugs Ther* 1990; 4:853-859.
- 224- Detry JM, Sellier P, Pennaforte S, Cokkinos D, Dargie H, Mathes P. Trimetazidine: a new concept in the treatment of angina. Comparison with propranolol in patients with stable angina. Trimetazidine European Multicenter Study Group. *Br J Clin Pharmacol* 1994; 37:279-288.
- 225- Lu C, Dabrowski P, Fragasso G, Chierchia SL. Effects of trimetazidine on ischemic left ventricular dysfunction in patients with coronary artery disease. *Am J Cardiol* 1998; 1; 82:898-901.

- 226- Manchanda SC, Krishnaswami S. Combination treatment with trimetazidine and diltiazem in stable angina pectoris. *Heart* 1997; 78:353-357.
- 227- Fragasso G, Piatti PM, Monti L, Pallosi A, Lu C, Valsecchi G, et al. Acute effects of heparin administration on the ischemic threshold of patients with coronary artery disease: evaluation of the protective role of the metabolic modulator trimetazidine. *J Am Coll Cardiol* 2002; 6; 39:413-419.
- 228- Minners J, van den Bos EJ, Yellon DM, Schwalb H, Opie LH, Sack MN. Dinitrophenol, cyclosporin A, and trimetazidine modulate preconditioning in the isolated rat heart: support for a mitochondrial role in cardioprotection. *Cardiovasc Res* 2000; 47:68-73.
- 229- Schultz JJ, Hsu AK, Gross GJ. Ischemic preconditioning and morphine-induced cardioprotection involve the delta (delta)-opioid receptor in the intact rat heart. *J Mol Cell Cardiol* 1997; 29:2187-2195.
- 230- Campo GM, Squadrito F, Campo S, Altavilla D, Quartarone C, Ceccarelli S, et al. Beneficial effect of raxofelast, an hydrophilic vitamin E analogue, in the rat heart after ischemia and reperfusion injury. *J Mol Cell Cardiol* 1998; 30:1493-1503.
- 231- Carbonin P, Di Gennaro M, Valle R, Beranbei R, Habed A. Intracellular calcium and electrogram in ischemic isolated rat heart. *Am J Physiol* 1980; 239:H380-H390.
- 232- Komori S, Ishii M, Hashimoto K. Antiarrhythmic effects of coronary vasodilators on canine ventricular arrhythmia models. *Jpn J Pharmacol* 1985; 38:73-82.
- 233- Iskit AB, Guc MO. Thimerosal attenuates ischaemia-reperfusion arrhythmias in rats: no modification by anti-ischaemic agent trimetazidine or endothelin receptor antagonist bosentan. *Pharmacol Res* 1996; 34:17-23.
- 234- Yamaguchi F, Nasa Y, Yabe K, Ohba S, Hashizume Y, Ohaku H, et al. Activation of cardiac muscarinic receptor and ischemic preconditioning effects in in situ rat heart. *Heart Vessels* 1997; 12:74-83.
- 235- Walker MJ, Curtis MJ, Hearse DJ, Campbell RW, Janse MJ, Yellon DM, et al. The Lambeth Conventions: guidelines for the study of arrhythmias in ischaemia infarction, and reperfusion. *Cardiovasc Res* 1988; 22:447-455.

- 236- Demiryurek AT, Yildiz G, Esiyok S, Altug S. Protective effects of poly (ADP-ribose) synthase inhibitors on digoxin-induced cardiotoxicity in guinea-pig isolated hearts. *Pharmacol Res* 2002; 45:189-194.
- 237- Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 1979; 95:351-358.
- 238- Jentsch AM, Bachmann H, Furst P, Biesalski HK. Improved analysis of malondialdehyde in human body fluids. *Free Radic Biol Med* 1996; 20:251-256.
- 239- Noble MI, Belcher PR, Drake-Holland AJ. Limitation of infarct size by trimetazidine in the rabbit. *Am J Cardiol* 1995; 24; 76:41B-44B.
- 240- Lavanchy N, Martin J, Rossi A. Anti-ischemic effects of trimetazidine: <sup>31</sup>P-NMR spectroscopy in the isolated rat heart. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 1987; 286:97-110.
- 241- Kay L, Finelli C, Aussedat J, Guarnieri C, Rossi A. Improvement of long-term preservation of the isolated arrested rat heart by trimetazidine: effects on the energy state and mitochondrial function. *Am J Cardiol* 1995; 24; 76:45B-49B.
- 242- Murnaghan MF. Effect of fatty acids on the ventricular arrhythmia threshold in the isolated heart of the rabbit. *Br J Pharmacol* 1981; 73:909-915.
- 243- Rowe MJ, Neilson JM, Oliver MF. Control of ventricular arrhythmias during myocardial infarction by antilipolytic treatment using a nicotinic-acid analogue. *Lancet* 1975; 8; 1:295-300.
- 244- Russell DC, Oliver MF. Effect of antilipolytic therapy on ST segment elevation during myocardial ischaemia in man. *Br Heart J* 1978; 40:117-123.
- 245- Oliver MF, Opie LH. Effects of glucose and fatty acids on myocardial ischaemia and arrhythmias. *Lancet* 1994; 15; 343:155-158.
- 246- Libersa C, Honore E, Adamantidis M, Rouet E, Dupuis B. Antiischemic effect of trimetazidine: enzymatic and electric response in a model of in-vitro myocardial ischemia. *Cardiovasc Drugs Ther* 1990; 4:808-809.

- 247- d'Alche P, Clauser P, Morel M, Gauthier V. Assessment with potential mapping of the cardiac protective effect of a drug. Example of trimetazidine. *J Pharmacol Methods* 1991; 26:43-51.
- 248- Aussedat J, Ray A, Kay L, Verdys M, Harpey C, Rossi A. Improvement of long-term preservation of isolated arrested rat heart: beneficial effect of the antiischemic agent trimetazidine. *J Cardiovasc Pharmacol* 1993; 21:128-135.
- 249- Veitch K, Maisin L, Hue L. Trimetazidine effects on the damage to mitochondrial functions caused by ischemia and reperfusion. *Am J Cardiol* 1995; 24; 76:25B-30B.
- 250- Renaud JF. Internal pH, Na<sup>+</sup>, and Ca<sup>2+</sup> regulation by trimetazidine during cardiac cell acidosis. *Cardiovasc Drugs Ther* 1988; 1:677-686.
- 251- Lagadic-Gossmann D, Le Prigent K, Feuvray D. Effects of trimetazidine on pHi regulation in the rat isolated ventricular myocyte. *Br J Pharmacol* 1996; 117:831-838.
- 252- Guarnieri C, Muscari C. Beneficial effects of trimetazidine on mitochondrial function and superoxide production in the cardiac muscle. *Cardiovasc Drugs Ther* 1990; 4:814-815.
- 253- Devynck MA, Le Quan Sang KH, Joulin Y, Mazeaud M. Acute membrane effects of trimetazidine in human platelets. *Eur J Pharmacol* 1993; 15; 245:105-110.
- 254- Fantini E, Athias P, Demaison L, Grynberg A. Protective effects of trimetazidine on hypoxic cardiac myocytes from the rat. *Fundam Clin Pharmacol* 1997; 11:427-439.
- 255- Kantor PF, Lucien A, Kozak R, Lopaschuk GD. The antianginal drug trimetazidine shifts cardiac energy metabolism from fatty acid oxidation to glucose oxidation by inhibiting mitochondrial long-chain 3-ketoacyl coenzyme A thiolase. *Circ Res* 2000; 17; 86:580-588.
- 256- Coetzee WA, Enous R, Opie LH. Trimetazidine: effects on delayed afterdepolarizations (DADs) and upstroke velocity of the action potential. *Cardiovasc Drugs Ther* 1990; 4:806-807.
- 257- Kennedy JA, Horowitz JD. Effect of trimetazidine on carnitine palmitoyltransferase-1 in the rat heart. *Cardiovasc Drugs Ther* 1998; 12:359-363.

- 258- Monteiro P, Oliveira PJ, Goncalves LM, Providencia LA. Trimetazidine-mediated cardioprotection during ischemia is mediated by mitochondrial respiratory chain's complex I activity. *J Am Coll Cardiol* 2003; 41:373.
- 259- Morin D, Elimadi A, Sapena R, Crevat A, Carrupt PA, Testa B, et al. Evidence for the existence of [3H]-trimetazidine binding sites involved in the regulation of the mitochondrial permeability transition pore. *Br J Pharmacol* 1998; 123:1385-1394.
- 260- Broekemeier KM, Dempsey ME, Pfeiffer DR. Cyclosporin A is a potent inhibitor of the inner membrane permeability transition in liver mitochondria. *J Biol Chem* 1989; 15; 264:7826-7830.
- 261- Hausenloy DJ, Maddock HL, Baxter GF, Yellon DM. Inhibiting mitochondrial permeability transition pore opening: a new paradigm for myocardial preconditioning? *Cardiovasc Res* 2002; 15; 55:534-543.
- 262- Yellon DM, Downey JM. Preconditioning the myocardium: from cellular physiology to clinical cardiology. *Physiol Rev* 2003; 83:1113-1151.
- 263- Plemper van Balen G, Carrupt PA, Morin D, Tillement JP, Le Ridant A, Testa B. Recognition forces involved in mitochondrial binding to a low-affinity trimetazidine binding site related to anti-ischemic activity. *Biochem Pharmacol* 2002; 1; 63:1691-1697.
- 264- Morin D, Sapena R, Elimadi A, Testa B, Labidalle S, Le Ridant A, Tillement JP. [(3)H]-trimetazidine mitochondrial binding sites: regulation by cations, effect of trimetazidine derivatives and other agents and interaction with an endogenous substance. *Br J Pharmacol* 2000; 130:655-663.
- 265- Nakai Y, Horimoto H, Mieno S, Sasaki S. Na(+)/H(+) exchanger inhibitor HOE642 offers myoprotection in senescent myocardium independent of ischemic preconditioning mechanisms. *Eur Surg Res* 2002; 34:244-250.
- 266- Mair J, Dienstl F, Puschendorf B. Cardiac troponin T in the diagnosis of myocardial injury. *Crit Rev Clin Lab Sci* 1992; 29:31-57.
- 267- Fabiani JN, Ponzio O, Emerit I, Massonet-Castel S, Paris M, Chevalier P, et al. Cardioprotective effect of trimetazidine during coronary artery graft surgery. *J Cardiovasc Surg (Torino)* 1992; 33:486-491.

- 268- Tunerir B, Colak O, Alatas O, Besogul Y, Kural T, Aslan R. Measurement of troponin T to detect cardioprotective effect of trimetazidine during coronary artery bypass grafting. *Ann Thorac Surg* 1999; 68:2173-2176.
- 269- Tselepis A, Doulias P, Lourida E, Glantzounis G, Tsimoyiannis E, Galaris D. Trimetazidine protects low-density lipoproteins from oxidation and cultured cells exposed to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> from DNA damage. *Free Radic Biol Med* 2001; 30:1357-1364.
- 270- Tetik C, Ozden A, Calli N, Bilgihan A, Bostanci B, Yis O, et al. Cytoprotective effect of trimetazidine on 60 minutes of intestinal ischemia-reperfusion injury in rats. *Transpl Int* 1999; 12:108-112.
- 271- Guarnieri C, Finelli C, Zini M, Muscari C. Effects of trimetazidine on the calcium transport and oxidative phosphorylation of isolated rat heart mitochondria. *Basic Res Cardiol* 1997; 92:90-95.
- 272- Schultz JE, Qian YZ, Gross GJ, Kukreja RC. The ischemia-selective KATP channel antagonist, 5-hydroxydecanoate, blocks ischemic preconditioning in the rat heart. *J Mol Cell Cardiol* 1997; 29:1055-1060.
- 273- Birand A, Kudaiberdieva GZ, Batyraliev TA, Akgul F, Usal A. Effects of trimetazidine on heart rate variability and left ventricular systolic performance in patients with coronary artery disease after percutaneous transluminal angioplasty. *Angiology* 1997; 48:413-422.